

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790623

研究課題名(和文) 転写メディエーターによる血球分化の制御とその破綻

研究課題名(英文) Regulation of hematopoietic cell differentiation by Mediator transcriptional coregulator complex

研究代表者

浦浜 憲永 (Urahama, Norinaga)

神戸大学・保健学研究科・研究員

研究者番号：40403208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：メディエーターはDNA結合転写因子とRNAポリメラーを架橋する基本的な転写共役複合体である。サブユニットのMED1は転写因子GATA1を活性化し赤芽球分化を誘導する。本研究ではGATA1からMED1へのシグナルを検討した。GATA1結合領域を含まないMED1の断片によりGATA1が活性化し赤芽球分化が進むことから、MED1はGATA1と直接結合せずともシグナルを受け取る。私達はそのバイパスとしてCCAR1とCoCoAのペアを同定した。本研究により、GATA1の転写活性化の機序に、GATA1とMED1が直接結合する経路とCoCoAとCCAR1がバイパスする経路が存在することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The MED1 subunit of the Mediator transcriptional coregulator complex coactivates GATA1 and induces erythropoiesis. Here, we show the dual mechanism of GATA1- and MED1-mediated transcription. An N-terminal fragment of MED1, which is incapable of interacting with GATA1, enhanced GATA1-targeted gene transcription and erythroid differentiation. The C-terminal zinc-finger domain of GATA1 interacts with the MED1(1-602)-interacting coactivator CCAR1, CoCoA, and MED1(681-715). CCAR1 and CoCoA synergistically enhanced GATA1-mediated transcription. Recombinant GATA1, CCAR1, CoCoA, and MED1(1-602) formed a complex *in vitro*, and GATA1, CCAR1, CoCoA, and MED1 were recruited to the gamma-globin promoter during erythroid differentiation. Therefore, in addition to the direct interaction between GATA1 and MED1, CoCoA and CCAR1 appear to relay the GATA1 signal to MED1, and multiple modes of the GATA1-MED1 axis may help to fine-tune GATA1 function during GATA1-mediated homeostasis events.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：MED1 Mediator GATA1 CCAR1 CoCoA

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内・国外の研究動向及び位置づけ
メディエーター研究はラスカー賞受賞者で転写研究の権威、ロックフェラー大学 Robert Roeder 教授(本研究の海外研究協力者)が主に生化学的研究において先導している。一方、個体レベルの生理的研究は私の所属する研究室(伊藤光宏教授:研究協力者)が Roeder 教授とともに、スタンフォード大学のノーベル賞受賞者 Roger Kornberg 教授の弟子であるドイツ Max-Planck 研究所 Tilman Borggreffe 博士(海外研究協力者)等、欧米の研究者と連絡を取りながら取り組んでいる。メディエーターは広範な生理機能を担うことから、内分泌・代謝学、神経学、腫瘍学など多くの分野の研究者が参集しているが、メディエーターの造血における機能に注目して研究しているのは知る限り私の所属する研究室と Borggreffe 博士のみである。

(2) 応募者のこれまでの研究成果

私たちの研究室の主宰者である伊藤光宏教授は、核内受容体と共発沈する大小約 30 個のサブユニットからなる約 2MDa の巨大な新規蛋白複合体の各サブユニット cDNA をクローニングし、同複合体がヒストン修飾酵素活性と違う機序で働く核内受容体特異的コアクチベーターであること、続いて本複合体が RNA ポリメラーゼ II ホロ酵素複合体の構成成分として全転写に必須である一方、異なるサブユニットが様々な転写因子との特異的結合によりシグナルを最終的に統合する細胞内シグナル伝達の終点であることを示し、世界的に大きく注目された。また種々のサブユニットの遺伝子改変マウスを作製し重要な生理的役割を提唱した (Ito et al. *Mol Cell* 5: 683-693, 2000 など)。

細胞分化の例として、MED1 は PPAR を介した脂肪分化に必要であることが伊藤教授らによって示されたが (Ge, Guermah, Yuan, Ito et al. *Nature* 417: 563-567, 2002; *Mol Cell Biol* 28: 1081-1091, 2008)、私は専門分野である臨床血液学の知識を生かし、正常造血細胞および白血病細胞において MED1 がレチノイン酸受容体 (RAR) やビタミン D 受容体 (VDR) を介した顆粒球/単球の分化に必要であることを示した (Urahama et al. *Genes Cells* 10: 1127-1137, 2005)。また、GATA1 を介する赤芽球分化と増殖(本研究)、T 細胞分化(Borggreffe 博士との共同研究)において担う役割とその機序を示しつつあり、MED1 が造血細胞全体の分化・増殖を司ることが明らかになってきた。さらに私達はごく最近、MED1 の造血ニッチにおける役割を示して基本的転写共役因子が特異的にニッチ機能を担うことを始めて提唱し、学際的に大きく注目されている (*Mol Cell Biol* 30, 4818-4827, 2010; 2009 年米国血液学会口演や 2010 年 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting 等で発表)。このように、メディエーター(または MED1)は造血全体の鍵を担う転写共役因子

複合体であることがわかりつつある。

また、ごく最近 MED1 の C 端に転写アダプター-PGC1 が結合することがわかったが、私達は既に MED1 の C 端が PGC1 を介してミトコンドリア機能に必須であり、重要な生理的機能を発揮することの証拠を得ている(未発表データ)。また、ミトコンドリア機能異常が造血にも影響を及ぼす可能性やそのような疾患の存在を念頭に、新しい分子診断を目指した解析を始めている。

(3) 本研究の着想に至った経緯

私や研究協力者の Borggreffe 博士は MED1 が核内受容体特異的コアクチベーターとして顆粒球・単球分化を (*Genes Cells* 10, 1127-1137, 2005)、GATA1 特異的コアクチベーターとして赤芽球分化を (*PNAS* 103: 18504, 2006) 担うことを示した。近年エストロゲン受容体について CCAR1 による MED1 のバイパス経路が報告されたが (*Mol Cell* 31: 510, 2008)、私達は既に CCAR1 による GATA1 シグナルのバイパスが存在する証拠を得ている(未発表)。その他の血球分化に関わる諸転写因子も、ヒストン修飾酵素が結合する以外に、基本転写因子がリクルートされる機序が必ず必要であるので、酵母で知られているのと同様、RNA ポリメラーゼ II までの核内シグナルをメディエーターが介在すると考えるのは合理的である。血球分化の転写制御のうち、特にヒストン修飾等の酵素活性を持たない系について、転写因子後の RNA ポリメラーゼ II 活性化まで、これまで調べられていない核内シグナルの分子機序を明らかにしたいと考え、また、その異常に伴う病態が見つかった際の新しい分子診断に寄与したいと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

メディエーター依存性の血球分化について、メディエーターとの関係が既知である転写因子 GATA 群や核内受容体依存性の機序を詳細に詰めるとともに、血球分化に重要な転写因子とメディエーターの関係を新たに検索し、転写因子後の情報ネットワーク機構を解明する。具体的に以下の項目を挙げる。

(1) 血球分化における GATA1 とメディエーターの役割。

赤白血病細胞 K562 の血球分化モデルを利用し、GATA1 誘導性の赤芽球分化におけるメディエーターの役割とその多様な分子機序を明らかにする。

(2) 血球分化を誘導する転写因子の後の核内情報伝達におけるメディエーターの役割。

血球分化の鍵を担う GATA1 がメディエーターと結合する機序を分子細胞生物学的に詳細に検討し、GATA1 転写制御におけるメディエーターの役割を明らかにする。また、GATA1 とメディエーターを介在する分子群を同定して、それらの細胞生物学的意義を明らかに

する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

K562 赤白血病細胞を赤芽球分化のモデルとして用いた。ヘミンを添加して赤芽球分化を誘導し、3,3'-dimethoxybenzidine の陽性率で赤芽球分化を定量した。また同腹由来の *Med1^{+/+}p53^{-/-}* および *Med1^{-/-}p53^{-/-}* MEF を用いた。

(2) 一過性発現と RNA 干渉

種々の MED1 変異や CCAR1、CoCoA の哺乳類発現ベクターを Lipofectamine LTX または Nucleofector を用いて細胞内に導入し、ヘミンを 6 時間後に添加した。RNA 干渉 (RNAi) には、MED1、CoCoA または GATA1 siRNA を、Lipofectamine RNAiMAX または Nucleofector を用いて導入した。si 抵抗性 cDNA 発現ベクターとの同時導入には Nucleofector を用いた。

(3) ルシフェラーゼレポーターアッセイと哺乳類 two-hybrid アッセイ

ルシフェラーゼレポーターアッセイには、各種アクチベーターや候補遺伝子の発現ベクターを グロビンプロモーターにルシフェラーゼレポーターをつないだプラスミドとコントロールルシフェラーゼ発現ベクターとともに Lipofectamine を用いて MEF に導入し、2 日後にルシフェラーゼ活性を定量した。siRNA を用いた実験では、発現ベクターを導入する前日に siRNA を Lipofectamine RNAiMAX を用いて細胞内に導入した。

哺乳類 Two-hybrid アッセイには、Gal4 結合蛋白発現ベクターと VP16 結合蛋白発現ベクターを Gal4 結合配列を持つルシフェラーゼレポーターと共に同様に細胞内に導入してレポーター活性を測定した。

(4) mRNA の定量

定法に従って定量 RT-PCR を行い、GAPDH 発現量との比により補正した。

(5) 共免沈とウエスタンブロット

ビーズに結合させた Protein G に抗 GATA1 抗体を吸着させ、細胞破砕物とインキュベーターとの結合蛋白を単離した。ウエスタンブロットは定法に従った。

(6) 試験管内蛋白結合解析

大腸菌で作成した GST 融合蛋白で、バキュロウイルスにより昆虫細胞内で発現させたタグ付き蛋白を、プルダウンして蛋白結合を解析した。

(7) CHIP アッセイ

K562 細胞を 1%ホルマリンで 10 分固定した後超音波破砕して各転写因子抗体で免疫沈降し、定量 PCR 法にて グロビンプロモーター DNA を増幅して、同プロモーターにリク

ルトされた因子を定量した。

4. 研究成果

(1) メディエーターサブユニット MED1 は GATA1 誘導性の転写と赤芽球分化を誘導する。

本研究では、赤白血病細胞株 K562 の赤芽球分化モデルを用いて GATA1 から MED1 へのシグナル伝達経路について検討した。このモデルにおいて、MED1 の発現量を siRNA にて低下させたり、あるいは MED1 発現ベクターを用いて過剰発現させると、赤芽球分化 (3,3'-dimethoxybenzidine 陽性率) と GATA1 標的・赤芽球分化マーカー遺伝子 (グロビン、 グロビン、 PBGD、ALAS-E) の発現量は MED1 の量に相関して変化した。

(2) GATA1 と MED1 は GATA1 の C 端側 Zn フィンガーと MED1 の 681~715 アミノ酸残基で結合する。

昆虫細胞で発現させたタグ付き GATA1 と GST に融合させた種々の MED1 断片を用いて GST プルダウンアッセイを行ったところ、MED1(681-715)が GATA1 と結合する最小単位であることが分かった。より生理的条件下で結合能を検討するため Gal4 結合 GATA1 と VP16 に結合させた同様の MED1 断片を哺乳類細胞で発現させて哺乳類 two-hybrid アッセイで検討したところ、MED1(681-715)が特異的に結合した。以上から、MED1 は GATA1 と MED1(681-715)を介して直接結合する。

同様に、GST プルダウンアッセイと哺乳類 Two-hybrid アッセイで MED1 と結合する GATA1 のドメインを調べたところ、MED1 は GATA1 の C 端側 Zn フィンガーに結合することが分かった。

(3) MED1 の N 端 602 アミノ酸残基は GATA1 を介する赤芽球分化を誘導する。

上の(1)で行ったのと同様に MED1 断片を K562 細胞に過剰発現させると、MED1(1-602)のみで GATA1 標的・赤芽球分化マーカー遺伝子発現を著明に誘導し、赤芽球分化を著明に促進した。しかし、全長の MED1 による効果には届かなかった。同様に、MED1 をノックダウンした K562 に siRNA 抵抗性の MED1(1-602) 発現ベクターを導入すると、部分的に GATA1 標的遺伝子発現や赤芽球分化の回復を認められた。以上から、GATA1 と直接結合しない MED1(1-602)が GATA1 の標的・赤芽球マーカー遺伝子の転写を活性化し、赤芽球分化を誘導する能力を持つことが明らかになった。

(4) MED1(1-602)は GATA1 による グロビンプロモーター活性を上げる。

Med1^{-/-} MEF と グロビンプロモーターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイで、MED1(1-602)はレポーター活性を著明に上げたが、全長 MED1 の効果には及ばなかった。

(5) CCAR1 は MED1 と GATA1 に結合する。

以上より、MED1 は GATA1 と直接結合せずとも、何らかのバイパス分子を介してシグナルが伝達されていることを示唆された。そこで、核内受容体と MED1 の間のバイパス分子として知られる CCAR1 と、そのパートナーである CoCoA が、GATA1 から MED1 のシグナル伝達にも関与している可能性を考えた。

MED1 の N 端は CCAR1 と結合することが知られている。本研究では MED1 が CCAR1 のどこに結合するか検討した。ルシフェラーゼレポーターアッセイで見たところ、MED1 は CCAR1 の N 端と C 端の 2 か所で結合することが示された。

一方、CCAR1 と GATA1 について、GST プルダウンアッセイで、これまでに始めてこれらが直接結合することが分かった。そこで同様に GST プルダウンアッセイと哺乳類 Two-hybrid アッセイでこれらの結合様式を検討したところ、GATA1 の Zn フィンガーと CCAR1 の C 端が直接結合することが分かった。

(6) CoCoA は GATA1 と CCAR1 に結合する。

CCAR1 とペアを作る CoCoA は、CBP/p300 と結合することが知られている。CoCoA が GATA1 による転写にどうかかわるか、メカニズムから検討した。GST プルダウンアッセイと哺乳類 Two-hybrid アッセイで同様に検討したところ、CoCoA は GATA1 の C 端側 Zn フィンガーと CCAR1 の N 端と結合することが判明した。

これらから、GATA1 と MED1 の N 端とは CCAR1 と CoCoA が介在すること、これらがバイパス経路を形成することが示唆された。

(7) CCAR1 と CoCoA は GATA1 による転写活性化に伴って グロビンプロモーターに結合する。

実際に CCAR1 と CoCoA が赤芽球分化に伴い グロビンプロモーターにリクルートされるか、ChIP アッセイで検討した。K562 細胞にヘミン添加後経時的に見たところ、12 時間後以降に MED1 と共に CCAR1 や CoCoA が グロビンプロモーターに結合した。GATA1 はもともと一定量が結合しているが、2 日後からさらにプロモーターにリクルートされ、同時に CCAR1、CoCoA、MED1 のリクルート量も増加した。

これらのリクルートの機序を検討するため、GATA1 をノックダウンして後に ChIP アッセイを行った。その結果、GATA1 の他に MED1 や CoCoA のリクルート量が著明に減少し、これらの分子が GATA1 をプラットフォームにして グロビンプロモーターにリクルートされることが明らかになった。

(8) GATA1、MED1、CCAR1、CoCoA は同時に複合体を形成できる。

GATA1、MED1、CCAR1、CoCoA が同時に複合体を形成できるか、CCAR1、CoCoA、MED1(1-602)を共発現させた細胞の破碎液から GST-GATA1(200-305)で GST プルダウンアッ

セイを行ったところ、これらの分子が検出された。従って、これらは細胞内で複合体を形成できることが判明した。

(9) CCAR1 と CoCoA は協調的に、また MED1 依存性に、GATA1 による転写を活性化させる。

MEF と グロビンプロモーターを用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、*Med1^{+/+}* MEF では GATA1 存在下で CCAR1 と CoCoA が協調的に転写を著増させた。しかし、これらの効果は *Med1^{-/-}* MEF では見られなかった。従って、グロビンプロモーターにリクルートされる CCAR1 と CoCoA は機能的であり転写を増強させる。

以上より、MED1 を介した GATA1 の転写活性化の機序には、GATA1 と MED1 が直接結合する経路のほかに、CoCoA と CCAR1 がバイパスする経路が存在することが明らかとなった。

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)

S. Mizuta, T. Minami, H. Fujita, C. Kaminaga, K. Matsui, R. Ishino, A. Fujita, K. Oda, A. Kawai, N. Hasegawa, N. Urahama, R. G. Roeder, M. Ito. CCAR1/CoCoA pair-mediated recruitment of the Mediator defines a novel pathway for GATA1 function. *Genes Cells* 19, 28-51, 2014. doi: 10.1111/gtc.12104.

(査読有)

K. Matsui, K. Oda, S. Mizuta, R. Ishino, N. Urahama, N. Hasegawa, R.G. Roeder, M. Ito. Mediator subunit MED1 is a T3-dependent and T3-independent coactivator on the thyrotropin gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 440, 184-189, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.061. (査読有)

N. Hasegawa, A. Sumitomo, A. Fujita, N. Aritome, S. Mizuta, K. Matsui, R. Ishino, K. Inoue, N. Urahama, J. Nose, T. Mukohara, S. Kamoshida, R. G. Roeder, M. Ito. Mediator subunits MED1 and MED24 cooperatively contribute to pubertal mammary gland development and growth of breast carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1483-1495, 2012. doi: 10.1128/MCB.05245-11. (査読有)

[学会発表](計8件)

S. Mizuta, C. Kaminaga, H. Fujita, K. Matsui, R. Ishino, K. Oda, A. Fujita, N. Kubota, N. Urahama, M. Ito. CCAR1/CoCoA-mediated Mediator recruitment indicates novel pathway for GATA1 action in erythropoiesis. 第 74 回日本血液学会総会、平成 24 年 10 月

19～21日、京都。

藤田陽加、水田駿平、神永千尋、織田華澄、松井啓治、森本由紀、畑ともみ、池端夕莉、浦浜憲永、伊藤光宏。赤芽球分化を誘導するコアクチベーター-CCAR1 と CoCoA の造血組織における特異的発現。第 74 回日本血液学会総会、平成 24 年 10 月 19～21 日、京都。

S. Mizuta, H. Fujita, C. Kaminaga, T. Minami, K. Matsui, R. Ishino, A. Fujita, K. Oda, N. Urahama, R.G. Roeder, M. Ito. CCAR1/CoCoA-mediated recruitment of the Mediator indicates a novel pathway for GATA1 action in erythropoiesis. 第 35 回日本分子生物学会年会、平成 24 年 12 月 11～14 日、福岡。

N. Kubota, K. Matsui, Y. Morimoto, Y. Hirohata, N. Hasegawa, R. Ishino, S. Mizuta, A. Fujita, N. Urahama, R.G. Roeder, M. Ito. Increased sensitivity to insulin at obese stress in mice with defective MED1 nuclear receptor recognition motifs. 第 35 回日本分子生物学会年会、平成 24 年 12 月 11～14 日、福岡。

K. Matsui, K. Oda, T. Hata, Sh. Mizuta, Y. Hirohata, R. Ishino, N. Urahama, R.G. Roeder, M. Ito. Mediator subunit MED1 is a T3-dependent coactivator on nTRE of the TSH promoter. 第 35 回日本分子生物学会年会、平成 24 年 12 月 11～14 日、福岡。

R. Ishino, K. Matsui, A. Sumitomo, K. Inoue, K. Minami, S. Yamagishi, S. Mizuta, O. Horie, N. Urahama and M. Ito. VDR-mediated osteopontin transcription plays crucial role in hematopoietic niche in concert with FGF7. EMBO Conference, Nuclear Receptors, Barcelona, Spain, September 16-20, 2011.

水田駿平、南智也、神永千尋、織田華澄、藤田陽加、松井啓治、石野瑠璃、住友明子、浦浜憲永、伊藤光宏。GATA1 特異的転写共役因子 MED1 を介する赤芽球分化における核内シグナル副経路の存在。第 34 回日本分子生物学会年会、平成 23 年 12 月 13～16 日、横浜。

C. Kaminaga, S. Mizuta, T. Minami, K. Oda, H. Fujita, K. Matsui, R. Ishino, A. Sumitomo, N. Urahama, M. Ito. CoCoA/CCAR1 pair-mediated recruitment of Mediator complex indicates novel pathway for the function of GATA1 in erythroid differentiation. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 10-13, 2011, San Diego, USA.

ホームページ等

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~itomi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦浜 憲永 (URAHAMA, Norinaga)

研究者番号：40403208

(2) 研究分担者

該当なし。

(3) 連携研究者

該当なし。

{その他}