

Notch シグナルが転写因子 PU.1 の機能をダイナミックに変化させる分子基盤

細川裕之

東海大学 医学部 基礎医学系 生体防御学

【研究の背景】

ガン遺伝子 PU.1 は様々な血球細胞の発生や機能を制御する転写因子で、マクロファージや顆粒球、樹状細胞、赤芽球前駆細胞、B 細胞、T 前駆細胞において細胞系列特異的なターゲット遺伝子の発現を制御する。実際に、PU.1 の細胞系列特異的な機能の破綻が、様々なタイプの白血病の原因となることが知られている。本研究では、リンパ球前駆細胞 (lymphoid progenitor; LP 細胞) が Notch シグナルを受け取り T 前駆細胞へと分化する際に、ダイナミックな PU.1 の機能変化が誘導される分子メカニズムの解明を試みた。

【目 的】

ガン遺伝子 PU.1 は様々な血球細胞の発生や機能を制御する転写因子で、マクロファージや顆粒球、樹状細胞、赤芽球前駆細胞、B 細胞、T 前駆細胞において細胞系列特異的なターゲット遺伝子の発現を制御する。PU.1 の機能や発現量は血球細胞の系列や、発生段階によって厳密に制御されている。我々はこれまでに、T 前駆細胞における PU.1 会合分子のプロテオミクス解析や PU.1 および PU.1 会合分子の ChIP-seq 解析を行うことで、PU.1 が T 前駆細胞特異的な機能を発揮する分子メカニズムを明らかにしてきた (Hosokawa, *Immunity*, 2018)。さらに、2020 年度に貴財団による研究助成のサポートを受け、T 前駆細胞の発生に伴って PU.1 の発現がタイミングよく抑制される分子メカニズムを明らかにした (Hosokawa, *J Exp Med*, 2021)。本研究では、リンパ球前駆細胞が Notch シグナルを受け取り、T 前駆細胞へと分化する際にダイナミックな PU.1 の機能変化が誘導される分子メカニズムの解明を目的とした。

【方 法】

T 細胞の初期発生を *in vitro* で再現する方法として、Notch リガンドを発現させたストローマ細胞と LP 細胞を共培養する方法が広く用いられている。この方法の問題点として、マウスの生体内に LP 細胞は極わずかしか存在せず、また、厳密に LP 細胞だけを精製する方法が確立されていない点が挙げられる。我々はこの問題を解決するために、B 細胞分化のマスター転写因子である EBF1 を欠損した LP 細胞を B 細胞分化条件下で培養することにより、T 細胞分化能を保持した LP 細胞株を樹立することに成功した。この細胞はストローマ細胞上でサイトカインと共に培養すると容易に増殖し、Notch シグナルを誘導することで生理的な T 細胞の初期発生を再現することが出来る (Hosokawa, *eLife*, 2021)。本研究では、この細胞株を用いて Notch シグナルを受け取る前の LP 細胞と Notch シグナルを受けた直後の T 前駆細胞を用いて PU.1 複合体のプロテオミクス解析、及び PU.1 結合ゲノム領域の網羅的同定を行った。

【結 果】

LP 細胞と T 前駆細胞から PU.1 複合体を精製するために、タグを付加した PU.1 を発現させる必要があるが、PU.1 の過剰発現は CD11b (Mac1) 陽性のミエロイド系列の分化を誘導する。そこで、タモキシフェン依存的に核移行する PU.1 発現ベクターを構築し、ミエロイド系列の分化転換が誘導される前に PU.1 タンパク質複合体を精製する方法を確立した。現在、精

製したステージ特異的な PU.1 複合体を質量分析により解析する準備を進めている。さらに、LP 細胞と T 前駆細胞を用いた PU.1 の ChIP-seq 解析を行い、一部の PU.1 結合ゲノム領域が Notch シグナル依存的にシフトすることを明らかにした。

【考 察】

現在我々は、LP 細胞と T 前駆細胞において、PU.1 が異なるタンパク質複合体を形成し、異なるゲノム領域に会合することで、発生段階特異的な機能を発揮する可能性を考えている。今後、発生段階特異的な PU.1 会合分子の機能解析を行い、その詳細な分子メカニズムの解明を目指す。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

PU.1 の細胞系列特異的な機能や発現制御機構の破綻が、様々なタイプの白血病の原因となることから、PU.1 の機能および発現量をコントロールするメカニズムの解明や、その制御法の開発は生命科学における重要課題の一つであると言える。本研究では、LP 細胞と T 前駆細胞における生理的な PU.1 の機能発現の分子メカニズムの解明を目的とするが、将来的には、PU.1 の細胞系列特異的な機能を制御する、副反応の少ない新たな血液腫瘍に対する治療戦略の開発に繋げていきたいと考えている。

【参考・引用文献】

Hirano K*, **Hosokawa H***, Koizumi M, Endo Y, Yahata T, Ando K and Hozumi K. :LMO2 is essential to maintain the ability of progenitors to differentiate into T-cell lineage in mice. *eLife* 10: e68227 (2021) *Co-first authors

Hosokawa H*, Koizumi M, Masuhara K, Romero-Wolf M, Tanaka T, Nakayama T and Rothenberg EV*. :Stage-specific action of RUNX1 and GATA3 controls silencing of PU.1 expression in mouse pro-T cells. *J Exp Med*. 218(8): e20202648 (2021) *Co-corresponding authors

Hosokawa H, Ungerback J, Wang X, Matsumoto M, Nakayama, KI, Cohen SM, Tanaka T, and Rothenberg EV. :Transcription factor PU.1 represses and activates gene expression in early T cells by redirecting partner transcription factor binding. *Immunity*. 48(6):1119-1134 (2018)