

## <はしがき>

血液細胞の分化は組織特異的転写因子により制御されている。これらの転写因子は他の転写因子や転写共役因子との相互作用を通じて分化に必要な遺伝子の発現調節を行なっている。Ets ファミリー転写因子のうちのいくつかのものは血球分化にとって必須なばかりでなく、白血病の発症にも関与することが知られている。一方、動物の発生において重要な転写因子であるホメオドメイン蛋白質も血液細胞の分化や白血病の発症に関与することが示されている。そこで本研究においては、両転写因子群に属する蛋白質間の相互作用を検索し、その血球分化における重要性を検討することを目的とした。

## <研究組織>

研究代表者： 山田俊幸 （弘前大学 医学部助教授）

研究分担者： 根岸文子 （財団法人佐々木研究所 細胞遺伝部研究員）

## <交付決定額>

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
平成16年度	1,700,000	0	1,700,000
平成17年度	1,400,000	0	1,400,000
総 計	3,100,000	0	3,100,000

## <研究発表>

### (1) 学会誌等

1. Yamada T, Suzuki M, Satoh H, Kihara-Negishi F, Nakano H and Oikawa T. Effects of PU.1-induced mouse calcium-calmodulin-dependent kinase I-like kinase (CKLiK) on apoptosis of murine erythroleukemia cells. *Exp. Cell Res.* 294: 39-50, 2004.
2. Kihara-Negishi F, Suzuki M, Yamada T, Sakurai T and Oikawa T. Impaired repressor activity and biological functions of PU.1 in MEL cells induced by mutations in the acetylation motifs within the ETS domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335: 477-484, 2005.
3. Teramoto S, Kihara-Negishi F, Sakurai T, Yamada T, Hashimoto-Tamaoki T, Tamura S, Kohno S and Oikawa T. Classification of neural differentiation-associated genes in P19 embryonal carcinoma cells by their expression patterns induced after cell aggregation and/or retinoic acid treatment. *Oncogene Rep.* 14: 1231-1238, 2005.
4. Nanashima N, Asano J, Hayakari M, Nakamura T, Nakano H, Yamada T, Shimizu T, Akita M, Fan Y and Tsuchida S. Nuclear localization of STAT5A modified with *O*-linked *N*-acetylglucosamine and early involution in the mammary gland of Hirosaki Hairless Rat. *J. Biol. Chem.* 280: 43010-43016, 2005.
5. Suzuki M, Yamada T, Kihara-Negishi F, Sakurai T, Hara E, Tenen DG, Hozumi N and Oikawa T. Site-specific methylation by a complex of PU.1 and Dnmt3a/b. *Oncogene*, in press.

### (2) 口頭発表

#### (国際学会)

1. Yamada T, Nakazawa Y, Manabe N, Mochizuki M, Oikawa T: Cooperative and antagonistic interactions between ETS and Gfi-1 transcription factor families. JBS International Symposium in 2005, New Frontier of Transcription Research, Kusatsu, Japan,

2005.

2. Yamada T, Suzuki M, Satoh H, Kihara-Negishi F, Nakano H, Sakurai T, Oikawa T and Tsuchida S. Effects of PU.1-induced mouse calcium-calmodulin-dependent kinase I-like kinase (CKLiK) on apoptosis of murine erythroleukemia cells. 9th Meeting of the Hirosaki International Forum of Medical Science. Hirosaki, Japan, 2005.

(国内学会)

1. 山田俊幸、根岸（木原）文子、櫻井拓也、及川恒之：Ets ファミリー転写因子とホメオボックス転写因子の機能的相互作用。第63回日本癌学会総会、福岡、2004.
2. 根岸（木原）文子、山田俊幸、櫻井拓也、及川恒之：Ets ファミリーFli-1 と白血病関連転写因子 AML1 との相互作用の解析。第63回日本癌学会総会、福岡、2004.
3. 鈴木光浩、山田俊幸、根岸（木原）文子、及川恒之：Ets ファミリー転写因子 PU.1 と DNMTs の相互作用によるエピジェネティックな転写制御と DNA メチル化制御。第63回日本癌学会総会、福岡、2004.
4. 中澤洋介、鈴木光浩、山田俊幸、根岸（木原）文子、橋本嘉幸、望月正隆、及川恒之：Ets ファミリー転写因子と血液細胞特異的転写因子 Gfi-1, Gfi-1B との相互作用。第63回日本癌学会総会、福岡、2004.
5. 櫻井拓也、近藤信夫、新井仁明、浜田淳一、山田俊幸、山本三毅夫、及川恒之：Ets ファミリー転写因子 Fli-1 の乳がん細胞のアポトーシスにおよぼす影響。第63回日本癌学会総会、福岡、2004.
6. 中澤洋介、鈴木光浩、山田俊幸、根岸文子、及川恒之、望月正隆：血球分化における転写因子 Ets-1 と Gfi-1 の相互作用の解析。第125回日本薬学会年会、東京、2005.
7. 山田俊幸、根岸（木原）文子、櫻井拓也、及川恒之、土田成紀：血球分化に重要な Ets ファミリー転写因子とホメオドメイン蛋白質の相互作用。第71回日本生化学

学会東北支部例会、仙台、2005.

8. 山田俊幸、木原（根岸）文子、櫻井拓也、及川恒之：Ets ファミリー転写因子とホメオドメイン蛋白質の物理的、機能的相互作用. 第 64 回日本癌学会総会、札幌、2005.
9. 木原（根岸）文子、山田俊幸、鈴木光浩、櫻井拓也、及川恒之：白血病関連転写因子 PU.1 のアセチル化・リン酸化による修飾制御とその生物学的機能. 第 64 回日本癌学会総会、札幌、2005.
10. 鈴木光浩、木原（根岸）文子、山田俊幸、及川恒之：Ets ファミリー転写因子 PU.1 と Dmrt3s との相互作用による p16INK4a 遺伝子の転写制御と DNA メチル化制御. 第 64 回日本癌学会総会、札幌、2005.
11. 櫻井拓也、近藤信夫、新井仁明、浜田淳一、山田俊幸、山本三毅夫、及川恒之：Ets ファミリー転写因子の乳がん細胞の悪性度におよぼす影響. 第 64 回日本癌学会総会、札幌、2005.
12. 五十嵐麻希、吉田緑、山田俊幸、櫻井拓也、植松史行、高橋正一、前川昭彦、及川恒之、中江大：ラット肺腺がんの発生過程における $\beta$ -カテニンの変化に関する検索. 第 64 回日本癌学会総会、札幌、2005.
13. 七島直樹、浅野純平、清水武史、秋田美季、範洋、山田俊幸、土田成紀：Hirotsaki hairless rat (HHR) の乳腺における核内受容体転写共役因子 (PBP, SRC) の発現変化. 第 64 回日本癌学会総会、札幌、2005.
14. 浅野純平、七島直樹、清水武史、秋田美季、範洋、山田俊幸、土田成紀：オエルオキシソーム増殖剤によるラット肝二頭酵素 (BE) 誘導の個体差における steroid receptor coactivator (SRC) 3 の関与. 第 64 回日本癌学会総会、札幌、2005.
15. 七島直樹、浅野純平、秋田美季、清水武史、範洋、山田俊幸、土田成紀：HHR の乳腺における O-GlcNAc 修飾による STAT5A の活性化. 第 78 回日本生化学会大会、神戸、2005.

16. 浅野純平、中野創、早狩誠、七島直樹、清水武史、範洋、秋田美季、山田俊幸、土田成紀：SRC3 はグルタチオントランスフェラーゼ遺伝子多型ラットにおけるクロフィブレートによる肝ペロキシソーム二頭酵素誘導の差異に係わる．第 78 回日本生化学会大会、神戸、2005.
17. 秋田美季、七島直樹、浅野純平、清水武史、範洋、山田俊幸、中野創、土田成紀：弘前ヘアレスラットにおける皮毛の減少と表面構造の変化．第 78 回日本生化学会大会、神戸、2005.

### (3) 出版物

1. Oikawa T, Yamada T, Kihara-Negishi F and Sakurai T. Ets family of transcription factors in normal hematopoiesis and in leukemogenesis. Molecular Genetics of Cancer (Review) Ed. by D. Sinnet, Research Signpost, pp119-148, 2005.

## <研究目的>

すべての血液細胞は造血幹細胞に由来するが、その分化は組織特異的転写因子による細胞系列特異遺伝子の発現調節により制御されている。これらの転写因子は他の転写因子や転写共役因子との相互作用を通じて標的遺伝子の発現調節を行なっているものと考えられている。

Ets ファミリー転写因子群は Ets ドメインを DNA 結合ドメインとして持つ転写因子のグループであるが、そのうちのいくつかのものは血球分化にとって重要な役割を果たすばかりでなく、その発現異常や染色体転座によるキメラ蛋白質の形成は白血病の発症にも関わることが知られている。

我々はこれまでに血球分化における Ets ファミリー転写因子の役割について解析を進め、その一員である PU.1 が赤血球系細胞の分化を骨髄単球系細胞へとスイッチさせることのできる分化制御のマスター因子であること、また一方で PU.1 は赤血球系細胞の分化を抑制することで赤白血病発症に寄与することを示してきた。さらに PU.1 はその機能を発現する上で転写の共役因子である CBP や HDAC、またメチル化 DNA に結合することが知られている MeCP2 と協調作用することを見い出してきた。また PU.1 以外の Ets ファミリー転写因子についても、TEL が巨核球の分化を抑制することを見い出し報告してきた。

一方、動物の発生や形態形成において重要な働きをするホメオドメイン蛋白質はホメオドメインを DNA 結合ドメインとして持つ転写因子であるが、血液細胞の分化にも深く関与していることが示されている。これらの蛋白質には Hox 蛋白質群を始めとして、これらと相互作用する Pbx1 や Meis1 などが含まれている。これまでに HoxA10 と HoxC4 がそれぞれ骨髄球系細胞の分化やリンパ球系細胞の活性化に関わることや、HoxA9 や HoxC13 あるいは Pbx1 が染色体転座を通じて白血病の発症に関わることも知られている。

このように両ファミリーに属する転写因子は血球分化にとって重要であるが、現在までにその相互作用については知られていない。そこで本研究においては、両転写因子群に属する蛋白質間の相互作用を検索し、その血球分化における重要性を検討することを目的とした。

## ＜研究結果＞

### （１）Ets ファミリー転写因子とホメオドメイン蛋白質の 機能的相互作用

まず検索の対象となる Ets ファミリー転写因子およびホメオドメイン蛋白質を決定するため、RT-PCR により種々のマウス血液細胞株（B 細胞、T 細胞、骨髄球系細胞、赤血球系細胞を含む）におけるこれら遺伝子の発現パターンを検索した。その結果を踏まえて Ets ファミリー転写因子としては Ets-1, Ets-2, PU.1, Spi-B, Fli-1, Elf-1, Erg-3, TEL を、ホメオドメイン蛋白質としては HoxA10, HoxC13, Pbx1B, Meis1 を候補に挙げ以下の解析を行った。

Ets 結合配列を持つレポーターを用いたルシフェラーゼ法によりそれぞれの Ets ファミリー転写因子の働きに対するホメオドメイン蛋白質の影響を検索したところ、HoxA10 と HoxC13 は PU.1 と Spi-B に対しては協調的に、Elf-1, Erg-3, Ets-2 に対しては拮抗的に働いたが、その他に対してはいずれの作用も示さなかった。また Pbx1B はすべての Ets ファミリー転写因子に対していかなる作用も示さず、Meis1 は Ets-1 と Ets-2 に対しては拮抗作用を示したがその他に対してはいずれの作用も示さなかった。

これらのことから、血球分化に関与する Ets ファミリー転写因子とホメオドメイン蛋白質の、少なくともいくつかのものの間には機能的な相互作用が存在することが明らかとなった。

### （２）Ets ファミリー転写因子とホメオドメイン蛋白質の 物理的相互作用

次にこれらの組み合わせの中から、リンパ球系、骨髄球系両細胞系列の分化に関与する Ets 転写因子である PU.1 と Elf-1、染色体転座を通じて白血病の発症に関与しているホメオドメイン蛋白質である HoxC13 に注目してこれらの物理的相互作用を検索した。

PU.1 と HoxC13 あるいは Elf-1 と HoxC13 を 293T 細胞に共発現させ免疫沈降法により解析したところ、これらはそれぞれ細胞中で結合することが示された。またこれら蛋白質の欠失変異体を用いた GST pull-down 法により、HoxC13 はホメオドメインの

中間より C 末端側の部分を介して PU.1、Elf-1 と結合すること、PU.1 は Ets ドメインを介して HoxC13 と結合することが明らかになった。さらに PU.1、Elf-1 との結合領域を欠いた変異 HoxC13 はこれら蛋白質との機能的な相互作用を示さないことから、これら蛋白質同士の結合はそれぞれの組み合わせによる協調作用、および拮抗作用に必要であると考えられた。

次にマウス赤白血病 (MEL) 細胞を DMSO により赤血球方向へ分化誘導した場合のそれぞれの遺伝子発現を PT-PCR 法により検索したところ、PU.1 と HoxC13 の遺伝子発現はともに低下するが、Elf-1 の遺伝子発現は上昇することが示された。

これらのことから、PU.1、Elf-1 と HoxC13 の間には物理的な相互作用が存在し、その相互作用が血液細胞の分化の制御になんらかの関わりをもつものと推察された。

## <考 察>

今回の研究から血液細胞で発現している Ets ファミリー転写因子とホメオドメイン蛋白質のうちの少なくともいくつかのものは物理的、機能的に相互作用することが明らかになった。ルシフェラーゼ法による検索において、HoxC13 と HoxA10 は 8 種類の Ets ファミリー転写因子のうち PU.1 と Spi-B に対しては協調作用を、Elf-1、Erg-3、Ets-2 に対しては拮抗作用を示した。しかしながら Pbx1B と Meis1 は前者が Ets-1 と Ets-2 に対して拮抗作用を示しただけで、その他の Ets ファミリー転写因子に対してはいずれの作用も示さなかった。HoxC13 と HoxA10 はその遺伝子がクラスターを形成している Hox 蛋白質群に属しその構造も類似しているが、Pbx1 と Meis1 は Hox 蛋白質群に属さずその構造も Hox 蛋白質とは異なっている。このようなことが、Ets ファミリー転写因子に対する作用の違いの原因のひとつと考えられた。

HoxC13 と HoxA10 は、PU.1 と Spi-B に対してはともに協調的な作用を示した。この理由として PU.1 と Spi-B の構造がよく似ていること、また両者は B 細胞の分化に関わるという機能的類似性を持つことがあげられる。しかしながら一方、Ets-1 と Ets-2 もその構造がよく似ているにもかかわらず、HoxC13 と HoxA10 は前者に対してはいかなる作用も示さず後者に対してのみ拮抗作用を示した。これらのことから、構造の類似性よりも機能の類似性により相互作用の質が規定される可能性が推察された。

本研究のルシフェラーゼ法に用いたレポーターは Ets 結合配列を持つがホメオドメイン蛋白質の結合配列は持たないものであった。そこで今回観察された協調作用、拮



抗作用はホメオドメイン蛋白質が Ets ファミリー転写因子に対して転写共役因子として働いた結果であると思われる。HoxC13 と HoxA10 は Ets ファミリー転写因子のうちのあるものには協調作用を、またあるものには拮抗作用を示したので、それ自体がコアクチベーターまたはコリプレッサーの活性を持つとは考えにくい。免疫沈降法、GST pull-down 法により少なくとも HoxC13 と HoxA10 は PU.1、Elf-1 と直接結合することか示されたことから、DNA に結合した Ets ファミリー転写因子にホメオドメイン蛋白質が結合し、さらに CBP などのコアクチベーターや HDAC などのコリプレッサーが呼び込まれるものと考えられた。また PU.1、Elf-1 との結合領域を欠いた変異 HoxC13 はこれら蛋白質との協調作用や拮抗作用を示さなかったことから、コアクチベーターやコリプレッサーはこの場合には HoxC13 に結合するものと思われた。

MEL 細胞の赤血球分化の過程で HoxC13 の遺伝子発現と HoxC13 が協調的に働く PU.1 の遺伝子発現は共に低下したが、HoxC13 が拮抗的に働く Elf-1 の遺伝子発現は増加した。我々は以前、PU.1 が赤血球分化を抑制することで MEL 細胞の白血病化に寄与している可能性を報告した。HoxC13 と血液細胞の関係についてはこれまでにヒト急性骨髄性白血病に見られる染色体転座によって同遺伝子が再構成しているという報告があるのみで、血球分化における HoxC13 の役割は不明であった。今回の結果から、HoxC13 も PU.1 との協調作用を通じて赤血球分化を抑制し赤白血病の発症に関与する可能性が考えられたが、この点に関しては現在 HoxC13 の遺伝子を導入した MEL 細胞を樹立し検討中である。一方、ELF-1 は赤血球分化に促進的に働き、PU.1 や HoxC13 と拮抗しているのかもしれない。

本研究により血液細胞で発現している Ets ファミリー転写因子とホメオドメイン蛋白質の間には相互作用が存在することが明らかになり、その相互作用が血球の分化やがん化の過程でなんらかの役割を果たすという可能性が示唆された。今後はこれらの知見をもとにこの方面での研究を展開していく予定である。