

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08285

研究課題名(和文) GATA転写因子によるマスト細胞プロテアーゼ遺伝子の統括的な発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Transcriptional regulation of mouse tryptase genes by GATA1 and GATA2 in mast cells.

研究代表者

大根田 絹子 (Kinuko, Ohneda)

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：50323291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マスト細胞の機能発現に重要なトリプターゼ遺伝子群(Tpsg1、Tpsb2、Tpsab1)は、マウス17番染色体A3.3に存在している。骨髄由来マスト細胞において、GATA転写因子(GATA1・GATA2)を欠失させると、トリプターゼ遺伝子群の発現が減少した。GATA因子はTpsb2から離れた2つの領域(region A・B)に結合し、その間に結合するCTCFとコヒーシンのDNA結合を促進していた。また、ゲノム編集によりRegion Aを欠失させるとTpsb2の発現が顕著に減少した。これらの結果から、GATA因子はトリプターゼ遺伝子の活性化型クロマチン高次構造の形成に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mouse mast cell tryptase genes (Tpsg1, Tpsb2 and Tpsab1) are located at chromosome 17A3.3. In this study, we examined molecular basis of mast cell tryptase gene regulation by GATA1 and GATA2. Quantitative RT-PCR analysis showed that tryptase gene mRNA levels were significantly reduced by the loss of GATA factors in bone marrow mast cells (BMNCs). CHIP assays revealed that the GATA factors bind to the regions located at 72.8 and 84.3 kb upstream of Tpsb2 gene (referred to as region A and region B) in BMNCs. Deletion of region A using the CRISPR/Cas9 system resulted in a significant reduction of the Tpsb2 and Tpsg1 mRNA levels in MEDMC-BRC6 mast cells. Furthermore, CTCF and the cohesin subunit Rad21 binding to the regions between regions A and B was significantly reduced by the loss of GATA1 in BMNCs. Collectively, these results suggest that GATA factors play important roles for organizing active chromatin architecture at mouse tryptase genomic locus in mast cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写因子 マスト細胞 プロテアーゼ 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は、造血幹細胞に由来する血球系細胞で、全身の末梢組織に存在し、アレルギー反応や病原微生物に対する生体防御に関与する。マスト細胞に発現するトリプターゼやキマーゼなどのタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)は、その大部分がヒスタミンやヘパリンなどと共に細胞内の顆粒に含まれている。マスト細胞が活性化され、脱顆粒反応がおこると、これらのプロテアーゼは、標的細胞や周辺組織の破壊、サイトカインの活性化など、生体防御やアレルギー性疾患等の様々な病態において、重要な役割を果たす。

マウスでは、トリプターゼとキマーゼをコードする遺伝子群は、それぞれ染色体(Chr)17A3.3、14C3上にまとまって存在しており、これらの遺伝子クラスターは種間でよく保存されている。しかし、機能的に重要であるにもかかわらず、マスト細胞プロテアーゼ群をコードする遺伝子の発現制御については、十分に解析されていない。

造血系転写因子であるGATA1とGATA2は、マスト細胞の機能発現に必要な多くの遺伝子を正に制御している。研究代表者は、平成21-23年度基盤研究C「成熟マスト細胞におけるGATA1の機能解析」(課題番号21590318)・平成24-27年度基盤研究C「GATA因子による成熟マスト細胞の機能制御機構の解明」(課題番号24590359)等において、マスト細胞の機能維持におけるGATA因子の役割について解析した。その結果、GATA1とGATA2はともにマスト細胞特異的遺伝子の一部を正に制御しており、機能的相補性を有しているという知見を得た。しかしながら、マウス骨髄由来マスト細胞(BMMCs)においてGATA2を単独で欠失させると、多くのマスト細胞特異的遺伝子のmRNAレベルが顕著に低下し、マスト細胞の分化形質が失われたのに対し、GATA1の単独欠失時に有意に発現低下する遺伝子は少なく、明らかな形質変化も観察されなかった。これらの結果は、マスト細胞特異的遺伝子の発現制御において、GATA2はGATA1よりも重要な役割を担っていることを示している。一方、興味深いことに、Chr17A3.3に存在するトリプターゼ遺伝子群(*Tpsab1*, *Tpsb2*, *Tpsg1*)は、GATA2のみならず、GATA1の単独欠失時にもmRNA発現量が有意に低下していた。このことは、マスト細胞トリプターゼ遺伝子の発現制御において、GATA1とGATA2は相互に代償できない機能を有していることを示唆している。

2. 研究の目的

本課題は、マスト細胞の生理機能発現に重要なタンパク質分解酵素のうち、トリプターゼに注目し、その遺伝子発現制御におけるGATA1とGATA2の役割を明らかにすることを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) GATA1またはGATA2の機能欠失解析

BMMCsにおけるGATA因子の機能欠失解析は、ノックアウトマウスを用いた方法、siRNA導入によるノックダウン法のいずれかを用いて行った。ノックアウトマウスを用いた方法では、CreER^{T2}-loxPシステムを用いて、誘導的GATA1またはGATA2欠失マウスの骨髄から作製したBMMCsの培養液に、4-ヒドロキシタモキシフェン(4-OHT; 最終濃度0.5μM)を加えて、細胞レベルでGATA1またはGATA2の発現を完全に欠失させた。ノックダウン法では、GATA1またはGATA2に対するsiRNAを、最終濃度100nMとなるように、エレクトロポレーション法によって導入し、24時間後にサンプルを採取した。

(2) 公開ChIP-SEQデータベースの解析と可視化

BMMCsを用いたGATA2、CTCF、H3K27Ac、H3K4me1の公開ChIP-SEQデータベースは、NCBIのGEO data setsを用いて検索した。以下のGSMのデータをダウンロードし、Chr17A3.3領域について解析し、得られたデータをIntegrative Genomics Viewer (IGV)を用いて可視化した。GATA2; GSM1167578、H3K27Ac; GSM2564722、H3K4me1; GSM2564730、CTCF; GSM1167574

(3) クロマチン免疫沈降アッセイ(ChIP)

上記データベース上で見出されたGATA2やCTCFの結合領域について、GATA1、GATA2、CTCF、Rad21(コヒーシンのサブユニット)に対する各抗体を用いてChIP解析した。細胞は1%ホルムアルデヒドで10分間、室温で固定した。細胞破碎はFocused-ultrasonicator M200(Covaris)を用いて行った。免疫沈降や洗浄方法は、発表論文5に記載した。

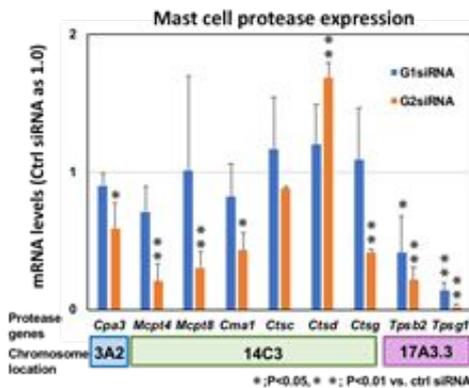
(4) CRISPR-Cas9法によるトリプターゼ遺伝子発現制御領域(RegionA)の欠失解析

RegionAをゲノム編集法により欠失させるため、CRISPRdirectを用いて、RegionAの両端にgRNAを設計した。Cas9とgRNAの発現ベクターpX330のDerivativeであるpX458(GFP発現)、pX459(puromycin耐性遺伝子発現、いずれもAddgeneを介してFeng Zhang博士より寄贈していただいた)を用いて、RegionAの5'-側を認識するgRNAをpX458、3'-側を認識するgRNAをpX459にそれぞれ挿入した。また、RegionAの欠失部位に、相同組換えによってneomycin耐性遺伝子が導入されるように、Targeting vectorを作製した。これらをマウスマスト細胞株であるMEDMC-BRC6細胞(Hiroyama T. *et al.*, PLoS ONE 2008; 3: e1544、理研BRCより購入)にエレクトロポレーション法(NEPA21)により導入し、Puromycin・G418耐性、GFP陽性細胞を選択し、クローニングした。ゲノムDNAを用いたPCR法により相同組換えが起こっているクローンを選び、DNA切断と相同組換えをシーケンスにより確認した。

4. 研究成果

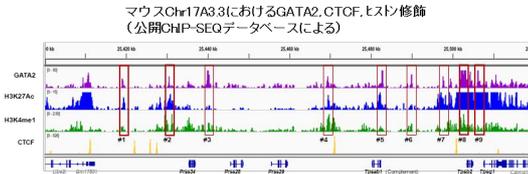
(1) GATA1 または GATA2 ノックダウン BMMCs におけるマスト細胞プロテアーゼの発現解析

GATA1 または GATA2 欠失 BMMCs でのマスト細胞プロテアーゼ遺伝子群の発現解析は、それぞれの誘導的ノックアウトマウスの BMMCs を用いて別々に行っていた。そこで本課題では、GATA1、GATA2 欠失の影響を直接比較するために、同一ロットの BMMCs を用いて siRNA によるノックダウン実験を行い、種々のプロテアーゼの mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法を用いて解析した。その結果、ノックアウトマウス由来の BMMCs での結果と一致して、GATA2 ノックダウン BMMCs では、多くのプロテアーゼ遺伝子の mRNA レベルが有意に低下していたのに対し、GATA1 の欠失時に有意に発現低下していた遺伝子は、トリプターゼ遺伝子である *Tpsb2* と *Tpsg1* のみであった(下図)。



(2) 公開 ChIP-SEQ データベースを用いたトリプターゼ遺伝子座における GATA 因子の結合解析(右上図)

研究代表者は以前、*Tpsb2* の転写開始点より 72.8kb 上流に、7 か所の GATA 結合配列を有する領域 (Region A と命名) が存在し、この領域に GATA1 と GATA2 が結合していることを報告した (Ohneda *et. al.*, Mol Cell Biol.34:1812-26, 2014)。本課題では、BMMCs を用いた GATA2 の公開 ChIP-SEQ データベースを用いて Chr17A3.3 領域を解析し、RegionA(#2)以外に 8 か所の GATA2 結合ピークが存在することを見出した(右図上段)。塩基配列を調べたところ、これらの領域には、全て 1 か所以上の GATA 結合配列が含まれていた。このうち、*Tpsb2* と *Tpsg1* の転写開始点に近い領域である 8 と 9 には、強い GATA2 結合のピークが観察され、活性型クロマチンのプロモーター・エンハンサー領域に特徴的なヒストン修飾である H3K27Ac のピークが観察された。一方、領域 #1 は Region A よりもさらに Distal (*Tpsb2* の転写開始点より 84.3kb 上流) に位置しており、2 か所の GATA 結合配列を含んでいた。また、#1 と Region A (#2) に

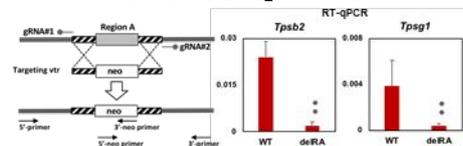


は、最も近傍に位置している *Prss34* が BMMCs ではほとんど発現していないにも関わらず、H3K27Ac に加えて、エンハンサーに特徴的なクロマチン修飾である H3K4me1 のピークが観察された(下図 2・3 段目)。領域 #1 の 5' 側に存在する *Ube21* は、Ubiquitous に発現する遺伝子であり、BMMCs では GATA 因子を欠失させても発現量が変化していなかった。これらのことから、#1 と Region A (#2) は、Distal enhancer として、GATA 因子による *Tpsb2* と *Tpsg1* の発現制御に関わっている可能性が高いと推察した。本課題では、既に報告した Region A (#2) に加えて #1 を RegionB と命名し、両領域と *Tpsb2* と *Tpsg1* 近傍の 8 と 9 に注目して、GATA 因子の分子機能を解析することとした。ChIP 解析で、これらの領域には GATA1 も結合していること、GATA1 欠失 BMMCs で結合が低下することを確認した。

(3) CRISPR-Cas9 法を用いたトリプターゼ遺伝子発現制御領域(RegionA)の欠失解析

次に、Region A が *Tpsb2* の発現制御に関与しているか否かを明らかにするため、マウスマスト細胞株 MEDMC-BRC6 細胞を用いて、CRISPR-Cas9 法で Region A を欠失させた。Region A が欠失し、相同組換えによって neomycin 耐性遺伝子が挿入されていることが確認された 3 クローンを用いて定量 RT-PCR 解析を行ったところ、*Tpsb2* と *Tpsg1* の mRNA レベルが有意に低下していた(下図)。GATA1・GATA2 や、他のプロテアーゼ遺伝子 (*Cpa3*・*Mcpt4*) の mRNA レベルは低下していなかった。これらの結果から、Region A は *Tpsb2* の正の発現制御領域であることが示唆された。

マウスマスト細胞株MEDMC-BRC6細胞を用いたCRISPR-Cas9法によるRegionA欠失解析



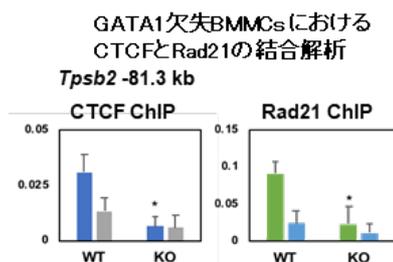
(4)トリプターゼ遺伝子座における CTCF・コヒーシンの結合解析

Region A が BMMCs では発現していない *Prss34*・*Prss28*・*Prss29* を飛び越えて *Tpsb2* と *Tpsg1* の発現を制御するためには、ルーピングによるクロマチン高次構造の構築が必要である。CTCF の公開 ChIP-seq データでは、Region A と Region B に挟まれた領域に 3 か所の結合ピークが観察された(上図下段)。ChIP 解析では、真ん中のピークは

PCR 増幅困難であったが、2つのピーク (*Tpsb2* -81.3kb・-75.9kb) については、CTCF とコヒーシンのサブユニットである Rad21 の結合が確認された。また、*Tpsb2* -2.6 kb に存在する結合ピークにも、実際に CTCF と Rad21 の結合が観察された。

(5) トリプターゼ遺伝子座への CTCF・コヒーシン結合に対する GATA1 の機能解析

1. 研究当初の背景で述べたように、GATA1 欠失 BMMCs では、トリプターゼ遺伝子の mRNA レベルが有意に低下するが、他のマスト細胞特異的遺伝子発現には変化が見られない。このことは、トリプターゼ遺伝子の発現制御において、GATA1 は GATA2 が代償できない分子機能を有していることを示唆している。そこで、多くのマスト細胞特異的遺伝子の発現に関与する GATA2 は、ChIP-seq で強いピークがみられたプロモーター領域で主に機能しているのに対して、GATA1 は Region A や Region B への結合を介して CTCF と Rad21 の結合を調整し、クロマチン高次構造の構築に関わっているのではないかと、という仮説を立てた。このことを検証するために、前項で確認された Region A と Region B に挟まれた領域への CTCF と Rad21 の結合が GATA1 欠失によって変化するかどうかを解析した。その結果、*Tpsb2* -81.3kb への CTCF と Rad21 の結合は、GATA1 欠失 BMMCs で有意に低下していた(下図)。



(6) 結論と考察

以上の結果から、Chr17A3.3 に存在するトリプターゼ遺伝子座には、*Tpsb2* と *Tpsg1* から遠く離れた2か所の活性化クロマチン領域 (Region A・B) が存在し、そこに GATA1・GATA2 が結合していること、両領域間には CTCF・Rad21 の結合部位が存在し、GATA1 は CTCF・Rad21 の結合を促進していることが明らかになった。これらの結果は、GATA 因子がトリプターゼ遺伝子の活性化型クロマチン高次構造の形成に寄与していることを示唆している。現在 Region B の欠失解析、GATA2 の CTCF・Rad21 結合への影響等の解析を行っており、これらをまとめて論文と発表する予定である。

本課題では当初、マスト細胞特異的・誘導的 CreER^{T2} トランスジェニックマウスの使用を予定していたが、このマウスは F1 樹立後トランスジーンが発現していないことが明らかとなり、使用を断念せざるを得なかつ

た。そこで、GATA1、GATA2 の分子レベルでの機能解析を重点的に行うこととし、公開 ChIP-SEQ データベースの利用やゲノム編集法を用いた解析などを追加することによって、上述のような新知見を得ることができた。

本課題は、マスト細胞では初めて、クロマチン高次構造の形成や遺伝子座全体の統括的な発現制御に注目して行った研究である。血球系細胞では、赤血球におけるグロビン遺伝子のスイッチング機構をパイオニアとして、B 細胞の免疫グロブリン重鎖遺伝子 (*IgH*) や、T 細胞の運命決定に関わる *Bcl11b* 遺伝子等において、活性化クロマチン領域がどのようなクロマチン高次構造によって形成されているのか、ルーピング形成因子と組織特異的因子がどのように相互作用しているのか等について、詳細な解析が進められている。これらの報告を参考に、マスト細胞特異的な遺伝子発現制御機構の解析を更に進めていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

1. Khanh V.C., Ohneda K., Kato T., Yamashita T., Sato F., Tachi K., Ohneda O. Uremic toxins affect the imbalance of redox state and overexpression of prolyl hydroxylase 2 in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells involved in wound healing., *Stem Cells Dev.* 2017, 26, 948-963. doi: 10.1089/scd.2016.0326. (査読有)

2. Tu TC, Yamashita T, Kato T, Nagano M, Trinh NT, Hamada H, Sato F, Ohneda K., Matsuo-Takasaki M, Ohneda O. Microvesicles derived from Alde-Low EPCs support the wound healing capacity of AT-MSCs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016, 477, 68-75. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.022. (査読有)

3. 大森慎也, 大根田絹子: GATA2 によるマスト細胞の分化と維持. *臨床免疫・アレルギー科*, 第64巻, 第4号, P352-365. 2015 (総説, 査読なし, <http://www.kahyo.com/item/M201510-644>)

4. Moriguchi T, Yu L, Takai J, Hayashi M, Satoh H, Suzuki M, Ohneda K., Yamamoto M. The human GATA1 gene retains a 5' insulator that maintains chromosomal architecture and GATA1 expression levels in splenic erythroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 2015, 35, 1825-37. doi: 10.1128/MCB.00011-15. (査読有)

5. Ohmori S., Moriguchi T, Noguchi Y, Ikeda M, Kobayashi K, Tomaru N, Ishijima Y., Ohneda O, Yamamoto M, Ohneda K. GATA2 is critical for the maintenance of cellular identity in

differentiated mast cells derived from mouse bone marrow. *Blood*, 2015, 125, 3306-15. doi: 10.1182/blood-2014-11-612465. (査読有)

6 . Tu TC, Nagano M, Yamashita T, Hamada H, Ohneda K, Kimura K, Ohneda O. A chemokine receptor, CXCR4, which is regulated by hypoxia-inducible factor 2 α , is crucial for functional endothelial progenitor cells migration to ischemic tissue and wound repair. *Stem Cells Dev.*, 2016, 25, 266-76. doi: 10.1089/scd.2015.0290. (査読有)

7 . Trinh NT, Yamashita T, Ohneda K, Kimura K, Salazar GT, Sato F, Ohneda O. Increased Expression of EGR-1 in Diabetic Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Reduces Their Wound Healing Capacity. *Stem Cells Dev.* 2016,25, 760-73. doi: 10.1089/scd.2015.0335. (査読有)

8. Trinh NT, Yamashita T, Tu TC, Kato T, Ohneda K, Sato F, Ohneda O. Microvesicles enhance the mobility of human diabetic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in vitro and improve wound healing in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016, 473, 1111-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.04.025. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

1 . 大森慎也, 島武志, 養田真理, 石嶋康史, 大根田絹子 : BMMCs において Cebpa は GATA 因子と PU.1 の相互作用によって制御される, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017.

2. 石嶋康史, 大井田晃莉, 大森慎也, 大根田絹子 : CRISPR/Cas9 法による *Gata2*-136K 領域を欠失した 3T3-L1 細胞の作製とその解析, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017.

3. 島武志, 大森慎也, 石嶋康史, 大根田絹子 : マウス骨髄由来マスト細胞における GATA 因子による *Cebpa* 転写抑制機序の解析, 平成 29 年度日本生化学会関東支部例会, 2017.

4. 和田圭祐, 大森慎也, 丸山恭平, 石嶋康史, 大根田絹子 : マウス皮下組織由来脂肪前駆細胞の分化過程における転写因子 GATA2 の機能解析, 平成 29 年度日本生化学会関東支部例会, 2017.

5. 大森慎也, 和田圭祐, 鈴木美穂, 風間由紀子, 石嶋康史, 大根田絹子 : マウス脂肪組織由来脂肪前駆細胞の分化過程における転写因子 GATA2 の機能解析. 日本薬学会 第 137 年会, 2017.

6 . 大森慎也, 掛野晶, 石嶋康史, 大根田絹子 : マウス骨髄由来マストにおける GATA2、PU.1、RUNX1 による *Cebpa* 抑制メカニズムの解析. 第 89 回日本生化学会大会, 2016.

7 . 石嶋康史, 大森慎也, 采女愛, 青木佑介, 小堀美樹, 大根田絹子 : 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化において Glucocorticoid 受容体の活性化が GATA2 の発現抑制をもたらす, 第 89 回日本生化学会大会, 2016.

8. 掛野晶, 大森慎也, 石嶋康史, 大根田絹子 : マスト細胞における GATA2 の *Cebpa* 転写抑制メカニズムの解析 - CRISPR/Cas9 法による *Cebpa*+37K 領域の機能的貢献の解析 - 平成 28 年度日本生化学会関東支部例会, 2016.

9. 蜂須和馬, 今野歩, 大根田絹子, 平井宏和 : Short version of Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element の作成および SynImCMV をプロモーターとして用いた場合の小脳での発現強度の確認. 平成 28 年度日本生化学会関東支部例会, 2016.

10 . 石嶋康史, 大森慎也, 青木佑介, 采女愛, 丹野志保, 前川悠理, 大根田絹子 : 脂肪細胞分化における GATA 因子の発現抑制機構の解析, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 1P-0679, 2015.

11. 大森慎也, 石嶋康史, 大根田絹子 : マスト細胞分化過程における GATA2 を介した *Cebpa* 遺伝子の発現抑制メカニズムの解析, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 2P-1020, 2015.

[その他]

ホームページ

<http://www.takasaki-u.ac.jp/dept/yaku/labo/details.php?L=1460>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大根田 絹子 (OHNEDA KINUKO)
高崎健康福祉大学・薬学部・教授
研究者番号 : 50323291

(2) 研究分担者

石嶋 康史 (ISHIJIMA YASUSHI)
高崎健康福祉大学・薬学部・講師
研究者番号 : 10433640

大森 慎也 (OHMORI SHINYA)
高崎健康福祉大学・薬学部・助教
研究者番号 : 10509194