

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 9日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2010～2012

課題番号：22590279

研究課題名（和文） 転写因子 GATA3 によるエピジェネティック制御の分子機構

研究課題名（英文） Epigenetic regulation by transcription factor GATA3

研究代表者

宮武昌一郎 (MIYATAKE SHOICHIRO)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・副参事研究員

研究者番号：30239420

研究成果の概要（和文）：Th2 分化に重要な転写因子 GATA3 の結合分子群の同定し、機能解析をおこなった。GATA3 に FLAG タグを融合した遺伝子を持つマウスを作製した。Th2 において DNA 脱メチル化に関与する遺伝子群のノックダウンをおこない、解析した。GATA3 結合分子として Rcor1 および Zbtb35(ZNF131)のノックアウトマウスを作成した。Rcor1 は Treg の誘導に重要であることを明らかにした。Zbtb35 は、T 細胞の初期分化過程では GATA3 と共役し、後期分化過程では、GATA3 とは関連しない機能を持つ事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Interacting molecules for transcription factor Gata3 were identified and their functions were analyzed. Mouse strain with flag tag integrated Gata3 locus was established. Knockdown of DNA demethylation enzymes in Th2 was performed. Rcor1 and Zbtb35 (Znf131) conditional knockout mice were established. Rcor1 plays important roles in Treg induction. Zbtb35 collaborates with Gata3 during early T lineage development, however in late T lineage development, Zbtb35 has different functions from those of Gata3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：ゲノム医化学

1. 研究開始当初の背景

免疫細胞の多くは、細菌、ウイルス、寄生虫などの病原体、癌細胞、常在菌、食物など、多様な外来抗原に対して、多様な免疫応答を展開するために、サブセットに分化し、機能する。CD4 陽性 T 細胞の場合、エフェクターヘルパー T 細胞サブセットとして、Th1、Th2、Th17、Tfh など、制御性 T 細胞として iTreg(pTreg)、Tr-1 などに分化する。サブセット分化で中心的な役割を担う転写因子を

マスターレギュレーターと呼び、種々のサブセットにおいて同定されている。寄生虫感染に対する免疫応答やアレルギー疾患の発症に関与する Th2 の誘導では、転写因子 GATA3 が中心的役割を担う。IL4、IL5、IL13 などのサイトカイン産生は、Th2 の重要な機能であり、GATA3 はこれらのサイトカイン遺伝子を、これらの遺伝子の発現制御領域に結合することで直接制御していることが明らかにされた。これらのサイトカイン遺伝子

領域は、Th2 において、特徴的なエピジェネティック制御を受ける。分化に伴うヒストン修飾や DNA メチル化の変化が詳細に解析されている。私たちは、Th2 分化において、DNA 脱メチル化が分化誘導初期に、細胞増殖に依存せずに誘導されることを明らかにした (Aoki K, Sato N, Yamaguchi A, Kaminuma O, Hosozawa T and Miyatake S. Regulation of DNA demethylation during maturation of CD4+ naive T cells by the conserved noncoding sequence 1. J Immunol. 182; 7698-7707, 2009)。しかし、GATA3 はどのような分子機序により、これらの遺伝子領域のエピジェネティック制御をおこなっているのか、またこれらのサイトカイン遺伝子の他に多くの Th2 特異的に発現する遺伝子、また Th2 では発現が抑制される遺伝子に対して、GATA3 はどのように作用をおよぼしているのか、これらの分子機構は不明である。その解明に向けた重要なアプローチのひとつとして GATA3 に結合する分子群の解析が重要である。GATA ファミリー転写因子群については、GATA1 でおこなわれているだけであった。そこで GATA3 結合分子群の探索を開始した。GATA3 を免疫沈降する際、共沈降する複合体を分離し、質量分析により、複合体の構成分子群を同定する。本来、マウスから分離した CD4 陽性ナイーブ T 細胞から誘導した Th2 の初代培養細胞を材料としたいところだが、実験を開始した時点において、タンパク質複合体の解析をおこなうために十分な量のタンパク質複合体を得られない、また GATA3 に対する親和性、選択性の充分高い抗体が入手できないなどの制約があった。そこで、タグを融合した GATA3 を、293 細胞 (ヒト胎児腎臓細胞) や Jurkat 細胞 (ヒト T 細胞白血病細胞) などの培養細胞株に発現させ、タグに対する抗体を用いて複合体を免疫沈降し、解析をおこなった。その結果、転写自体を担う RNA ポリメラーゼのサブユニットやヒストンシャペロンである FACT 複合体、やはり転写自体への関与が報告されているポリ ADP リボースポリメラーゼ PARP1、ヒストンを含むタンパク質アセチル化をおこなう PRMT1、複数のキナーゼやフォスファターゼ、コリプレッサー RCOR1 (CoREST) やそれと複合体を形成するヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1、機能未知の Zn フィンガータンパク質 ZNF131、脱ユビキチン化酵素 USP7 などが同定された。私たちは、これらの GATA3 結合タンパク質群の機能を、T 細胞サブセット分化において解析することをめざし、本研究課題の申請をおこなった。

2. 研究の目的

上記、研究開始時の背景で述べたように、申請時において転写因子 GATA3 の T 細胞サブ

セット分化における作用機序を解明するアプローチのひとつとして、GATA3 を含むタンパク質複合体の分離と構成分子群の同定を開始していた。その結果をふまえ、以下の研究目的を設定した。

(1) Th2 サブセットからの GATA3 を含む複合体の分離と構成分子群の同定

技術的な制約から、培養細胞に GATA3 を過剰発現するというアプローチにより、GATA3 結合分子群の探索をおこなったが、本来、マウスより分離した T 細胞を用いて解析することが重要である。そこで、GATA3 遺伝子に FLAG タグを挿入するノックインマウスを作成する。GATA3 コンディショナルノックアウトマウスは、少なくとも 3 系統報告されているが、タグを挿入するにあたり、コンディショナルノックアウトマウスとなるように作成する。このマウスから CD4 陽性ナイーブ T 細胞を分離し、Th2 に分化させ、FLAG タグに対する抗体を用いて GATA3 複合体を免疫沈降し、複合体構成分子群の同定、解析をおこなう。

(2) エピジェネティック制御 (ヒストン修飾、クロマチンリモデリング、DNA メチル化制御など) に関与する分子の解析

私たちは、Th2 分化におけるサイトカイン遺伝子領域のエピジェネティック制御の中で、DNA 脱メチル化に特に注目して来た。DNA 脱メチル化は、種々のエピジェネティック制御機構の中で、分子機序が最も解析が進んでおらず、この制御機構を担う酵素群の同定も、黎明期にあると言える。TDG (thymine-DNA glycosylase)、Tet1-3 (tet methylcytosine dioxygenase 1-3)、AID (activation-induced cytidine deaminase)、MBD4 (methyl-CpG binding domain protein 4)、elp3 (elongator acetyltransferase complex subunit 3) などが、受精卵や初期胚におけるゲノム全体にわたり誘導される脱メチル化を担う分子の候補として報告されている。そこで、これらの遺伝子が、Th2 分化における特定の遺伝子領域における、非常に短時間に誘導される脱メチル化に関与しているのか解析する。Tet、MBD4、TDG、AID は、これらの酵素が DNA のメチルシトシンに作用した後、ヌクレオチド除去修復機構を介してメチル化されていないシトシンにおきかえると考えられている。そこで、ヌクレオチド除去修復機構も Th2 分化における特定の遺伝子領域の脱メチル化に関与しているか検討する。

(3) GATA3 結合分子群として、293 細胞や Jurkat 細胞において同定された分子群の解析

293 細胞や Jurkat 細胞を用いて同定された GATA3 結合分子群は多数あった。これらをすべて解析するほど研究室の人的および物的規模が大きくないので、より重要と考えら

れる分子を選んで解析をおこなう。

第1は RCOR1 (CoREST) と HDAC1 である。コリプレッサー RCOR1 は、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1/2 とヒストン脱メチル化酵素 LSD1 と複合体を構成し、多数の遺伝子発現を抑制する。Th2 サブセットにおいて、発現が抑制される遺伝子群、たとえば IFN γ や IL-17F など他の Th サブセットで発現するサイトカイン遺伝子の発現抑制に関与する可能性がある。shRNA によるノックダウン法、およびコンディショナルノックアウトマウスの作成により検討する。

第2は、RNA ポリメラーゼ II、FACT 複合体、ポリ ADP リボースポリメラーゼ PARP1 である。これらの分子群は、クロマチン上の遺伝子の転写に直接関与する。GATA3 がこれらの分子を標的遺伝子上にリクルートする機能を持つか検証する。Tag が融合した GATA3 を持つ T 細胞を用いて、クロマチン免疫沈降法や免疫組織化学法により、GATA3 とこれらの転写装置の局在を詳細に解析する。第3は、機能未知の Zn フィンガータンパク質 ZNF131 (報告書作成時 Zbtb35 という遺伝子名が与えられた) で、コンディショナルノックアウトマウス作成をおこなう。

3. 研究の方法

(1) Th2 サブセットからの GATA3 を含む複合体の分離と構成分子群の同定

GATA3 遺伝子に Flag タグを挿入したマウスの作成をおこなう。同時に loxP 配列を挿入することで、種々の Cre リコンビナーゼ発現マウスと交配することにより、特定の細胞系列、分化段階あるいは誘導的に GATA3 遺伝子の欠失を誘導できるようにする。GATA3 の単純な欠失マウスは胚性致死であり、また GFP タンパク質を融合した場合は GATA3 が不安定化し、その機能が大きく障害される。そこで FLAG タグを融合したマウスの T 細胞が、正常に分化するか確認をおこなう。問題がなければ、このマウスより分離した CD4 陽性ナイーブ T 細胞から T 細胞サブセットを分化させ、GATA3 複合体を FLAG タグに対する抗体を用いて免疫沈降させ、構成分子群の同定をおこなう。

(2) ヒストン修飾、クロマチンリモデリング、DNA メチル化/脱メチル化に関与する分子の解析

染色体のエピジェネティック制御に関与する分子群が GATA3 複合体に含まれる場合、その分子群と GATA3 の相互作用の解析、染色体上での共局在、分化誘導に伴う経時的变化を解析する。特に DNA メチル化/脱メチル化に関与する分子群が同定された場合、重点的に解析する。マウスより分離した T 細胞を Th2 に分化誘導する実験系において siRNA、shRNA の手法によりノックダウンし、効果を検討する。特に重要と考えられる遺伝子については、

ノックアウトマウスの作成あるいは入手を検討する。

(3) GATA3 結合分子群として、293 細胞や Jurkat 細胞において同定された分子群の解析

すでに培養細胞を用いて分離された GATA3 結合分子群について、解析を進める。マウスより分離した T 細胞を Th2 に分化誘導する実験系において siRNA、shRNA の手法によりノックダウンし、効果を検討する。またコリプレッサー RCOR1 および機能未知の遺伝子 Zbtb35 (ZNF131) については、ノックアウトマウスを作成し、解析を進める。

4. 研究成果

(1) Th2 サブセットからの GATA3 を含む複合体の分離と構成分子群の同定

GATA3 遺伝子に FLAG タグを挿入、さらに LoxP 配列を挿入したコンディショナルノックアウトマウスを作成した。これまで報告されているコンディショナルノックアウトマウスは、ふたつの Zn フィンガーを欠失するものと翻訳開始コドン ATG を欠失させるものであったが、私たちのものは、C 末側の Zn フィンガーを欠失させるものである。マウスは正常に生まれ、繁殖する。図に示すように T 細胞サブセットに分化し、GATA3 の FLAG タグに対する抗体により、検出感度が増大した。

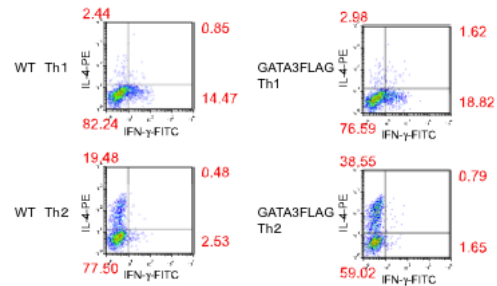
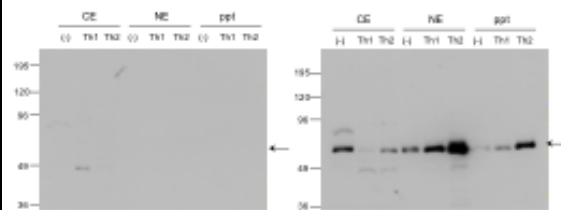


図1、GATA3 に FLAG タグを挿入したマウスのナイーブ T



細胞の Th1/Th2 分化

上段；コントロール (WT) と FLAG タグ挿入マウス (GATA3FLAG) の Th1 および Th2 の IFN γ および IL4 産生
下段；コントロール (左) および FLAG タグ挿入マウス (右) 由来 Th1/Th2 のウェスタンブロット。右は抗 GATA3 抗体、左は抗 FLAG 抗体を用いている。CE (細胞質)、NE (核)、ppt (不溶分画)

(2) ヒストン修飾、クロマチンリモデリング、DNA メチル化/脱メチル化に関与する分子の解析

染色体上での解析は進んでいない。DNA 脱メ

チル化に重要であることが報告されている MBD2, 4, Tet1-3, TDG, elp3, AID の各酵素について Th サブセット誘導系において解析した。Tet1, AID, elp3 は T 細胞でほとんど発現していないため、除外した。マウスより分離した CD4 陽性ナイーブ T 細胞に shRNA を発現させるレトロウイルスベクターを作成し、各遺伝子のノックダウンをおこなった。MBD2, 4 のノックダウンでは、ほとんどサイトカイン産生に影響がなかった。TDG では、IL4 産生には影響が見られなかったが、IFN γ 産生の亢進が認められた。この効果が、DNA メチル化/脱メチル化と関連しているか、検討中である。

(3) GATA3 結合分子群として、293 細胞や Jurkat 細胞において同定された分子群の解析

① コリプレッサー Rcor1 の解析

Rcor1 のコンディショナルノックアウトマウスを作成した。転写に抑制的に作用すると考えられる分子であるが、Th2 誘導においては、Th2 特異的サイトカイン産生がノックアウトマウスにおいて減弱した。また予想していた、Th2 では抑制されている IFN γ など、他のサイトカイン遺伝子の発現も見られなかった。Treg の誘導が強く阻害されていた。これは、Treg の誘導が関与する腸炎モデルにおいては、ノックアウトマウスにおいて腸炎の悪化が認められ、個体レベルでも Treg の誘導の低下が示唆された。Treg の機能に関与する細胞表面分子の発現異常も認められた。Treg の誘導、特に転写因子 Foxp3 の誘導に関与し、Rcor1 とも複合体を形成することが報告されている転写因子 Gfi1 や Nr4a との関係を中心に解析を進めている。

② BTB Zn フィンガー転写因子 Zbtb35 (ZNF131) の解析

典型的な BTB/POZ ドメインと Zn フィンガードメインを持つ転写因子であるが、機能には不明な点が多い。最近 Zbtb35 という名称が与えられた。コンディショナルノックアウトマウスを作成し解析した。GATA3 は造血幹細胞から胸腺に移動し、T 前駆細胞として、多くの分化段階を経て、成熟し末梢に放出される。転写因子 GATA3 は、T 細胞系列への分化に必須であり、多くの分化過程に関与すること、末梢においては Th2 の分化だけでなく Treg の機能にも重要であることが示されている。ノックアウトマウスの解析では、驚いた事に、造血幹細胞から胸腺での double negative と呼ばれる分化段階までは GATA3 と共同で機能すること、double positive から末梢では、GATA3 とは関係なく、別な機能を持つ事が明らかとなった。図は、胸腺における Double negative から Double positive への分化過程を GATA3 欠失マウスと Zbtb35 欠失マウスで比較したものである。

T 細胞分化において、GATA3 がどのような機

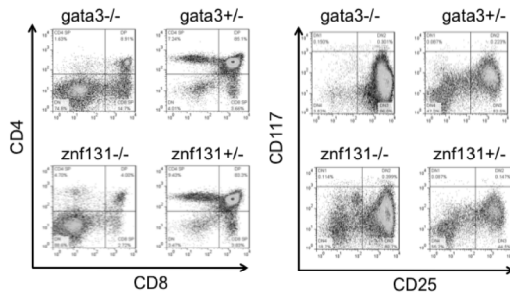


図. 転写因子 gata3 および znf131 の欠失による T 細胞分化の DN3 での停止。Lck-Cre との交配により、DN3 において CreI による欠失を誘導し、CD4/CD8 および DN の分画を CD127/CD25 で解析した。

能を持つ事が、T 細胞系列への分化を規定するのか、多くの研究室が解析を進めているが、その中で Zbtb35 がどのような役割を担っているのか解析している。また GATA3 とは異なる機能を担う double positive から末梢の T 細胞での機能の解析も進めている。現時点では、T 細胞受容体シグナルを細胞周期制御に伝える過程で重要であることが示唆された。

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 3 件)

① Masumi, A., Miyatake, S., Kohno, T. and Matsuyama, T. Interferon regulatory factor-2 regulates hematopoietic stem cells in mouse bone marrow. In Advances in Hematopoietic Stem Cell Research (ed. Pelayo, R.) 91-112 (InTech, 2012) 査読有

② Tanaka, S., Motomura, Y., Suzuki, Y., Yagi, R., Inoue, H., Miyatake, S., and *Kubo M. The enhancer HS2 critically regulates GATA-3-mediated I14 transcription in T(H)2 cells. Nat Immunol. 12, 77-85, 2011. 査読有

③ Kitamura, F., Kitamura, N., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., Miyoshi, H., Miyatake, S., Hiroi, T. and *Kaminuma, O. Selective down-regulation of Th2 cytokines by C-terminal binding protein 2 in human T cells. Int. Arch. Allergy Immunol. 152, Suppl 1, 18-21, 2010. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

① Miyatake S BTB-ZF transcription factor ZNF131 is crucial for early T cell development in thymus and exerts its function through the interaction with GATA3 KTCC 2013: Sixth International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2013. 6. 3-7 Kyoto University Shiran Kaikan, Kyoto (招待講演)

② 青木和久、宮武昌一郎 T 細胞の分化に関与する DNA 脱メチル化酵素の探索 日本分子生

物学会年会 2012.12.11-14 福岡国際会議場、福岡

③ Iguchi T, Aoki K, Aihara Y and Miyatake S The role of POZ-ZF protein Znf131 in T cell homeostasis Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2012.12.5-7 Kobe International Conference Center, Kobe

④ 井口 智弘、青木 和久、相原 祐子、宮武 昌一郎 T 細胞恒常性維持における ZNF131 の役割 第 22 回 Kyoto T Cell Conference (KTCC) 2012.7.6-7 京都

⑤ Iguchi T, Aoki K, Taya C, Sakimura K, and Miyatake S POZ-ZF protein, ZNF131 is required for the development of T cells during the double negative stage as well as for the maintenance in the periphery Gene Expression & Signaling in the Immune System (Cold Spring Harbor Meeting) 2012.4.24-28 Cold Spring Harbor Institute, New York, USA

⑥ Kazuhisa Aoki, Shoichiro Miyatake Epigenetic regulation in T cell development Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan 2011.12.13-16 Yokohama

⑦ 井口智弘、宮武昌一郎 POZ-ZF タンパク質である ZNF131 の T 細胞分化およびホメオスタシスにおける役割 日本免疫学会総会 2011.11.27-29 千葉

⑧ 井口智弘、宮武昌一郎 T 細胞分化および活性化における、BTB/POZ ドメインと Zn フィンガーを持つ遺伝子、ZNF131 の機能解明 KTCC (Kyoto T Cell Conference) 2011.6.10-11 京都

⑨ 青木和久、宮武昌一郎 T 細胞分化に伴う サイトカイン産生のエピジェネティック制御 第 33 回日本分子生物学会 第 83 回日本生化学会 合同大会 2010.12.7-10 神戸ポートピアホテル/神戸国際展示場 (兵庫県)

⑩ Iguchi, T., Yoshitani, H., Aoki, K., Miyatake, S. Function of Bst2/tetherin in immune response. 14th International Congress of Immunology 2010.8.22-27 Kobe Portopia Hotel/Kobe International Exhibition Hall, Kobe, Japan

⑪ Kubo, M., Motomura, Y., Tanaka, S., Suzuki, Y., Inoue, H., Miyatake, S. I14 Intronic enhancer HS2 is critical element regulating the GATA-3 mediated type 2 helper T cell development. 14th International Congress of Immunology 2010.8.22-27 Kobe Portopia Hotel/Kobe International Exhibition Hall, Kobe, Japan

⑫ 宮武昌一郎、青木和久、田沼雄一、村越早絵、井口智弘 GATA3 結合分子群の解析

KTCC(Kyoto T cell Conference) 2010.6.4-5 京都大学芝蘭会館、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮武 昌一郎 (MIYATAKE SHOICHIRO)
公益財団法人東京都医学総合研究所・副参事
研究員

研究者番号 : 30239420

(2) 研究分担者

青木 和久 (AOKI KAZUHISA)
公益財団法人東京都医学総合研究所・主任研究員

研究者番号 : 00280785

(3) 連携研究者