

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460355

研究課題名(和文) 型グロビン遺伝子のエピジェネティック制御におけるDNAメチル基転移酵素1の役割

研究課題名(英文) Role of DNA Methyltransferase 1 in the Epigenetic Regulation of Beta-type Globin Genes

研究代表者

田邊 修 (TANABE, OSAMU)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号：70221398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：サラセミアや鎌状赤血球症などのグロビン異常症の治療には、胚型あるいは胎児型の型グロビンの発現誘導が有効であるが、そのための技術開発には、これらの遺伝子の成人における不活性化機構の解明が重要である。本研究では、DNAメチル基転移酵素1(DNMT1)が胚型型グロビン遺伝子の不活性化に必要であることを示した。さらに、核内受容体TR2とTR4が、胚型及び胎児型の型グロビン遺伝子不活性化と、DNMT1のこれら遺伝子プロモータへの結合に必要であることを示した。これらより、TR2とTR4による、胚型及び胎児型型グロビン遺伝子不活性化において、DNMT1が重要な役割を担うことが示された。

研究成果の概要(英文)：Re-induction of embryonic or fetal hemoglobin has therapeutic effects for patients with beta-globin disorders such as beta-thalassemia and sickle cell disease. For the development of therapeutic agents with such effects, the elucidation of the molecular mechanisms for the inactivation of those genes in adult is crucial. In this study, we demonstrated that DNA methyltransferase 1 (DNMT1) is essential for the inactivation of the embryonic beta-type globin gene in adult erythroid cells. Furthermore, we demonstrated that nuclear receptors TR2 and TR4 are essential for the inactivation of the embryonic and fetal beta-type globin genes, as well as for the recruitment of DNMT1 to the promoters of these genes in adult erythroid cells. These results indicate the critical roles of DNMT1 in the inactivation of the embryonic and fetal beta-type globin genes in adult, which is elicited by TR2 and TR4.

研究分野：分子生物学

キーワード：グロビン異常症 胚型 グロビン 胎児型 グロビン 遺伝子発現制御 DNAメチル基転移酵素1 核内受容体 TR2 TR4

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内外の研究動向と本研究の位置づけ
 ヘモグロビンβ鎖をコードするヒト遺伝子座は5個のβ型グロビン遺伝子とその5'上流に位置するLCRと呼ばれる発現制御領域から構成される(図1)。5個のβ型グロビン遺伝子は、5'側から順に、胚型ε、2個の胎児型γ(G_γA_γ)、成人型δとβの各グロビン鎖をコードする。ヒト造血組織は胎生初期に卵黄嚢に発生して胚型εグロビンを発現するが、造血組織が胎児肝に移行するとともにεに代わって胎児型γが発現し、胎児型ヘモグロビン(α₂γ₂)が作られる。その後、出生までに造血組織が骨髄へ移行するとともに胎児型γ遺伝子は不活性化を受け、代わりに成人型β(および少量のδ)が発現する。これら発生段階に応じたグロビン鎖のアイソフォーム変化をグロビンスイッチングと呼ぶ。β型グロビン遺伝子群の制御は、エピジェネティックな組織特異的、発生段階特異的な遺伝子発現制御のモデルとして活発に研究されている。これらの研究は、血球系の発生分化の分子機構の解明や、その異常である血液疾患の病態解明につながるとともに、造血幹細胞移植療法や再生医療の進歩にも貢献しうる。

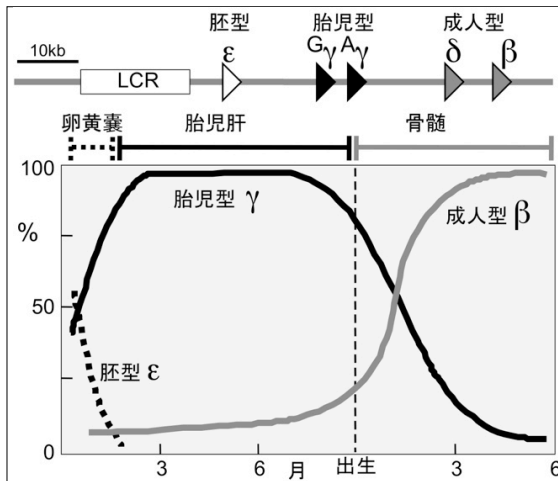


図1. ヒトβ型グロビン遺伝子座の構造と発生段階特異的発現

一方、世界で最も多い単一遺伝子病であるβサラセミアや鎌状赤血球症などの遺伝性βグロビン異常症の治療法として、胚型εあるいは胎児型γグロビンの合成誘導が有効であることが知られている。効果的な胚型ε/胎児型γグロビン誘導薬の開発のためにはグロビンスイッチング、特に胚型ε/胎児型γ遺伝子の不活性化機構の解明が重要である。胚型εと胎児型γ遺伝子の不活性化はともに「自律的不活性化」即ち、他のグロビン遺伝子とは独立に、プロモータ領域内のサイレンサ配列の働きにより発生段階特異的に不活性化されることが知られているが、その分子機構には未解明の部分が多い。その解明は、胚型ε/胎児型γグロビン誘導薬開発のための治療標的発見につながる可能性があるため、世界的に活発な研究が行われている。

(2) 研究代表者の研究開始当初までの研究成果

研究代表者らはこれまでに、胚型εと胎児型γグロビン遺伝子のプロモータ領域内のサイレンサ配列を同定してそれに結合するタンパク質を精製し、これが核内受容体TR2とTR4のヘテロ2量体を含む複合体であることを明らかにした(文献①②)。次いでTR2とTR4の遺伝子欠損マウスを作成し、これらにヒトβ型グロビン遺伝子座全体をトランスジェーンとして導入することにより、TR2とTR4がヒトの胚型εと胎児型γ遺伝子を発生段階特異的に抑制することにより「自律的不活性化」をもたらすことを明らかにした(図2)(文献③)。これは、胚型εと胎児型γグロビン遺伝子の不活性化に関わるDNA結合因子を初めて明らかにした成果であり、TR2/TR4を標的とする薬剤を開発できれば、遺伝性β型グロビン異常症の画期的治療薬になると期待されている。実際に代表者らは、鎌状赤血球症のモデルマウスで、TR2/TR4の活性を変化させることにより胎児型γグロビンの発現を誘導してこれを治療できることを証明した(文献④)。

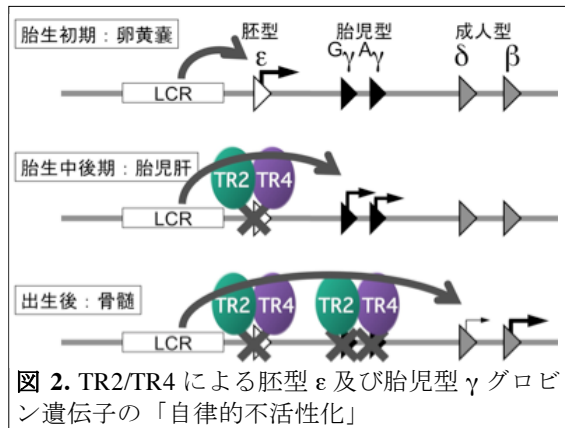


図2. TR2/TR4による胚型ε及び胎児型γグロビン遺伝子の「自律的不活性化」

さらに代表者らは、TR2/TR4によるこれら遺伝子の転写抑制機構を解明する目的で、細胞内でTR2/TR4と会合するタンパク質群を解析し、TR2/TR4がDNAメチル基転移酵素1(DNMT1)、ヒストン脱メチル化酵素LSD1、ヒストン脱アセチル化酵素HDACなど、エピジェネティックなクロマチン修飾制御により転写を抑制する酵素群と複合体を形成していることを明らかにした(図3)(文献⑤)。

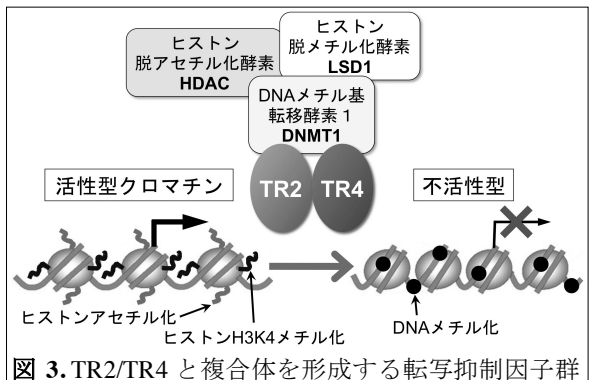


図3. TR2/TR4と複合体を形成する転写抑制因子群

胚型 ϵ と胎児型 γ グロビン遺伝子の不活性化に伴って、DNA メチル化、ヒストン脱アセチル化、ヒストン H3 リジン 4 番 (H3K4) の脱メチル化など、不活性型のクロマチンが形成されることが知られているが、研究代表者らの知見は、これらの過程に、TR2/TR4 と複合体を形成するこれら転写抑制因子群が関与する可能性を示している。この結果は、DNA メチル基転移酵素阻害剤や HDAC 阻害剤が、胎児型 γ グロビンを誘導するという過去の臨床的観察とも一致しており、これら酵素群が胎児型 γ 遺伝子の転写を直接抑制することを示唆する。さらに代表者らは、ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 の特異的阻害剤を、ヒト造血幹細胞のインビトロ分化培養系に添加することにより、胎児型 γ グロビン遺伝子が、プロモータ領域の H3K4 メチル化の増加とともに、顕著に再活性化されることを示した (文献⑥)。この結果は LSD1 阻害剤が、遺伝性 β 型グロビン異常症治療のための γ グロビン誘導薬として応用できる可能性を示す。

2. 研究の目的

β サラセミアや鎌状赤血球症などの遺伝性 β 型グロビン異常症の治療法として、胚型 ϵ あるいは胎児型 γ グロビンの発現誘導が有効である。効果的な胚型 ϵ /胎児型 γ グロビン誘導薬開発のためには、これら遺伝子の不活性化機構の解明による治療標的の同定が重要である。本研究では始めに、DNMT1 変異マウスを用いて、DNMT1 の胚型 ϵ /胎児型 γ グロビン遺伝子不活性化における役割の解明を試みた。具体的には、DNMT1 欠損マウスは胎生初期に致死となるため、DNMT1 遺伝子座に DNA 組換え酵素 Cre の標的配列 LoxP が複数導入された「条件的 DNMT1 欠損マウス」を使用して、マウス骨髄細胞に Cre 発現アデノウイルスを感染させることにより、成体マウスにおける DNMT1 欠損の胚型 ϵ /胎児型 γ グロビン遺伝子不活性化への影響を分析、検討した。

一方、研究代表者は、これまでに TR2 と TR4 の遺伝子欠損マウスを作成して、胚型 ϵ /胎児型 γ グロビン遺伝子不活性化における TR2/TR4 の役割の解明を進めて来たが、両遺伝子を共に欠損したマウスはやはり胎生致死となるため、詳細なメカニズムの解明が困難であった。このため本研究では、TR4 遺伝子座に複数の LoxP 配列を導入した、「条件的 TR4 欠損マウス」を作成して、成体マウスでの胚型 ϵ /胎児型 γ グロビン遺伝子不活性化における TR2 と TR4 の役割とそのメカニズムを分析した。具体的には、TR2 欠損マウスと条件的 TR4 欠損マウスを交配させて取得した複合変異マウスの骨髄細胞に、Cre 発現アデノウイルスを感染させることにより、インビトロで両遺伝子を共に欠損させることにより、成体マウスでの胎児型 γ グロビン遺伝子不活性化における TR2 と TR4 の役割と、そのメカニズム、特に DNMT1 などのエピジェネティックな遺伝子発現抑制因子の、プロモータへの結合に

対する影響を分析、検討した。

3. 研究の方法

(1) 条件的 DNMT1 欠損マウスの入手

配列特異的 DNA 組換え酵素 Cre の標的配列である LoxP が DNMT1 遺伝子内の 2 ヶ所に導入された、条件的 DNMT1 欠損マウスは、作成者の Jaenisch 博士から供与された。

(2) TR2 欠損マウス及び条件的 TR4 欠損マウスの作成

ファージライブラリから単離したマウス TR2 及び TR4 遺伝子の、DNA 結合ドメインをコードするエクソンを挟むイントロンに LoxP 配列を挿入し、ネオマシン耐性遺伝子 (DNA 組換え酵素 Flp の標的配列 Frt を両端に付加) とチミジン・キナーゼ遺伝子を付加したターゲット・ベクターを作成した。これらをマウス ES 細胞に導入して、相同組換え ES 細胞株を取得した。これらを胚盤胞にマイクロインジェクションすることにより、キメラマウスを作成し、野生型マウスと交配させて、相同組換えマウスを取得した。これらを Cre 発現トランスジェニックマウスおよび Flp 発現トランスジェニックマウスと交配することにより、TR2 欠損マウス及び条件的 TR4 欠損マウスを取得した (図 4)。

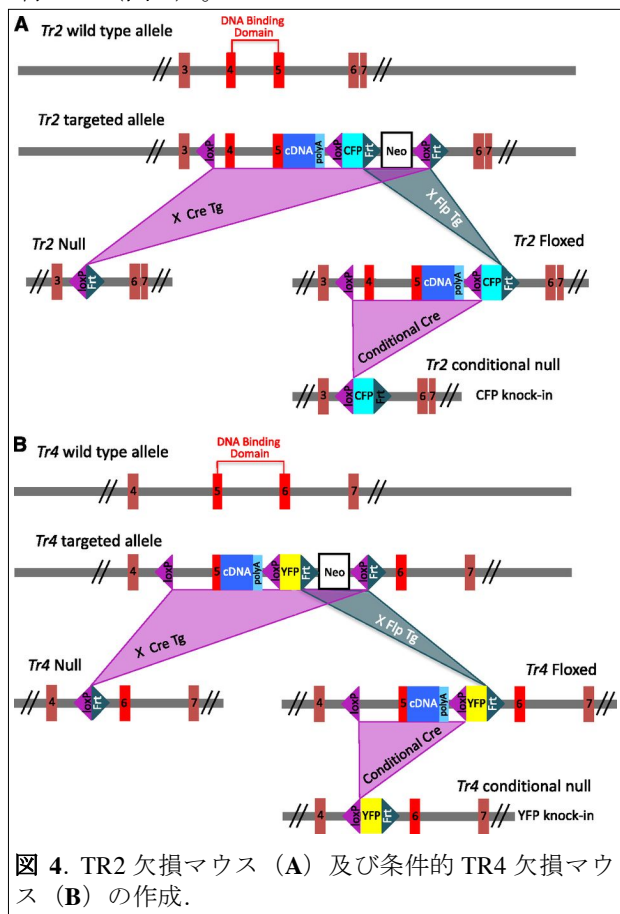


図 4. TR2 欠損マウス (A) 及び条件的 TR4 欠損マウス (B) の作成。

(3) 骨髄細胞の培養とアデノウイルス感染

マウスの骨髄細胞から分化マーカー陰性細胞を FACS で分離後に、エリスロポイチンを加えて培養して赤血球系に分化させた。培養開始 1 日後と 3 日後に、Cre 発現アデノウイルス

ス(または対照として、Cre 非発現アデノウイルス)を感染させた。これら細胞から、DNA と RNA を抽出して、リアルタイム PCR による、TR4 遺伝子 DNA およびその mRNA の定量解析(欠損効率の解析)及び、マウス β 型グロビン遺伝子群の mRNA 定量解析を行なった。

(4) クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイ
マウス骨髄細胞への 2 回目のアデノウイルス感染の 2 日後に、細胞を回収して、ホルムアルデヒドでクロマチンをクロスリンク後に、超音波処理により DNA を断片化した。特異抗体を用いて TR2、TR4、DNMT1、LSD1、CoREST、TIF1 β などを免疫沈降して、これらタンパク質に結合している、マウス β 型グロビン遺伝子群のプロモータ領域をリアルタイム PCR により定量した。

4. 研究成果

(1) DNMT1 欠損細胞における β 型グロビン遺伝子群の発現

条件的 DNMT1 欠損マウスの成体から、未分化な骨髄細胞を分離し、インビトロで分化誘導した。この細胞に Cre 発現アデノウイルスを感染させることにより、DNMT1 遺伝子をインビトロで欠損させた(DNMT1 欠損細胞)。この細胞におけるマウス β 型グロビン遺伝子群の発現をリアルタイム PCR にて定量したところ、対照と比較して、胚型 $\epsilon\gamma$ グロビン遺伝子(ヒト胚型 ϵ グロビンのオルソログ)の発現が約 2 倍に上昇していた。このことから、DNMT1 が胚型グロビン遺伝子の不活性化に必要であることが明らかになった。

(2) 条件的 TR4 欠損マウスの性状

条件的 TR4 欠損マウス (TR4 Flox マウス: TR4^{F/F}) (図 4) と TR2 欠損マウス (TR2^{-/-}) とを交配させて、複合変異マウス (TR2^{-/-} TR4^{F/F}) を取得した (図 5A)。このマウスから未分化な骨髄細胞を分離して分化誘導した。この細胞に Cre 発現アデノウイルスを感染させることにより、TR4 遺伝子をインビトロで欠損させ

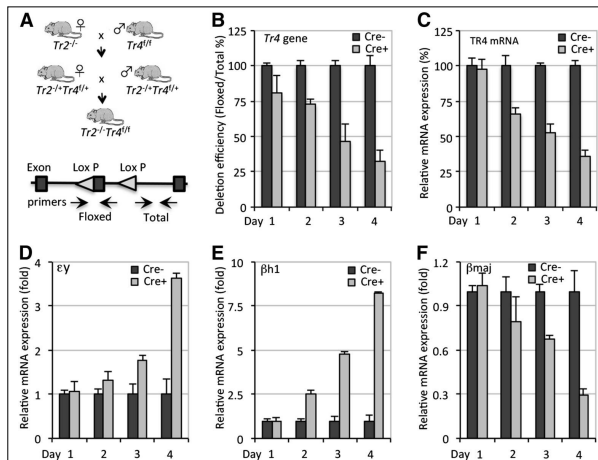


図 5. TR2/TR4 二重欠損細胞における TR4 遺伝子欠損効率とマウス β 型グロビン遺伝子群の発現. (A) マウスの交配と TR4 遺伝子定量用プライマー. (B) TR4 遺伝子 DNA 量. (C) TR4 mRNA 発現量. (D-F) 胚型 $\epsilon\gamma$ と $\beta h1$ 及び成体型 $\beta major$ グロビンの mRNA 発現量.

ることにより、TR2 と TR4 の両遺伝子を欠損した細胞を得た(TR2/TR4 二重欠損細胞)。この時の TR4 遺伝子 DNA 量及びその mRNA 発現量を、リアルタイム PCR にて定量することにより、アデノウイルス感染 4 日後の TR4 遺伝子の欠損効率が、約 70%であることが解った (図 5B, C)。

(3) TR2/TR4 二重欠損細胞における β 型グロビン遺伝子群の発現

TR2/TR4 二重欠損細胞におけるマウスの β 型グロビン遺伝子群、すなわち、胚型 $\epsilon\gamma$ (ヒト胚型 ϵ グロビンのオルソログ) と $\beta h1$ (ヒト胎児型 γ グロビンのオルソログ) 及び成体型 $\beta major$ 、の各グロビン遺伝子の発現をリアルタイム PCR にて定量した。対照の Cre 非発現アデノウイルスを感染させた細胞と比較したところ、 $\epsilon\gamma$ グロビン遺伝子の発現が 3.6 倍、 $\beta h1$ グロビン遺伝子の発現が 8.2 倍に増加したが、 $\beta major$ グロビン遺伝子の発現は逆に低下した (図 5D-F)。

(4) TR2/TR4 二重欠損細胞における β 型グロビン遺伝子プロモータへの転写抑制因子群の結合

TR2/TR4 二重欠損細胞におけるマウスの β 型グロビン遺伝子群の発現変化のメカニズムを明らかにする目的で、 β 型グロビン遺伝子プロモータへの転写抑制因子群の結合を ChIP アッセイにより分析した。対照の Cre 非発現アデノウイルスを感染させた細胞では TR4 に加えて、DNMT1、LSD1、CoREST、TIF1 β など、クロマチン修飾制御によるエピジェネティックな遺伝子発現抑制に関わる因子群が、 $\epsilon\gamma$ 及び $\beta h1$ グロビン遺伝子のプロモータに結合していることが観察された。これに対して、TR2/TR4 二重欠損細胞では、これらの結合量が有意に低下していた (図 6)。

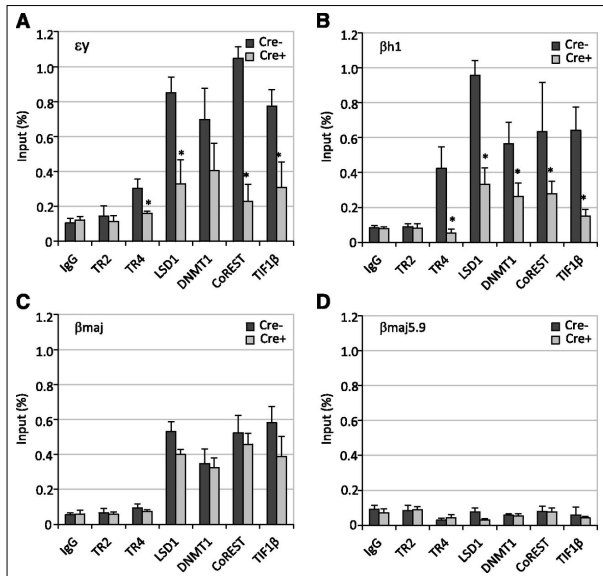


図 6. TR2/TR4 二重欠損細胞における β 型グロビン遺伝子プロモータへの転写抑制因子群の結合. ChIP アッセイによる、TR2、TR4、LSD1、DNMT1、CoREST、TIF1 β の、胚型 $\epsilon\gamma$ (A) と $\beta h1$ (B) 及び成体型 $\beta major$ グロビンの各遺伝子プロモータ、及び対照の $\beta major$ グロビン遺伝子上流領域 (D) への結合量の分析結果.

(5) 研究成果のまとめ

条件的 DNMT1 欠損マウスの骨髄細胞に Cre 発現アデノウイルスを感染させた DNMT1 欠損細胞では対照と比較して、ヒト胚型 ϵ グロビン遺伝子のオルソログの発現が約 2 倍に増加した。このことから、DNMT1 が胚型グロビン遺伝子の不活性化に必要であることが明らかになった。さらに、TR2 欠損と条件的 TR4 欠損との複合変異マウスの骨髄細胞に Cre 発現アデノウイルスを感染させることにより、TR2/TR4 二重欠損細胞を得た。この細胞では、対照と比較して、ヒト胚型 ϵ 及び胎児型 γ グロビン遺伝子のオルソログの発現が有意に上昇した。また、この細胞では、DNMT1、LSD1、CoREST、TIF1 β などのエピジェネティックな遺伝子発現抑制因子の、ヒト胚型 ϵ 及び胎児型 γ グロビンのオルソログ遺伝子のプロモータへの結合が、対照に比べて有意に減少していた。これらの結果から、TR2 と TR4 が、胚型 ϵ 及び胎児型 γ グロビン遺伝子不活性化と、DNMT1 のこれら遺伝子プロモータへの結合に必要であることが明らかになった。このことから、TR2 と TR4 による、これら遺伝子の不活性化において、DNMT1 が重要な役割を担うことが示された。

<引用文献>

- ① [Tanabe O](#), Katsuoka F, Campbell AD, Song W, Yamamoto M, Tanimoto K, Engel JD: An embryonic/fetal β -type globin gene repressor contains a nuclear receptor TR2/TR4 heterodimer. **EMBO J** 21: 3434-3442, 2002.
 - ② [Omori A](#), [Tanabe O](#), Engel JD, Fukamizu A, Tanimoto K: Adult stage γ -globin silencing is mediated by a promoter direct repeat element. **Mol Cell Biol** 25: 3443-3451, 2005.
 - ③ [Tanabe O](#), McPhee D, Kobayashi S, Shen Y, Brandt W, Jiang X, Campbell AD, Chen YT, Chang CS, Yamamoto M, Tanimoto K, Engel JD: Embryonic and fetal β -globin gene repression by the orphan nuclear receptors, TR2 and TR4. **EMBO J** 26: 2295-2306, 2007.
 - ④ Campbell AD, Cui S, Shi L, Urbonya R, Mathias A, Bradley K, Bonsu KO, Douglas RR, Halford B, Schmidt L, Harro D, Giacherio D, Tanimoto K, [Tanabe O](#), Engel JD: Forced TR2/TR4 expression in sickle cell disease mice confers enhanced fetal hemoglobin synthesis and alleviated disease phenotypes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 108: 18808-18813, 2011.
 - ⑤ Cui S, Kolodziej KE, Obara N, Amaral-Psarris A, Demmers J, Shi L, Engel JD, Grosveld F, Strouboulis J, [Tanabe O](#): Nuclear receptors TR2 and TR4 recruit multiple epigenetic transcriptional corepressors that associate specifically with the embryonic β -type globin promoters in differentiated adult erythroid cells. **Mol Cell Biol** 31: 3298-3311, 2011.
 - ⑥ Shi L, Cui S, Engel JD, [Tanabe O](#): Lysine-specific demethylase 1 is a therapeutic target for fetal hemoglobin induction. **Nature Medicine** 19: 291-294, 2013.
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 10 件)
- ① [Lee MP](#), [Tanabe O](#), Shi L, Jearawiriyapaisarn N, Lucas-Alcaraz D, Engel JD: The orphan nuclear receptor TR4 regulates erythroid cell proliferation and maturation. **Blood** 130: 2537-2547, 2017. 査読有
DOI:10.1182/blood-2017-05-783159.
 - ② [Keleku-Lukwete N](#), [Suzuki M](#), Otsuki A, Tsuchida K, Katayama S, Hayashi M, Naganuma E, Moriguchi T, [Tanabe O](#), Engel JD, Imaizumi M, Yamamoto M: Amelioration of inflammation and tissue damage in sickle cell model mice by Nrf2 activation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 112: 12169-12174, 2015. 査読有
DOI:10.1073/pnas.1509158112.
 - ③ Cui S, [Tanabe O](#), Sierant M, Shi L, Campbell A, Lim KC, Engel JD: Compound loss of function of nuclear receptors *Tr2* and *Tr4* leads to induction of murine embryonic β -type globin genes. **Blood** 125: 1477-1487, 2015. 査読有
DOI:10.1182/blood-2014-10-605022.
 - ④ Shi L, Lin YH, Sierant MC, Zhu F, Cui S, Guan Y, Sartor MA, [Tanabe O](#), Lim KC, Engel JD: Developmental transcriptome analysis of human erythropoiesis. **Hum Mol Genet** 23: 4528-4542, 2014. 査読有
DOI:10.1371/journal.pgen.1004339.
- [学会発表] (計 2 件)
- ① [Keleku-Lukwete N](#), [Suzuki M](#), Otsuki A, Tsuchida K, Katayama S, Hayashi M, Naganuma E, Moriguchi T, [Tanabe O](#), Engel JD, Imaizumi M, Yamamoto M: Keap1-Nrf2 System: potential role in prevention of sickle cell disease organ damages and inflammation. **57th ASH Annual Meeting & Exposition**, Orlando, USA, Dec 5-8, 2015.
 - ② [Keleku-Lukwete N](#), 鈴木未来子, 大槻晃史, 土田恒平, 片山紗乙莉, 林真貴子, 森口尚, [田邊修](#), 今泉益栄, 山本雅之: NRF2 protects sickle cell disease model mice from inflammation and organ damage. **日本生化学会東北支部第 81 回例会**, 東北大学(宮城県仙台市), 2015 年 5 月 9 日.
6. 研究組織
(1) 研究代表者
[田邊修](#) (TANABE, Osamu)
東北大学・東北メディカル・メガバンク機

構・教授
研究者番号：70221398

(2)研究分担者

鈴木 未来子 (SUZUKI, Mikiko)
東北大学・医学系研究科・講師
研究者番号：80508309

横澤 潤二 (YOKOZAWA, Junji)
東北大学・東北メディカル・メガバンク機
構・非常勤講師
研究者番号：10722605

西川 慧 (NISHIKAWA, Satoshi)
東北大学・東北メディカル・メガバンク機
構・研究支援者
研究者番号：40722616