血管内皮細胞特異的レセプター Robo4 の発現制御メカニズムの解析

岡田 欣晃

Transcriptional Regulation of the Endothelial Cell-specific Receptor, Robo4

Yoshiaki Okada

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

(Received May 24, 2012)

Roundabout4 (Robo4) is a transmembrane receptor that belongs to the Robo family of neural cell adhesion molecules. Robo4 has been shown to play a role in endothelial cell (EC) migration, proliferation, angiogenesis, and stabilizing the vasculature. Robo4 is expressed specifically in ECs in the developing embryo, placenta, tumors, and normal tissues. The goal of our study is to understand the mechanism for Robo4 gene expression. In the previous study we demonstrated that EC-specific Robo4 gene expression was regulated by the 3-kb Robo4 promoter in the 5'-flanking region of the human Robo4 gene. *In vitro* studies demonstrated that the Robo4 promoter is activated by the transcription factors GABP and SP1 through the ETS binding site at -119 and the 2 SP1 binding sites at -42 and -153, respectively. The functional relevance of these sites was confirmed by *in vivo* reporter gene assays using Hprt locus knock in mice. In addition to the regulation mechanism by transcription factors, our recent study implicated that epigenetic modification of the promoter contributes to the Robo4 gene expression. Here I will discuss the regulation mechanism of Robo4 gene expression by transcription factors and epigenetic control.

Key words—roundabout4; endothelial cell; tissue-specific gene expression

1. はじめに

Roundabout (Robo) は神経細胞接着分子としてショウジョウバエから単離された一回膜貫通型レセプターであり、そのリガンドである Slit と Robo-Slit シグナル伝達系を形成することにより、神経軸索の分岐や遊走を制御する。^{1,2)} 哺乳類においても、Robo ファミリータンパク質と Slit ファミリータンパク質が同定され、反発シグナルを介して軸索の成長やネットワーク形成に寄与することが報告されている。¹⁾ Robo4 は、2002 年に Robo ファミリーの 4 番目の分子としてクローニングされたが、その発現組織は Robo1-3 と異なり、血管内皮細胞に極めて特異的であることが示された。^{3,4)} また、Robo4 の発現は心臓や肺など正常臓器にもみられるものの、^{5,6)} 胎児、胎盤、がんなど血管新生が盛んな臓器

で特に発現が高いことが示されている。^{3,5,6)} これまでに Robo4 は血管内皮細胞の遊走や増殖、血管新生に関与することが報告されているが、^{5,7-9)} その機能の詳細はいまだ不明である。例えば、Li らのグループは Robo4 のリガンドが Slit2 であり、Robo4-Slit2 シグナルが血管内皮細胞の安定化をもたらした病的血管新生を抑制すると報告した。¹⁰⁾ しかし、一方で Eichmann らは、Robo4 が Slit2 と相互作用せず Unc5B と相互作用することを報告している。¹¹⁾ このように、Robo4 機能の詳細については論文間で相違がみられる点があるものの、少なくとも Robo4 が血管内皮細胞において他の Robo ファミリーレセプターとは異なるユニークなシグナル伝達系を形成しており、その機能や発現制御メカニズムの全容解明が血管関連疾患の新しい治療戦略の提案につながることを期待されている。筆者らは、Robo4 遺伝子がクローニングされた直後から本分子に着目し、遺伝子発現制御について研究を行ってきた。^{12,13)} 本総説では、Robo4 遺伝子の発現制御メカニズムについて、筆者らがこれまでに得た知見を

The author declares no conflict of interest.

大阪大学大学院薬学研究科生命情報解析学分野 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6)

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

本総説は、平成 23 年度日本薬学会近畿支部奨励賞 (生物系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

中心に紹介したい。

2. Robo4 プロモーター領域の決定

Robo4 遺伝子の発現制御を研究するにあたり、まずヒト Robo4 の発現を制御するプロモーター領域のクローニングを行った。まず、ヒト初代培養血管内皮細胞を用いて Robo4 遺伝子の転写開始点の同定後、その発現制御に関与すると予想される遺伝子上流配列の解析を行ったところ、複数のユニークな繰り返し配列や転写因子結合配列、また、マウス、ラットなど種間で高度に保存された転写開始点上流約 300 bp の配列などが存在することが明らかになった (Fig. 1)。そこで、Robo4 遺伝子の発現調節に関与する可能性が高いこれら特徴的な配列をすべて含む転写開始点上流 3 kb の配列をクローニングし、Robo4 遺伝子の発現制御に十分な領域を含むかを検証した。

まず、3 kb の配列が血管内皮細胞においてプロモーター活性を持つかを、初代培養血管内皮細胞を用いて評価したところ、Flt-1、Tie-2 など既知の高い活性を持つ血管内皮細胞特異的遺伝子プロモーターと同等以上の高い活性を持つことが明らかにな

った。次に、この配列が Robo4 遺伝子の組織特異的な発現を制御する機能を持つかを、3 kb の配列に LacZ 遺伝子を連結させた配列を Hprt 遺伝子上流に 1 コピー挿入した遺伝子改変マウスを用いて評価した。作製したマウスにおける LacZ 遺伝子の発現組織の解析を行ったところ、すべての正常臓器、胎児、移植したがん組織において LacZ は血管内皮細胞特異的に発現していた (Fig. 2)。さらに、マウスの各臓器の内在性 Robo4 遺伝子と LacZ 遺伝子の mRNA 発現量を定量したところ、両者は同じ臓器分布を示していた。これらの結果から、クローニングした 3 kb の配列は、血管内皮細胞特異的な Robo4 遺伝子発現を制御するプロモーターであることが証明された。

3. Robo4 発現制御因子の探索

Robo4 プロモーターを介した遺伝子発現制御メカニズムを解析するために、まずプロモーター中の機能配列の探索を行った。プロモーターを 5' 上流領域から段階的に欠失させる実験から、プロモーターのほぼ全領域がプロモーター活性に寄与することが明らかになった。特に、寄与の大きい上流領域

Fig. 1. Transcriptional Regulatory Elements in the Robo4 Promoter

Rectangles in the upstream region represent 2 upstream enhancers (REn1 and REn2). Arrowheads in the REn1 and REn2 indicate inverted repeat sequences. Ovals and a rectangle in the downstream region represent 2 SP1 sites and an ETS site, respectively.

Fig. 2. LacZ Staining of Organs and Embryos from Hprt-Robo4-lacZ Mice

Organs and embryos were harvested from Hprt-targeted mice carrying the Robo4 promoter-LacZ transgene and processed for whole mount staining with X-Gal.

の配列を詳細に解析したところ、上流-2.5 kと-2.9 kに2カ所のエンハンサーが存在し、その配列に含まれる12 bpのinverted repeat配列がプロモーターの活性化に寄与することが明らかになった (Fig. 1)。この配列を介する転写制御メカニズムの詳細については現在引き続き解析を行っている。

次に、種間で高度に保存されている転写開始点付近の配列に含まれる転写因子結合モチーフの解析を行ったところ、2カ所のSP1サイト (-153 SP1, -42 SP1)とETSサイト (-119 ETS)が種間で高度に保存されていた (Fig. 1)。これらのサイトに変異を導入するとプロモーター活性が顕著に減少し、これらのサイトがプロモーター活性化に必須であることが明らかになったため、これらのサイトを介した発現制御メカニズムの詳細について解析を行うことにした。

4. SP1サイトを介するRobo4遺伝子発現制御メカニズム

SP1サイトを介する遺伝子発現制御メカニズムを明らかにするため、まず、SP1サイトに結合するタンパク質が存在するかをゲルシフトアッセイで解析した。その結果、-153 SP1, -42 SP1の両サイトに特異的に結合するタンパク質が血管内皮細胞中に存在し、さらに抗体を用いた解析からそれらのタンパク質がSP1であることが明らかになった。また、クロマチン免疫沈降法を用いた解析においては、血管内皮細胞中の内在性Robo4プロモーターの転写開始点付近に確かにSP1が結合することも明らかになり (Fig. 3)、-153 SP1, -42 SP1の両サイトへの結合因子がSP1であることが証明された。

次に、SP1がプロモーターに結合しどのように活性を制御するかについて解析を行った。まず、培養細胞を用いた*in vitro*におけるSP1の強制発現実験から、SP1が-153 SP1, -42 SP1の2つのサイトを介してRobo4プロモーターを活性化することが明らかになった。さらに、SP1サイトの一方、若しくは両方に変異を導入したプロモーターにLacZを連結した配列を持つ遺伝子改変マウスを作製し、野生型プロモーターを持つマウスとLacZ遺伝子の発現量を比較したところ、*in vivo*においても-153 SP1, -42 SP1の両サイトがプロモーターの活性化に寄与することが示された。また、SP1が内在性の

Fig. 3. Binding of SP1 and GABPα to the Proximal Region *in vivo*

ChIP assay was performed using human primary endothelial cells. Resulting DNA-protein complexes were immunoprecipitated in the absence or presence of antibodies to SP1, GABPα, or control IgG. Real-time PCR analysis was performed using the precipitated DNA fragments and primers for Robo4 proximal region.

Robo4遺伝子の発現を制御しているかをsiRNA導入実験で解析したところ、血管内皮細胞におけるSP1の発現量減少は内在性Robo4遺伝子の発現を優位に減少させ、SP1が確かにRobo4遺伝子の発現促進因子であることが確認された。これらすべての結果から、SP1は、-153 SP1, -42 SP1の両サイトに結合しRobo4遺伝子の発現を促進することが証明された (Fig. 1)。

5. ETSサイトを介するRobo4遺伝子発現制御メカニズム

次にETSサイトを介する遺伝子発現制御メカニズムを明らかにするため、ゲルシフトアッセイを用いて解析したところ、血管内皮細胞中に-119 ETSサイトに特異的に結合するタンパク質が存在することが示された。このタンパク質を同定するために、これまで血管内皮細胞における遺伝子発現に寄与することが知られているETS-1, ELF-1, FLI-1, ERGなど複数のETSファミリータンパク質の抗体を用いて解析を行ったが、これらは結合タンパク質ではなかった。そこで、これまで血管内皮細胞における遺伝子発現制御の報告がないETSファミリータンパク質の抗体を用いて解析を行ったところ、結

合タンパク質が GABP であることが明らかになった。GABP は ETS ドメインを持ち DNA に結合する GABP α と、転写活性化ドメインを持つ GABP β 若しくはそのスプライシングアイソフォームである GABP γ からなり、ヘテロダイマーを形成し DNA に結合することが知られている。¹⁴⁾ そこで、-119 ETS サイトへの結合様式を各サブユニットのリコンビナントタンパク質を用いて解析を行ったところ、-119 ETS には、GABP α 単独、GABP α/β 、GABP α/γ 複合体が結合できるが、血管内皮細胞においては、GABP α/β 、GABP α/γ の両複合体（以後、両複合体を合わせ GABP と呼ぶ）の状態で結合していることが明らかになった。また、クロマチン免疫沈降法を用いた解析においては、血管内皮細胞中の内在性 Robo4 プロモーターの転写開始点付近に確かに GABP が結合することも明らかになり (Fig. 3)、-119 ETS のサイトへの結合因子が GABP であることが証明された。

次に、GABP がプロモーターに結合しどのように活性を制御するかについて解析を行った。まず、培養細胞を用いた *in vitro* における GABP の強制発現実験から、GABP が -119 ETS サイトを介して Robo4 プロモーターを活性化することが明らかになった。さらに、-119 ETS サイトに変異を導入したプロモーターに LacZ を連結した配列を持つ遺伝子改変マウスを作製し、野生型プロモーターを持つマウスと LacZ 遺伝子の発現量を比較したところ、*in vivo* においても -119 ETS がプロモーターの活性化に寄与することが示された。また、GABP が内在性の Robo4 遺伝子の発現を制御しているかを siRNA 導入実験で解析したところ、血管内皮細胞における GABP の発現量減少は内在性 Robo4 遺伝子の発現を優位に減少させ、GABP が確かに Robo4 遺伝子の発現促進因子であることが確認された。これらすべての結果から、GABP は、-119 ETS に結合し Robo4 遺伝子の発現を促進することが証明された (Fig. 1)。

6. Robo4 遺伝子の発現制御への DNA メチル化の寄与

ここまでの解析から SP1、GABP は Robo4 遺伝子の発現に必須の転写因子であることが明らかになった。また、筆者らはこれらの転写因子に加えプロモーター上流に結合し Robo4 遺伝子の発現を制御

する数種の転写因子の同定にも成功した。しかし、それらの転写因子は血管内皮細胞にのみ発現する転写因子ではなかったため、Robo4 が血管内皮細胞特異的に発現するメカニズムは不明のままであった。そこで筆者らは、遺伝子発現制御メカニズムとして近年急速に研究が進むエピジェネティクスにより、Robo4 遺伝子の組織特異的な発現が制御される可能性を考えた。エピジェネティクスによる転写制御には、DNA メチル化、ヒストン修飾によるものなどがあるが、筆者らは DNA メチル化に着目し Robo4 プロモーターのメチル化パターンを血管内皮細胞と非血管内皮細胞とで比較した。その結果、転写開始点付近の配列は Robo4 を発現する血管内皮細胞では非メチル化、発現しない非血管内皮細胞では高メチル化されており、この DNA メチル化が SP1 のプロモーターへの結合を減弱させることも明らかになった。これらの結果から Robo4 の組織特異的な発現にエピジェネティックな制御が関与することが明らかになった。

7. おわりに

Robo4 は血管内皮細胞の新規シグナル伝達系を形成する分子として、近年血管研究のホットトピックとなっている。筆者らは現在、Robo4 が血管関連疾患治療のターゲット分子となる可能性を考え、がんや胎児の新生血管に Robo4 が高発現するメカニズムについても解析を進めている。また、Robo4 遺伝子は血管内皮細胞特異的に発現するため、その発現制御研究を介して、多くの研究者の挑戦にもかかわらずいまだ不明のままである「血管内皮細胞特異的に遺伝子が発現するメカニズム」を解明していきたい。今後、転写因子とエピジェネティクスの両側面からさらに研究を進め、Robo4 遺伝子の発現制御メカニズムの全容を解明し、新しい疾患治療法や遺伝子発現制御モデルを提唱していきたい。

謝辞 本研究は、大阪大学大学院薬学研究科生命情報解析学分野及び Harvard Medical School で行われた研究であり、御指導賜りました土井健史教授、William Aird 教授に心から感謝致します。また、本研究をともに実施し多大なご支援を頂きました、舟橋伸昭氏、西山侑児氏を始めとするチームメンバーの皆様に感謝致します。

REFERENCES

- 1) Kidd T., Brose K., Mitchell K. J., Fetter R. D., Tessier-Lavigne M., Goodman C. S., Tear G., *Cell*, **92**, 205–215 (1998).
- 2) Rothberg J. M., Hartley D. A., Walther Z., Artavanis-Tsakonas S., *Cell*, **55**, 1047–1059 (1988).
- 3) Huminiecki L., Gorn M., Suchting S., Poulosom R., Bicknell R., *Genomics*, **79**, 547–552 (2002).
- 4) Huminiecki L., Bicknell R., *Genome Res.*, **10**, 1796–1806 (2000).
- 5) Park K. W., Morrison C. M., Sorensen L. K., Jones C. A., Rao Y., Chien C. B., Wu J. Y., Urness L. D., Li D. Y., *Dev. Biol.*, **261**, 251–267 (2003).
- 6) Seth P., Lin Y., Hanai J., Shivalingappa V., Duyao M. P., Sukhatme V. P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **332**, 533–541 (2005).
- 7) Wang B., Xiao Y., Ding B. B., Zhang N., Yuan X., Gui L., Qian K. X., Duan S., Chen Z., Rao Y., Geng J. G., *Cancer Cell*, **4**, 19–29 (2003).
- 8) Suchting S., Heal P., Tahtis K., Stewart L. M., Bicknell R., *FASEB J.*, **19**, 121–123 (2005).
- 9) Bedell V. M., Yeo S. Y., Park K. W., Chung J., Seth P., Shivalingappa V., Zhao J., Obara T., Sukhatme V. P., Drummond I. A., Li D. Y., Ramchandran R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 6373–6378 (2005).
- 10) Jones C. A., London N. R., Chen H., Park K. W., Sauvaget D., Stockton R. A., Wythe J. D., Suh W., Larrieu-Lahargue F., Mukouyama Y. S., Lindblom P., Seth P., Frias A., Nishiya N., Ginsberg M. H., Gerhardt H., Zhang K., Li D. Y., *Nat. Med.*, **14**, 448–453 (2008).
- 11) Koch A. W., Mathivet T., Larrivee B., Tong R. K., Kowalski J., Pibouin-Fragner L., Bouvree K., Stawicki S., Nicholes K., Rathore N., Scales S. J., Luis E., del Toro R., Freitas C., Breant C., Michaud A., Corvol P., Thomas J. L., Wu Y., Peale F., Watts R. J., Tessier-Lavigne M., Bagri A., Eichmann A., *Dev. Cell*, **20**, 33–46 (2011).
- 12) Okada Y., Yano K., Jin E., Funahashi N., Kitayama M., Doi T., Spokes K., Beeler D. L., Shih S. C., Okada H., Danilov T. A., Maynard E., Minami T., Oettgen P., Aird W. C., *Circ. Res.*, **100**, 1712–1722 (2007).
- 13) Okada Y., Jin E., Nikolova-Krstevski V., Yano K., Liu J., Beeler D., Spokes K., Kitayama M., Funahashi N., Doi T., Janes L., Minami T., Oettgen P., Aird W. C., *Blood*, **112**, 2336–2339 (2008).
- 14) LaMarco K., Thompson C. C., Byers B. P., Walton E. M., McKnight S. L., *Science*, **253**, 789–792 (1991).