

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460585

研究課題名(和文) 転写因子GATA3の新規パートナー分子、ZNF131の解析

研究課題名(英文) ZNF131, a novel partner molecule of the 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・研究員

研究者番号：30239420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ZNF131はBTB Znフィンガーファミリータンパク質のひとつである。転写因子GATA3は、T細胞分化やT細胞機能の種々の過程に非常に重要である。ZNF131をGATA3結合タンパク質のひとつとして見出した。ZNF131は、胸腺において、ダブルポジティブへの分化に伴う細胞増殖に重要である。ZNF131は、T細胞受容体刺激による末梢T細胞の増殖に必須である。B細胞の分化過程において、pro B細胞での細胞増殖および遺伝子再構成に重要である。ZNF131はcdkインヒビターp21 (cdkn1a) の発現を抑制し、癌抑制遺伝子p53によるp21の誘導に拮抗する。

研究成果の概要(英文)：ZNF131 is one of the BTB Zn finger family proteins. GATA3 is a transcription factor critically involved in many aspects of T cell differentiation and function as well as the development of various tissues such as mammary gland, kidney, inner ear etc. We identified ZNF131 as one of GATA3 binding proteins. ZNF131 is required for the expansion of thymocytes accompanied with the differentiation of double positive population. ZNF131 is also required for the proliferation of T cells upon TCR stimulation. ZNF131 is critical for the proliferation and gene rearrangement that take place during the pro B cell stage of B cell development. ZNF131 suppresses the expression of cdk inhibitor p21 (cdkn1a), thus it counteracts against the effect of tumor suppressor p53.

研究分野：免疫学

キーワード：ZNF131 GATA3 BTB Znフィンガー T細胞 B細胞 p21

1. 研究開始当初の背景

転写因子 GATA3 は、T 細胞の分化や機能に必須であり、転写因子として様々な機能を有すると考えられるが、転写因子として具体的にどのような役割を担い、T 細胞の種々の形質に関与しているのかは不明な点が多い。血液系細胞では、innate lymphoid cell の分化にも重要であることが明らかにされている。GATA3 は発生過程において、乳腺、神経系、腎臓、血管内皮、毛嚢など多様な組織、臓器の発生においても重要である。単一の転写因子が、このように組織や分化過程特異的に様々な機能を持つことは、分子レベルでどのように捉えられるのか、それを具体的に明らかにすることを、大きな目標としている。そのために、GATA3 の結合分子群の変化や、標的となるクロマチンの構造変化を明らかにすることが第 1 歩と考えている。

GATA3 結合分子として多数の転写因子やクロマチンタンパク質が報告されているが、我々は独自に探索を行い、複数の候補分子を見出した。新たな結合分子候補として、機能がほとんど知られていない、BTB Znフィンガータンパク質 ZNF131 を見出した。Znフィンガーを 6 個 (オルターナティブスプライシングにより 5 個の場合も) 持ち、N 末に BTB-POZ ドメインが存在する典型的な構造を持っている。このファミリーに属する多くの分子が免疫系で重要な機能を担うことが明らかにされている。ZNF131 についての報告は少ないが、転写因子として機能すると考えられる。我々は、機能の解明と、GATA3 との関係を明らかにする目的で、コンディショナルノックアウトマウスを作成した。胸腺における T 細胞分化過程において、分化初期の double negative において欠失すると、double negative から double positive への分化と、それに伴う細胞増殖が強く障害された。これは、GATA3 を同様に欠失させた表現型と一致する。興味深い点は、BTB Znフィンガータンパク質に属し、多様な機能を持ち、T 細胞の初期分化過程でも重要であることが明らかにされている Miz1 の同様の欠失では、このような表現型は得られない。一方、double positive の過程で ZNF131 を欠失させると、GATA3 の同様の欠失とは異なり、single positive への分化に影響はない。しかし、末梢の T 細胞 (CD4+ 及び CD8+ T 細胞) の減少が認められ、T 細胞の維持に関与することが示唆された。

2. 研究の目的

T 細胞の分化過程や成熟 T 細胞で、欠失による表現型がいくつか得られているが、それを説明する機能は何かを明らかにする。その中で、GATA3 との関係を位置付ける。ZNF131 タンパク質の分布は不明だが、mRNA の発現は、かなりユビキタスである。また T 細胞以外の細胞系列での機能を明らかにし、T 細胞での機能との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

ZNF131 遺伝子に loxP を挿入したアレルを持つマウスを、細胞系列特異的に Cre を発現するマウス (Lck-Cre、CD4-Cre、mb1-Cre) と交配し、T 細胞及び B 細胞の特定の分化過程で ZNF131 を欠失させ、T 細胞及び B 細胞の分化過程に対する影響を解析した。また細胞を分離し、マイクロアレーによる発現解析を行った。分離した細胞を、活性化刺激存在下及び非存在下で培養し、in vitro での細胞分化、細胞増殖、細胞死などの解析を行った。cdk インヒビター p21 (cdkn1a) のプロモーター領域を持つレポータープラスミドを作成し、ZNF131 及び p53 の転写活性に対する影響を検討した。

4. 研究成果

(1) T 細胞分化での ZNF131 の機能

胸腺の DN での ZNF131 の欠失による影響を、マイクロアレーによる発現解析により検討した。DN から DP への分化は、細胞増殖を伴うが、細胞増殖制御因子群に注目した。cdk インヒビター p21 (cdkn1a) の発現が、ZNF131 の欠失により亢進した。また DP で ZNF131 を欠失した場合、胸腺内での SP への成熟や、胸腺から末梢への T 細胞の移動には影響が見られないが、末梢での T 細胞の維持や、T 細胞受容体を介する活性化シグナルに対する細胞増殖の障害が認められた。この時、cdk インヒビター p21 (cdkn1a) の発現が、亢進した。cdk インヒビター p21 (cdkn1a) に対して、ZNF131 は抑制的に機能していることが示唆された。

(2) B 細胞分化での ZNF131 の機能

B 細胞分化における ZNF131 の機能を検討するために、mb1-Cre マウスと交配させることで、pre pro B 細胞の分化過程で、ZNF131 の欠失を誘導した。pre pro B 細胞での欠失は、pro B 細胞の細胞数を低下させ、pre B 細胞には分化を認めなかった。pro B 細胞の分化過程は、T 細胞の分化過程や pre B 細胞の分化過程と異なる特徴を持つことが知られている。T 細胞や pre B 細胞の分化過程では、遺伝子再構成と細胞増殖の過程が明瞭に区分されており、遺伝子再構成が誘導される過程では、細胞増殖は停止する。一方、pro B 細胞では、heavy chain の遺伝子再構成と、細胞増殖が並行して進行し、明瞭な区分が認められていない。遺伝子再構成は、DNA の double strand break repair を伴っており、DNA 複製と同時進行することは、ゲノムの著しい不安定化をもたらす、細胞の癌化をひきおこす可能性が高まる。したがって DNA 複製と遺伝子再構成は、同時に起こらないような仕組みが必要と考えられ、癌抑制遺伝子 p53 の関与も報告されている。一方、pro B 細胞の分化過程での細胞増殖と遺伝子再構成の関係は不明な点が多い。ZNF131 の pre pro B 細胞での欠失は、pro B 細胞数の低下をもたらす、DNA への BrdU の取り込みの解析などから、細胞増殖の強い抑制が認められた。また

heavy chain の遺伝子再構成は、検出されるが、その頻度の低下が認められた。pro B 細胞の分化過程における、細胞増殖と遺伝子再構成の関係について、以下の仮説を提起する。遺伝子再構成は、細胞周期の G1 期のタイミングに合わせて誘導される。細胞周期が進行する際、pro B 細胞の分化過程のどの時期に遺伝子再構成が誘導されるかは、個々の細胞により異なる。すなわち細胞によって、pro B 細胞の分化過程の初期に遺伝子再構成するもの、また後期に遺伝子再構成するもの、あるいは中期に遺伝子再構成するものが、stochastic に決定されると考える。ただし、pro B 細胞の分化過程の後期で遺伝子再構成を起こす細胞の比率が、やや高いと仮定する。この仮説に基づけば、pro B 細胞の分化過程での細胞増殖を低下させると、遺伝子再構成した細胞としていない細胞の比率が、していない細胞が増大する側に傾くことになる。ZNF131 の欠失が、細胞増殖の抑制を誘導することで、遺伝子再構成を起こした細胞の割合も低下する。ZNF131 を欠失した pro B 細胞では、T 細胞と同様に cdk インヒビター-p21 (cdkn1a) の発現が亢進していた。細胞増殖が抑制され、細胞数の低下が見られるとともに、遺伝子再構成も抑制されたと考えられる。(3) ZNF131 による cdk インヒビター-p21 (cdkn1a) の転写制御

細胞増殖の誘導を伴う T 細胞の異なる分化過程において、ZNF131 は p21 の発現を抑制し、細胞増殖を阻害しないように機能していると考えられた。B 細胞の分化過程においても、p21 の発現抑制を通して、pro B 細胞の増殖を阻害しないように機能することで、細胞数の増大と遺伝子再構成の進行を促進すると考えられた。

ZNF131 が転写因子として、p21 のプロモーター活性に作用するか検討するため、レポーターアッセイを行い、ZNF131 が抑制することを明らかにした。p53 は、p21 のプロモーター活性を促進し、それに拮抗すると考えられた。興味深い点として、ZNF131 の制御領域が、p53 の制御領域の近傍、あるいは重なっていることが示唆された。現在、より詳細な解析を行ない、ZNF131 と p53 の相互作用が p21 の制御に重要であること、同様の制御が、p53 で制御される他の遺伝子でも見られないかといった点の解析を進めている。

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 2 件)

1, Iguchi, T., Aoki, K., Ikawa, T., Taoka, M., Taya, C., Yoshitani, H., Toma-Hirano, M., Koiwai, O., Isobe, T., Kawamoto, H., Masai, H. and Miyatake, S. BTB-ZF Protein Znf131 Regulates Cell Growth of Developing and Mature T Cells. *J. Immunol* 195, 982-993,

2015. (査読有り)
DOI:10.4049/jimmunol.1500602

2, Takemura, N., Kawasaki, T., Kunisawa, J., Sato, S., Aayam, L., Kobiyama, K., Aoshi, T., Ito, J., Mizuguchi, K., Karuppuchamy, T., Matsunaga, K., Miyatake, S., Mori, N., Tsujimura, T., Satoh, T., Kumagai, Y., Kawai, T., Standley, D., Ishii, K., Kiyono, H., Akira, S., *Uematsu, S. Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome. *Nat. Commun.* 5, 1-15, 2014. (査読有り)
DOI:10.1038/ncomms4492

[学会発表](計 9 件)

1, 坂本大和、平野真希子、井口智弘、青木和正、村松正明、正井久雄、宮武昌一郎「GATA3 変異マウスで発症する自己免疫性皮膚炎」第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜、神奈川、2016.11.30-12.2

2, Shoichiro Miyatake, Kazuhisa Aoki, Tomohiro Iguchi “Dermatitis development in GATA3 defective mice” The 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology, Sapporo Convention Center, Sapporo, November 17-20, 2015

3, 宮武昌一郎, 青木和久, 正井久雄, 井口智弘「T 細胞の増殖制御に必須な新規 BTB-ZF タンパク質 ZNF131 (Zbtb35)」第 38 回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場、神戸、兵庫、2015.12.1-4 (Workshop)

4, Shoichiro Miyatake “GATA3 and inflammatory disease” International Symposium on Immune Regulation, Oharai Park Hotel, Oharai, Ibaraki, October 29-30, 2015 (招待講演)

5, 宮武昌一郎「GATA3 ノックアウトマウスと炎症性疾患」第 25 回 KTCC、京大芝蘭会館、京都、2015.5.15-16

6, Shoichiro Miyatake “GATA3, old timer and ZNF131, newcomer in T cell development and function” Block symposium 2, T cell development and function, The 2014 Fall Conference of the Korean Association of Immunologists, Sejong University Convention Center, Seoul, Korea, November 6-7, 2014 (招待講演)

7, Tomohiro Iguchi, Shoichiro Miyatake “Interaction of Gata3 and ZNF131 in hematopoiesis” KTCC, 京都平安ホテル、京都、2014,5,16-17

8, 青木和久、宮武昌一郎「ナイーブ T 細胞が Th2 細胞に分化する際におこる DNA 脱メチ

ル化の解析」第37回日本分子生物学会年会、
パシフィコ横浜、横浜、神奈川 2014.11.25-
27

9, Tomohiro Iguchi, Shoichiro Miyatake
“Role of POZ-ZF protein, ZNF131 in
hematopoietic cell proliferation and
differentiation” The 43rd Annual Meeting
of The Japanese Society of Immunology,
Kyoto International Conference Center,
Kyoto, December 10-12, 2014 (Workshop)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

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・ゲノム
医科学研究分野・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・精神行
動医学研究分野・研究員
研究者番号：00280785