

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390069
 研究課題名（和文） 転写因子 NF-E2 による巨核球分化と血小板形成の制御機構の解明
 研究課題名（英文） Functional roles of transcription factor NF-E2 in megakaryocytic differentiation and platelet production
 研究代表者
 本橋 ほづみ (MOTOHASHI HOZUMI)
 東北大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：00282351

研究成果の概要：NF-E2 は、巨核球の終末分化と血小板産生に必須の転写活性化因子である。本研究において、NF-E2 が、血小板の機能に関わる因子群を統一的に制御することを明らかにした。また、NF-E2 は、酸化ストレス応答を誘導する転写因子 Nrf2 に対して競合的に作用することにより、巨核球内の活性酸素の蓄積を促進し、巨核球分化を促進することを見いだした。本研究の成果は、巨核球の分化・成熟の体内環境が、産生される血小板の活性化能に影響を与える可能性を示唆するものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：生化学・分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：転写因子、巨核球、血小板、細胞分化、胞体突起形成

1. 研究開始当初の背景

p45 と小 Maf 群因子は、NF-E2 と呼ばれるヘテロ 2 量体を形成し、Maf 群認識配列(Maf recognition element; MARE)を介して転写を活性化し、巨核球の最終分化と血小板形成に必須の機能を果たしている。申請者は、これまで、小 Maf 群因子欠損マウス(mafG^{-/-}マウス)と小 Maf 群因子過剰発現トランスジェニックマウス(MafG TG マウス)を組み合わせたトランスジェニック相補レスキュー法を用いることにより、これまで培養細胞への一過性過剰発現実験では検出できなかった小 Maf 群因子のカルボキシル末端(C 末端)領域の機能貢献

を明らかにした。

一方、巨核球においてNF-E2の下流で制御されている遺伝子を明らかにするために、マイクロアレイ法を用いてp45欠損マウス由来の巨核球のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、p45欠損巨核球では、血小板関連因子の発現が著減する一方で、親電子性物質・酸化ストレス応答遺伝子群の発現が上昇することが明らかになった。巨核球分化は、酸素分圧や酸化ストレスにより影響されることが知られている。このことから、p45が、巨核球の分化・成熟に機

能すると同時に、その酸化ストレス応答にも関わることが予想された。

2. 研究の目的

本研究では、NF-E2 の転写活性化機構の解明と巨核球分化におけるその意義について明らかにすることを目的とした。以下の3つの観点からアプローチを試みた。

(1) NF-E2 の機能を支える小 Maf 群因子の C 末端領域に結合する因子を明らかにする。

(2) p45 の転写活性化ドメインの構造活性連関を調べ、転写活性化機構を明らかにする。

(3) 活性酸素種の蓄積とそれに対する応答反応における p45 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 小 Maf 群因子 C 末端領域は、核マトリックス移行シグナルとして機能することを見いだしている。そこで、核の不溶画分を調整し、架橋剤によりクロスリンクをかけ、そこから、小 Maf 群因子を含む複合体を精製することを試みた。

(2) p45 のアミノ末端領域に転写活性化ドメインが存在することが報告されている。そこで、N 末端領域 38 アミノ酸を欠失させた p45 Δ 1-38 を巨核球において発現するトランスジェニックマウスを作成した。このマウスを、p45 遺伝子欠損マウスと交配して得られる複合変異マウスを解析することにより、p45 の機能における N 末端領域 38 アミノ酸の必要性を検討した。

また、巨核球系培養細胞 MEG01 に、Flag-HA-2 重タグを付加した p45 を安定に発現させて、抗 Flag 抗体、抗 HA 抗体による連続免疫沈降により、p45 転写複合体の精製を試みた。

(3) p45 欠損マウスにおける細胞内活性酸素種の減少と、抗酸化ストレス応答蛋白質遺伝子の発現上昇が、転写因子 Nrf2 の機能に依存するかどうかを明らかにするために、p45:Nrf2 2 重欠損マウスを作成して解析した。また、p45 と Nrf2 が競合することを、レポーターアッセイ、巨核球を用いたクロマチン免疫沈降により検討した。

4. 研究成果

(1) Ni-NTA ビーズと親和性が高い His₁₂-タグを小 Maf 群因子 MafG の N 末端に付加することにより、不溶画分を可溶化するために使用する 8M 尿素の条件下でも収量が比較的多いアフィニティー精製が可能となった。しかし、これだけでは非特異的な結合が目立ったため、変性させた蛋白質をリフォールディング後さらに抗 HA タグ抗体を用いて免疫沈降させることにより、特異性を向上させることに成功した。現在、HA-His₁₂-MafG を安定に発現する MEG01 細胞を樹立し、大量培

養から核不溶画分を調整して、クロスリンク後 MafG を含む複合体を精製しつつある。

(2) 野生型 p45 を発現する p45 遺伝子欠損マウス(p45^{-/-}:Tgp^{p45} マウス)はほぼ正常であり、p45 遺伝子欠損マウスにみとめられる血小板減少、出血傾向、脾腫、巨核球胞体突起形成障害などの異常はすべて認められない。一方、p45 Δ 1-38 を発現する p45 遺伝子欠損マウス(p45^{-/-}:Tgp^{p45 Δ 1-38} マウス)は、p45 遺伝子欠損マウスとほぼ同様の表現をしめすことがわかった。これは、p45 がその機能を果たす上で N 末端の 38 アミノ酸が必須であることを示している。

MEG01 に発現させた Flag-HA 2 重タグを有する p45 を含む転写複合体を精製し、質量分析にかけたところ、クロマチンリモデリング因子、DNA 修復因子、細胞骨格系因子などが同定された。現在、その確認をとりつつ、機能的重要性の検討を行うための実験系を構築中である。

(3) p45:Nrf2 2 重欠損マウスでは、p45 単独欠損マウスでみとめたような、細胞内活性酸素種の増加はなく、また、酸化ストレス応答遺伝子群の発現上昇も認められなかった。また、一過性過剰発現によるレポーターアッセイでは、p45 と Nrf2 が競合することが観察され、野生型マウスの巨核球では、p45 が結合して転写を活性化している遺伝子に、p45 欠損マウスの巨核球では、Nrf2 が結合していることが明らかになった。これらの結果から、巨核球の分化にしたがい、p45 と Nrf2 の競合がおこり、p45 の作用により、酸化ストレス応答遺伝子の発現が抑制され、細胞内の活性酸素種レベルが上昇し、その結果、巨核球の終末分化が促進されると考えられた。

以上のように、巨核球が酸化ストレスに曝されることがその終末分化を促進するという結果は、酸化ストレスの付加が増大していると考えられる糖尿病などの代謝疾患の際、血小板の産生亢進と、活性化亢進がおこる理由の一つになる可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① 本橋ほづみ、巨核球分化過程におけるストレス応答とその調節機構。
生化学 印刷中。
査読あり
- ② Yamamoto, T., Suzuki, T., Kobayashi, A., Wakabayashi, J., Maher, J., Motohashi, H., and Yamamoto, M. Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity.

- Mol. Cell. Biol.** 28, 2758-2770, 2008.
査読あり
- ③ Suzuki, T., Kelly, V. P., **Motohashi, H.**, Nakajima, O., Takahashi, S., Nishimura, S., and Yamamoto, M. Deletion of selenocysteine tRNA gene in macrophage and liver results in compensatory gene induction of cytoprotective enzymes by Nrf2.
J. Biol. Chem. 283, 2021-2030, 2008.
査読あり
- ④ Hosoya, T., Harada, N., Mimura, J., **Motohashi, H.**, Takahashi, S., Nakajima, O., Motita, M., Kawauchi, S., Yamamoto, M., and Fujii-Kuriyama, Y. Inducibility of cytochrome P450 1A1 and chemical carcinogenesis by benzo[a]pyrene in AhR repressor-deficient mice.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 365, 562-567, 2008.
査読あり
- ⑤ Zhang, J., Hosoya, T., Maruyama, A., Nishikawa K., Maher, J.M., Ohta, T., **Motohashi, H.**, Fukamizu, A., Shibahara, S., Itoh, K. and Yamamoto, M. Nrf2 Neh5 domain is differentially utilized in the transactivation of cytoprotective genes.
Biochem. J. 404, 459-466, 2007.
査読あり
- ⑥ Kimura, M., Yamamoto, T., Zhang, J., Itoh, K., Kyo, M., Kamiya, T., Aburatani, H., Katsuoka, F., Kurokawa, H., Tanaka, T., **Motohashi, H.***, and Yamamoto, M. Molecular basis distinguishing the DNA binding profile of NRF2-MAF heterodimer from that of MAF homodimer.
J. Biol. Chem. 282, 33681-33690, 2007.
(* corresponding author)
査読あり
- ⑦ **Motohashi, H.**, and Yamamoto, M. Carcinogenesis and transcriptional regulation through Maf recognition elements.
Cancer Sci. 98, 135-139, 2007.
査読あり
- ⑧ 本橋ほづみ. 血小板形成を支える転写制御機構と血小板異常症.
実験医学 25, 1618-1623, 2007.
査読なし
- [学会発表] (計 26 件)
- ① **Motohashi, H.**, Takayama, M., Fujita, R., Katsuoka, F., Suzuki, M. and Yamamoto, M. Gata1 gene hematopoietic regulatory domain directs functionally sufficient expression of NF-E2 p45 in megakaryocytes. Gordon Research Conference on Cell Biology of Megakaryocytes & Platelets. Galveston, Texas. 15-20 March, 2009.
- ② Takayama, M., **Motohashi, H.**, Ikura, T., Igarashi, K. and Yamamoto, M. NF-E2 p45 N-terminal region is essential for transactivation mediating terminal differentiation of megakaryocytes. Molecular mechanism of environmental response to food and oxygen III. Gonryo-kaikan in Tohoku University, Sendai, Japan. 9-11 February, 2009.
- ③ Fujita, R., Takayama, M., **Motohashi, H.** and Yamamoto, M. Gata1 hematopoietic regulatory domain directs sufficient expression of NF-E2 p45 in megakaryocytes. Molecular mechanism of environmental response to food and oxygen III. Gonryo-kaikan in Tohoku University, Sendai, Japan. 9-11 February, 2009.
- ④ 本橋ほづみ, 高山昌理子, 藤田理恵, 勝岡史城, 山本雅之. 巨核球分化と転写因子 NF-E2 による酸化ストレス蓄積プログラム. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会. 神戸ポートアイランド. 2008. 12.9-12.
- ⑤ 高山昌理子, 井倉毅, 五十嵐和彦, 山本雅之, 本橋ほづみ. 巨核球における転写因子 NF-E2 p45 の転写調節機構. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会. 神戸ポートアイランド. 2008. 12.9-12.
- ⑥ 藤田理恵, 高山昌理子, 本橋ほづみ, 山本雅之. NF-E2 p45 欠失マウスの巨核球系のトランスジェニックレスキュー解析. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会. 神戸ポートアイランド. 2008. 12.9-12.
- ⑦ 澤智裕, 藤井重元, 入江厚, 岡本竜哉, 居原秀, 本橋ほづみ, 山本雅之, 赤池孝章. S-Guanylation proteomics: NOと活性酸素に依存したユニークなチオール基翻訳後修飾. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会. 神戸ポートアイランド.

- ド. 2008. 12.9-12.
- ⑧ 藤井重元, 澤智裕, 岡本竜哉, 居原秀, **本橋ほづみ**, 山本雅之, 赤池孝章. 新規環状ヌクレオチド 8-ニトログアノシン 3',5'-環状 1 リン酸による転写制御因子 Keap1 の S-グアニル化とその酸化ストレス応答における役割. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会. 神戸ポートアイランド. 2008. 12.9-12.
- ⑨ 勝岡史城, 中山博未, **本橋ほづみ**, 山本雅之. 小Maf群因子 3 重欠損細胞レスキュー系の確立と同系を用いた小Maf群因子の機能解析. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会. 神戸ポートアイランド. 2008. 12.9-12.
- ⑩ 鈴木伸幸, 小野栄夫, 北沢博, **本橋ほづみ**, 原田彰宏, 秋山弘匡, 内田隆史. 血小板分化におけるプロリン異性化控訴 Pin1 の機能解析. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会. 神戸ポートアイランド. 2008. 12.9-12.
- ⑪ 澤智裕, 藤井重元, 入江厚, 岡本竜哉, **本橋ほづみ**, 山本雅之, 赤池孝章. NO 依存的なニトロ化ヌクレオチド、8-ニトログアノシン 3', 5'-環状 1 リン酸の精製を介した Keap1 チオール基の修飾. 第 67 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 2008.10.28-30.
- ⑫ **Motohashi, H.**, Takayama, M., Fujita, R., Katsuoka, F., and Yamamoto, M. NF-E2 enhances accumulation of reactive oxygen species and promotes megakaryocytic terminal differentiation. 16th Conference on Hemoglobin Switching, Asilomar Conference Center, Monterey, California, October 11-14, 2008.
- ⑬ Fujii, S., Sawa, T., Okamoto, T., Ihara, H., **Motohashi, H.**, Yamamoto, M., and Akaike, T. Physiological role of Keap1 S-guanylation by 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate formed in C6 glioma cells. Fifth International Conference Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. Festspielhaus Bregenz, Austria, August 24 - 28, 2008.
- ⑭ Sawa, T., Fujii, S., Irie, A., Okamoto, T., **Motohashi, H.**, Yamamoto, M., and Akaike, T. Nitric oxide-dependent sulfhydryl modification of Keap1 by 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. Fifth International Conference Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. Festspielhaus Bregenz, Austria, August 24 - 28, 2008.
- ⑮ Kurokawa, H., Sueno, S., Kimura, M., **Motohashi, H.**, Yamamoto, M., and Tanaka, T. Crystal structure of MafG in complex with iys cognate DNA. The 21st Naito conference on Nuclear Dynamics and RNA [I], Yatsugatake, June 24-27, 2008.
- ⑯ Maher, J., Suzuki, T., Taguchi, K., Kawatani, Y., **Motohashi, H.**, Ishii, Y., Yamamoto, M. Clara-cell specific *keap1* conditional knockout mice have strong Nrf2 activation but are sensitive to bleomycin-induced lung injury. The 2nd JST-ERATO Environmental Response Project International Symposium on "The Environmental Response" in Tsukuba, Japan, December 21-22, 2007.
- ⑰ Katsuoka, F., Nakayama, H., **Motohashi, H.**, and Yamamoto, M. Small Maf proteins are required for the stable nuclear localization of Nrf2. The 2nd JST-ERATO Environmental Response Project International Symposium on "The Environmental Response" in Tsukuba, Japan, December 21-22, 2007.
- ⑱ Kimura, M., Yamamoto, T., Zhang, J., Itoh, K., Katsuoka, F., Tanaka, T., **Motohashi, H.**, and Yamamoto, M. Molecular basis distinguishing the DNA binding profile of NRF2-MAF heterodimer from that of MAF homodimer. The 2nd JST-ERATO Environmental Response Project International Symposium on "The Environmental Response" in Tsukuba, Japan, December 21-22, 2007.
- ⑲ Suzuki, T., Yamamoto, T., Kobayashi, A., Wakabayashi, J., Maher, J., **Motohashi, H.**, and Yamamoto, M. Deciphering key reactive cysteines that determine Nrf2 activation in vivo. The 2nd JST-ERATO Environmental Response Project International Symposium on "The Environmental Response" in Tsukuba, Japan, December 21-22, 2007.
- ⑳ Mukai, H.Y., Kono, T., Motohashi, H., Kojima, H., and Yamamoto, M. c-Myb regulates CD9 gene expression during megakaryopoiesis. 49th ASH Annual Meeting and Exposition. Atlanta, Georgia, USA, December 8-11, 2007 (Blood 110, 376a)
- ㉑ 木村桃子, 山本雅之, **本橋ほづみ**. Maf認

識配列に依存する転写制御の巨核球分化に対する貢献。第30回日本分子生物学会年会・第80回に本生化学会大会。パシフィコ横浜。2007.12.11-15.

㉒ 本橋ほづみ, 木村桃子, 京基樹, 伊東健, 勝岡史城, 山本雅之. Mafホモ2量体とMaf-CNCヘテロ2量体によるDNA認識様式の違いの分子基盤とその生物学的重要性の検討。第30回日本分子生物学会年会・第80回に本生化学会大会。パシフィコ横浜。2007.12.11-15.

㉓ 勝岡史城, 中山博未, 本橋ほづみ, 山本雅之. Nrf2の核安定局在化における小Maf群因子の重要性の検討。第30回日本分子生物学会年会・第80回に本生化学会大会。パシフィコ横浜。2007.12.11-15.

㉔ Maher, J., Suzuki, T., Taguchi, K., Kawatani, Y., **Motohashi, H.**, Ishii, Y., Yamamoto, M. Clara-cell specific *keap1* conditional knockout mice have strong Nrf2 activation but are sensitive to bleomycin-induced lung injury. 8th International ISSX meeting, Sendai, October 9-12, 2007.

㉕ 向井陽美, 本橋ほづみ, 長澤俊郎, 山本雅之. 転写因子c-mybによる巨核球造血制御。第5回幹細胞シンポジウム。淡路島。2007. 5.17-19.

㉖ Mukai, H.Y., **Motohashi, H.**, Nagasawa, T., and Yamamoto, M. The critical function of c-myb and its related genes on megakaryopoiesis. Gordon Research Conference on Cell Biology of Megakaryocytes and Platelets. Ventura, CA, USA, March 4-8, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本橋 ほづみ (MOTOHASHI HOZUMI)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00282351

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者

なし