

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：13601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22501007
 研究課題名（和文） 発癌のシグナル伝達における転写因子 GATA-6 の機能的役割の研究
 研究課題名（英文） Study on functional significance of transcription factor GATA-6 during oncogenic signal transduction.
 研究代表者
 安達 喜文 (ADACHI YOSHIFUMI)
 信州大学・医学部・准教授
 研究者番号：50201893

研究成果の概要（和文）：Ras 発癌において重要な活性酸素産生遺伝子 Nox1 の発現がリン酸化された転写因子 GATA-6 と HMGB1 によってプラスに制御される分子メカニズムを解明した。GATA-6 により転写が2倍以上に促進される遺伝子 719 個と転写が 50%以上抑制される遺伝子 1161 個を明らかにした。その中、癌抑制遺伝子 TOPORS が大腸癌細胞において GATA-6 によりマイナスに転写制御される分子機構も併せて解明した。

研究成果の概要（英文）：We clarified that phosphorylation of GATA-6 and GATA-6-associated cofactor HMGB1 positively regulate the transcriptional machinery for Nox1 gene in oncogenic Ras signaling. We identified 719 genes upregulated by GATA-6 and 1161 genes downregulated by GATA-6 in colon cancer cell-line CaCo-2. We also clarified the molecular mechanism for transcriptional repression of TOPORS gene by GATA-6.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：病態生化学、分子腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：転写因子・GATA-6・シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1)我々は、Ras 発癌の細胞において活性酸素産生遺伝子 Nox1 が発現誘導され、細胞内活性酸素 (ROS) の産生が亢進することを明らかにし (Mitsushita J, Kamata T *et al. Cancer Res.* 64:3580-3585, 2004)、ROS が ERp72 を標的として癌細胞の増殖に関わること報告した (Chen W, Shang WH, Adachi Y *et al. Biochem. J.* 416:55-63, 2008)。そして、Ras 活性化が知られている大腸癌由来 CaCo-2 細胞を用い、Nox1 遺伝子発現には

Ras-Raf-MEK-ERK シグナルによる転写因子 GATA-6 の Ser120 リン酸化が必要不可欠であることを世界に先駆け明らかにした (Adachi Y *et al. Oncogene* 27:4921-4932, 2008)。しかしながら、Ras 発癌における Nox 遺伝子の転写調節機構の分子レベルでの詳細は不明のままであった。

(2)GATA ファミリーは Zn フィンガー構造をもつ転写因子群で、結合する DNA のコンセンサス配列は (A/T)GATA(A/G)である。GATA-1, 2, 3

は類似しており、血球系および神経系細胞に発現し、これら細胞の分化に関わる多くの遺伝子発現を制御する。一方、GATA-4, 5, 6 は別のサブグループを形成し、内臓内胚葉（心臓、肺、血管平滑筋、消化管、生殖器）の分化に必須であり、GATA-4, 5 については多くの標的遺伝子群が知られている。しかし、GATA-6 には Ala, Gly, His クラスターや Pro, Thr, Ser 残基に富む領域など他の GATA にはみられない特徴的な領域が存在し、転写調節の様式が進化の過程で変化している可能性が指摘されている。GATA-6 の標的遺伝子も Nox1、アクアポリン-5 を含め数種が知られるのみであった。

(3)本研究開始当時、ゲノムプロファイリング研究から、GATA-6 が大腸癌のほか膵胆管癌や卵巣癌に深く関わるということが明らかとなり (Kwei KA *et al.* *PLoS Genet.* 4:e1000081, 2008; Cai KQ *et al.* *PLoS ONE* 4:e6454, 2009)、世界の動向は GATA-6 の標的遺伝子に集まりつつあった。

2. 研究の目的

(1)本研究では、大腸癌細胞において Ras-Raf-MEK-ERK シグナルによりリン酸化された GATA-6 がどのようなメカニズムで Nox1 遺伝子を発現させるのか分子レベルでその転写調節機構を解明することを目的の1つとした。

- ①Ras-Raf-MEK-ERK シグナルにより S120 でリン酸化された GATA-6 の Nox1 プロモーターへの結合親和力について生化学的に解明すること
- ②リン酸化 GATA-6 が Nox1 プロモーター上で相互作用する他の転写因子およびクロマチンタンパク質を同定し、相互作用の分子機序を明らかにすること
- ③GATA-6 複合体におけるヒストンのアセチル化/メチル化および HDAC/HAT の活性などクロマチンレベルでの Nox1 遺伝子活性化を解明すること
- ④細胞の増殖、分化および癌化にともなう GATA-6 リン酸化の動態を明らかにすること

(2)ゲノムプロファイリング研究から、GATA-6 が大腸癌のほか膵胆管癌や卵巣癌に深く関わるということが明らかとなり、世界の動向は GATA-6 の標的遺伝子に集まりつつあったので、Nox1 遺伝子以外の発癌に関係する新規 GATA-6 標的遺伝子群を検索・同定し、Ras 発癌における機能的役割を明らかにすることを第2の目的とした。

- ①大腸癌細胞におけるリン酸化 GATA-6 が標的とする Nox1 遺伝子以外の新たな標的遺伝子群を検索・同定すること

- ②リン酸化 GATA-6 標的遺伝子群の Ras 発癌および細胞分化や増殖における機能的役割を明らかにすること

3. 研究の方法

(1)Ras-Raf-MEK-ERK シグナルにより GATA-6 の Ser120 がリン酸化され活性化している大腸癌由来の CaCo-2 細胞からクロマチン抽出液または核抽出液を調製し、抗 GATA-6 免疫共沈法/クロマチン免疫沈降法/GATA-6 アフィニティークロマトグラフィーを用いて Nox1 転写複合体中の GATA-6 と相互作用をするタンパク質を単離精製し、MALDI-TOF 質量分析とペプチドデータベース解析によりタンパク質を同定した。タンパク質間の相互作用および結合親和力はプルダウンアッセイ/in vitro 結合アッセイ/ペプチドマップ/Scatcherd-plot 法にて解析した。

(2)GATA-6 の Ser120 リン酸化による Nox1 プロモーターおよび HMGB1 への結合の影響と Nox1 プロモーター-GATA-6-HMGB1 複合体の形成様式は in vitro リン酸化/ゲルシフトアッセイ/スーパーシフトアッセイ/プルダウンアッセイを組み合わせた方法で解析をおこなった。

(3)HMGB1 の GATA-6 による Nox1 転写活性への影響は大腸癌由来 CaCo-2 細胞へ HMGB1 発現ベクター、リン酸化型 GATA-6 発現ベクターと Nox1 ルシフェラーゼリポーターを DNA トランスフェクションし、ルシフェラーゼリポーターアッセイ/Western-blot 法/RT-PCR 法/免疫染色法/フローサイトメトリーにより解析した。

(4)Ras-Raf-MEK-ERK シグナルによりリン酸化され活性化した GATA-6 の Nox1 以外の新規標的遺伝子群をクロマチン免疫沈降法を用いて検索するため、CaCo-2 細胞からクロマチンを回収し、200~1000bp (平均 600bp) に断片化後、抗 GATA-6 抗体を用いたクロマチン免疫沈降にて GATA-6 が結合したゲノム DNA 断片を単離した。サブクロニング後、DNA シークエンスを解析し、GATA-6 が標的とする新規遺伝子群を同定した。新規 GATA-6 標的遺伝子群転写制御領域内の GATA 配列の解析を併せて行った。

(5)活性型リン酸化 GATA-6 が標的とする新規遺伝子のうちこれまで解析がなされていなかった癌抑制遺伝子と考えられるトポイソメラーゼ I/p53 結合性 RING フィンガータンパク質 (TOPORS) に着目し、発癌における GATA-6 による転写制御を解析した。TOPORS 遺伝子 5' 上流-2500bp から GATA 配列を順次欠損させたプロモーター断片のシリーズを

組み込んだルシフェラーゼリポーターと-415/-389のGATA配列を含むEMSA用プローブを作製した。GATA-6によるTOPORS転写活性への影響は大腸癌由来CaCo-2細胞へリン酸化型GATA-6発現ベクター/GATA-6shRNAとTOPORSルシフェラーゼリポーターをDNAトランスフェクションし、ルシフェラーゼリポーターアッセイ/Western-blot法/RT-PCR法/ゲルシフトアッセイにより解析した。

(6)GATA-6の標的遺伝子を網羅的に探索するため、CaCo-2細胞にGATA-6 shRNA アデノウイルスまたはControl shRNA アデノウイルスを感染させ、それぞれのmRNAからCy3標識プローブを作製し、GATA-6依存性遺伝子発現促進またはGATA-6依存性遺伝子発現抑制をDNAマイクロアレイチップ(SurePrint G3 Human GE Microarray 8x60k<G4851B>, Agilent Technologies社)を用いて登録されている50683遺伝子を対象に解析した。GATA-6依存的に転写がプラスまたはマイナスに制御される遺伝子群について、転写制御領域シス配列の解析とデータベース/文献の解析を行い、GATA-6の直接的な関与を精査した。

4. 研究成果

(1)GATA-6クロマチン免疫沈降とGATA-6アフィニティークロマトグラフィーにより、GATA-6結合タンパク質としてHNF-1 α とp34を単離した。p34はそのペプチドのMALDI-TOF質量分析とデータベース検索から非ヒストンクロマチンタンパク質HMGB1であることがわかった。In vitroの結合解析より、HMGB1のアミノ酸48-56領域がGATA-6への結合部位であることを明らかにした。HMGB1のGATA-6への結合親和力Kdは25nMであった。

(2)GATA-6のSer120リン酸化はHMGB1との結合には関与せず、Nox1プロモーターのnt-161/-136とnt-125/-100への結合を40倍強めるのに必要であることを明らかにした。Nox1プロモーター上でリン酸化GATA-6はHMGB1と結合し、転写複合体を形成することを証明した。

(3)大腸癌由来CaCo-2細胞において、HMGB1はGATA-6によるNox1転写活性を2倍に増強することを明らかにした。HMGB1はNox1転写に関与するHNF-1 α とも結合することが知られており、我々の研究結果と併せ考えると、Nox1プロモーター上へRas-Raf-MEK-ERKシグナルでリン酸化されたGATA-6が結合し、リン酸化GATA-6はHMGB1を介して下流プロモーター上のHNF-1 α と連携することで転写活性をさらに増加させるというプラス制御モデルをうち立てた。

(4)大腸癌由来CaCo-2細胞からクロマチン免疫沈降とDNAクローニング法にてGATA-6標的遺伝子172クローンを得た。そのうち7クローンは癌抑制遺伝子と考えられているトポイソメラーゼI/p53結合性RINGフィンガータンパク(TOPORS)をコードする遺伝子のプロモーター領域で、GATA-6の新規標的遺伝子であった。TOPORS遺伝子5'上流-2500bpまでの領域にはGATA結合配列が8ヶ所存在した。

(5)TOPORS遺伝子5'上流-2500bpからGATA配列を順次欠損させたプロモーター断片のシリーズを組み込んだルシフェラーゼリポーターと-415/-389のGATA配列を含むEMSA用プローブを作製してGATA-6のTOPORS遺伝子発現への影響をリポーターアッセイとゲルシフトアッセイで解析した。CaCo-2細胞にGATA-6shRNA アデノウイルスを感染させてGATA-6の発現を抑えるとTOPORSの転写が促進することがわかった。一方、GATA-6発現ベクターを導入してGATA-6の発現を上げるとTOPORSの転写は抑制された。このようにGATA-6はTOPORS遺伝子発現についてはマイナス制御をおこなうことを明らかにした。

(6)TOPORSプロモーター上の8つのGATA配列のうちGATA-6に応答するのは-415/-389のGATA配列であり、TOPORSの転写抑制に重要であることを明らかにした。また、-415/-389のGATA配列を変異させるとGATA-6は結合せず、GATA-6によるTOPORS転写の抑制は起こらないことも証明した。このようにGATA-6は他の核内因子と協働して癌抑制遺伝子TOPORSの発現をトランスに抑制することを明らかにした。

(7)GATA-6の標的遺伝子を網羅的に探索するため、CaCo-2細胞にGATA-6 shRNA アデノウイルスまたはControl shRNA アデノウイルスを感染させ、それぞれのmRNAからCy3標識プローブを作製し、GATA-6依存性遺伝子発現促進またはGATA-6依存性遺伝子発現抑制をDNAマイクロアレイチップ(SurePrint G3 Human GE Microarray 8x60k<G4851B>, Agilent Technologies社)を用いて登録されている50683遺伝子を対象に解析した。その結果、GATA-6により転写が50%以上抑制される遺伝子を1161個、GATA-6により転写が2倍以上に促進される遺伝子719個を同定した。

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 Adachi Y., Fukuhara C. TA strategy

for site-directed mutagenesis. Anal. Biochem. 査読有、Vol.431、2012、66-68
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.08.030>

② Kajla S., Mondol AS., Nagasawa A., Zhang Y., Kato M., Matsuno K., Yabe-Nishimura C., Kamata T. Acrucial role for Nox 1 in redox-dependent regulation of Wnt-b-catenin signaling. 査読有、Vol.26、No.5、2012、2049-2059
<http://www.fasebj.org/content/26/5/2049.long>

③ Shinohara M., Adachi Y., Mitsushita J., Kuwabara M., Nagasawa A., Harada S., Furuta S., Zhang Y., Seheli K., Miyazaki H., Kamata T. Reactive oxygen generated by NADPH oxidase 1 (Nox1) contributes to cell invasion by regulating matrix metalloprotease-9 production and cell migration. 査読有、Vol.285、No.7、2010、4481-4488
<http://www.jbc.org/content/285/7/4481>

[学会発表] (計6件)

① 安達喜文、High mobility group protein-B1 (HMGB1) is a novel activator of GATA-6 in the transcriptional machinery for NADPH oxidase1. 第85回日本生化学会大会、2012年12月16日、福岡国際会議場(福岡市)

② 安達喜文、Transcriptional repression of TOPORS gene expression by GATA-6. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月20日、ロイトン札幌(札幌市)

③ 安達喜文、発癌のシグナル伝達におけるTOPORSの機能的役割：Functional characterization of GATA-6-regulated TOPORS in oncogenic signal transduction. 第84回日本生化学会大会、2011年9月23日、国立京都国際会館(京都市)

④ 安達喜文、Regulatory mechanism of Ras-ERK signaling-responsive transcription factor GATA-6 that mediates the expression of NADPH oxidase (Nox) 1. 第83回日本生化学会・第33回に本分子生物学会年会合同大会、2010年12月8日、神戸ポートアイランド(神戸市)

⑤ 安達喜文、Regulation of the NADPH oxidase 1 gene expression by the GATA-6. 第60回藤原セミナー国際シンポジウム「Zinc signaling and cellular functions」、2010年10月29日、大阪国際会議場(大阪市)

⑥ 安達喜文、Ras/ERK シグナルによるGATA-6のリン酸化とNADPHオキシダーゼ1(Nox1)遺伝子発現の制御機構、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22日、大阪国際会議場(大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 喜文 (ADACHI YOSHIFUMI)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号：50201893

(2) 研究分担者

鎌田 徹 (KAMATA TOHRU)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：40056304

(3) 連携研究者

()

研究者番号：