

巨核球・血小板系列の遺伝子発現に関する転写因子

土井 健史

Transcription Factors Responsible for Megakaryocyte-specific Gene Expression

Takefumi DOI

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita 565-0871, Japan

(Received June 13, 2005)

Megakaryocytes are the hematopoietic precursors of platelets, which play an essential role in thrombosis and hemostasis. Platelet factor 4 (PF4) is expressed exclusively in megakaryocytes and platelets and serves as a lineage-specific marker of megakaryocytic differentiation. We previously characterized a number of upstream enhancer and repressor elements and demonstrated that GATA-1 and ETS-1 are important for PF4 gene expression. Recently, we have determined the novel regulatory element termed “TME” in the PF4 promoter and identified a group of binding proteins from megakaryocytic HEL cells. Here we review the function of these proteins in PF4 gene expression and discuss megakaryocyte-specific gene expression and megakaryocytopoiesis.

Key words—megakaryocyte; transcription; platelet factor 4; promoter; transcription factors

1. はじめに

巨核球は、すべての血液系細胞の源となる多能性血液幹細胞が一方向に分化・増殖し産生される1系列の細胞であり、核内DNAの多倍体化と言う特徴的な分化・成熟過程を経て最終的に血小板を放出する。

血液幹細胞が巨核球系前駆細胞、巨核球系細胞へと分化・成熟する過程に関する因子の探求は、今から30年以上も前から多くの人々によって研究されてきた。これらの研究から、interleukin 3 (IL-3), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin 6 (IL-6), interleukin 11 (IL-11), oncostatin, leukemia inhibitory factor (LIF), erythropoietin (EPO) などが関与することが示されてきたが、血小板減少時に特異的に血小板増加作用を示す因子として、いわゆる thrombopoietin (TPO) の正体が明るみに出たのは今から約10年前のことである。¹⁻⁴⁾ この発見により巨核球の分化・成熟機構の解明とTPOの臨床応用への

期待が高まった。現在、TPO受容体からのシグナル伝達に関して、Janus family of protein tyrosine kinase 2 (JAK2) などのチロシンリン酸化酵素の活性化による signal transducers and activators of transcription (STATs) などを介する経路、^{5,6)} Ras系から mitogen-activated protein kinase (MAPK) を通る Ras シグナルカスケード、⁷⁾ phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) から Akt を介する経路、protein kinase C (PKC) 活性化経路などが明らかになっている。^{8,9)} しかし、その先の巨核球の成熟機構、マーカータンパク質の形質発現機構まではほとんど明らかにされていない。

巨核球の分化・成熟に関する遺伝子発現レベルでの分子機構については、いくつかの転写因子が関与することが明らかにされている。遺伝子欠損マウスを用いた実験より、転写因子 GATA-1, nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2), Fli-1, acute myeloid leukemia 1 (AML1, 別名 Runx1) などが巨核球の分化・成熟に関与することが報告されている。¹⁰⁻¹⁴⁾ 中でも、GATA-1 は巨核球の分化に非常に重要な役割を果たしている転写因子であり、GATA-1 欠損マウスや GATA-1 のコファクターである friend of GATA-1 (FOG-1) との相互作用ができない GATA-1 変異を持ったヒトでは、大きく血小板数

大阪大学大学院薬学研究科蛋白質情報解析学分野 (〒565-0871 吹田市山田丘 1-6)

e-mail: doi@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、平成17年度日本薬学会学術振興賞の受賞を記念して記述したものである。

が減少していた。¹⁵⁾ Figure 1 に現在まで明らかにされている転写因子を示す。

巨核球系細胞の分化・成熟機構を解明するための他のアプローチとして、巨核球において特異的に発現するマーカータンパク質の発現制御機構を解明する方法がある。巨核球分化の早い時期に発現のみられる glycoprotein IIb (GPIIb), MPL や、それから少し遅れて発現のみられる platelet factor 4 (PF4), glycoprotein V (GPV), glycoprotein IX (GPIX) などについて、その発現制御機構が調べられてきた。¹⁶⁻²¹⁾

筆者らは、巨核球における分化・成熟の分子機構を明らかにする目的で、先に挙げたマーカータンパク質の内、ケモカインの1つである PF4 に着目し、この遺伝子の発現制御機構の解明を行ってきた。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、巨核球特異的発現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、これを基に血小板系列の遺伝子発現制御の全体像を知ろうというアプローチである。筆者らは、このアプローチにより、Fig. 1 に新たに加えるべき転写因子の同定をめざしている。本稿では、これまで行ってきた巨核球特異的発現遺伝子の発現機構を明らかにする研究について、PF4 遺伝子の発現制御に関わる転写因子の同定を中心

に、最近の知見を交え概説したい。

2. PF4 遺伝子の発現制御に関与する DNA 領域

筆者らは rat PF4 遺伝子のクローニングに成功し、その巨核球特異的発現に関与する領域がイントロン部や3'下流域にはなく、転写開始点より上流 1.1 kbp 領域に含まれることをみつけた。²²⁾ この 1.1 kbp について欠失変異体を作成して活性化領域を調べ、さらにそれに基づき点変異体を作成し詳しく調べた結果、Fig. 2 に示すように、コアのプロモーターとして-30 付近の GATA サイトが関与し、またエンハンサーとして-370, -130 付近の配列が活性化に働くことが判明した。^{23,24)} 一方、-160 付近の T-クラスター配列は抑制的に働いた。この5'側上流に存在する T-クラスターは、ラットだけでなくヒトの PF4 遺伝子のプロモーター領域にも存在するため、PF4 遺伝子の発現制御に重要な配列であることが示唆された。^{23,25)}

コアのプロモーター配列としての GATA 配列に加え、-130 付近にも GATA 配列があり、また-370 付近には Ets 結合配列が存在している。GPIIb 遺伝子の発現においては、GATA 配列と Ets 結合配列がその制御に関与することが報告されたことより、これらが PF4 遺伝子発現にどのような影響を及ぼすかについて検討を行った。²⁶⁾

巨核球系培養細胞に GATA 配列、Ets 結合配列

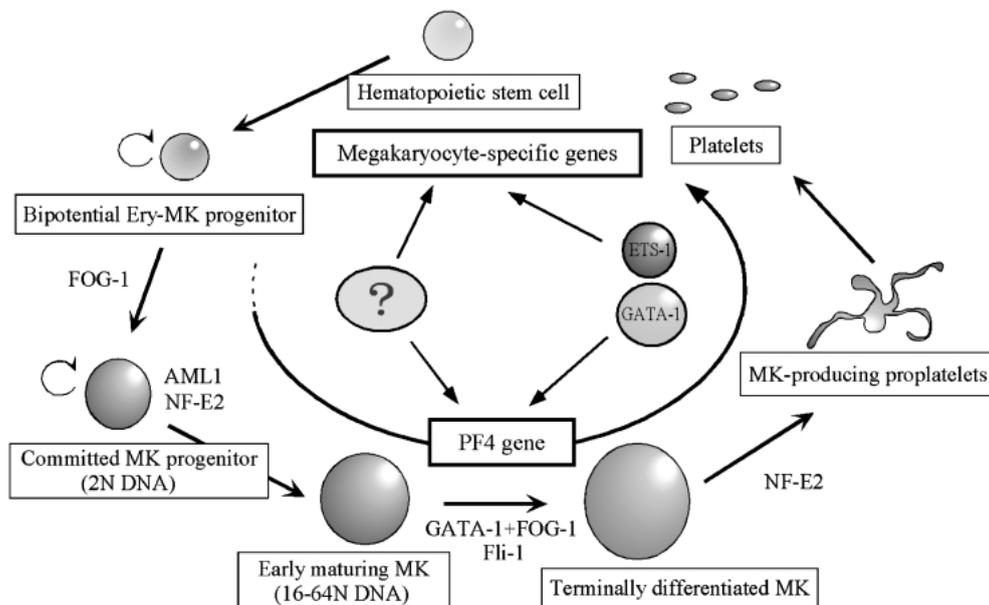


Fig. 1. Schematic Representation of Different Stages in Megakaryocyte Differentiation and Related Transcription Factors

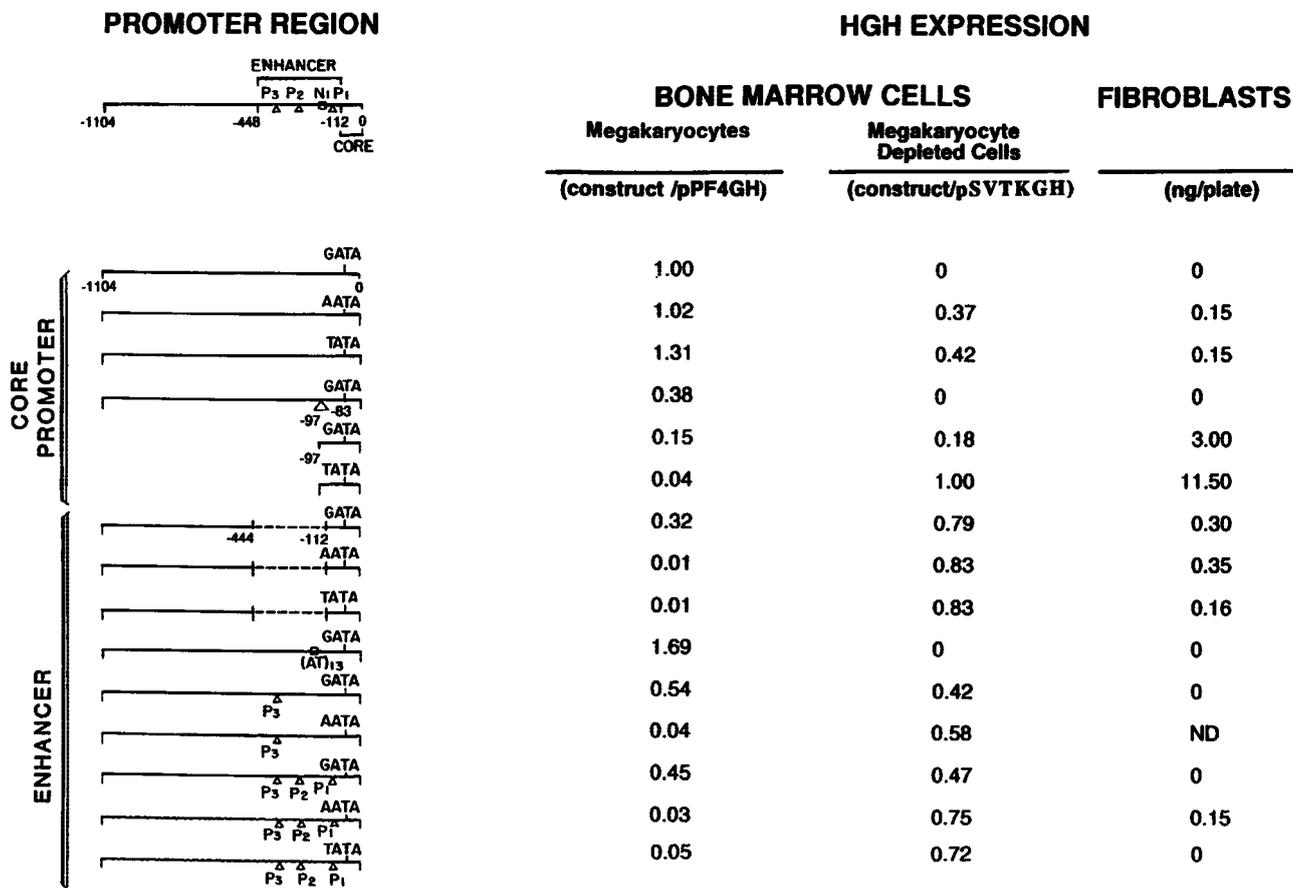


Fig. 2. Effect of Different PF4 Promoter Deletions and Mutations on Transcriptional Activity and Specificity
The triangles represent deletions of P1, P2 and P3 site.

にそれぞれ変異のある PF4 遺伝子プロモーターを有するレポータープラスミドを導入し、その発現を調べた結果、これらの配列が大きく関与することが明らかになった (Fig. 3). さらに、ゲルシフトアッセイにより、これらの配列には、GATA-1, Ets-1 がそれぞれ結合することが判明した。またこれら因子の PF4 プロモーターにおける転写活性化能を調べたところ、両因子を加えることにより巨核球における PF4 遺伝子の発現が 20 倍近く増加することが確認できた。

このように、PF4 遺伝子の発現には GATA-1 及び Ets-1 が大きく関与することが明らかになったが、これらの因子が発現しているにも関わらず PF4 遺伝子が発現しない赤血球系細胞などでは、これだけでは説明がつかず、別の制御機構が存在することが予想される。

そこで、次に PF4 遺伝子の巨核球特異的発現に関与する DNA 配列が他にも存在するのではないか

と予想し、そのエレメントの探索に着手した。²⁷⁾

PF4 プロモーターの下流にほとんどすべての細胞で働く SV40 プロモーターを接続したコンストラクトを作成し、非巨核球系細胞 HepG2 細胞における発現を調べた結果、SV40 プロモーター単独の場合に比べ発現が大きく低下した。そこで、次にこの効果が PF4 プロモーターのどの領域に存在するかを調べるために、5'-側からプロモーター配列を欠失させた変異体を作成し調べた結果、ある領域を欠如すると HepG2 における発現が大きく増加することが判明した。さらに、その欠如したプロモーター配列にその領域を加えるとその抑制効果が回復し、またその部分に変異の入った断片を加えた場合では、抑制効果が回復できないことが分かった。興味深いことに、この領域が欠如した PF4 プロモーターの巨核球系細胞における発現を調べたところ、発現の顕著な低下が観察された。この結果から、この領域には非巨核球系細胞における発現抑制、さら

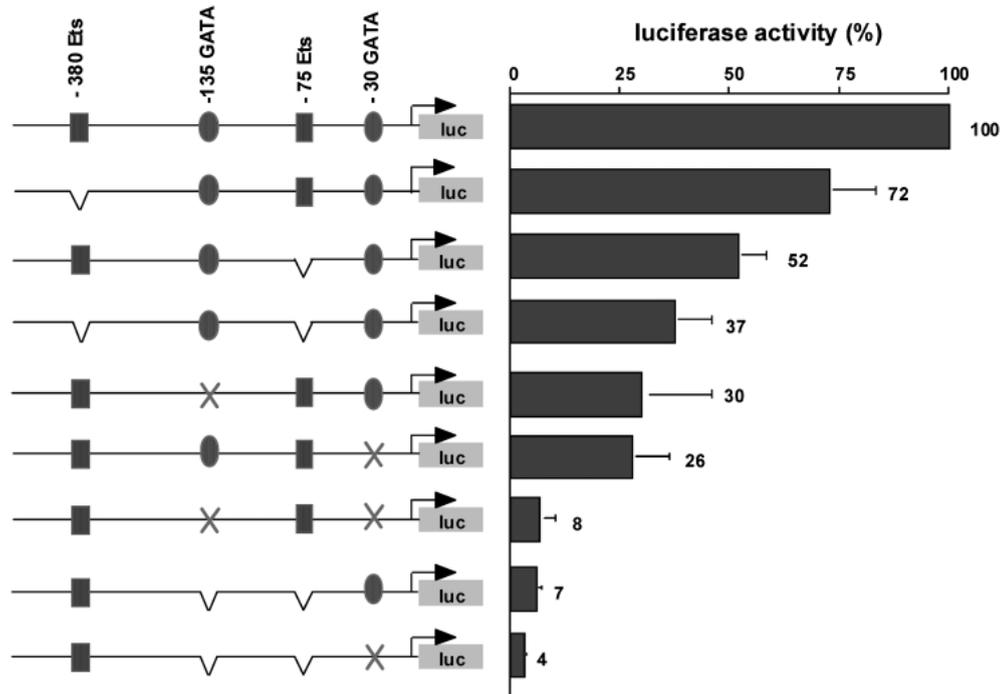


Fig. 3. The Effect of the Mutations of the GATA and Ets Motifs on the PF4 Promoter Activity
 V : designates the deletion point, X : indicates the point-mutated sequence.

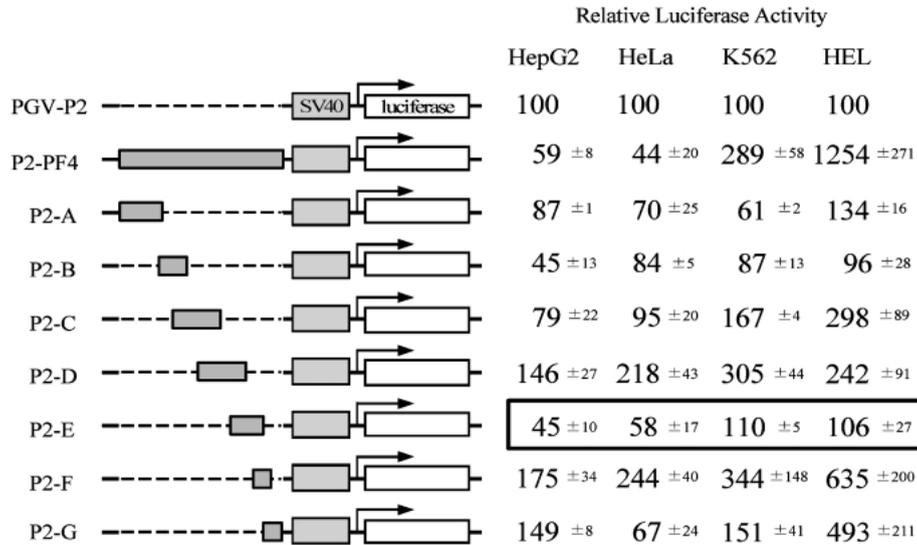


Fig. 4. Screening of the Regulatory Elements Related to the Tissue-specific Expression of the PF4 Gene
 Relative activities of the constructs containing PF4 promoter fragments in the 4 cell lines.

に巨核球系細胞における発現促進作用を担う情報が含まれていることが示唆された。

次に、PF4 プロモーター全域を種々断片に分け(ただし、それぞれの断片には隣り合う断片の配列が一部存在するように調製した)、先と同様にSV40 プロモーターの上流に組み込んだコンストラクトを作成し、これら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、これら断片の発現に及ぼす影響を評価した (Fig. 4)。その結果、先と同じ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ときと同等の活性の低下がみられた。一方、造血系細胞ではこの抑制効果はみら

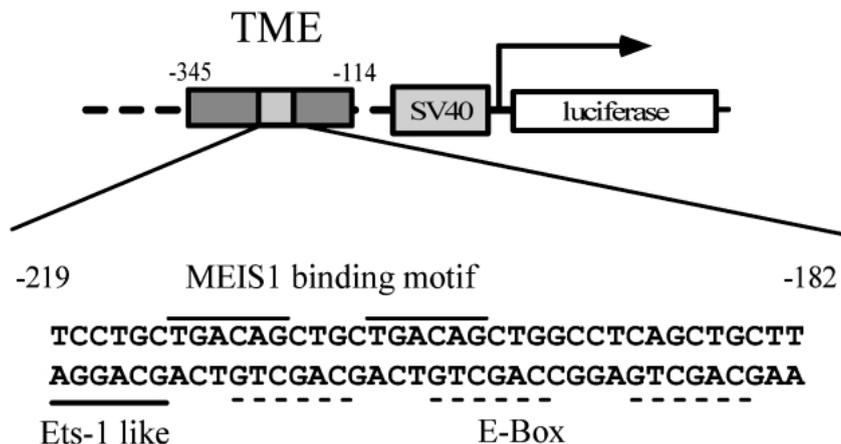


Fig. 5. Structure of the Novel Regulatory Element Found in the P2-E Fragment

れなかった。この配列には、Ets-1 結合モチーフに似た配列、2 つの TGACAG モチーフ (myeloid ecotropic integration site 1 (MEIS1), Pbx-regulating protein 1 (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 モチーフが存在しており、筆者らはこの配列を TME (tandem repeat of MEIS1 binding element) と名付けた (Fig. 5)。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。

いくつかの巨核球特異的発現マーカータンパク質遺伝子のプロモーター領域の模式図を Fig. 6 に示す。いずれのプロモーターにも共通に存在するエレメントのみを示したが、これから分かるように GATA, Ets エレメントが複数個それぞれのプロモーターに存在しており、これらが遺伝子発現に重要な働きをすると考えられる。さらに、今回筆者らが示した抑制、促進の両方に働くエレメントと相同性の高い配列がすべてのプロモーターに存在しており、これが巨核球特異的発現に深く関与することが予想された。

3. PF4 遺伝子の発現制御領域に結合するタンパク質の同定

これまでに PF4 遺伝子上に存在する発現制御領域を明らかにしてきたが、次に発現制御の分子機構を明らかにするために、この領域に結合するタンパク質の同定を試みた。

まず、T-クラスター領域に結合するタンパク質を、サウスウエスタン法を用いて探求した。²⁵⁾ HEL 細胞から調製した cDNA ライブラリーを用い、スクリーニングを行った結果、nucleolysin のスプライシングアイソフォームを単離した。T-クラスターに結合するタンパク質と言うことで、T-cluster binding protein (TCBP) と名付けた。TCBP は、2 本鎖の T-クラスター配列、及びその下流に存在する T が多く含まれる領域と相互作用し、HEL 細胞において転写を負に制御することが明らかになった (Fig. 7)。

次に TME 領域に結合するタンパク質の探求を行った。²⁸⁾ TME 配列を用いたゲルシフトアッセイの結果から、多くのタンパク質の結合が予想された。多種類のタンパク質が複合体を形成し相互作用することが考えられ、その中には直接 DNA と結合しないタンパク質も存在することが予想されたため、方法として TME 配列を用いた DNA アフィニティークラムによる精製を試みた。

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のち、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、精製を重ねる毎に活性の低下がみられ複合体が壊さ

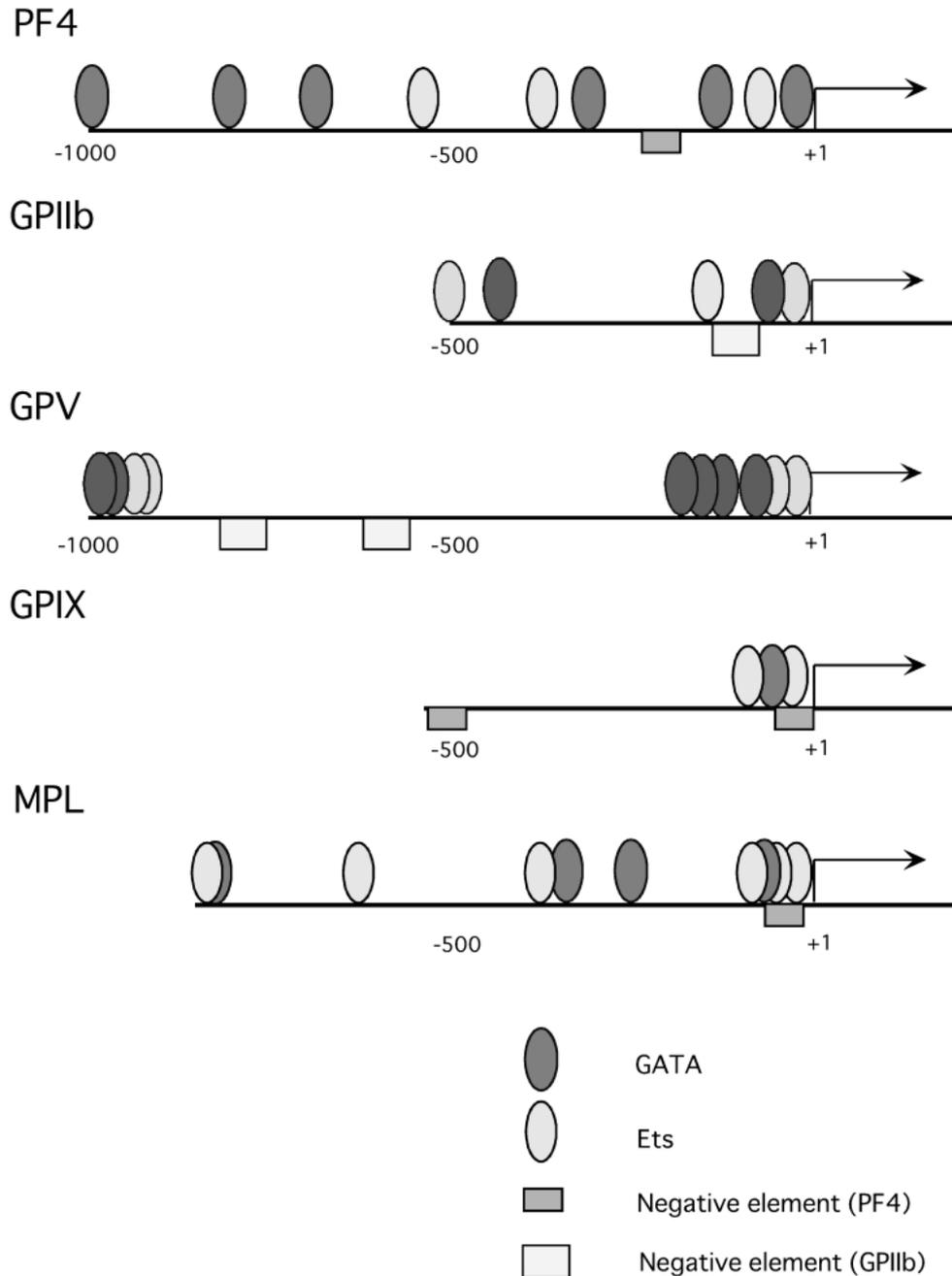


Fig. 6. Megakaryocyte-specific Promoters Including GATA, Ets and Negative Regulatory Elements

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、すべて質量分析装置を用い同定することにした。Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) からバンドを切り出し、dithiothreitol (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。質量分析装置 (LC-MS/MS システム) による解析から

ペプチドの1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、様々な核酸結合タンパク質が同定され、その中にいくつかの転写因子も含まれていた (Table 1)。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 upstream stimulatory factor 2 (USF-2)、並びに造血系への関与が示唆される pre-B-cell leukemia transcription factor (PBX) (PBX1B と PBX2) と AML1 の3つの転写因子に

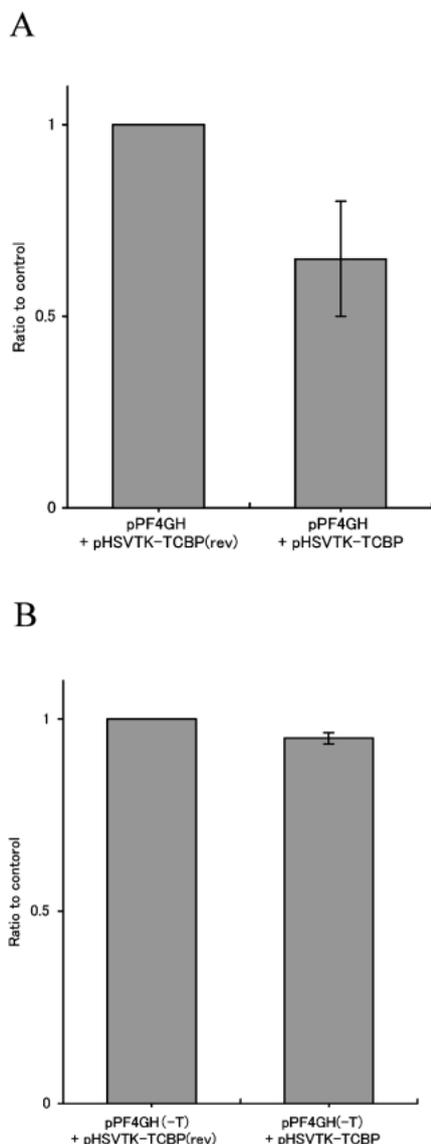


Fig. 7. Transcriptional Repression by TCBP

The TCBP expression vector (pHSVTK-TCBP) was co-transfected with the PF4 promoter plasmid (pPF4GH (A) or pPF4GH (-T) (B)) in HEL cells. pPF4GH, reporter plasmid containing native PF4 promoter; pPF4GH (-T), reporter plasmid containing PF4 promoter without T-cluster and T rich region; pHSVTK-TCBP (rev), the TCBP cDNA is inserted in the opposite orientation as compared with pHSVTK-TCBP.

注目し以後の解析を行った。

4. 転写因子の機能解析

4-1. 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 は白血病化を引き起こす。²⁹⁾ 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。³⁰⁾ また、PBX は同じ

Table 1. Identified Proteins by Mass Spectrometry

| kDa | Search result |
|-----|--|
| 114 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U |
| 90 | PTB-associated splicing factor |
| 80 | ATP-dependent DNA helicase II, 70-kDa subunit (KU70) |
| 80 | Nucleolar protein NOP56 |
| 80 | Probable RNA-dependent helicase p72 (dead box protein p72) |
| 80 | Putative pre-mRNA splicing factor RNA helicase |
| 80 | Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ABL (P150) |
| 65 | Probable RNA-dependent helicase p68 (dead box protein p68) |
| 65 | GAP-associated tyrosine phosphoprotein p62 |
| 65 | RNA-binding protein (FUS) |
| 55 | Similar to zinc finger protein (BR140) |
| 55 | 54-kDa nuclear RNA-binding protein |
| 45 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G |
| 45 | Transcription factor NF-AT 45k chain |
| 43 | Upstream stimulatory factor |
| 43 | Pre B-cell leukemia transcription factor |
| 43 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like protein |
| 43 | Repressor ZEB |
| 40 | Heterogeneous nuclear riboproteins A2/B1 |
| 40 | Paired box protein 8 |
| 40 | Heterogeneous nuclear riboprotein A1 |
| 40 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 |
| 40 | Heterogeneous ribonucleoprotein homolog |
| 40 | Heterogeneous nuclear proteins C1/C2 |
| 28 | Transcription factor CBF alpha 2, splice form 1, AML1a protein |
| 28 | Nonhistone chromosomal protein (HMG-1) |
| 28 | Transcription initiation factor TFIID 30-kDa subunit |

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,³¹⁾ 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 2 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。

始めに PBX と MEIS1 についての解析を行った。²⁷⁾ 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のち、TME への結合様式を種々の因子の組み合わせによるゲルシフトアッセイを行い明らかにした。Figure 8 に示すように、MEIS1 は単独で TME に結合する

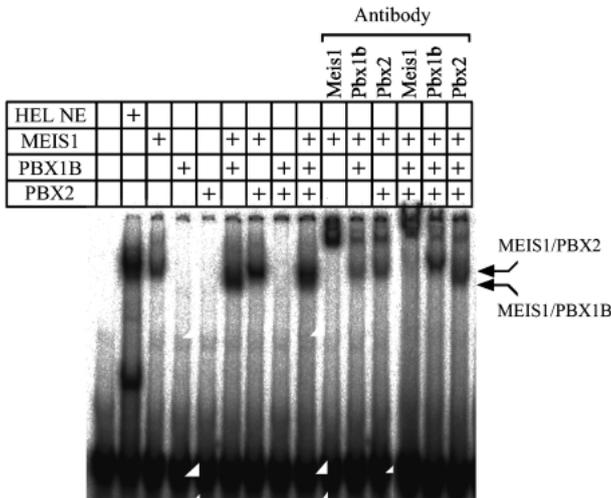


Fig. 8. Binding Activities of Various Combinations of MEIS1, PBX1B, and PBX2 to the TME

HEL NE (nuclear extract) and MEIS1, PBX1B, and PBX2 prepared by *in vitro* translation were used in electrophoresis mobility shift assay.

が、PBX は結合しないことが分かった。しかし MEIS1 と PBX を加えたときに生じる TME 複合体には、PBX が含まれることがスーパーシフトアッセイにより明らかになった。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判明した。同様の実験を TME に点変異を加えた配列を用いて行ったが、そのときは DNA-タンパク質複合体の形成はみられなかった。

次に、これらの因子の PF4 遺伝子発現への効果を、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。その結果、Fig. 9 に示すように、MEIS1, PBX はそれぞれ単独では活性化を示さないが、両因子が存在すると約 2 倍の活性化を示した。また、TME に点変異が入った配列では、これらの活性化はみられなかった。これらのことから、MEIS1 と PBX は、TME 上で MEIS1/PBX 複合体を形成し、初めて PF4 遺伝子の転写を活性化できることが明らかになった。

次に既知の PF4 遺伝子のプロモーター活性化因子である GATA-1, ETS-1 との協調作用について調べた。MEIS1, PBX を GATA-1, ETS-1 と共発現させ、先ほどと同様に HepG2 細胞におけるレポーター遺伝子発現系で調べた。その結果、Fig. 10 に示すように、GATA-1 と ETS-1 による活性化作用を、MEIS1 と PBX2 はさらに 2 倍上昇させること

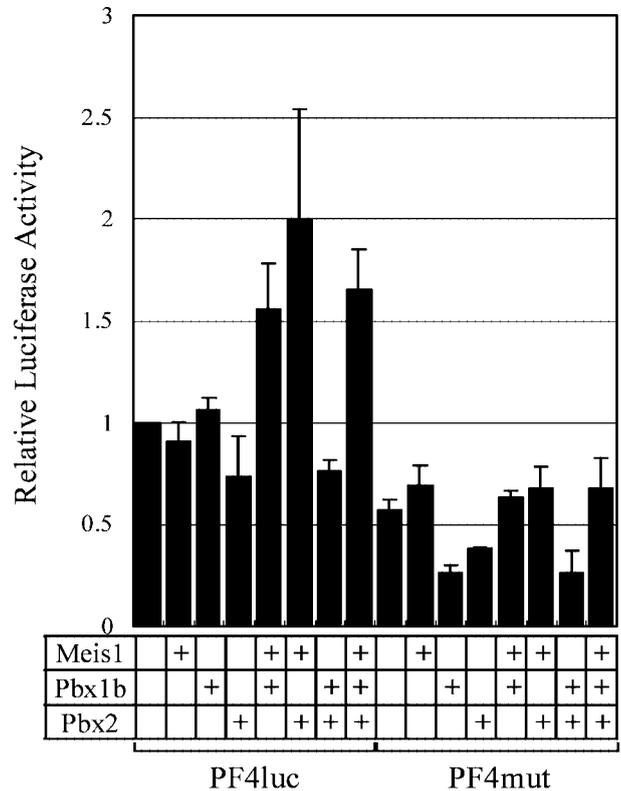


Fig. 9. Transcriptional Activities of Various Combinations of MEIS1, PBX1B, and PBX2 to the PF4 Promoter

PF4luc contains 1.1 kb PF4 promoter in front of the luciferase reporter gene. PF4mut contains mutations in the MEIS1 binding sites in the TME.

が判明した。すなわち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。始め MEIS1 と PBX の活性化効果は約 2 倍と小さく、その意味が問われる程度のものであったが、これらは他の因子による作用を相乗的に増加させる働きがあったため、これら因子による活性化効果は非常に意味のあるものと考えられる。

また、HepG2 細胞ではなく、巨核球系細胞である HEL 細胞を用いて、TME に点変異の入ったレポーター遺伝子の発現を調べた結果、PF4 遺伝子プロモーターの活性は約 6 割にまで減少した。このことから、これら因子が結合する TME 配列は、巨核球系細胞における PF4 遺伝子発現にとって重要な配列であり、そこに結合するこれらの因子の重要性が確かめられた。

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。³²⁾ 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

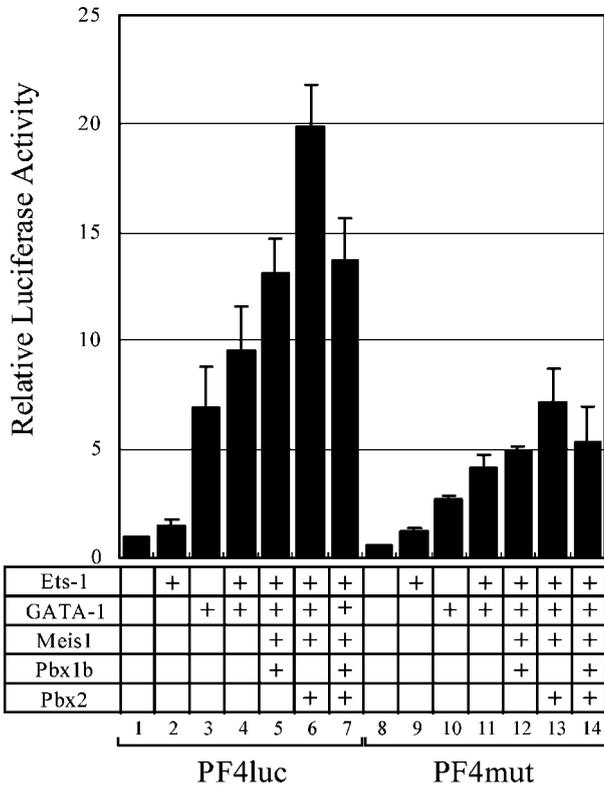


Fig. 10. The Synergistic Activation of the PF4 Promoter by GATA-1, ETS-1, and the PBX/MEIS Complex
 PF4luc contains 1.1 kb PF4 promoter in front of the luciferase reporter gene. PF4mut contains mutations in the MEIS1 binding sites in the TME.

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持つことが明らかとなった.³³⁾

4-2. USF についての解析 USF は, basic Helix-Loop-Helix (bHLH) 構造を持ち E-box モチーフに結合する転写因子である.^{34,35)} USF ファミリーの中には USF-1, 2 が存在しており, ホモ, ヘテロ 2 量体を組んで DNA に結合することが知られている. USF-2 が質量分析装置による解析で検出されたことから, まず, USF の TME への結合を確認した. その結果, Fig. 11 に示すように USF-1, USF-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った. さらに, ラットから巨核球を調製し, クロマチン免疫沈降を行ったところ, Fig. 12 のように TME を含む DNA 配列が検出され, 巨核球細胞において USF が TME に結合していることが確認できた. 以上より, USF-1, USF-2 は, TME に結合し, PF4

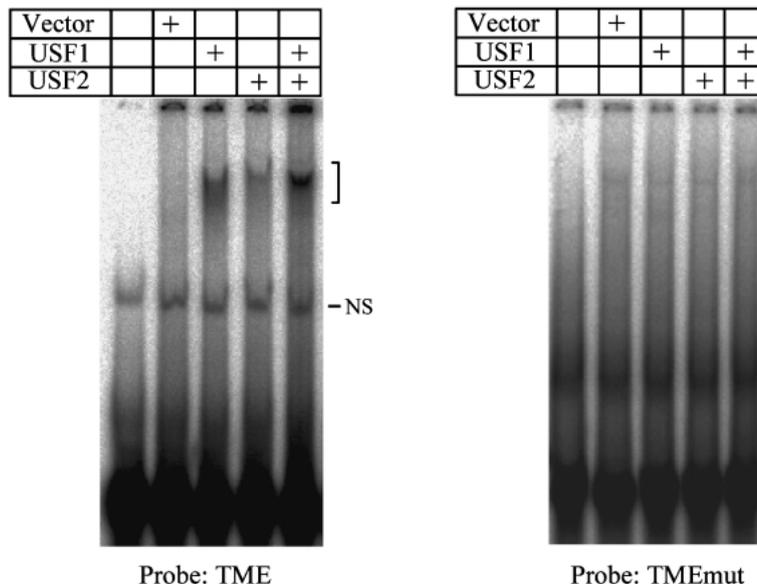


Fig. 11. Binding Activities of USF1 and USF2 to the TME
 The bracket indicates the specific shifted bands. NS indicates a nonspecific band. TMEmut probe includes the mutations in the E-box motifs.

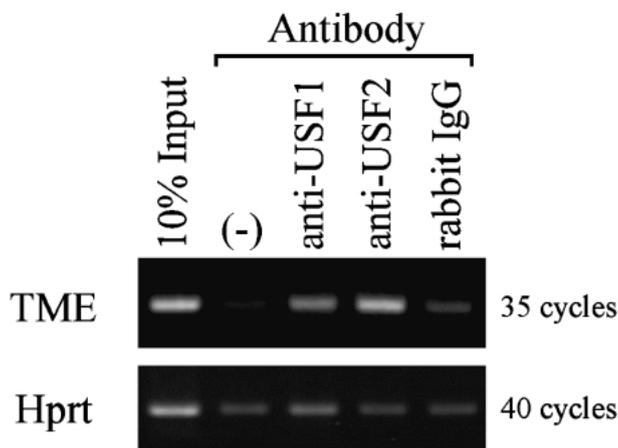


Fig. 12. Purified Megakaryocytes were Incubated for 2 hr in IMDM Containing 5% FBS, 100 IU/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin and 0.2 ng/ml Thrombopoietin (TPO) (Donated by Kirin Brewery)

After the incubation, the ChIP assay was performed using a Chromatin Immunoprecipitation Assay Kit (Upstate, Lake Placid, NY) according to the manufacturer's instructions. For the assay, 10 μ g of antibodies for USF1 and 2 or subtype-matched normal rabbit IgG (Santa Cruz) were used. The PCR amplification for the fragment including the TME was performed by 35 cycles of three steps (94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 30 sec). The PCR amplification for Hprt (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) was performed by 40 cycles of three steps (94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 30 sec) as a control. PCR products were separated on a 2% agarose gel and stained by ethidium bromide.

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.²⁸⁾

4-3. AML1 についての解析 AML1 (別名 Cbfa2, Runx1, Pebp2 α B) 遺伝子においては、急性骨髄性白血病患者の細胞で、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。³⁶⁻³⁹⁾ この遺伝子の変異は、成体型造血の欠損をもたらすことから、造血細胞全般に対する AML1 遺伝子の関与が考えられていた。^{13,40,41)} 最近、Cre-loxP システムを用いた AML1 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスの作成実験から、このマウスにおいては、T-cell, B-cell の減少、成熟巨核球、血小板の減少が引き起こされることが明らかになった。⁴²⁾ AML1 遺伝子に変異を持つ家系においては、血小板減少症 (familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia (FPD/AML)) を発症する頻度が高いことが報告されており、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る。

筆者らは 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 core binding factor β (CBF β) が、PF4 遺伝子の発現にどう影響するかについて、HepG2 細胞を用いた強制発現系を用いて調べた。その結果、各因子単独では顕著な転写活性化がみられなかった (AML1 で約 2 倍) が、AML1, ETS-1 の共発現で約 6 倍、AML1, CBF β の共発現で約 12 倍、3 因子を強制発現させると約 25 倍にまで強く活性化されることが判明した。これらの結果から、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大きく活性化することが明らかとなった。

非造血系細胞株 HepG2 において、AML1 単独の発現では細胞質における分解が速やかに進むため、約 2 倍の活性化しか示さなかったが、ETS-1 との共発現では、その協調作用によりさらなる活性化がみられたと考えられる。一方、CBF β は、細胞質において filamin A と相互作用していることが最近報告されているが、⁴³⁾ AML1 の CBF β との共発現における約 10 倍に及ぶ転写活性化は、AML1 が CBF β と相互作用することによって分解を受けずに安定に存在したことによるものと推測される。AML1 や ETS-1 は、mitogen-activated protein (MAP) キナーゼによりリン酸化を受けることが知られており、TPO が MAP キナーゼのシグナル伝達に関わっていることを考えると、これら 3 因子の相互作用は、巨核球特異的遺伝子発現に重要な意味を持っていると予想される。

一方、FPD/AML の家系においては、片側の染色体上に AML1 遺伝子に変異が入り、例として Fig. 13 に示すように点変異体や欠失変異体を作られることが明らかになっている。⁴⁴⁻⁴⁷⁾ 筆者らは、これら変異体を作成しその機能を調べた結果、自身の転写活性化機能を失う変異であることが判明したが、その中には共存する正常な AML1 の活性を阻害する変異も含まれていた。現在、その機構を明らかにする試みを行っているが、3 因子の相互作用がこの機構にも関与していると思われる。

5. おわりに

以上のように、巨核球 (血小板) 系列特異的に発現する PF4 遺伝子の発現制御に関与する DNA 配列を決定し、またその領域への結合を介して転写を活性化あるいは抑制する因子群の同定に成功した。この DNA アフィニティカラムと LC-MS/MS シス

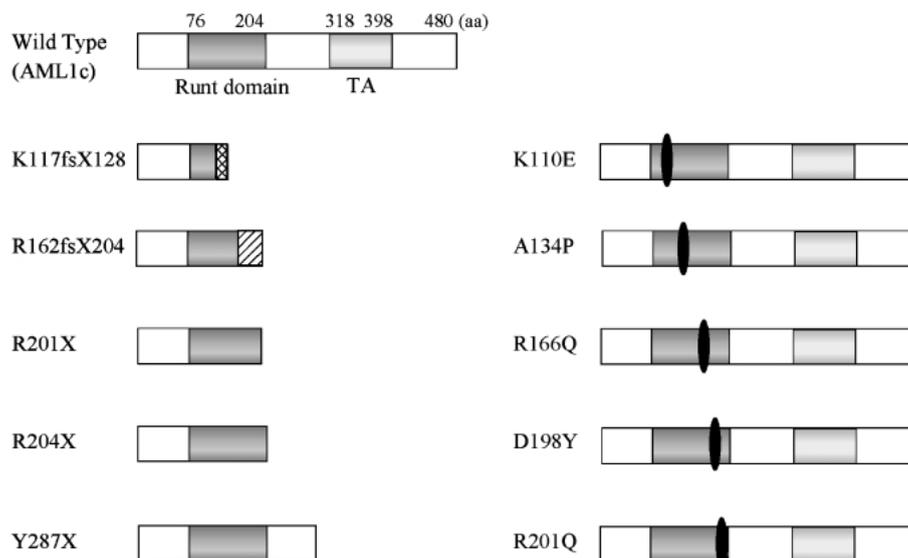


Fig. 13. Schematic Representation of FPD/AML RUNX1 Mutations
Solid ellipse indicates the mutation point.

テムを用いた転写因子群の同定法は、非常に有用な手法であり、これまでの多くの材料と労力、時間を費やしてようやく1つの因子を同定できる状況を一変させることができた。すなわち、直接結合する1つの因子のみならず、複合体を形成する因子群を1度に同定することを可能にしている。

筆者らは、PF4 遺伝子のプロモーターを解析し、その発現制御に関わる DNA エlement を決定したが、これらの DNA 配列は Fig. 6 に示すように、巨核球で発現される他のタンパク質のプロモーター領域にも存在している。したがって、今回筆者らが明らかにした PF4 遺伝子の発現を制御する因子群は、巨核球特異的な遺伝子発現に関与すると考えられる。今後、これらの因子が巨核球の分化・成熟における引き金役としても関わっているのか否かについて検証していく必要がある。巨核球の分化・成熟へのスイッチが入り、そのアウトプットの1つとして巨核球特異的なタンパク質の遺伝子発現がみられるが、その間の時空的隔たりは予想外になく、同じ転写因子が制御している可能性も考えられる。事実、分化・成熟の段階で GATA-1 が重要な役割を果たしているが、これは、Fig. 6 にも示すようにマーカータンパク質の発現に非常に重要な役割を果たしている。

筆者らは、ヒト臍帯血からの CD34 陽性細胞を巨核球に分化させ、その過程におけるこれら転写因子

の発現を mRNA レベルで調べたが、分化前後で差がみられたものもあるが、分化前から存在する因子も多く存在した。分化・成熟には、これら一連の転写因子の存在が必要であるが、これに加え TPO などの刺激によるシグナルカスケード、すなわちリン酸化などの修飾が必要であり、これら条件が揃うことにより、必要な転写因子群が必要な状態で必要な場所に集まり、巨核球特異的な遺伝子発現を実行すると考えられる。

筆者らは、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。

巨核球系細胞の分化・成熟における分子機構の全容はいまだ明らかではないが、現在探究中である因子の働きが明らかになれば、その解明に繋がることが予想される。TPO が血小板減少症に対する究極の治療薬と期待され臨床試験が続けられてきたが、最近中和抗体の出現等により開発が停止され足踏み状態となっている。われわれは、本研究成果が新しい治療薬開発の発端となり、多くの人々を救う手段となることを願いさらに研究を続けていきたい。

謝辞 本研究は、大阪大学薬学研究科薬化学講

座で開始し、筆者が蛋白情報解析学分野に移り展開した研究であり、開始時期に大変お世話になりました大阪大学薬学研究科、今西 武教授に深く感謝申し上げます。また、一緒に研究を遂行した多くの学生諸氏、共同研究者の皆様にご心から感謝申し上げます。終始、筆者を支えていただきました大阪大学、馬場明道副学長に深謝いたします。本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金並びに先進医薬研究振興財団助成金により行われたものであり、ここに感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Bartley T. D., Bogenberger J., Hunt P., Li Y. -S., Lu H. S., Martin F., Chang M. -S., Samal B., Nichol J. L., Swift S., Johnson M. J., Hsu R. -Y., Parker V. P., Suggs S., Skrine J. D., Merewether L. A., Clogston C., Hsu E., Hokom M. M., Hornkohl A., Choi E., Pangelinan M., Sun Y., Mar V., McNinch J., Simonet L., Jacobsen F., Xie C., Shutt J., Chute H., Basu R., Selander L., Trollinger D., Sieu L., Padilla D., Trail G., Elliott G., Izumi R., Covey T., Crouse J., Garcia A., Xu W., Del Castillo J., Biron J., Cole S., Hu M. C. -T., Pacifici R., Ponting I., Saris C., Wen D., Yung Y. P., Lin H., Rosselman R. A., *Cell*, **77**, 1117-1124 (1994).
- 2) de Sauvage F. J., Hass P. E., Spencer S. D., Malloy B. E., Gurney A. L., Spencer S. A., Darbonne W. C., Henzel W. J., Wong S. C., Kuang W. -J., Oles K. J., Hultgren B., Solberg L. A., Goeddel D. V., Eaton D. L., *Nature*, **369**, 533-538 (1994).
- 3) Lok S., Kaushansky K., Holly R. D., Kuijper J. L., Lofton-Day C. E., Oort P. J., Grant F. J., Heipel M. D., Burkhead S. K., Kramer J. M., Anne Bell L., Sprecher C. A., Blumberg H., Johnson R., Prunkard D., Ching A. F. T., Mathewes S. L., Bailey M. C., Forstrom J. W., Buddle M. M., Osborn S. G., Evans S. J., Sheppard P. O., Presnell S. R., O'hara P. J., Hagen F. S., Roth G. J., Foster D. C., *Nature*, **369**, 565-568 (1994).
- 4) Sohma Y., Akahori H., Seki N., Hori T., Ogami K., Kato T., Shimada Y., Kawamura K., Miyazaki H., *FEBS Lett.*, **353**, 57-61 (1994).
- 5) Parganas E., Wang D., Stravopodis D., Topham D. J., Marine J. C., Teglund S., Vainin E. F., Bodner S., Colamonici O. R., van Deursen J. M., Grosveld G., Ihle J. N., *Cell*, **93**, 385-395 (1998).
- 6) Schulze H., Ballmaier M., Welte K., Germeshausen M., *Exp. Hematol.*, **28**, 294-304 (2000).
- 7) Kaushansky K., Drachman J. G., *Oncogene*, **21**, 3359-3367 (2002).
- 8) Dorsch M., Fan P. D., Danial N. N., Rothman P. B., Goff S. P., *J. Exp. Med.*, **186**, 1947-1955 (1997).
- 9) Hong Y., Dumenil D., van der Loo B., Goncalves F., Vainchenker W., Erusalimsky J. D., *Blood*, **91**, 813-822 (1998).
- 10) Shivdasani R. A., Fujiwara Y., McDevitt M. A., Orkin S. H., *EMBO J.*, **16**, 3965-3973 (1997).
- 11) Lecine P., Villeval J. -L., Vyas P., Swencki B., Xuand Y., Shivdasani R. A., *Blood*, **92**, 1608-1616 (1998).
- 12) Hart A., Melet F., Grossfeld P., Chien K., Jones C., Tunnacliffe A., Favier R., Bernstein A., *Immunity*, **13**, 167-177 (2000).
- 13) Okada H., Watanabe T., Niki M., Takano H., Chiba N., Yanai N., Tani K., Hibino H., Asano S., Mucenski M. L., Ito Y., Noda T., Satake M., *Oncogene*, **17**, 2287-2293 (1998).
- 14) Elagib K. E., Racke F. K., Mogass M., Khetawat R., Delehanty L. L., Goldfarb A. N., *Blood*, **101**, 4333-4341 (2003).
- 15) Freson K., Devriendt K., Matthijs G., van Hoof A., de Vos R., Thys C., Minner K., Hoylaerts M. F., Vermynen J., van Geet C., *Blood*, **98**, 85-92 (2001).
- 16) Prandini M., Martin F., Thevenon D., Uzan G., *Blood*, **88**, 2062-2070 (1996).
- 17) Deveaux S., Filipe A., Lemarchandel V., Ghysdael J., Romeo P., Mignotte V., *Blood*, **87**, 4678-4685 (1996).
- 18) Ravid K., Doi T., Beeler D., Kuter D. J., Rosenberg R. D., *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 6116-6127 (1991).
- 19) Minami T., Tachibana K., Imanishi T., Doi T., *Eur. J. Biochem.*, **258**, 879-889 (1998).
- 20) Lepage A., Uzan G., Touche N., Morales M., Cazenave J., Lanza F., Salle C., *Blood*, **94**, 3366-3380 (1999).

- 21) Bastian L. S., Yagi M., Chan C., Roth G. J., *J. Biol. Chem.*, **271**, 18554–18560 (1996).
- 22) Doi T., Greenberg S. M., Rosenberg R. D., *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 898–904 (1987).
- 23) Ravid K., Doi T., Beeler D. L., Kuter D. J., Rosenberg R. D., *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 6116–6127 (1991).
- 24) Arid W. C., Parvin J. D., Sharp P. A., Rosenberg R. D., *J. Biol. Chem.*, **269**, 883–889 (1994).
- 25) Doi T., Minami T., Itoh M., Aburatani H., Kawabe Y., Kodama T., Kondo N., Satoh Y., Asayama T., Imanishi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 625–630 (1997).
- 26) Minami T., Tachibana K., Imanishi T., Doi T., *Eur. J. Biochem.*, **258**, 879–889 (1998).
- 27) Okada Y., Nagai R., Sato T., Matsuura E., Minami T., Morita I., Doi T., *Blood*, **101**, 4748–4756 (2003).
- 28) Okada Y., Matsuura E., Tozuka Z., Nagai R., Watanabe A., Matsumoto K., Yasui K., Jackman R. W., Nakano T., Doi T., *Blood*, **104**, 2027–2034 (2004).
- 29) Shimamoto T., Ohyashiki K., Toyama K., Takeshita K., *Int. J. Hematol.*, **67**, 339–350 (1998).
- 30) DiMartino J. F., Selleri L., Traver D., Firpo M. T., Rhee J., Warnke R., O’Gorman S., Weissman I. L., Cleary M. L., *Blood*, **98**, 618–626 (2001).
- 31) Shen W. F., Rozenfeld S., Kwong A., Komves L. G., Lawrence H. J., Largman C., *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 3051–3061 (1999).
- 32) Berthelsen J., Zappavigna V., Mavilio F., Blasi F., *EMBO J.*, **17**, 1423–1433 (1998).
- 33) Okada Y., Matsuura E., Nagai R., Sato T., Watanabe A., Morita I., Doi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 155–159 (2003).
- 34) Carthew R. W., Chodosh L. A., Sharp P. A., *Cell*, **43**, 439–448 (1985).
- 35) Gregor P. D., Sawadogo M., Roeder R. G., *Genes Dev.*, **4**, 1730–1740 (1990).
- 36) Meyers S., Lenny N., Hiebert S. W., *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 1974–1982 (1995).
- 37) Tanaka T., Kurokawa M., Ueki K., Tanaka K., Imai Y., Mitani K., Okazaki K., Sagata N., Yazaki Y., Shibata Y., Kadowaki T., Hirai H., *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 3967–3979 (1996).
- 38) Miyoshi H., Ohira M., Shimizu K., Mitani K., Hirai H., Imai T., Yokoyama K., Soeda E., Ohki M., *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2762–2769 (1995).
- 39) Lutterbach B., Westendorf J. J., Linggi B., Isaac S., Seto E., Hiebert S. W., *J. Biol. Chem.*, **275**, 651–656 (2000).
- 40) Okuda T., van Deursen J., Hiebert S. W., Grosveld G., Downing J. R., *Cell*, **84**, 321–330 (1996).
- 41) Okuda T., Takeda K., Fujita Y., Nishimura M., Yagy S., Yoshida M., Akira S., Downing J. R., Abe T., *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 319–328 (2000).
- 42) Ichikawa M., Asai T., Saito T., Yamamoto G., Seo S., Yamazaki I., Yamagata T., Mitani K., Chiba S., Hirai H., Ogawa S., Kurokawa M., *Nat. Med.*, **10**, 299–304 (2004).
- 43) Yoshida N., Ogata T., Tanabe K., Li S., Nakazato M., Kohu K., Takafuta T., Shapiro S., Ohta Y., Satake M., Watanabe T., *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 1003–1012 (2005).
- 44) Michaud J., Wu F., Osato M., Cottles G. M., Yanagida M., Asou N., Shigesada K., Ito Y., Benson K. F., Raskind W. H., Rossier C., Antonarakis S. E., Israels S., McNicol A., Weiss H., Horwitz M., Scott H. S., *Blood*, **99**, 1364–1372 (2002).
- 45) Song W. J., Sullivan M. G., Legare R. D., Hutchings S., Tan X., Kufirin D., Ratajczak J., Resende I. C., Haworth C., Hock R., Loh M., Felix C., Roy D. C., Busque L., Kurnit D., Willman C., Gewirtz A. M., Speck N. A., Bushweller J. H., Li F. P., Gardiner K., Poncz M., Maris J. M., Gilliland D. G., *Nat. Genet.*, **23**, 166–175 (1999).
- 46) Buijs A., Poddighe P., van Wijk R., van Solinge W., Borst E., Verdonck L., Hagenbeek A., Pearson P., Lokhorst H., *Blood*, **98**, 2856–2858 (2001).
- 47) Walker L. C., Stevens J., Campbell H., Corbett R., Spearing R., Heaton D., Macdonald D. H., Morris C. M., Ganly P., *Br. J. Haematol.*, **117**, 878–881 (2002).