

赤血球分化におけるSATB1の機能解析

神戸女学院大学大学院 人間科学研究科
博士前期課程 2 年 大平 直子

第 1 章 緒言

血液中には赤血球、白血球、血小板などそれぞれに異なった形態と機能を持った血液細胞が存在するが、すべて骨髄にある造血幹細胞に由来している。造血幹細胞からそれぞれの細胞への分化の過程には多くの因子が関与しているが、その中でspecial AT-rich sequence binding protein 1 (SATB 1) はリンパ球への分化に重要な役割を果たすことが明らかになっており (Yokota, 2014)、赤血球分化においてはグロビン遺伝子の発現に関与することが報告されている (Wenn J et al., 2005)。本研究ではSATB 1 が赤血球分化において果たしている機能を検討することを目的とした。

研究においてはSATB 1 の機能を検討するためゲノム編集によりSATB 1 ノックアウトK562細胞 (以下KO) を樹立し、細胞増殖や赤血球分化について野生型株 (以下WT) との間の比較検討を行った。さらにWTならびにKOについてRNA-seq法による網羅的遺伝子解析を実施し、両者における遺伝子発現の変化を検討した。

第 2 章 材料と方法

1. 細胞および培養液

ヒト白血病細胞株であるK562は理化学研究所より購入、10%ウシ胎児血清、1 %ペニシリン-ストレプトマイシン (penicillin-streptomycin, Sigma) 含有RPMI1640 (富士フィルム和光純薬) を用いて37℃ 5 %CO₂環境で培養した。赤血球分化誘導実験にはヘミン (Hemin, Sigma) を各種濃度に希釈して使用した。

2. 細胞増殖の評価

細胞増殖の評価はK562細胞を96ウェルプレートで培養し、Premix WST-1 Cell Prolifera-

tion Assay System (タカラバイオ) (以下WST-1 アッセイ) を用いて行った。またK562細胞の赤血球分化についてはヘモグロビン合成を指標とし、ベンジジン染色によって定量的に評価した。

3. リアルタイムRT-PCR

QIAGEN社RNeasy Mini Kitを用いてRNA抽出を行い、QIAGEN社QuantiTect® Reverse Transcription kitを使用してcDNA合成を行った。プライマーはヒトSATB 1、ヒトSATB 2、およびヒトGAPDH (キャリブプレート遺伝子) に対するデザイン済みプライマー QuantiTect® PrimerAssay (QIAGEN) を使用して相対定量法で行なった。リアルタイムRT-PCRにはMyGOpro (フナコシ) を用い、定量解析は $\Delta \Delta$ Ct解析法により行った。

4. SATB1ノックアウトK562細胞

ゲノム編集による下KOクローンの作成をセツロテック社への委託研究として行った。

5. RNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析

WTおよびKOそれぞれ2サンプルについてRNAを抽出してcDNAライブラリーを作成し、イルミナ社の次世代シーケンサを用いてRNA-Seq解析を行った。解析はマクロジェンジャパン社に委託して行った。

6. 統計解析

統計解析にはStudentの *t* 検定 (両側検定) を用いた。*P* 値が0.05未満を統計学的に有意とした。

第 3 章 結果

1. WTとKOの比較

1-1 細胞増殖能の比較

WTとKOについて各種濃度の細胞浮遊液による細胞増殖能の比較を行った。2.5×10⁵/mlおよび1×10⁴/mlいずれの細胞濃度においてもWT

とKOの細胞増殖能に差は認められなかった。

1-2 ヘミンによる赤血球分化能の比較

WTとKOにヘミンを30 μ M添加してそれぞれのK562細胞から赤血球系細胞への分化を観察し、さらにベンジジン染色を行った。4日目(図1)に細胞は図のように褐色を帯びた色調に変化したが、WTとKOで明らかな違いは認められなかった。また、ヘモグロビン合成を確認するベンジジン染色の結果はいずれも200細胞数中、1日目WT65個(32.5%)、KO59個(29.5%)、3日目WT63個(31.5%)、KO47個(23.5%)、4

日目WT65個(32.5%)、KO43個(21.5%)(図2)で、いずれの日においてもKOとWTのベンジジン染色陽性細胞数は同程度であった。

さらにヘミン30 μ M添加24時間後のベンジジン染色の結果について、WTとKOで比較したが、統計学的に有意な差は認めなかった(図3)。

WTとKOについてヘミン添加を行わないものと30 μ M添加したものについて*SATB2*のリアルタイムRT-PCRによる遺伝子発現解析を行ったが、いずれの発現量も同程度であった(図4)。

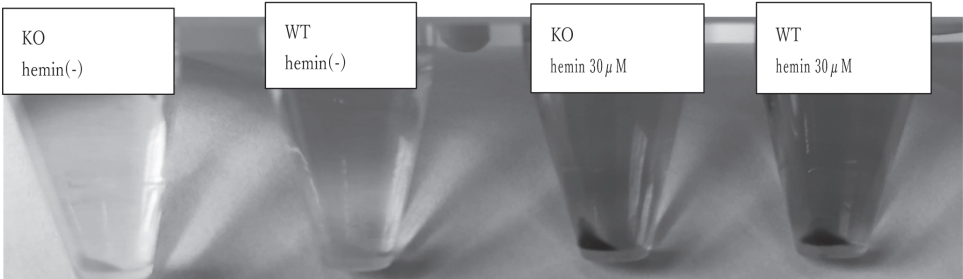


図1 ヘミン添加4日後培養液の比較

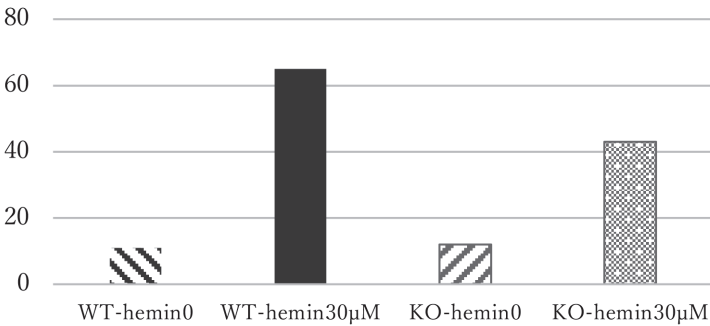


図2 ヘミン添加4日後200細胞中のベンジジン染色陽性細胞数

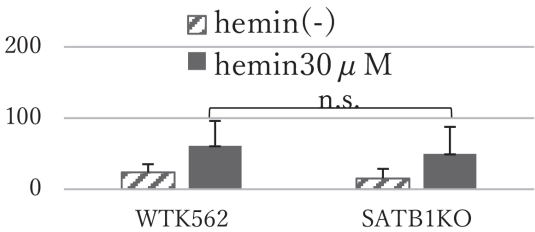


図3 hemin添加24時間後200細胞中のベンジジン染色陽性細胞数

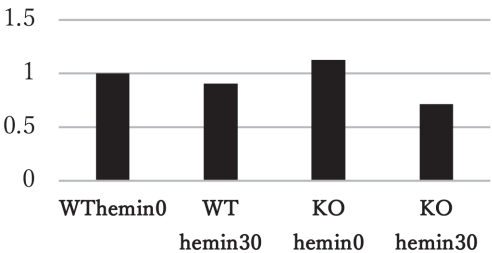


図4 SATB2 遺伝子発現解析

2. RNA-seq法による網羅的遺伝子発現解析

WTとKOについて遺伝子発現を網羅的に解析比較した。遺伝子発現が2倍以上を超え統計学的に有意差がある遺伝子数について検討したところ、発現が上昇している遺伝子は593個、低下している遺伝子は850個であった。WTでKOと比較して遺伝子発現変動が上昇した上位5遺伝子の中には*ZNF521* (zinc finger protein 521) を認めた。

Gene Ontology エンリッチメント解析は遺伝子全体と比較して有意に多くの発現変動が観測される遺伝子機能をGene Ontology database登録情報において抽出する解析であり、その遺伝子群がどのような機能に関与しているのかを解釈するために実施している。今回のGene Ontology Enrichment解析で "Biological Process" ではbiological regulationおよびregulation of biological processに係る遺伝子群の変動が大きく、それぞれ74.4%および72.4%の遺伝子が発現変動した。"Cellular Component" においてはcytoplasmの変動が最も大きかった (66.3%)。"Molecular Function" においてはbinding (94.6%) およびprotein binding (83.4%) に関する発現遺伝子の変化が多く認められた。

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) エンリッチメント解析は、代謝経路を中心とした酵素反応やシグナル伝達などを遺伝子や化合物に関連づけたデータを提供しているデータベースであるKEGGを利用して、発現の変動した遺伝子にはどのようなパスウェイを持つ遺伝子が多いのかを解析するものである。今回のKEGG エンリッチメント解析では20の情報伝達パスウェイにおいて特に有意差の大きな遺伝子発現変化を認めた。本研究に関連のあるパスウェイとしては "Hematopoietic cell lineage" や "Pathways in cancer" などがあり造血幹細胞系統への関与やがん細胞増殖についての項目が確認された。

第4章 考察

赤血球は造血幹細胞から骨髓系共通前駆細胞、前赤芽球、赤芽球、網状赤血球などを経て産生され、血液中での酸素運搬を担う。この過程には骨髓内の造血支持組織から供給されるサイトカインなどの因子と赤血球形質の発現を誘導する転写因子が必須である。一方SATB1は細胞の核内に存在する蛋白質であり、染色体の構造を調節することで遺伝子の発現に影響を与えていると考えられている (Seo et al., 2005)。これまでのSATB1と赤血球分化についての研究ではヘミンによる誘導によってSATB1の発現が低下しγグロビン遺伝子の発現増加、εグロビン遺伝子発現の減少が起こるなどグロビン遺伝子発現制御に関与していることが報告されている (Wenn et al., 2005)。今回このSATB1が赤血球分化にどのように関与するかについて研究を行ったが、K562を用いた実験系においてはSATB1発現の有無は赤血球分化に大きな影響を与えないという結果となった。

先に述べた赤血球分化において機能する転写因子で最も重要で必須と考えられるのはGATA遺伝子群である (張替, 2006)。他にもいくつかの転写因子が造血に関与しているが、SCL/TAL1は造血に必須の因子であると考えられている。造血幹細胞からの赤血球分化の過程ではGATA-2、GATA-1、SCL/TAL1を中心にGATA-1-SCL/TAL1複合体の各構成因子の厳密な発現制御が行われ、複合体の機能が維持されていると考えられている (藤原, 2017)。今回の研究で行ったように、SATB1がノックアウトされた状況でSATB1によるクロマチン制御が失われたとしてもこれらの転写因子がその発現量を相互に制御し、K562がヘミンによって赤血球へ分化する過程が妨げられなかったのではないかと推察される。

また最近の研究では (Wilkes et al., 2023)、造血幹細胞から骨髓系共通前駆細胞さらに巨核球赤芽球系への分化の際のGATA-1の誘導には

SATB1が必要であるが、さらに分化が進行しGATA-1が最も著しく増加する前赤芽球への分化においてはSATB1は影響はしない、とされている。この知見から推察すると、ヘミンによるK562の赤血球分化の段階においてはすでにGATA-1の発現がある程度進んでおり、SATB1のノックアウトがGATA-1誘導に及ぼす影響は限定的であった結果、赤血球への分化が可能であったのではないかと考える。

SATB1にはアミノ酸の相同性が高いファミリープロテインであるSATB2が存在する。ヘミン添加前後でのWTとKOで差が見られなかったことから、SATB2がその発現量を増してSATB1の機能を代償したということは可能性が低いと考えた。しかしSATB1にはSATB2以外にもアミノ酸の相同性が高いファミリープロテインが存在することから、SATB1が欠失した際に他の類似タンパク質などが機能の修飾を行うことは起こりうるのではないかと推察する。

RNA-seq法による網羅的な遺伝子解析の結果では、GOエンリッチメント解析のMolecular Functionで示されたbindingならびにprotein bindingに関係する遺伝子群の変動が特に大きかった。SATB1は細胞内で多くの遺伝子の発現に影響を与えるクロマチン制御分子としてDNAの結合に関与していると考えられていることから、今回の結果はこれまでの研究と合致するものであると考えられる。またKEGGエンリッチメント解析で変動が大きいと提示されたパスウェイの中には“Hematopoietic cell lineage”があり、過去にSATB1の機能として報告されているリンパ球の初期分化や赤血球グロビン遺伝子の分化への関与などと矛盾しない結果と考えられる。WTで発現が大きく上昇した遺伝子の中にZNF521 (zinc finger protein 521)があったが、この遺伝子は造血幹細胞や前駆細胞など様々な細胞の分化に関与しているとされている (Fleenor et al., 2018)。

今後のSATB1と赤血球分化に関する研究においては、SATB1とSATB2との相互作用に関する検討、あるいはSATB1とGATA-1等種々の転写因子との相互作用についての検討を深めることが重要であると考ええる。赤血球分化の詳細が明らかになれば、遺伝性造血性疾患の病態解明や治療の進歩、あるいは人工血液の開発などの再生医療への応用に寄与することも可能となる。

引用文献

- Alvarez J.D., Yasui D.H., Niida H., Joh T., Loh D.Y., & Kohwi-Shigematsu T., (2000) The MAR-binding protein SATB1 orchestrates temporal and spatial expression of multiple genes during T-cell development. *Genes and Development*, 14, 521-535.
- Dickinson L.A., Joh T., & Kohwi-Shigematsu T. (1992) A tissue specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition *Cell*, 70, 631-645.
- Doi Y., Yokota T., Satoh Y., Okuzaki D., Tokunaga M., Ishibashi T., Sudo T., Ueda T., Shingai Y., Ichii M., Takeda J., Oritani K., & Kanekura Y. (2018) Variable SATB1 levels regulate hematopoietic stem cell heterogeneity with distinct lineage fate. *Cell Reports*, 23, 3223-3235.
- Fleenor C.J., Arends T., Lei H., Ahsberg J., Okuyama K., & Hagman J.R. (2018) Zinc Finger Protein 521 Regulates Early Hematopoiesis through Cell-Extrinsic Mechanisms in the Bone Marrow Microenvironment. *Molecular and Cellular Biology*, 38, e00603-00617.
- 藤原 亨 (2017) 赤血球造血における転写制御機構 臨床血液, 58, 643-647.
- 張替秀郎 (2006) 赤血球造血の基礎知識 日内

会誌, 95, 1983-1987.

- Kohwi-Shigenatsu T. & Kanakura Y. (2013)
The Satb1 protein Directs Hematopoietic
Stem Cell Differentiation toward
Lymphoid Lineages. *Immunity*, 38, 1105-
1115.
- Seo J., Lozano M.M., & Dudley J.P. (2005)
Nuclear Matrix Binding Regulates
SATB1-mediated Transcriptional
Repression. *The Journal of Biological
Chemistry*, 280, 24600-24609.
- Wenn J., Huang S., Rogers H., Dickinson
L.A., Kohwi-Shigematsu T., & Noguchi
C.T. (2005) SATB1 family protein
expressed during early erythroid
differentiation modifies globin gene
expression. *BLOOD*, 105, 3330-3339.
- Wilkes M.C., Chae H-D., Scanlon V., Cepika
A.M., Wentworth E.P., Saxena M., Eskin
A., Chen Z., Glader B., Roncarolo M.G.,
Nelson S.F., & Sakamoto K.M. (2023)
SATB1ss Chromatin Loops Regulate
Megakaryocyte/Erythroid Progenitor
Expansion by Facilitating HSP70 and
GATA1 Induction. *Stem Cells*, 41, 560-569.
- Yokota T. & Kanakura Y. (2014) Role of
tissue-specific AT-rich DNA sequence-
binding proteins in lymphocyte
differentiation. *International Journal of
Hematology*, 100, 238-245.