

巨核球・血小板系列特異的遺伝子発現制御 に關与する転写因子群の解析



研究ノート

土井 健史*, 岡田 欣晃**

Analyses of transcription factors regulating megakaryocyte-specific gene expression

Key Words : Megakaryocyte, Platelet factor 4, Transcription factors, LC/MS/MS

はじめに

血小板減少症は生体内の血小板数が減少する疾患であり、抗がん剤による副作用やウイルス感染、遺伝的要因などが原因で発症することが知られている。生体における血小板減少は止血低下をもたらし、重篤な出血傾向は命に関わってくる。1994年、血小板産生を強く促進する造血因子としてトロンボポエチンがみつけれられ、血小板減少症治療薬としての使用が期待された。しかし抗原性のため医薬品への応用が難しく、これにかわる血小板減少症治療薬の開発が強く望まれている。現在、血小板系列の分化・成熟機構については未だ不明な点が多く、その全容を明らかにすることが医薬品開発を行う上で重要であり、我々はその課題に取り組んでいる。

血小板は、造血幹細胞から巨核球を経て産生される(図1)。この血小板への分化・成熟過程は、形態

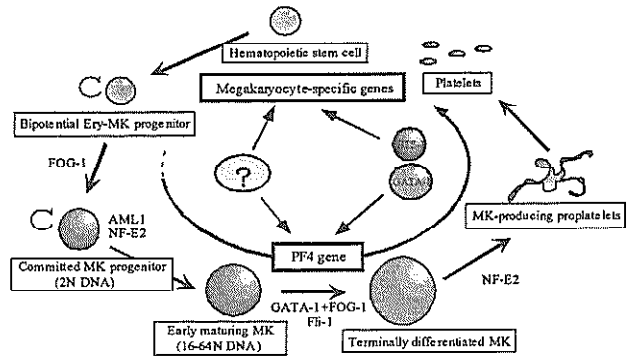


図1 巨核球の分化・成熟と転写因子

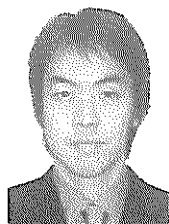
的にも機能的にも劇的な変化を伴うが、この過程に關与する遺伝子産物は膨大であると予想される。しかし、過程全容の解明には、これら因子一つ一つの解析が必要であり、我々はまず血小板系列に不可欠な遺伝子の発現を制御する転写因子についての研究を始めた。すなわち、血小板系列に必要な膨大な数の遺伝子を解析する代わりに、それらの遺伝子の発現制御を行う数少ない転写因子の種類、発現時期、機能についての解析を行い血小板系列の全体像を大まかに知ろうというアプローチである。図1に現在までに明らかにされた転写因子を示すが、我々はこの図に新たに加えるべき転写因子を同定するために、血小板系列にのみ発現が認められる血小板第4因子(PF4)遺伝子の発現制御領域の解析を進めてきており¹⁻⁶⁾、最近、新たな知見を得たので紹介したい⁷⁻⁹⁾。

PF4遺伝子プロモーターに存在する 新規転写調節領域の同定

PF4遺伝子のプロモーターにおける新規転写調節領域を同定するために、PF4遺伝子のプロモーター領域1.1kbを部分断片にわけ、ルンフェラーゼ遺伝



* Takefumi DOI
1955年8月生
1984年大阪大学大学院薬学研究所博士課程修了
現在、大阪大学大学院・薬学研究科、教授、薬学博士、分子生物学
TEL 06-6879-8158
FAX 06-6879-8158
E-Mail doi@phs.osaka-u.ac.jp



** Yoshiaki OKADA
1975年6月生
2003年大阪大学大学院薬学研究所生命情報環境科学博士後期課程修了
現在、Harvard Medical School, Beth Israel Deaconess Medical Center, Molecular and Vascular Medicine, reseach fellow, Ph.D., 分子生物学
TEL +1-617-667-5741
E-Mail yokada@bidmc.harvard.edu

子の上流に組み込んだレポータープラスミドを作成した。なお、隣り合う断片には機能配列の分断を避けるためにいくらかの重なりを持たせた。このプラスミドを、非造血系細胞株である、HepG2, HeLaの各細胞, 比較的未分化な造血系細胞であるK562細胞, 巨核球形質を持つHEL細胞の4つの細胞株に導入しその活性を評価した。その結果, ある領域が非造血系細胞株においてPF4遺伝子のプロモーター全長を用いた時と同等の活性の低下が見られたが, 造血系細胞には見られないことが明らかとなった。この配列には, ETS-1結合モチーフに似た配列, 二つのTGACAGモチーフ(MEIS1, PREP1の結合モチーフとして知られている), 3つの連続したE-boxモチーフが存在し, この配列をTME(tandem repeat of MEIS1 binding element)と名付けた(図2)。これらのモチーフの存在から, TMEへの転写因子の結合が予想され, TMEをプローブとしゲルシフトアッセイを行った結果, すべての細胞株の核抽出液中にTMEに特異的に結合するタンパク質が存在し, 特に巨核球形質を持つHEL細胞に多く存在することが明らかとなった。

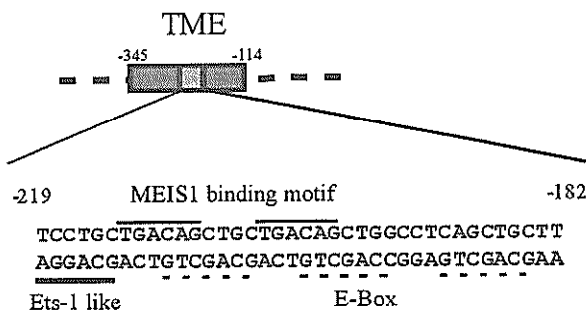


図2 巨核球特異的発現に關与するDNA配列

新規転写調節領域(TME)結合タンパク質の同定

PF4遺伝子のプロモーター上のTME領域にタンパク質が結合することが明らかとなったため, 次にこのTMEに結合するタンパク質の探求を行った。TME配列を用いたDNAアフィニティーカラムによる結合タンパク質の精製を試みた。まず, 大量調製したHEL細胞の核抽出液とTMEの末端をビオチン化したオリゴヌクレオチドを混合した後, この混合物をアビジン樹脂を詰めたカラムに通し, TMEとタンパク質の複合体をカラムに結合させた。その後

カラムを十分に洗浄し, KClにより結合タンパク質を溶出した。得られたフラクションを用いてゲルシフトアッセイを行い, その結果からTME結合活性フラクションを集めた。このフラクションをさらにイオン交換カラムクロマトグラフィーなどにより精製することを試みたが, 精製を重ねるごとに活性の低下が見られ複合体が壊されていることが予想された。そこで, アフィニティーカラム後のフラクションに含まれるタンパク質を, 総て質量分析装置を用い同定することにした。SDS-PAGEからバンドを切り出し, DTTによる還元, ヨードアセトアミドによるアルキル化後, ゲル中でトリプシン消化を行い, マススペクトル用のサンプルとした。LC-MS/MSによる解析からペプチドの一次構造を決定し, 解析プログラムSEQUESTを用いてデータベースサーチを行った結果, さまざまな核酸結合タンパク質が同定され, そのなかにはいくつかの転写因子も含まれていた(表)。これらの中から, TME中に結合モチーフが含まれ直接の結合が予想されたUSF-2, ならびに造血系への関与が示唆されるPBX(PBX1とPBX2)とAML1の3つの転写因子に注目し以後の解析を行った。

表 質量分析装置により同定されたタンパク質

| Ionid (kDa) | Search result |
|-------------|--|
| 114 | human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U) |
| 90 | human PTF-associated splicing factor (PSF) |
| 90 | KU70 human ATP-dependent DNA helicase II, 70kD subunit (LUPUS KU AUTANTIGEN PROTEIN P70) |
| 90 | human nuclear protein NOP56 (hnNop56) |
| 80 | human probable RNA-dependent helicase p72 (dead box protein p72) |
| 80 | human putative pre-mRNA splicing factor RNA helicase |
| 80 | human proto-oncogene tyrosine-protein kinase ABL (P150) |
| 65 | DDX5 human probable RNA dependent helicase p68 (dead box protein p68) |
| 65 | GAP-associated tyrosine phosphoprotein p62 |
| 65 | Fus human RNA-binding protein FUS |
| 55 | similar to human zinc finger protein, BR140 |
| 55 | NR54 human 54kD nuclear RNA-binding protein (p54(NRB)) |
| 45 | hnRNP G protein |
| 45 | transcription factor NF-A1 45k chain |
| 43 | upstream stimulatory factor (USF2) |
| 43 | pbx3 human preB cell leukemia transcription factor-3 (homeobox protein PBX3), pbx1 or pr1 |
| 43 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like protein |
| 43 | E-box-binding repressor ZEB |
| 40 | ROA2 human heterogeneous nuclear riboprotein A2/B1 |
| 40 | Foxed box protein Pax-5 |
| 40 | FBRNP heterogeneous ribonucleoprotein homolog |
| 40 | ROA1 mouse heterogeneous nuclear riboprotein A1 (helix-destabilizing protein)(single strand binding protein) |
| 40 | FBRNP (heterogeneous ribonucleoprotein homolog) |
| 40 | human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 (hnRNP A3) FBRNP |
| 40 | human heterogeneous nuclear proteins C1/C2 (hnRNP C1 and hnRNP C2) |
| 33 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein |
| 28 | transcription factor C/EB alpha 2, splice form 1, AML1a protein |
| 28 | nonhistone chromosomal protein HMG-1 |
| 28 | T203 human transcription initiation factor TFIID 30kD subunit (TBP associated factor 30kD subunit) |

ホメオドメインタンパク質PBXについての解析

ホメオドメインタンパク質PBXは, 白血病関連遺伝子として同定されたものであり, 遺伝子転座が原因で発現する融合タンパク質E2A-PBXは白血病を引き起こす。また, PBX1のノックアウトマウ

スは、造血細胞分化の多くの系列でその分化阻害が認められている。また、PBXは同じくホメオドメインタンパク質であるHOXA9, MEIS1, PREP1と相互作用し、これら相互作用因子の造血系への関与も示唆されている。今回、同定したTME中には二つのTGACAGモチーフ(MEIS1, PREP1の結合モチーフ)が含まれており、PBXがMEIS1, PREP1を介してTMEに結合している可能性が考えられたため、これらのTMEへの結合とPF4遺伝子のプロモーターへの影響について検討を行った。

はじめにPBXとMEIS1についての解析を行った。まず、これらが実際にTMEに結合することをスーパーシフトアッセイにより確認した後、TMEへの結合様式を種々の因子の組合せによるゲルシフトアッセイを行い明らかにした。すなわちPBXのTMEへの結合にはMEIS1が必要であり、PBXはMEIS1を介してTMEに結合していることが示唆された。

次に、これらのPF4遺伝子発現への影響を、HepG2細胞を用いたレポーター遺伝子(ルシフェラーゼ)発現系により確認した結果、MEIS1, PBXは、MEIS1/PBX複合体を形成して初めてPF4遺伝子の転写を活性化できることを明らかにした。さらに、既知のPF4遺伝子のプロモーター活性化因子であるGATA-1, ETS-1とMEIS1, PBXを共発現させると、活性化効果が相乗的に増加し、最大20倍の転写活性化を示すことが明らかとなった。

PREP1はMEIS1ホモログであり、PBXと相互作用する因子として同定されている。PREP1がDNAアフィニティーカラムの精製フラクションにも含まれていたことから、PREP1もMEIS1と同様の働きをすることが考えられた。そこで、先と同様の解析を行った結果、PREP1は単独でも、PBXとの複合体を形成してもTMEに結合でき、MEIS1と同様にPF4の発現制御に関与していることが示唆され、ホモログ間で類似した機能をもつことが明らかとなった。

USFについての解析

USFは、E-boxモチーフに結合するbHLH(basic Helix-Loop-Helix)構造を持つ転写因子である。USFのファミリーの中にはUSF-1, 2が存在し、ホモ、ヘテロ二量体を組んでDNAに結合することが知られている。USFのTMEへの結合を確認した結

果、USF-1, 2単独でも、両者を加えた場合でも結合活性があることが判明した。次に、PF4遺伝子発現への影響についてHepG2細胞を用いた強制発現系で解析したところ、USF-1単独で7倍、USF-2単独で12倍、両者を同時に強制発現させた場合には14倍まで強く活性化されることが明らかとなり、USF-1, 2は、TMEに結合し、PF4遺伝子のプロモーターを活性化することが明らかとなった。

AML1についての解析

AML1(別名Cbfa2, Runx1, Pebp2 α B)は、急性骨髄性白血病患者の細胞において、遺伝子転座を始めとする遺伝子変異を起こしていることが知られている。この遺伝子の欠損は、成体型造血の欠損をもたらすことから、造血細胞全般へのAML1遺伝子の関与が考えられている。また、AML1遺伝子に変異をもつ家系においては、血小板減少症(FPD: Familial Platelet Disorder)を発症する頻度が高いことが報告されていることから、AML1は成体型造血全般における役割とは別に、血小板系列特異的な役割を持っていると考えられている。

今回、我々はTME結合因子としてAML1とETS-1を同定した。そこで、これら因子とAML1との相互作用が知られているCBF β を加えた3因子が、PF4遺伝子発現にどう影響するかについて調べた。その結果、各因子単独ではほとんど転写活性化されなかったが、AML1, ETS-1の共発現で6倍、AML1, CBF β の共発現で12倍、3因子の強制発現では25倍にまで強く活性化されることが判明した。この結果から、AML1はその相互作用因子ETS-1, CBF β とそれぞれ協調的に機能しPF4遺伝子のプロモーターを活性化することが明らかとなった。

おわりに

以上のように、巨核球(血小板)系列特異的発現に関与するDNA配列の決定と、その領域に作用するタンパク質因子群の同定に成功した。これらの成果は*in vitro*での結果であるが、これらの因子が本当に細胞内でその領域に結合しているであろうか。我々はそのことを確かめるために、クロマチン免疫沈降法と呼ばれる方法を用いて核内での結合を調べた結果、実際に細胞内で結合していることを確認することができた。

さらに、これらの因子が造血幹細胞から巨核球に分化・成熟していく過程で発現されているかをヒトの臍帯血を用いて調べ、造血幹細胞の時から発現しているものもあれば分化に伴って発現するものも存在することを明らかにした。

このように、巨核球特異的に発現されるPF4遺伝子の発現に関わる因子群の同定に成功したが、現在、これらが造血幹細胞から巨核球への発現にどのように関与しているかを明らかにする試みを、これら因子の遺伝子発現をノックダウンすることにより行っている。

文 献

- 1) Structure of the rat platelet factor 4 gene : a marker for megakaryocyte differentiation. T.Doï, S.M.Greenberg & R.D.Rosenberg *Mol. Cell. Biol.*, 7, 898-904 (1987)
- 2) Transcriptional regulation of the rat platelet factor 4 gene: Interaction between an enhancer/silencer domain and the GATA site. K.Ravid, T.Doï, D.Beeler, D.J.Kuter & R.D.Rosenberg *Mol. Cell. Biol.*, 11, 6116-6127 (1991)
- 3) Selection of an HEL-Derived Cell Line Expressing High Levels of Platelet Factor 4. K.Ravid, D.J.Kuter, D.L.Beeler, T.Doï, & R.D.Rosenberg *Blood*, 81, 2885-2890 (1993)
- 4) An alternative form of nucleolysin binds to a T-cluster DNA in the silencer element of platelet factor 4 gene. T.Doï, T.Minami, M.Itoh, H.Aburatani, Y.Kawabe, T.Kodama, N.Kondo, Y.Satoh, T.Asayama, & T.Imanishi *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 235, 625-630 (1997)
- 5) Both Ets-1 and GATA-1 are essential for positive regulation of platelet factor 4 gene expression. T.Minami, K.Tachibana, T.Imanishi, & T.Doï *Eur. J. Biochem.* 258, 879-889 (1998)
- 6) Identification of a chromosome-targeting domain in the human condensin subunit CNAP1/hCAP-D2/Eg7. A.R.Ball Jr., J.A.Schmiesing, C.Zhou, H.C.Gregson, Y.Okada, T.Doï, & K.Yokomori *Mol. Cell. Biol.*, 22, 5769-5781 (2002)
- 7) Homeodomain proteins, MEIS1 and PBX, regulate the lineage specific transcription of the platelet factor 4 gene. Y.Okada, R.Nagai, T.Sato, E.Matsuura, T.Minami, I.Morita, & T.Doï *Blood*, 101, 4748-4756 (2003)
- 8) PREP1, MEIS1 homolog protein, regulates PF4 gene expression. Y.Okada, R.Nagai, T.Sato, E.Matsuura, T.Minami, I.Morita, & T.Doï, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305, 155-159 (2003)
- 9) Upstream stimulatory factors stimulate transcription through E-box motifs in the PF4 gene in megakaryocytes. Y.Okada, E.Matsuura, Z.Tozuka, R.Nagai, A.Watanabe, K.Matsumoto, K.Yasui, R.W.Jackman, T.Nakano and T.Doï *Blood*, 104, 2027-2034 (2004).

