

平成22年5月18日現在

| |
|---|
| 研究種目：若手研究（B） |
| 研究期間：2008～2009 |
| 課題番号：20790367 |
| 研究課題名（和文） クロマチンリモデリング機能を担う GATA3 複合体の同定と機能解析 |
| 研究課題名（英文） Identification of the functional molecular complexes of GATA3 in Th2 cells. |
| 研究代表者 |
| 細川 裕之（HOSOKAWA HIROYUKI） |
| 千葉大学・大学院医学研究院・助教 |
| 研究者番号：60431756 |

研究成果の概要（和文）：GATA3 はアレルギー疾患発症の根幹である Th2 細胞の分化を誘導する重要な転写因子である。しかし、GATA3 がどのように Th2 細胞の分化を誘導しているのか？については明らかにされていなかった。本研究では Th2 細胞の中で GATA3 に会合し、Th2 細胞の分化誘導に関わる分子として Chd4 を同定した。Chd4 は Th2 細胞の機能に重要ないくつかのサイトカイン遺伝子座に GATA3 依存的に会合し、クロマチン構造を変化させていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：GATA3 is the master transcription factor for T helper 2 (Th2) cell differentiation and is critical for the expression of Th2 cytokines. Little is known, however, about the nature of the functional molecular complexes of GATA3. We identified a chromodomain-containing transcription factor, chromodomain helicase DNA binding protein 4 (Chd4) in the GATA3 complex present in Th2 cells. We found that Th2 cell differentiation is impaired in Chd4-knockdown cells and Chd4 binds to the Th2 cytokine gene loci in a GATA3-dependent manner. These results suggest that the GATA3-dependent recruitment of Chd4 at the Th2 cytokine gene loci is involved in the induction of Th2 cytokine expression.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：GATA3、Th2 細胞、クロマチン、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎などアレルギー反応が原因で起こる疾患を総称して「アレルギー疾患」と呼ぶが、アレルギー疾患は世界的に増加傾向にあり、我が国でもアレルギー疾患を有する人の比率は増加の一步をたどっている。最近では国民の 1/3 は何らかのアレルギー疾患に罹患しているとまで言われ、社会問題化している。アレルギー疾患を根本的に解決するにはその発症メカニズムを解明することが不可欠なのは言うまでもないが、その中心に位置すると考えられている「アレルギー疾患の発症の要であるヘルパーT細胞の機能分化」に関する研究分野は、この10年間に飛躍的に進歩した。

私たちは、Th2細胞分化のマスター転写因子であるGATA3の研究を行ってきた。GATA3によるTh2サイトカイン遺伝子座のクロマチンリモデリングの誘導がTh2細胞分化の本質であり、アレルギー疾患の病態形成や維持に深く関わっていることを実験的に証明してきた。最近では、GATA3がユビキチン-プロテアソーム経路によりタンパク質レベルでの制御を受けていること、さらに、TCR刺激によるRas-ERK-MAPK経路の活性化がGATA3のユビキチン化を抑制することでTh2細胞分化を制御していることを報告してきた(Yamashita et al., J.B.C., 2005)。ポリコーム群遺伝子は多種多様な複合体をクロマチン上に形成し、ホメオボックス遺伝子をはじめとする発現調節遺伝子の発現状態を抑制的に維持しているが、それ以外にも細胞増殖やゲノム刷り込みなど様々な細胞機能に寄与する興味深い分子である。面白いことに、ポリコーム群遺伝子の一つであるMe1-18がGATA3の転写活性化を制御すること(Kimura et al., Immunity, 2001)、ポリコーム群遺伝子の中でも最も作用の強いBmi-1がGATA3と複合体を形成し、ユビキチン化経路を介したGATA3タンパク質の分解を抑制していることを報告した(Hosokawa et al., J. Immunol., 2006)。これらエビデンスは、GATA3の機能制御分子の同定という点で非常に重要な知見ではあるものの、Th2細胞分化に必須のGATA3がどのような分子群と複合体を形成し機能しているのか？そして、どのようにTh2サイトカイン遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導するのかについてはほとんどわかっていない。

一方で、転写因子研究という別の視点から

GATA3を考えた時、ポストゲノム時代における最近のトピックとして、ヒストンの修飾を含むクロマチンの構造変化とダイナミズム(クロマチンリモデリング)が挙げられる(Cell Res 15:292-300, 2005)。ゲノム上に存在する数多くの遺伝子がクロマチンという構造を介してどのように緻密に発現調節を受けているのかは未だに多くの謎が残されている。発生の過程や細胞の増殖・分化・アポトーシスの過程において、クロマチンやヒストンの構造的変化が遺伝子の発現調節に非常に重要であり、GATA3がTh2細胞分化を引き起こすプロセスでもやはり、Th2サイトカイン遺伝子座におけるクロマチンの構造的変化やその制御が深く関わっていることが知られている(Yamashita, J.B.C. 2002, Omori Immunity 2003)。GATA3によるTh2細胞分化のメカニズムを解明していく上で、これらは根本的な問題であり、国際的にも競合的な研究が進められている先端分野のひとつである。しかし、今のところ各々の研究者がそれぞれの実験モデルの中で興味深い分子や予想される因子を組み合わせで解析している報告が多く、機能的で斬新なアプローチを用いて網羅的に根本的な解決を目指したプロジェクトはほとんど見受けられていない。そこで本研究では、GATA3によるTh2細胞分化制御機構の解明を目的として、特にクロマチンリモデリングを誘導する機能的複合体に焦点を当て、プロテオミクス手法によってin vivoにおけるGATA3複合体の精製とそこに含まれる機能的な分子群の同定を行う。

2. 研究の目的

本研究のテーマは、クロマチンリモデリングを誘導するGATA3複合体に含まれる機能的制御分子を同定することで、アレルギー疾患の病態の中心にあるTh2細胞分化において、GATA3がどのような分子メカニズムを介して制御を受け、どのように生理作用を発揮するのか？という核心に迫ることである。この研究の着想が従来の方法と全く異なる点は、細胞内における機能的なGATA3/クロマチン複合体をターゲットにしたアプローチであり、過去のプロテオミクスを用いたいわば単なる結合タンパクの同定とは意味が異なる。このアプローチは、共同研究者である田中がp53を用いて解析した方法(Tanaka et al., Cell, 2007)を改良・進歩させたもので、クロマチン免

疫沈降法とプロテオミクス技術を組合わせた手法である。FLAG など標識アミノ酸配列を用いたアフィニティー精製による結合タンパクの同定や GST-pull down を応用した結合因子の精製などの既存の方法の大きな問題点は、生理的に非常に重要であるが結合が弱い分子は同定が困難である点や、ライゼートの調製・免疫沈降反応の過程で生じてしまう非特異的結合タンパク質の存在であった。また Yeast-Two-Hybrid などでは、確かに結合はするが生理機能とはかけ離れていることが多い点や、直接結合する分子以外は同定されないことなどが問題であった。クロマチン免疫沈降法は、細胞を生きた状態のままクロスリンク処理することにより、DNA に結合したままの転写因子を含むクロマチン複合体を細胞内から免疫沈降し、目的の転写因子の DNA 結合能を解析する方法である。本研究の独創的なポイントは、単なるアッセイ法のひとつである免疫沈降法のプロトコルを応用し、プロテオミクスの生化学的手法と組み合わせることで、細胞内において Th2 サイトカイン遺伝子座に結合している機能型の GATA3 複合体を取り出し、その中に含まれる機能的役割を持つ分子群を同定しようという点である。それによって、真に生理活性を発現する機能分子の同定が可能になると考えている。

これまで Th2 細胞の分化に関する研究は、主にサイトカインレセプターからのシグナル伝達や Th2 細胞特異的な転写因子の同定に集中していた (Murphy et al., Nat Rev Immunol., 2002) が、本研究は、クロマチンリモデリングと Th2 細胞分化の接点で作用する新たな鍵分子の発見を世界に先駆けて可能にすると思われる。それらは、アレルギー疾患治療における新たな創薬の標的分子となることが予想され、非常にインパクトのある成果が期待される。

3. 研究の方法

本研究計画では、平成 20 年度にクロマチンリモデリングを担う新たな GATA3 複合体の同定を目指すと同時に、これまでに同定済みの分子について機能解析を行う。平成 21 年度は、新たに同定した分子のクロマチンリモデリングへの関与を検討し、いくつかの成果を論文発表することを目指す。

(1) 2008 年度 (平成 20 年度)

- ① 標識抗体及び特異抗体を用いた GATA3/クロマチン複合体のアフィニティー精製:
このステップは、マスペックによる同

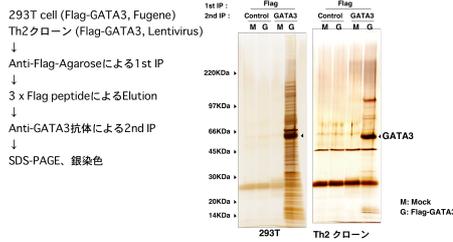
定の前段階として抗体を用いたアフィニティー精製を組み合わせることにより GATA3 特異的な複合体を精製することである。

具体的には、FLAG タグなどで標識した GATA3 をリポフェクション法やレンチウイルスを用いて細胞内に遺伝子導入する。通常の方法を用いてライゼートを調製する場合と、クロスリンク剤エージェントであるホルムアルデヒドで処理することで細胞内の GATA3/クロマチン複合体を架橋した後、超音波破碎機を用いて粗核分画の可溶化を行なう 2 種類の方法を検討し比較する。ここでのポイントは、1) この後のタンパク同定のステップのためにスケールアップが可能なシステムを用いること、2) 過剰発現系だけではなく、Th1/Th2 細胞分化誘導のサンプルを用いるなど実際の生理的条件に近い系も検討すること、3) GATA3/クロマチン複合体の免疫沈降物の精製度が低い場合にそなえて、タグアフィニティー精製過程を加えることができるように準備しておくことである。我々は既に、レンチウイルスにより GATA3 を遺伝子導入するシステムを確立しているが、これは遺伝子導入率がほぼ 100% と効率的であり、スケールアップして細胞内の内因性分子をできるだけ共沈することに適している。タグとペプチド Elution を用いたアフィニティー精製だけではなく、GATA3 に対する特異抗体をプロテイン A/G セファロースビーズに固定してアフィニティーカラムを作製し、これらを組み合わせて GATA3 複合体の精製を行なう。

上記によって精製された GATA3 複合体を、クロマチン免疫沈降法で Th2 サイトカイン遺伝子座への会合を確認しながら、リバースクロスリンク後に SDS-PAGE 上で展開し、それぞれの複合体に含まれる特異的分子の同定を行なう。また CBB 染色や銀染色で確認された特異的分子のポリペプチドのゲルスポットを切り出し、LC-MS/MS を用いて目的タンパクの同定を行なう。

申請者はこれまでに、スモールスケールの精製により GATA3 結合タンパク質を数多く検出し (図 1)、ラージスケールでの精製をほぼ完了している。

図1 GATA3複合体の2ステップアフィニティー精製

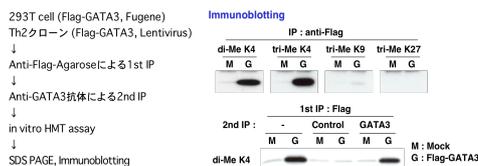


②GATA3 複合体中の機能的分子群の絞り込み:

このステップでは、GATA3 複合体中に認められる分子群の中から、より生理的に意味のあるものを絞り込む。アフィニティー精製後でも、GATA3/クロマチン複合体のなかに数多くの分子が含まれていることがスモールスケールの精製(図1)から明らかになった。そこで、Th2 サイトカイン遺伝子への結合能、ヒストン H3 メチル化(HMT)活性を指標に、GATA3 複合体の中でも生理的機能を持つ複合体だけをさらに精製する。

申請者は既に予備実験として、ヒト 293T 細胞やマウス Th2 細胞クローン(D10G4.1 細胞)において、GATA3 複合体の中にクロマチンリモデリングの指標であるヒストン H3 K4 をメチル化する活性が含まれていること(図2)や GATA3 複合体が Th2 サイトカイン遺伝子座に会合していることを確認している。スクロースグラディエントによるサイズ分画と組み合わせることで、サイズの異なる GATA3 複合体ごとに HMT 活性や Th2 サイトカイン遺伝子座への結合能を検討し、マススペックによる同定に向けての更なる精製を行う。

図2 同定したGATA3複合体はヒストンH3 K4をメチル化する



③すでに同定されている GATA3 会合分子の解析:

すでに同定済みである Bmi-1 や ROG, LEF1, Mdm2 はレトロウイルスベクターによる過剰発現系やレンチウイルスベクターによるノックダウン系を用いた in vitro の解析、Tg マウスや KO マウスを用いた in vivo の解析を組み合わせることで、GATA3 による Th2 細胞分化の誘導において、これらの分子がどのような役割を果たしているか明らかにし、論文発表することを目指

す。

(2)2009 年度 (平成 21 年度)

選択的転写制御分子としての機能解析マススペックにより同定された分子は、GATA3 複合体に含まれ、かつ GATA3 によるクロマチンリモデリングの誘導に関与することが期待される。しかし、中には生理的な機能とはかけ離れた分子も含まれることが予想される。そこで、候補分子が Th2 細胞内で GATA3 複合体の中に含まれているか、そして GATA3 による Th2 細胞分化の誘導に影響を及ぼすかを検討するスクリーニングが必要である。

具体的には、Th2 細胞を用いて抗 GATA3 抗体による免疫沈降後のウェスタンブロットティングを行い、GATA3 との会合を確認する。さらに機能的なスクリーニングとして、レンチウイルスを用いた shRNA による同定分子のノックダウンを行ない、Th2 細胞の分化を細胞内染色法で、Th2 サイトカイン遺伝子座のクロマチン状態をクロマチン免疫沈降法で検討する。これらのスクリーニングにより生理的な機能の確認された分子については、ノックアウトマウスや Tg マウスを作製し、OVA/Alum 免疫後に誘導される免疫応答や気道炎症モデル、喘息モデルなどの Th2 型病態動物モデルを用いて in vivo における同定分子の生理的役割について解析を行なう。

本研究計画はプロテオミクスアプローチであるため、当然予期せぬトラブルに見舞われ進行が遅れる可能性が考えられる。しかし、申請者はプレリミナリーに GATA3 に特異的に結合するポリペプチドを複数検出し、その複合体の中に、クロマチンリモデリングの指標である、ヒストン H3-K4 をメチル化する活性が含まれることを確認している。また、すでに同定した分子については機能解析を行う。従って、研究全体が頓挫することはまずあり得ない。

4. 研究成果

(1)2008 年度 (平成 20 年度)

①標識抗体及び特異抗体を用いた GATA3 複合体のアフィニティー精製:

マススペックによる同定の前段階としてレンチウイルスを用いて Flag tag を付加した GATA3 を発現する Th2 細胞クローンを確立し、抗 Flag 抗体を用いて

免疫沈降法により GATA3 複合体を粗精製した。さらに抗 GATA3 抗体を用いて GATA3 複合体を高度に精製した。CBB 染色や銀染色で確認された特異的分子のポリペプチドのゲルスポットを切り出し、LC-MS/MS を用いて目的タンパクの同定を行なった。

②GATA3 複合体中の機能的分子群の絞り込み:

同定された分子が生理的に重要であるか、スクリーニングを行うために、primary CD4 T 細胞を用いた siRNA によるノックダウンシステムを確立した。この実験系を用いることで、GATA3 会合分子の中から Th2 細胞の分化制御に関わる分子をスクリーニングすることが可能になった。

(2)2009 年度 (平成 21 年度)

①マススペックにより同定された GATA3 会合分子の機能的スクリーニング:

GATA3 会合分子の中から機能的な分子を絞り込むため、siRNA によるノックダウンを行い、Th2 細胞の分化に影響を与える分子をスクリーニングした。それと平行して、GATA3 会合分子の cDNA をクローニングし、GATA3 との会合を免疫沈降法により確認した。この 2 つのスクリーニングから GATA3 に会合し、かつ Th2 細胞の分化を制御する分子として、抑制性複合体 (NuRD complex) の構成分子として知られる Chd4 を同定した。

②Th2 細胞分化を制御する GATA3 会合分子 Chd4 の解析:

Chd4 をノックダウンした CD4T 細胞では Th2 細胞への分化が抑制されるとともに、Th1 細胞への分化が亢進していた。この結果から、Chd4 は GATA3 による Th2 サイトカインの活性化のみならず Th1 細胞分化の抑制にも関与していると考えられた。また、クロマチン免疫沈降法を用いて Chd4 が GATA3 依存的に Th2 サイトカイン遺伝子座に会合していることを明らかにした。以上の結果から、Chd4 を Th2 サイトカイン遺伝子座に動員することが GATA3 による Th2 サイトカイン活性化メカニズムの 1 つである可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

①Miki, H. T., Hasegawa, A., Iwamura, C., Shinoda, K., Tofukuji, S., Watanabe, Y., Hosokawa, H., Motohashi, S., Hashimoto,

K., Shirai, M., Yamashita, M., and Nakayama, T., CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation., *J. Immunol.*, 183: 8203-8215, 2009, 査読有

②Kitajima, M., Iwamura, C., Miki, H. T., Shinoda, K., Endo, Y., Watanabe, Y., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Hashimoto, K., Motohashi, S., Koseki, H., Ohara, O., Yamashita, M., and Nakayama, T., Enhanced Th2 cell differentiation and allergen-induced airway inflammation in Zfp35-deficient mice., *J. Immunol.*, 183: 5388-5396, 2009, 査読有

③Nagata, A., Tanaka, T., Minezawa, A., Poyurovsky, M., Mayama, T., Suzuki, S., Hashimoto, N., Yoshida, T., Suyama, K., Miyata, A., Hosokawa, H., Nakayama, T., and Tatsuno, I., cAMP^{q1} activation by PACAP/VIP stimulates IL-6 release and inhibits osteoblastic differentiation through VPAC2 receptor in osteoblastic MC3T3 cells., *J. Cell. Physiol.*, 221: 75-83, 2009, 査読有

④Shinnakasu, R., Yamashita, M., Kuwahara, M., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Motohashi, S., and Nakayama, T., Gfil-mediated stabilization of GATA3 protein is required for Th2 cell differentiation., *J. Biol. Chem.*, 283: 28216-28225, 2008, 査読有

⑤Hossain, M. B., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Watarai, H., Taniguchi, M., Yamashita, M., and Nakayama, T., Lymphoid enhancer factor interacts with GATA-3 and controls its function in T helper type 2 cells., *Immunology*, 125: 377-386, 2008, 査読有

⑥Ito, T., Hasegawa, A., Hosokawa, H., Yamashita, M., Motohashi, S., Naka, T., Okamoto, Y., Fujita, Y., Ishii, Y., Taniguchi, M., Yano, I., and Nakayama, T., Human T_H1 differentiation induced by lipoarabinomannan/lipomannan from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo-172, *Int. Immunol.*, 20: 849-860, 2008, 査読有

⑦Yamashita, M., Kuwahara, M., Suzuki, A., Hirahara, K., Shinnakasu, R.,

Hosokawa, H., Hasegawa, A., Motohashi, S., Iwama, A., and Nakayama, T., Bmi1 regulates memory CD4 T cell survival via repression of the Noxa gene., J. Exp. Med., 205: 1109-1120, 2008, 査読有

[学会発表] (計5件)

- ①Hosokawa, H., Transcription factor MLL regulates IL-4 mediated anti-tumor response by tumor specific memory Th2 cells, 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 2009年12月3日, 大阪
- ②Nakayama, T., Hosokawa, H., Regulation of memory Th cell survival and function by the polycomb and trithorax group gene products., The 5th International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2009, 2009年6月4日, 京都
- ③Yamashita, M., Hosokawa, H., Bmi1はNoxa遺伝子の発現抑制を介してメモリーTh細胞の生存を制御する/Bmi1 regulates memory CD4 T cell survival via repression of the Noxa gene., 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 2008年12月2日, 京都
- ④細川裕之, Lymphoid enhancer factor 1 (LEF1)はGATA3に会合しその機能を調節する/Lymphoid enhancer factor interacts with GATA3 and controls its function in T helper type 2 cells, 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 2008年12月1日, 京都
- ⑤Ito, T., Hosokawa, H., BCG Tokyo-172から分離精製したLAM/LM分子によるHuman Th1分化誘導機構/Human Th1 differentiation induced by lipoarabinomannan/lipomannan from Mycobacterium bovis BCG Tokyo-172., 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 2008年12月1日, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 裕之 (HOSOKAWA HIROYUKI)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号: 60431756

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし