

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23790522

研究課題名（和文） 翻訳後修飾による GATA3 制御機構の解明

研究課題名（英文） Functions of posttranscriptional regulation 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）：アレルギー疾患発症の根幹である Th2 細胞の分化はマスター転写因子 GATA3 が制御している。本研究により GATA3 のリン酸化は GATA3 の機能のうち Th1 細胞の抑制能を制御し、また、メチル化修飾は IL-5 誘導能の制御に重要である事が明らかになった。この結果から、GATA3 の翻訳後修飾の人為的制御が GATA3 の特定の機能のみを抑制する、より副作用の少ないアレルギー治療法の開発につながる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：GATA3 controls differentiation of naïve CD4 T cells into Th2 cells. However, the molecular mechanisms how GATA3 induces Th2 cell differentiation remain unclear. In this study, we found that GATA3 is phosphorylated and methylated in the zinc finger domains. Interestingly, the phosphorylated GATA3 could not repress Th1 cell differentiation and the activation of *Ii5* gene was selectively impaired in methylated GATA3. These results suggest that the regulation of posttranscriptional modifications of GATA3 may lead to the discovery of novel therapeutic targets for the treatment of allergic diseases with less side effects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：アレルギー・ぜんそく / 発現制御 / Th2 細胞 / GATA3 / 翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

近年では、国民の 1/3 以上が何らかのアレルギー疾患に罹患していると言われており、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の解明が重要である。Th2 細胞はアレルギー疾患発症の根幹にあたる細胞で、その分化はマスタ

ー転写因子 GATA3 によって制御されている。GATA3 の機能を制御できれば、アレルギー疾患の根治療法の開発につながると思われるが、GATA3 がどのような分子メカニズムを用いて Th2 細胞の分化を制御しているかは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、GATA3がTh2細胞の中で機能の異なるいくつかの複合体を形成し、Th2サイトカインを活性化すると同時にTh1細胞の分化を抑制していることを報告してきた。本研究では、GATA3の翻訳後修飾に着目し、GATA3がどのように複合体の構成を変化させ、それに伴ってどのようにターゲット遺伝子を選択するのか解析する。これらの解析から、Th2細胞分化のマスター転写因子であるGATA3がどのようにTh2細胞の分化を制御しているのか包括的に理解するとともに、アレルギー疾患に対する新たな治療戦略を提唱することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 機能的なGATA3の翻訳後修飾のスクリーニング

申請者はこれまでに新規GATA3翻訳後修飾を15カ所同定している。これらの翻訳後修飾を受けるアミノ酸に変異を導入したGATA3変異体を作製し、その機能をレトロウイルスによる遺伝子発現系を用いて解析した。

(2) NuRN複合体との会合を抑制するリン酸化修飾の解析

(1)の解析から、リン酸化修飾を受けたGATA3はTh1細胞分化を抑制できないことを見出した。そこで、GATA3変異体やリン酸化GATA3を特異的に認識する抗体を用いて、細胞の中でリン酸化されたGATA3がNuRD複合体と結合が出来るか、また、T-betの発現を抑制できるか検討した。

(3) IL-5の産生誘導能を特異的に阻害するメチル化修飾の解析

(1)の解析から、メチル化修飾を受けたGATA3がTh2サイトカインのうちIL-5だけを誘導できない事が明らかになった。そこで、その分子メカニズムを明らかにする目的で、メチル化GATA3のDNA結合能と複合体の構成能を検討した。

4. 研究成果

(1) 機能的なGATA3の翻訳後修飾のスクリーニング

我々は15カ所の新規GATA3の翻訳後修飾を同定していた。翻訳後修飾をうけるアミノ酸に変異を導入したGATA3変異体をレトロウイルスを用いてTh1細胞へ導入した。ウイルス感染後4日目の細胞を用いて、IFN γ を産生する

Th1細胞とIL-4を産生するTh2細胞の割合を細胞内染色とフローサイトメーターを用いて解析した。その結果、リン酸化状態をミミックしたGATA3変異体では、Th1細胞の抑制が出来なかった。さらに、ウイルス感染細胞を精製し、再刺激後に誘導されるIL-4, IL-5, IL-13およびIFN γ の産生をRT-PCRで検討した。その結果、GATA3のメチル化状態をミミックした変態では、IFN γ 産生の抑制、IL-4とIL-13の活性化は正常に誘導できるが、IL-5誘導能が特異的に欠失していた。

(2) NuRN複合体との会合を抑制するリン酸化修飾の解析

(1)の解析から、リン酸化修飾を受けたGATA3はTh1細胞分化抑制能が欠如していることが明らかになった。申請者はこれまでにGATA3が抑制性NuRD複合体と会合し、Th1細胞分化のマスター転写因子であるT-betの発現抑制とそれに続くTh1細胞分化の抑制を行っていることを見出している。そこで、リン酸化GATA3はNuRD複合体と会合出来ないのではないかと考え、GATA3変異体とNuRD複合体の構成分子であるHdac2との会合を免疫沈降法により検討した。さらに、リン酸化GATA3を特異的に認識する抗体を用いて、内在性リン酸化GATA3のHdac2結合能を検討したところ、リン酸化していないGATA3と比較して、リン酸化GATA3はHdac2との会合能が低下していることが明らかになった。さらにリン酸化GATA3はT-betの発現抑制をできない事がわかった。以上の結果から、GATA3のリン酸化はGATA3の複合体形成能に影響を与え、抑制性NuRD複合体との会合を抑制し、GATA3によるT-betとTh1細胞分化の抑制を負に制御している事が明らかになった。

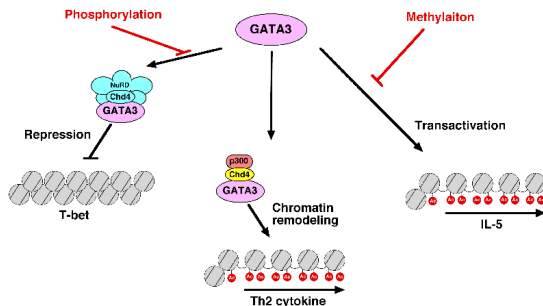
(3) IL-5の産生誘導能を特異的に阻害するメチル化修飾の解析

(1)の解析から、メチル化修飾を受けたGATA3はTh2サイトカインのうちIL-5を特異的に誘導できない事が明らかになった。そこで、GATA3変異体のDNA結合能をDNA-pull down assayを用いて解析したところ、メチル化GATA3でもIL-5プロモーターに正常に結合出来ることがわかった。メチル化GATA3がIL-5を活性化するときに必要な機能的な複合体を形成できないのではないかと考え、Th2細胞クローンにFlag-tagを付加した野生型GATA3およびGATA3変異体を発現させ、抗Flag抗体および抗GATA3抗体を用いた2ステップアフィニテ

イー精製を行った。その結果、100kDa付近のGATA3会合分子との結合がメチル化GATA3では消失し、60kDa付近にメチル化GATA3特異的に会合する分子が見つかった。現在、これらの分子が何であるか、質量分析により同定中である。

GATA3はTh2細胞の分化を誘導する際、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、*I15*、*I113*遺伝子の転写活性化、Th1細胞分化の抑制を行う。本研究により、これらの機能のうち*I15*の転写活性化とTh1細胞分化の抑制はそれぞれGATA3の翻訳後修飾によって制御されていることが明らかになった(図1)。これらの結果から、GATA3の翻訳後修

図1. 翻訳後修飾によるGATA3の機能制御



飾を人為的に制御することが、GATA3の特定の機能だけを制御する副作用の少ない、新たな治療法の開発につながる可能性が示された。

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 8 件) (全て査読有り)

1. Hosokawa, H., Tanaka, T., Suzuki, Y., Iwamura, C., Ohkubo, S., Endoh, K., Kato, M., Endo, Y., Onodera, A., Tumes, D. J., Kanai, A., Sugano, S., and Nakayama, T.: Functionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish T helper 2 (Th2) cell identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110(12):4691-4696 (2013).
DOI: 10.1038/ni.2362
2. Kuwahara, M., Yamashita, M., Shinoda, K., Tofukuji, S., Onodera, A., Shinnakasu, R., Motohashi, S., Hosokawa, H., Tumes, D., Iwamura, C., Lefebvre, V., and Nakayama, T.: The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF- β and suppresses Th2 differentiation. *Nat. Immunol.* 13:778-786 (2012).
DOI: 10.1038/ni.2362
3. Lavial, F., Bessonard, S., Ohnishi, Y., Tsumura, A., Chandrashekan, A., Fenwick, M., Tomaz, R. A., Hosokawa, H., Nakayama, T., Chambers, I., Hiiragi, T., Chazaud, C., and Azuara, V.: Bmi1 facilitates primitive endoderm formation by stabilizing Gata6 during early mouse development. *Genes Dev.* 26:1445-1458 (2012).
DOI: 10.1101/gad.188193.112
4. Shinoda, K., Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Hayashizaki, K., Zehentmeier, S., Hosokawa, H., Iwamura, C., Koseki, H., Tumes, D. J., Radbruch, A., and Nakayama, T.: Type II membrane protein CD69 regulates the formation of resting T-helper memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:7409-7414 (2012).
DOI: 10.1073/pnas.1118539109
5. Inamine, A., Sakurai, D., Horiguchi, S., Yonekura, S., Hanazawa, T., Hosokawa, H., Matuura-Suzuki, A., Nakayama, T., and Okamoto, Y.: Sublingual administration of *Lactobacillus paracasei* KW3110 inhibits Th2-dependent allergic responses via upregulation of PD-L2 on dendritic cells. *Clin. Immunol.* 143:170-179 (2012).
DOI: 10.1016/j.clim.2012.01.008
6. Yamashita, J., Iwamura, C., Mitsumori, K., Hosokawa, H., Sasaki, T., Takahashi, M., Tanaka, H., Kaneko, K., Hanazawa, A., Watanabe, Y., Shinoda, K., Tumes, D., Motohashi, S., and Nakayama, T.: Murine Schnurri-2 controls Natural Killer cell function and lymphoma development. *Leuk. Lymphoma*. 53:479-486 (2012).
DOI: 10.3109/10428194.2011.625099
7. Endo, Y., Iwamura, C., Kuwahara, M., Suzuki, A., Sugaya, K., Tumes, D. J., Tokoyoda, K., Hosokawa, H., Yamashita, M., and Nakayama, T.: Eomesodermin controls interleukin-5 production in memory T helper 2 cells through inhibition of activity of the transcription factor GATA3. *Immunity*. 35:733-745 (2011).
DOI: 10.1016/j.immuni.2011.08.017
8. Horiuchi, S., Onodera, A., Hosokawa, H., Watanabe, Y., Tanaka, T., Sugano, S., Suzuki, Y., and Nakayama, T.: Genome-wide analysis reveals unique regulation of transcription of Th2-specific genes by GATA3. *J. Immunol.* 186:6378-6389 (2011).

[学会発表] (計 7 件)

1. Onodera, A., Horiuchi, S., Sasaki, T., Hosokawa, H., Watanabe, Y., Suzuki, Y., and Nakayama, T.: Epigenetic regulation of helper T cells by Polycomb and Trithorax complexes. International Symposium on Genome Science 2013 Jan. 9, Tokyo
2. Shinoda, K., Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Hayashizaki, K., Hosokawa, H., Iwamura, C., Koseki, H., Tumes, D., Radbruch, A., and Nakayama, T.: CD69 regulates the formation of resting T-helper memory. 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012 年 12 月 6 日、神戸
3. Sasaki, T., Onodera, A., Hosokawa, H., Watanabe, Y., Horiuchi, S., Yamashita, J., and Nakayama, T.: Genome-wide gene expression profiling revealed a critical role for GATA3 in the maintenance of the Th2 cell phenotype. 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012 年 12 月 5 日、神戸
4. 細川裕之、田中知明、加藤美紀、遠山裕之、鈴木茜、中山俊憲 GATA3/Ruvb12 複合体による Cdkn2c (p18, Ink4c) の転写制御を介した Th2 細胞増殖制御メカニズムの解析 第 22 回 Kyoto T cell Conference 2012 年 7 月 7 日、京都
5. Yamamoto, N., DelaCruz, C., Takahashi, M., Fujita, T., Hosokawa, H., Nakayama, T., Akahori, Y., Yamamoto, H., Kawakami, K., Askenase, W. P., and Kanemitsu, K.: 肺炎球菌の血流感染及び肺炎における、IL-13 による宿主防御の役割 / Protective role of IL-13 in sepsis and respiratory infection against *S. pneumoniae*. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 29 日、幕張
6. Yamashita, J., Iwamura, C., Hosokawa, H., Sasaki, T., Tumes, D., Motohashi, S., and Nakayama, T.: マウス Schnurri-2 は NK 細胞の機能とリンパ腫の発症を制御する / Murine Schnurri-2 controls Natural Killer cell function and lymphoma development. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 28 日、幕張
7. Onodera, A., Yamashita, M., Endo, Y., Kuwahara, M., Tofukuji, S., Hosokawa, H., Horiuchi, S., Watanabe, Y., and Nakayama, T.: STAT6 によって誘導されるポリコムとト

ライソラックスの置換反応 / STAT6-mediated displacement of Polycomb by Trithorax complex establishes long-term maintenance of GATA3 expression in Th2 cells. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27 日、幕張

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：6 0 4 3 1 7 5 6