

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08643

研究課題名(和文) マスト細胞関連転写因子によるCebpa転写抑制メカニズムの解析

研究課題名(英文) The mechanism of Cebpa transcriptional repression by mast transcription factors

研究代表者

大森 慎也 (Ohmori, Shin'ya)

高崎健康福祉大学・薬学部・講師

研究者番号：10509194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、GATA2をはじめとするマスト細胞関連転写因子によるCebpa転写抑制メカニズムの解明を行った。GATA2欠失によるCebpaの発現上昇における正のトランス因子の一つとしてPU.1を同定した。GATA2を欠失するとCebpa遺伝子の下流でPU.1の結合が増加すること、アセチル化が亢進することを見出した。P300阻害剤(A-485)を用いて解析した結果、PU.1はアセチル化が誘導された後に結合することを見出した。マスト細胞で認められたGATA2欠失によるCebpaの発現上昇において、PU.1は発現開始のトリガーではなく、その後の急激な発現上昇に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、マスト細胞で認められたGATA2欠失によるCebpaの脱抑制機構にPU.1が正の制御因子として働くことを明らかにし、またPU.1は発現開始のトリガーではなく、その後の発現上昇に関与していることを見出した。これまでにPU.1は骨髄球の分化過程においてCebpaの正の制御因子として報告されているが、その詳しい制御メカニズムは不明である。また好塩基球ではGATA2、PU.1、C/EBPαが全て発現しており、マスト細胞の近縁と考えられているにもかかわらずその制御機構は全く異なっている可能性が考えられる。本研究課題で得られた成果は、これらの分子基盤の解明の足がかりとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined molecular basis of Cebpa transcriptional repression by mast transcription factors. The simultaneous KD of PU.1 and GATA2 in mast cells resulted in a significant reduction of the Cebpa expression compared to that in the cells transfected with GATA2 siRNA. Furthermore, deletion of GATA2 resulted in increased PU.1 binding in the downstream of Cebpa gene. We then examined the changes in histone modifications after deletion of GATA2. The GATA2 deletion increased the acetylation of histone H3 at the gene body and downstream of Cebpa gene. CBP functions as a coactivator for PU.1. However, inhibition of acetylation with P300 inhibitor (A-485) did not increase the binding of PU.1 in the downstream of Cebpa gene. These results suggest that in the up-regulation of Cebpa by GATA2 deletion in mast cells, PU.1 may be involved in the rapid up-regulation of Cebpa rather than trigger the onset of expression.

研究分野：医化学一般、分子生物学、生物系

キーワード：転写因子 GATA2 PU.1 C/EBPα マスト細胞 形質転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転写因子 GATA2 と C/EBP α は造血幹細胞から前駆細胞を経て各血球細胞への分化が決定する段階で重要な役割を果たす。GATA2 は、巨核球、好酸球、好塩基球、マスト細胞でも発現が認められ、特にマスト細胞においては、その分化決定に必要であることが報告されている。一方、転写因子 C/EBP は、骨髄球から顆粒球への分化決定において中心的な役割を担う因子である。研究代表者は 2013-2014 若手 B 「成熟マスト細胞における GATA2 の機能解析」(課題番号 25860221)において、マウス骨髄由来マスト細胞(BMMCs)を用いて GATA2 の欠失解析を行った。その結果、GATA2 はマスト細胞への分化が決定のみならず、マスト細胞関連遺伝子の発現を広範に制御し、それと同時に *Cebpa* の転写を抑制することでマスト細胞の分化形質を維持していることを明らかにした(Ohmori *et al.*, Blood 2015)。しかしながら、マスト細胞において GATA2 がどのようなメカニズムによって *Cebpa* の転写を抑制しているのかは明らかではない。

血球細胞は造血幹細胞を起源とし、骨髄球系幹細胞とリンパ球系幹細胞に別れ、その後各分化系列の前駆細胞を経て成熟すると考えられている。しかしこの血液細胞の分化経路、特に前駆細胞の性質については議論の最中である。昨今、ストローマ細胞と胸腺リンパ球の共培養法を用いたシングルセルレベルの解析結果から、血球細胞の新しい分化モデルとして骨髄球系列の細胞が分化の基本となる「ミエロイド基本型モデル」が提唱されている。本研究課題の提案のきっかけとなった「GATA2 欠失による *Cebpa* の脱抑制を介した骨髄球化」は、このモデルを異なる視点から考察する上で有用なモデルになると考えられる。本研究課題で GATA2 による *Cebpa* の転写抑制メカニズムを明らかにし、血球分化における *Cebpa* の多段階的な抑制メカニズムについて考察することで、血球分化の総合的理解を深めることができると期待される。

2. 研究の目的

本研究課題では、そのプロトタイプとして BMMCs における GATA2 を中心としたマスト細胞関連転写因子による *Cebpa* 転写抑制メカニズムの詳細を明らかにし、血球分化過程における多段階的な *Cebpa* の抑制メカニズムの一端を明らかにする

3. 研究の方法

(1) GATA2 または PU.1 の機能欠失解析

本研究で使用した Gata2CKO マウスと PU.1CKO マウスは、共に DNA 結合領域をコードする配列を LoxP 配列で挟んでいる。Cre-LoxP システムによって、4-Hydroxytamoxifen(4-OHT)誘導的に DNA 結合領域を欠失させるために、CreER^{T2} を全身性に発現する ROSA26-CreER^{T2} マウスと交配し、Gata2^{flox/flox}::ROSA26-CreER^{T2} マウスおよび PU.1^{flox/flox}::ROSA26-CreER^{T2} マウスを得た。本研究課題は主に両マウスから採取した骨髄細胞を用いて樹立した BMMCs を用いて解析を行った。

(2) クロマチン免疫沈降アッセイ (qChIP)

細胞を 1%ホルムアルデヒドで 10 分間、室温固定した。細胞破碎は Focused-ultrasonicator M200(Covaris)を用いて行った。免疫沈降は Dynabeads protein A (VERITAS)を用いて行った。精製後濃縮された DNA は Go Taq qPCR master mix (Promega) および、Mx3000P real-time PCR system (Stratagene)を用いて SYBR green 法により増幅し定量を行った。

(3) CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集

ゲノム編集は、Cas9 と gRNA の発現プラスミドベクターである pX330、pX458、pX459 を用いて行った(いずれも Addgene を介して Feng Zhang 博士より寄贈して頂いた)。gRNA の設計は、Web tool(CRISPR direct)を利用した。これらを MEDMC-BRC6 細胞(Hiroshima T. *et al.*, PLoS ONE 2008、理研 BRC より購入)をエレクトロポレーション法(NEPA21)により導入し、24h 後に薬剤セレクションを行った。さらに翌日 pX458 由来の GFP の発色を利用し BD FACSJazz セルソーター(BD Biosciences)を用いてシングルセルを分取し、クローニングを行った。

4. 研究成果

(1) GATA2 欠失時の *Cebpa* の発現上昇における *Cebpa* +37K 領域(+37 kbp)の関与

BMMCs において GATA2 を欠失すると、*Cebpa* の発現が上昇する。これまでに、骨髄球における *Cebpa* のエンハンサーとして+37K 領域が同定されており、PU.1 や RUNX1 が結合することが報告されている。qChIP-assay によって *Cebpa* 遺伝子に対する GATA2、PU.1、RUNX1 の結合を調べた結果、PU.1 や RUNX1 は BMMCs においても+37 kbp に強く結合しており、特に GATA2 はそれに加え+34.8 kbp でも強く結合していることを見出した。そこで、*Cebpa* の脱抑制における+37 kbp の機能を明らかにするために、マウスマスト細胞株でゲノム編集法を用いて+37 kbp を欠失させた。その結果、変異株(+37 kbp)における *Cebpa* の発現上昇は、変異株と同様に観察され

た。そこで、すでに公開されている血球細胞や脂肪細胞の ChIP-Seq のデータを入力し、*Cebpa* の制御領域の探索を行った。しかしながら、*Cebpa* の制御領域は細胞種によって複雑に異なっており、シス領域の同定は困難と判断した。

(2) GATA2 欠失時の *Cebpa* の発現上昇におけるトランス因子の同定

そこで、GATA2 欠失時に *Cebpa* の転写を正に制御するトランス因子を同定するために、他の血球系細胞で *Cebpa* の転写活性化に関与することが報告されている幾つかの転写因子について siRNA によるノックダウン (KD) を行い解析した。その結果、PU.1 を GATA2 欠失時に KD した時、*Cebpa* の発現上昇が約半分に減弱することを見出した (図 1 A)。この結果を受け GATA2 欠失時の *Cebpa* 遺伝子座に対する PU.1 の結合変化を qChIP-assay によって調べた。その結果、PU.1 の結合は、+37 kbp のみならず *Cebpa* 遺伝子の下流に位置する複数のシス領域で増加していた (図 1 B、b-e、*-44 kbp はネガティブコントロール領域)。以上の結果から、PU.1 は GATA2 欠失時における *Cebpa* の発現上昇において、正の制御因子として働く可能性が示唆された。

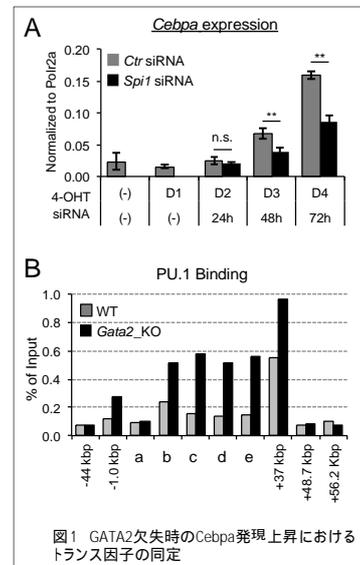


図 1 GATA2欠失時の*Cebpa*発現上昇におけるトランス因子の同定

(3) GATA2 欠失時における *Cebpa* 遺伝子座のヒストン修飾の変化

次に、GATA2 欠失時の *Cebpa* 発現上昇にヒストン修飾が関与しているのか否か明らかにするために、野生型の BMMCs に HDAC 阻害剤である SAHA (Suberoylanilidehydroxamic Acid) と TSA (trichostatin A) を添加し、定量 RT-PCR (qRT-PCR) で *Cebpa* の発現を解析した。その結果、GATA2 が存在しているにもかかわらず、薬剤濃度依存的に *Cebpa* の発現が上昇した。特に SAHA 処理における上昇は顕著であった (図 2 A)。そこで、GATA2 欠失時の *Cebpa* 遺伝子座全体のヒストン H3 のアセチル化 (H3K27ac) とメチル化 (H3K27me3) の変化について、qChIP 解析を行った。その結果、GATA2 欠失により *Cebpa* 遺伝子本体 (GB-3' UTR2) の K27me3 修飾は顕著に減少し、相反して遺伝子座全体で K27ac が増加していた。(図 2 B)。この結果は *Cebpa* の発現上昇のタイミングと相関していた。以上のことから、*Cebpa* の発現上昇に *Cebpa* 遺伝子座が Ac 化されることが重要であると考えられた。

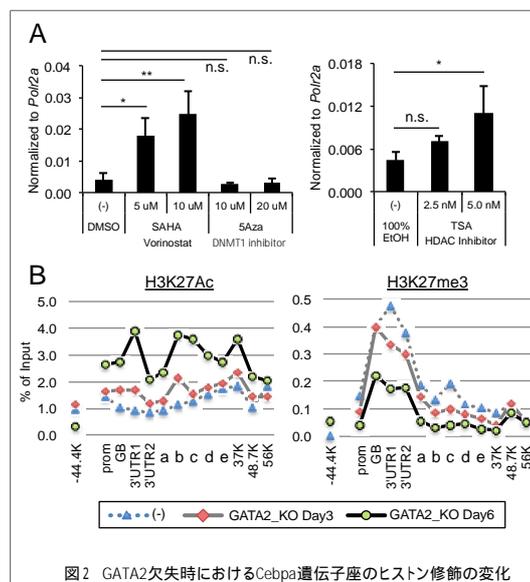


図 2 GATA2欠失時における*Cebpa*遺伝子座のヒストン修飾の変化

(4) PU.1 による *Cebpa* 遺伝子座のアセチル化

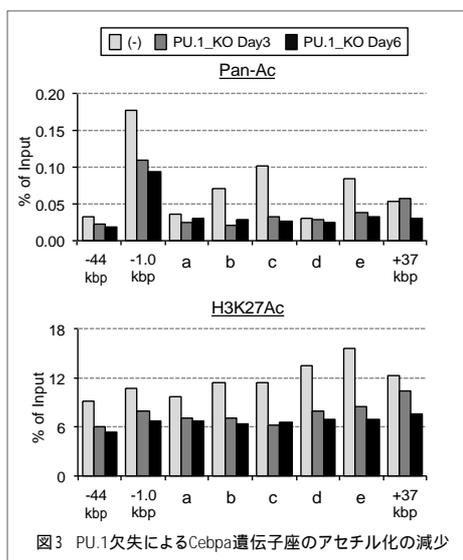


図 3 PU.1欠失による*Cebpa*遺伝子座のアセチル化の減少

前述したように、PU.1 は GATA2 欠失によって *Cebpa* 遺伝子座の下流で結合が増加する (図 1 B)。また PU.1 は CBP/P300 と結合することが報告されていることから、PU.1 の欠失による *Cebpa* 遺伝子座のアセチル化に対する影響について解析を進めた。PU.1 flox/flox::ROSA26-CreER² マウスから BMMCs を樹立し、4-OHT 処理により PU.1 を欠失させ qChIP-assay を行った。その結果、*Cebpa* プロモーター付近をはじめ、複数の領域でアセチル化修飾 (Pan-Ac) が減少した (-44 kbp はネガティブコントロール領域) (図 3)。この結果から定常状態における *Cebpa* 遺伝子座の弱いアセチル化は、PU.1 によって維持されていることを示唆された。

そこで、GATA2 欠失時に PU.1 が *Cebpa* 遺伝子座の結合しアセチル化を亢進させているのか否か調べるために 2 つの実験を行った。まず CBP/P300 の阻害剤 (A-485) を BMMCs に添加し、アセチル化を阻害した状態 GATA2 を欠失させ、qRT-PCR 法により *Cebpa* の

発現を調べた。その結果、GATA2 欠失による *Cebpa* の発現上昇は、A-485 処理によって完全に阻害された (図 4 A、*Cebpa* A-485(-)/4OHT(+) vs A-485(+)/4OHT(+))。この結果は、GATA2 欠失による *Cebpa* の発現上昇には *Cebpa* 遺伝子座のアセチル化が必要であること、そのアセチル化には CBP/P300 が関与していることを示唆している。しかし PU.1 が CBP/P300 をリクルートしてアセチル化を誘導しているのか、あるいはアセチル化された場所に PU.1 が結合するのかわきについては不明である。そこで次に A-485 処理によってアセチル化をあらかじめ阻害した状態で GATA2 を欠失させ、PU.1 の結合の変化を調べた。その結果、GATA2 を欠失による *Cebpa* 遺伝子座に対する PU.1 の結合増加は、A-485 処理によって阻害された (図 4 B、b-e)。以上の結果から、GATA2 欠失時の *Cebpa* の発現上昇において、PU.1 は *Cebpa* の正の制御因子として役割を果たすこと、またその制御機構において PU.1 は発現開始のトリガーではなく、その後の発現上昇に関与している可能性が示唆された。

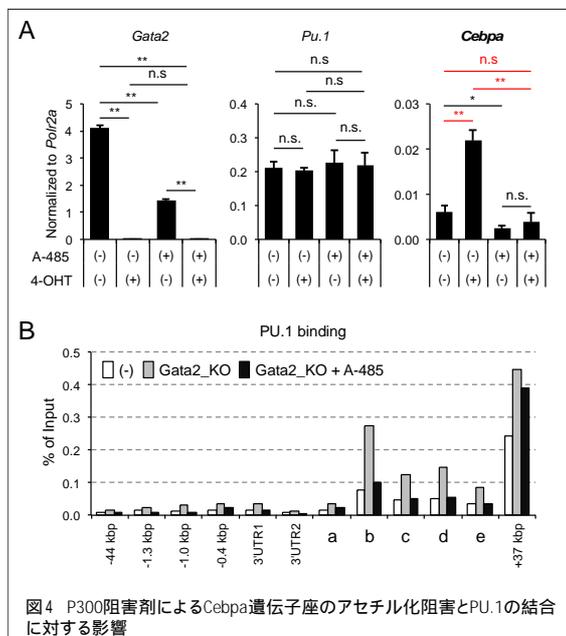


図4 P300阻害剤による*Cebpa*遺伝子座のアセチル化阻害とPU.1の結合に対する影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohneda, Ohmori, Yamamoto	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 -
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 Y., Ohmori S., Uneme A., Aoki Y., Kobori M., Ohida T., Arai M., Hosaka M., Ohneda K.	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 Mol. Cell. Endocrinol	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. Epub 2019 Jan 4.	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, 千川さつき, 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化の維持に関与する
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

1. 発表者名 島武志, 大森慎也, 石嶋康史, 大根田絹子
2. 発表標題 マウス骨髄由来マスト細胞におけるGATA因子によるCebpa転写抑制機序の解析
3. 学会等名 平成29年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大森慎也, 島武志, 養田真理, 石嶋康史, 大根田絹子
2. 発表標題 BMMCsにおいてCebpaはGATA因子とPU.1の相互作用によって制御される
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

高崎健康福祉大学ホームページ
http://www.takasaki-u.ac.jp/p_yaku_labo/yaku-02-01/

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
--	---------------------------	-----------------------	----