

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06920

研究課題名(和文) マスト細胞遺伝子発現制御におけるGata1/Gata2とPU.1の相互作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of the molecular basis of mast cell-specific gene transcription by Gata1/Gata2 and PU.1.

研究代表者

大根田 絹子 (Ohneda, Kinuko)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号：50323291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マスト細胞特異的遺伝子の発現制御におけるGATA転写因子とPU.1の役割について、高親和性IgE受容体鎖をコードするMs4a2遺伝子をモデルとして解析した。マウス骨髄マスト細胞(BMMCs)におけるMs4a2の発現量は、GATA2とPU.1を欠失させると同程度に低下した。クロマチン免疫沈降法では、Ms4a2遺伝子へのGATA2とPU.1の結合様式は異なっており、ゲノム編集法で両者が共に結合する+10.4 kbpを欠失させると、Ms4a2遺伝子の発現が著しく低下した。これらの結果から、Ms4a2遺伝子の発現制御において、GATA2とPU.1は異なる役割を有し協調的に働くことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GATA転写因子とPU.1がお互いの発現を抑制し拮抗的に作用することは、血球細胞の分化過程で重要な分子基盤として知られてきた。本研究では、Ms4a2遺伝子の発現制御機構をモデルとしてGATA2とPU.1の協調的作用を示し、マスト細胞には従来知られていた両者の拮抗的作用とは異なる転写因子ネットワークが存在することを示した。ヒトMs4a2遺伝子のコード領域のバリエーションは気管支喘息等のリスクと関連する。今回明らかにした遺伝子発現制御の仕組みがヒトでも保存されていれば、同遺伝子の非コード領域においても、病的バリエーションや構造多型がヒト疾患リスクに関与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：GATA1/GATA2 and PU.1 are known to function antagonistically during hematopoietic development. However, these factors are co-expressed in mast cells, and activate the expression of the Ms4a2 gene encoding the chain of the high-affinity IgE receptor (Fc RI). The present study investigated the roles of GATA2 and PU.1 on Ms4a2 gene transcription. Gene ablation experiments revealed that GATA2 and PU.1 almost equally contributed to the Ms4a2 gene expression. A chromatin immunoprecipitation analysis showed that they shared DNA binding to the +10.4 kb region downstream of the Ms4a2 gene, whereas the proximal -0.06 kb region was exclusively bound by GATA2. Furthermore, we showed that the ablation of the +10.4 kb region by genome editing abolished the Ms4a2 gene expression. Collectively, these results suggest that PU.1 plays central roles in the formation of active chromatin structure, whereas GATA2 directly activates the Ms4a2 promoter.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写因子 遺伝子発現制御 マスト細胞 高親和性IgE受容体

1. 研究開始当初の背景

PU.1 と GATA1/GATA2 は、それぞれ単球・顆粒球と赤血球・巨核球への分化に必要なマスター因子である。両者が相互に遺伝子発現を抑制し、拮抗的に作用することは、20 年来、造血幹細胞から血球細胞系列決定を制御する分子基盤として教科書的なモデルとされていた。しかしながら、近年シングルセル解析など精度の高い技術が開発され、幹細胞から血球細胞系列決定までの過程において、マスター因子間の相互抑制が実際に機能しているかどうか再検証が必要であるというデータが示されるようになった。また、このような転写因子相互作用を適用し得るのは血球分化段階の特定の時期や細胞系列であり、“narrow window”が存在することも示唆されるようになった。研究代表者は、マスト細胞には、PU.1 と GATA1/GATA2 を始め、造血発生の初期で重要な役割を果たす SCL、RUNX 1 などの転写因子が共発現していることに興味を持った。マスト細胞には高親和性 IgE 受容体を介したアレルゲンに対する脱顆粒反応や多彩な生理活性物質の合成など、特異な機能を発現するために細胞系列特異的な遺伝子発現制御機構が存在すると考えられる。しかしながら、マスト細胞における転写因子相互作用や細胞系列特異的な遺伝子発現制御機構についてはこれまでほとんど研究されていなかった。

2. 研究の目的

マスト細胞特異的な遺伝子発現制御において、PU.1 と GATA1/GATA2 がどのように機能しているのかを解析し、マスト細胞に共発現している血球系転写因子のネットワーク機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BMMCs における PU.1 の機能欠失解析

研究開始当初は、BMMCs において PU.1 の発現を完全に欠失させた解析は報告されていなかった。そこで本研究では、エストロゲン誘導性に PU.1 を欠失する *Spi1^{fl/fl}::Rosa26-CreERT2* マウス (以下、PU.1 CKO マウス) から BMMCs を作製し、4-hydroxytamoxifen (4-OHT) 添加後、経時的に細胞を採取し、FACS、サイトスピン標本による形態観察、主なマスト細胞関連遺伝子の発現解析 (定量 RT-PCR) を行った。また、PU.1 の欠失に伴う GATA1/GATA2 の発現量の変化に注目し、PU.1 欠失により GATA1/GATA2 の発現が増加していた場合には、PU.1 と GATA1 または GATA2 とのダブルノックアウト (DKO) マウスを作製して、表現型がレスキューされるか否かを解析した。

(2) GATA1/GATA2 と PU.1 相互の発現制御機構の解析

予備的検討として行った CHIP 解析では、GATA1 と GATA2 が PU.1 をコードする *SPI1* 遺伝子のプロモーター領域に結合していた。また、MEDMC-BRC6 マスト細胞株 (BRC6) に siRNA を導入したノックダウン (KD) 細胞を用いて解析したところ、PU.1 mRNA 量は GATA1 または GATA2 のどちらかを抑制してもほとんど変化しないが、両者を同時に KD すると有意に増加していた。これらの結果から、GATA1 と GATA2 は *SPI1* 遺伝子の発現に対して抑制的にはたらくことが示唆された。しかしながら、GATA2 が高発現している BMMCs や BRC6 で PU.1 が発現していることから、GATA 因子による抑制は不完全であり、PU.1 の発現量を調整する役割を持つ

ているのではないかと考えられた。そこで本研究では、マスト細胞における GATA1/GATA2 と PU.1 相互の発現制御機構について、CHIP 解析や GATA1/GATA2 の標的遺伝子の発現変化に注目して解析を進めた。

(3) GATA1/GATA2 と PU.1 の相互作用によるマスト細胞特異的遺伝子 *Ms4a2* の遺伝子発現制御機構の解析

当初の計画では、以前行った GATA2 欠失 BMMCs を用いた RNA シークエンス法によるトランスクリプトームの結果と併せて PU.1 欠失 BMMCs を用いた RNA シークエンス法を実施し、網羅的に解析することで、GATA1/GATA2 と PU.1 のマスト細胞における標的因子の全体像を明らかにする予定であった。しかし予備的に行った PU.1 欠失 BMMCs の RT-PCR 解析では発現変化が明らかな遺伝子はわずかであった。一方、高親和性 IgE 受容体 鎖 (FcεRIβ) をコードする *Ms4a2* 遺伝子は、GATA2 と PU.1 を欠失させると同程度に mRNA 量が低下し、両者の DNA 結合部位が異なっていることが解析を進めるうちに明らかになった。高親和性 IgE 受容体はマスト細胞特異的な機能発現に必須の因子であることから、*Ms4a2* 遺伝子の発現制御機構の分子機序をマスト細胞特異的遺伝子のモデルとして解析することとした。具体的には、GATA1/GATA2 と PU.1 それぞれを欠失させた時の FcεRI の発現変化と相互の発現量の変化を解析し、*Ms4a2* 遺伝子のシス領域を ChIP 解析で同定した。CRISPR-Cas9 法により、重要なシス領域を欠失させ、*Ms4a2* 遺伝子発現への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) BMMCs における PU.1 の機能欠失解析

エストロゲン誘導性に Cre-loxP システムが作動する「条件付き PU.1 ノックアウトマウス」から作製した PU.1 欠失骨髄由来マスト細胞 (BMMCs) を用いて主な表現型を解析した。その際、既に報告されている siRNA による PU.1 ノックダウン (KD) マスト細胞の表現型と比較しながら、PU.1 欠失時の GATA 因子の発現変動に注目した。その結果、PU.1 を完全に欠失させた BMMCs は、細胞の生存率、細胞の形態、顆粒の染色性、抗原非依存性の脱顆粒能は、野生型 BMMCs と同様であったが、高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) の発現強度の減少、FcεRIβ mRNA の発現量低下、シグナル分子 Syk の発現低下が認められ、抗原刺激によるマスト細胞の脱顆粒反応が低下していた。これらの表現型は、PU.1KDBMMCs の解析で報告されていた表現型と一致していた。興味深いことに、フローサイトメトリー (FACS) で FcεRIα に対する抗体を用いて測定した細胞表面の FcεRI の発現強度は減少していたが、BMMCs での *FceR1a* の発現量は PU.1 の欠失により逆に増加した。このことは、FcεRIα タンパク質の細胞表面への輸送に FcεRIβ との結合が必要であるという過去の報告を裏付けるものであり、細胞表面の FcεRI の発現は、FcεRIβ の発現量に依存することを示唆していると考えられた。

(2) GATA1/GATA2 と PU.1 相互の発現制御機構の解析

PU.1 欠失 BMMC では、GATA1 と GATA2 の mRNA 量が増加していた。一方、GATA 因子を KD した BMMCs や MEDMC-BRC6 マスト細胞株 (BRC6 細胞) での PU.1 mRNA は、単一の GATA 因子を KD しても変化はなく、GATA1 と GATA2 の双方を KD すると増加した。

(1) で述べたように、PU.1 欠失 BMMCs では *FceR1a* の発現量が増加したが、この細胞では GATA1 と GATA2 の mRNA 量が増加していた。また、GATA1 と GATA2 を欠失させた BMMCs では *FceR1a* の mRNA 量が低下していた。これらの結果から、*FceR1a* の発現は GATA1 と GATA2

に依存すると考えられた。同じように、BRC6細胞において、GATA1とGATA2の直接の標的遺伝子である *Tpsb2* と *Tpsg 1* (ともにマスト細胞トリプターゼをコードする) の mRNA 量は、GATA1とGATA2をKDすると減少し、PU.1をKDすると増加した。

このように、PU.1とGATA1/GATA2は、相互の発現を抑制するが、この機構は造血幹細胞・前駆細胞で知られているようなお互いの発現を完全に抑えるほど強いものではなかった。しかしながら、PU.1によるGATA因子の発現抑制は、GATA1/GATA2の標的遺伝子の発現量の調整に働いている可能性が示唆された。

(3) GATA1/GATA2とPU.1の相互作用によるマスト細胞特異的遺伝子 *Ms4a2* の遺伝子発現制御機構の解析

(1)と(2)の解析から、GATA2とPU.1によってともに正に制御されている *Ms4a2* 遺伝子の遺伝子発現制御機構について、*Ms4a2* 遺伝子をモデルとして解析を進めることとした。公開されているBMBCsでのGATA2とPU.1のChIP-seqデータベースを手がかりに、ChIP解析を行ったところ、GATA2は *Ms4a2* 遺伝子の転写開始点(TSS)近くの-60bpと+10.4kb領域に、PU.1は+10.4kb領域と-12kb領域に結合していた。種々の血球系細胞株で同様の解析を行ったところ、GATA2の-60bpへの結合はマスト細胞特異的であったが、それ以外の結合はマスト細胞以外の細胞でも観察された。+10.4kb領域には、クロマチンループ構造の形成に関わることが知られているLdb1も結合しており、Ldb1をKDすると *Ms4a2* の発現量が低下することが確認された。これらのことから、Ldb1もGATA2、PU.1と共に *Ms4a2* の発現制御に関わっていること、+10.4kb領域はGATA2、PU.1、Ldb1の協調的な作用において主要な役割を果たしていることが示唆された。次に、PU.1の役割を明らかにするため、PU.1欠失BMBCsを用いてGATA2とLdb1のDNA結合を解析した。その結果、GATA2の-60bpと+10.4kb領域への結合と、Ldb1の+10.4kb領域への結合がPU.1欠失により低下することがわかった。最後にCRISPR-Cas9法を用いてBRC6細胞で+10.4kb領域を欠失させたところ、ホモ欠失クローンでは *Ms4a2* の発現がほぼ消失した。これらの結果から、*Ms4a2* の発現制御においてGATA2とPU.1は異なる役割を持ち、GATA2はマスト細胞特異的な *Ms4a2* プロモーターの活性化に、PU.1はLdb1と共に活性化クロマチン構造の維持に重要であることが示唆された。

(4) 結論と考察

本研究によって、*Ms4a2* 遺伝子が、GATA因子とPU.1によって同じ方向(発現促進)に制御され、両者の作用メカニズムが異なることを示唆する知見を得た。これらの研究成果は論文発表し(Ohmori *et al.*, Mol Cell Biol. 39 doi: 10.1128/MCB.00314-19.) 同誌のSpotlightと表紙に掲載された。本研究でPU.1はクロマチン構造の活性化維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。論文発表後、マスト細胞特異的な遺伝子発現制御におけるGATA2とPU.1の役割についてさらに理解を深めるため、BMBCsにおいてGATA2とPU.1のDNA結合をChIP-seq解析を行った(東北医科薬科大学 森口尚先生、高井淳先生との共同研究)。Gene Ontology解析を行ったところ、GATA2とPU.1がともに結合する遺伝子には、炎症応答などマスト細胞の動的な機能発現にはたらく遺伝子が多く見られることがわかってきた。

本研究で見いだされた *Ms4a2* +10.4kb領域と相同性を示すヒト *Ms4a2* 遺伝子の領域は同定されていない。しかしながら、ヒトにおいても、PU.1やLdb1が形成する活性化クロマチン構造が足場となり、GATA2が転写活性化する機構が保たれている可能性がある。最近、ヒトマスト細胞を対象としたクロマチン活性化(Cildir *et al.*, Immunity 51, 2019)とプロテオーム解析(Plum *et*

al., Immunity 52, 2019) の網羅的解析が相次いで報告され、豊富な解析データが公開された。これらのリソースも利用しながら、GATA2 と PU.1 を中心に、ヒトのマスト細胞特異的な遺伝子発現制御における転写因子の機能や疾患との関連について理解を深めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 大森 慎也、大根田 絹子	4. 巻 92
2. 論文標題 転写因子GATA2とPU.1による高親和性IgE受容体の発現と転写制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 587 ~ 590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920587	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 大森慎也、大根田絹子	4. 巻 40
2. 論文標題 マスト細胞遺伝子発現制御におけるGATA1/GATA2とPU.1との相互作用の解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 1024-1029
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohneda Kinuko, Ohmori Shin'ya, Yamamoto Masayuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Mouse Tryptase Gene Expression is Coordinately Regulated by GATA1 and GATA2 in Bone Marrow-Derived Mast Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4603 ~ 4603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20184603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohmori Shin'ya, Ishijima Yasushi, Numata Suzuka, Takahashi Mai, Sekita Masataka, Sato Taichi, Chugun Keisuke, Yamamoto Masayuki, Ohneda Kinuko	4. 巻 39
2. 論文標題 GATA2 and PU.1 Collaborate To Activate the Expression of the Mouse Ms4a2 Gene, Encoding Fc RI, through Distinct Mechanisms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00314 ~ 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00314-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishijima Yasushi, Ohmori Shin'ya, Uneme Ai, Aoki Yusuke, Kobori Miki, Ohida Terutoshi, Arai Momoko, Hosaka Misa, Ohneda Kinuko	4. 巻 483
2. 論文標題 The Gata2 repression during 3T3-L1 preadipocyte differentiation is dependent on a rapid decrease in histone acetylation in response to glucocorticoid receptor activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 39 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mce.2019.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大森慎也, 石嶋康史, 沼田涼香, 高橋舞, 中郡佳甫, 大根田絹子
2. 発表標題 GATA2とPU.1の高親和性IgE受容体サブユニットFceRIb遺伝子(Ms4a2)発現制御機構の解析
3. 学会等名 平成31年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大森慎也, 関田将孝, 佐藤太一, 石嶋康史, 大根田絹子
2. 発表標題 GATA2とPU.1は,異なる働きにより高親和性IgE受容体サブユニットFceRIb遺伝子の発現を制御する.
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大森慎也, 干川さつき, 大根田絹子
2. 発表標題 マスト細胞においてGATA1はトリプターゼ遺伝子座におけるCTCFとコヒーシンの結合を制御する.
3. 学会等名 平成30年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大森慎也, 養田真理, 大杉真甲, 大根田絹子
2. 発表標題 骨髄由来マスト細胞においてGATA2はCebpa遺伝子座のK27me3化の維持に關与する.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohneda K., Ohmori S., Philipsen S., Yamamoto M.
2. 発表標題 GATA factor-mediated regulation of CTCF and cohesin binding at the mouse tryptase genomic locus in mast cells.
3. 学会等名 The IUBMB Focused Meeting on GATA Transcription Factors (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>マスト細胞における高親和性IgE受容体の転写制御メカニズムの一端を本学教員が解明 https://www.takasaki-u.ac.jp/news/16000.html?pid=482&clr=_lightperpul 高崎健康福祉大学薬学部 分子生体制御学研究室 http://www.takasaki-u.ac.jp/p_yaku_lab/yaku-02-01/</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大森 慎也 (Ohmori Shin'ya) (10509194)	高崎健康福祉大学・薬学部・講師 (32305)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------