

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間： 2008～2009
 課題番号：20790683
 研究課題名 (和文) 血液細胞分化マスターレギュレーター：PU.1 の遺伝子発現調節機序の
 解明
 研究課題名 (英文) Transcriptional regulation of PU.1, which is a master regulator of
 hematopoietic cell differentiation
 研究代表者
 鈴木光浩 (SUZUKI MITSUHIRO)
 産業医科大学・医学部・講師
 研究者番号：00321662

研究成果の概要 (和文)：転写因子 PU.1 は造血幹細胞から各種血液細胞への分化進行決定に重要な役割を果たしており、その標的遺伝子の発現調節機構は PU.1 と他の転写因子・転写共役因子とのクロストークおよび PU.1 自身の修飾により制御されている。本研究ではさらに詳細な PU.1 による転写調節機構の選択性について解明を目指し、PU.1 自身の修飾有無および部位の同定を行いアセチル化、リン酸化修飾により PU.1 の標的遺伝子の転写活性に影響を与える結果を得た。

研究成果の概要 (英文)：Transcription factor PU.1 is a hematopoietic master regulator and essential for the development of myeloid and B-cell lineages. PU.1 functions in concert with other transcription factors and cofactors. As we shown previously represented, PU.1 interact with both p300/cbp, which function as a coactivator and HDAC, which function as a corepressor. In this study, to determine whether modification of PU.1 is responsible for switching its association between coactivator and corepressor, we examined whether acetylation regulates the physical and functional activities of PU.1. We found that PU.1 was acetylated in vivo and its repressor activity was reduced when the putative acetylation motif in ETS domain were mutated. Our data suggest that acetylation might regulate the biological functions in erythroid cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：血球細胞、発生・分化、転写調節、タンパク質修飾

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞からリンパ球系および骨髄単球系の種々の細胞への分化にはそれぞれにマスター遺伝子と呼ばれる転写因子の関与が明らかとなっている。PU.1 はその中でも B 細胞と顆粒球・マクロファージ細胞への分化に必須な転写因子である。PU.1 は転写共役因子（コアクティベーター）、CBP/p300 と相互作用し転写を「正」に、また転写共役制御因子（コリプレッサー）Sin3A と相互作用し HDAC1 と共に複合体の形成により転写を「負」に制御するという相反機能を有していることをこれまで我々のグループが示してきた。加えて、PU.1 は Sin3A との結合に先立ちメチル化 DNA 結合タンパク質の MeCP2 と結合し両者の結合が Sin3A/HDAC 複合体のリクルート機能を持ち、さらに DNA メチル基転移酵素 Dnmt3a/b との直接的な相互作用により PU.1 の標的遺伝子である *p16* 遺伝子プロモーター領域の CpG 配列のメチル化に寄与し転写抑制に働くことも明らかにしてきた。これらの結果は PU.1 の正・負の転写調節活性は PU.1 が古典的な他の転写因子タンパク質との相互作用による転写調節機構を有しているだけでなくエピジェネティックな転写調節に積極的な関与を行っていることを示す新しい知見となっている。

2. 研究の目的

上述の研究背景・成果により、PU.1 の標的遺伝子群には昂進：「正」または抑制：「負」に調節されるものに分かれ、その調節機構は PU.1 と結合する他の転写因子と転写共役因子群によりジェネティック・エピジェネティック両機構にて変化すると考えられる。しかしながら PU.1 と転写共役因子群とのクロストークの選択のメカニズムについてその全容が解明されたワケではなく、むしろ多数の転写因子、転写共役因子間のクロストークと種々の標的遺伝子に対する転写調節機構についての研究報告がなされたことで PU.1 自身も持つ本質的な機能とその詳細は不明の状態である。本研究では PU.1 による血液細胞の調節機構の解明を目指し、次の点を重点的に研究する。

3. 研究の方法

PU.1 は自身の ETS ドメインに多くの他の転写因子との結合領域とリン酸化・アセチル化被修飾領域を有している。これまでに PU.1 の 3 カ所の被アセチル化部位のリジンをアルギニンへ個別または全て置換した変異体において co-activator (CBP/p300) や co-repressor (mSin3A-HDAC1) 転写共役因子群との複合体形成に変化が起ることを示唆する実験結果を得ている（論文投稿準備中）。しかし他の被アセチル化・被リン酸化部位での解析については不明な点が多く残されている。最近、他の研究グループより PU.1 が Co-repressor, Ski が結合し HDAC3 を含む転写抑制機序が働いていることを示唆する結果が報告されている。しかしながら、依然、co-activator, co-repressor 複合体形成への PU.1 選択性を示す結果を報告している研究は存在していない。本研究では以下の解析を行いさらに詳細な PU.1 による転写調節機構の選択性について解明を目指す。

さらに、マウスより純化した血液幹細胞から骨髄単球系細胞・B 細胞への各種分化マーカー遺伝子の発現調節とそれらプロモーター領域におけるクロマチン構造の変化（アセチル化・メチル化修飾）の相関性について確認する。

4. 研究成果

具体的な方法として以下の解析を行った。

- 造血幹細胞から骨髄単球系細胞・B 細胞への分化における PU.1 の修飾状態と転写共役因子群との結合の関連性の解析、修飾調節をしているシグナル伝達経路の同定を行なった。
- PU.1 と結合し相互作用する新規因子の同定を行なった。
- マウス骨髄細胞より造血幹細胞を純化し各分化進行段階において PU.1 の質的・量的な変化が標的遺伝子の転写調節領域のヒストンのアセチル化状態・CpG 領域のメチル化状態にどのような変化を与えるのか

を個々に解析することでより高次の転写調節機構の知見を得る。

a-c の解析の結果、208,244a.a.のリジン残基のアセチル化と 132, 133a.a.に存在するセリン残基のリン酸化が PU.1 標的遺伝子、*m-csfr*, *IL7R* 遺伝子の発現昂進に、245-249a.a.のリジン残基のアセチル化と 245a.a.のリン酸化が *m-csfr*, *p16* 遺伝子の転写抑制に寄与していること、さらに、208a.a.のリジン残基が PU.1 の DNA 結合能に寄与していることを明らかとした。

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3件)

① Toshiyuki Yamada, Takeshi Shimizu, Takuya Sakurai, Fumiko Kihara-Negishi, Mitsuhiro Suzuki, Naoki Nanashima, Yang Fan, Miki Akita, Tsuneyuki Oikawa and Shigeki Tsuchida. Physical and functional interactions between hematopoietic cell-specific ETS transcription factors and homeodomain proteins. *Leukemia Res.* **33**:483-9, 2009 査読・有

② Naoyuki Makita, Mitsuhiro Suzuki, Shiori Asami, Rintaroh Takahata, Daika Kohzaki, Sho Kobayashi Takashi Hakamazuka and Nobumichi Hozumi. Two of four alternatively spliced isoforms of RUNX2 control osteocalcin gene expression in human osteoblast cells. *Gene* **413**: 8-17, 2008 (correspondence author) 査読・有

③ Toshiyuki Yamada, Takeshi Shimizu, Mitsuhiro Suzuki, Fumiko Kihara-Negishi, Naoki Nanashima, Takuya Sakurai, Yang Fan, Miki Akita, Tsuneyuki Oikawa and Shigeki Tsuchida. Interaction between the homeodomain protein HOXC13 and ETS family transcription factor PU.1 and its implication in the differentiation of murine erythroleukemia cells. *Exp. Cell Res.* **314**: 847-858, 2008 査読・有

[学会発表] (計7件)

① 平成20年12月10日 第31回日本分子生物学会・日本生化学会合同年会(神戸)

「造血系細胞における PU.1 の修飾部位を介した転写調節の選択性」

ポスター発表 福田弘典、鈴木光浩、山田健太、穂積信道

② 平成20年12月2日 第38回日本免疫学会総会・学術集会(京都)

「造血細胞分化における IL-7Ra 遺伝子発現のエピジェネティック制御機構の解析」

ポスター発表 山田健太、鈴木光浩、福田弘典、穂積信道

③ 平成19年12月13日 第30回日本分子生物学会年会(横浜)

「マウス胚芽の micromass culture における軟骨細胞分化と Notch との関与」

ポスター発表 小林翔、鈴木光浩、榎田直之、穂積信道

④ 平成19年12月12日 第30回日本分子生物学会年会(横浜)

「ヒト EC 細胞株、NEC14 を用いた分化誘導時における未分化マーカー及び軟骨細胞マーカー遺伝子群のエピジェネティクス発現調節機構」

ポスター発表 阿佐美志織、鈴木光浩、榎田直之、穂積信道

⑤ 平成19年12月12日 第30回日本分子生物学会年会(横浜)

「造血細胞分化における IL-7Ra 遺伝子発現のエピジェネティック制御機構の解析」

ポスター発表 山田健太、鈴木光浩、福田弘典、穂積信道

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 光浩 (SUZUKI MITSUHIRO)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号：00321662

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：