

平成21年 5月29日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590296
 研究課題名（和文） 細胞系列決定に必須な転写因子GATA3とFACT複合体、RNAポリメラーゼの関係
 研究課題名（英文） Mechanism of lineage commitment by GATA3 - RNA polymerase II, FACT complex and DNA demethylation
 研究代表者
 宮武 昌一郎 (MIYATAKE SHOICHIRO)
 財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・副参事研究員
 研究者番号：30239420

研究成果の概要：寄生虫感染に対する生体防御やアレルギー疾患に関与する Th2 細胞の分化について、マスターレギュレーターGATA3 の作用機序を解析した。GATA3 は転写を担う RNA ポリメラーゼ II および FACT 複合体を染色体へ運ぶ機能を持つことが示唆された。またサイトカイン遺伝子の発現制御には DNA 脱メチル化が重要で、T 細胞の分化過程においてその活性が変化する事、DNA 複製非依存的であること、メチルシトシン結合タンパク質が関与する事などを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
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：FACT, GATA3, DNAメチル化, Th1/Th2, DNAメチルトランスフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

GATA3 は、T 細胞サブセットの Th2 細胞への分化という細胞系列決定に必要な転写因子であるが、遺伝子欠失マウスの作成により、リンパ球前駆細胞からの T 細胞への分化、胸腺での CD4 陽性細胞分化、乳腺の分化、神経細胞の分化、腎臓の発生、毛嚢の発生など、様々な細胞分化過程において、必須であることが明らかになっている。しかし、その分化誘導作用の分子機構については、未知な部分が多い。その作用を発揮するために、どのような分子群と相互作用するのか、どのような分子を制御しているのか、遺伝子発現制御に必要な種々のエピジェネティック機構のど

のようなものを制御しているのか、などの点である。我々は、本研究課題を申請した時点で、プロテオミクス的手法を用いて、GATA3 と相互作用すると考えられる分子群を同定していた。また Th2 細胞分化でのサイトカイン遺伝子のエピジェネティック機構として、DNA 脱メチル化の重要性に注目していた。

2. 研究の目的

(1) T 細胞サブセット分化をモデルとして、GATA3 と相互作用する分子群の機能解析を手がかりに、GATA3 による遺伝子制御の分子機構の解明をおこなう。GATA3 と相互作用する分子群の候補として、多数の遺伝子が同定さ

れたが、その中で FACT 複合体と RNA ポリメラーゼ II の解析をおこなう。RNA ポリメラーゼ II は、mRNA や種々の non-coding RNA を転写する RNA 合成酵素であり、FACT 複合体は、RNA ポリメラーゼ II が DNA 上を移動しながら転写をおこなう際、ヒストンを DNA から取り外したり、挿入したりするヒストンシャペロンとして機能することが明らかとなっている。

(2) Th2 細胞でのサイトカイン遺伝子発現制御において、DNA 脱メチル化制御が、遺伝子発現量の制御において重要であることを見出した。DNA 脱メチル化制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) FACT 複合体および RNA ポリメラーゼ II と GATA3 による制御

FACT 複合体を構成する SUPT16h および SSRP1 の cDNA に tag を挿入し、GATA3 存在下、非存在下で発現させ、局在など解析する。

(2) Th2 細胞分化に伴い、RNA ポリメラーゼ II が、Th2 サイトカイン遺伝子領域にどのように分布するか、クロマチン免疫沈降法を用いて経時的に解析する。

(3) Th2 サイトカイン遺伝子発現の制御領域 CNS-1 を欠失したマウス由来の T 細胞および胸腺で、成熟した CD4 single positive (CD4SP) 細胞を用い、T 細胞サブセット分化の誘導とサイトカイン遺伝子領域のエピジェネティック構造の変化を解析する。

4. 研究成果

(1) FACT 複合体と GATA3 の相互作用

FACT 複合体を構成する SUPT16h および SSRP1 を、293T 細胞に発現すると、各々単独に発現させた場合、発現量が非常に少ない事が認められた。両者を発現させると、どちらの分子も発現量が増大した。単独で存在する状況では非常に不安定であることが示唆された。細胞質分画、核可溶性分画、核不溶性分画に分け、局在を解析すると、細胞に導入して発現させた SUPT16h および SSRP1 は、主に細胞質に局在した。一方、GATA3 は細胞に導入し発現させた場合、核に局在し、特に不溶性分画に多く見られる事から、クロマチンに強く結合する性質を示した。SUPT16h、SSRP1 と GATA3 を細胞に導入し発現させた場合、より多くの SUPT16h および SSRP1 が核に局在することが認められた。GATA3 の発現量に依存して、核へ移行したことから、GATA3 が FACT 複合体を核へ、さらにはクロマチンへリクルートしている可能性が示唆された。

(2) Th2 細胞への分化に伴う RNA ポリメラーゼ II の局在の変化

Th2 細胞への分化を誘導する前には、RNA ポリメラーゼ II は、Th2 特異的サイトカインで

ある IL-4、IL-13 遺伝子およびその遺伝子間領域には、ほとんど検出されない。ナイーブ細胞を活性化すると、IL-4 を弱く産生するが、クロマチン免疫沈降法による RNA ポリメラーゼ II は検出できなかった。Th2 分化誘導にともなう活性化後、3 日で RNA ポリメラーゼ II の結合が検出された。これはサイトカイン遺伝子の発現が検出されない時点であるが、Th2 細胞でのみ遺伝子間領域の non-coding RNA の産生が検出された。RNA ポリメラーゼ II の結合は、時間とともに増大すること、また遺伝子間領域にも結合が認められる事から、non-coding RNA の産生に重要であることが示唆された。

RNA ポリメラーゼ II と FACT 複合体は、転写による RNA 合成を直接おこなう分子であり、GATA3 という転写因子が、これらの分子をクロマチンまで運ぶ機能を持つ可能性が示唆された。そして mRNA の産生だけでなく、non-coding RNA の産生にも必要であることが示唆された。

(3) T 細胞サブセット分化におけるエピジェネティック制御

Th2 細胞特異的に産生されるサイトカイン遺伝子である IL-4、IL-5、IL-13 は染色体上で近接して存在する。特に IL-4 と IL-13 は 10kb 程度しか離れていない。この遺伝子間領域に、哺乳動物では保存された配列が存在し、CNS1 と呼ばれる。CNS1 欠失マウス由来の Th2 細胞では、Th2 サイトカインの発現が半分以下に低下する。野生型と CNS1 欠失マウス由来の Th1 および Th2 細胞において、転写活性化領域に見られるヒストン H3 リジン 9/14 のアセチル化およびリジン 4 のジメチル化を解析し、以下のことを見いだした。

A、Th2 細胞では、IL-4 から IL-13 遺伝子にかけて、広い領域で、これらのヒストン修飾が見られた。特に CNS1 と IL-4 遺伝子イントロン 2 で強い修飾が見られた。

B、野生型と CNS1 欠失マウス由来の Th2 細胞を比較した場合、これらのヒストン修飾に差異はみられなかった。

野生型と CNS1 欠失マウス由来の Th2 細胞では、サイトカイン産生量が大きく異なる事から、これらのヒストン修飾は、遺伝子発現の ON/OFF には関与しているが、遺伝子の転写量は規定していないと結論された。

次に注目したエピジェネティック制御は、DNA メチル化である。T 細胞サブセットに分化する前のナイーブ T 細胞において、IL-4 および IL-13 遺伝子や、その近傍領域では、プロモーター領域を除いて、DNA はメチル化されている。Th2 細胞への分化にともない、遺伝子やその近傍領域の脱メチル化が誘導され、CNS1 とその周辺領域はほぼ 100%の脱メチル化が誘導される。CNS1 が欠失している場合には、脱メチル化の程度が減弱し、CNS1 の

近傍の脱メチル化では、この傾向が顕著であった。CNS1 欠失は、CNS1 を loxP 配列により置き換えて作成されたが、この loxP 配列は Th2 細胞でも、ほぼ完全にメチル化されていた。まとめると

A、サイトカイン遺伝子転写量と脱メチル化の程度が関連した。

B、CNS1 領域は、脱メチル化の誘導に重要である。

サイトカイン遺伝子の発現量が変化する別の例として、新生獣 T 細胞がある。妊娠を維持するために、胎子の免疫系は強い免疫応答である炎症がおこりにくくなっている。その機序のひとつとして、胎子や新生獣の T 細胞では、IL-4 などのサイトカイン産生が亢進し、逆に樹状細胞での IL-12 産生能が減弱している。このようなサイトカイン産生パターンにより、胎子/新生獣 T 細胞は Th2 細胞に分化しやすく、炎症を引き起こす Th1 細胞の分化は抑制される。我々は、胸腺で成熟した CD4 陽性 CD8 陰性 T 細胞 (CD4SP 細胞) が、このような胎子/新生獣 T 細胞の性質を保持しているのではないかと考えた。CD44 の発現が低い CD4SP 細胞を分離し、サイトカイン産生能の高い NKT 細胞を排除して解析に用いた。CD4SP 細胞から分化した Th2 細胞は、末梢ナイーブ T 細胞から分化した Th2 細胞より、IL-4 や IL-13 の産生量が高かった。Th1 細胞に分化させた場合にも、特異的サイトカインである IFN γ について、同様の傾向が見られた。さらに Th2 細胞では、ほとんど発現しない IFN γ の産生が、Th1 細胞ではほとんど発現しない IL-4、IL-13 の産生が、CD4SP 細胞から分化した場合、見られた。これは、CD4SP 細胞から分化した T 細胞のサイトカイン産生量が、末梢ナイーブ T 細胞から分化した場合より多く、サブセット特異的なサイトカイン産生パターンが維持できなくなっていることを示唆している (図 1)。

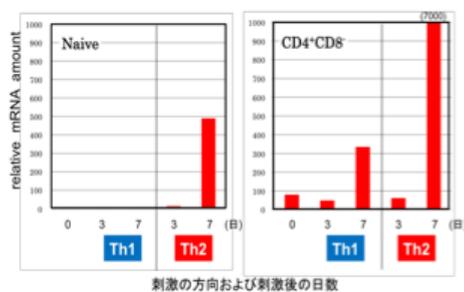


図1 末梢ナイーブT細胞とCD4SP細胞から分化したTh2サブセットのサイトカイン産生活性(mRNA量)
CD4SP細胞から分化したTh2細胞は、より多くのIL-4を産生するだけでなく、Th1細胞もIL-4を産生した。

胎子/新生獣では、胸腺で分化した T 細胞が、高いサイトカイン産生能を維持したまま、末梢に移行するが、成獣では、末梢に移行する

際の成熟過程において、サイトカイン産生能の減弱とそれともなうサブセット特異性の獲得が誘導されると考えられた。

CD4SP 細胞と末梢ナイーブ T 細胞のサイトカイン産生能の差異について検討した。ヒストン H3 リジン 9/14 のアセチル化およびリジン 4 のジメチル化に差異は認められなかった。DNA 脱メチル化を比較したところ、CD4SP 細胞から分化した Th2 細胞では、脱メチル化がより強く誘導されていた。しかも Th1 細胞に誘導した場合にも、脱メチル化がある程度誘導された。分化誘導ともなう脱メチル化を経時的に解析したところ、CD4SP 細胞を分化させた場合、CNS1 領域では、誘導後 3 日で 60-80%脱メチル化が誘導されたのに対して、末梢ナイーブ T 細胞から分化した場合、誘導後 3 日では、ほとんど脱メチル化は誘導されず、7 日で誘導された。このような、脱メチル化誘導の特徴は、CD4SP 細胞の分化に伴うサイトカイン産生の特性と関連し、DNA メチル化制御がサイトカイン産生に重要であることを示唆した。

脱メチル化の分子機構は未知である。DNA 複製において、親鎖のメチル化パターンを娘鎖にコピーするメチルトランスフェラーゼ活性を持つ Dnmt1 を、抑制することにより、娘鎖の脱メチル化を誘導し、それを鋳型としてもう一度 DNA が複製されると完全な脱メチル化が誘導されたことになる。このような DNA 複製に依存した脱メチル化について、どのような分子群が関与するのか、不明であるが、さらに DNA 複製を必要としない脱メチル化も認められる。特にサイトカイン産生など、短時間に発現が誘導される遺伝子において、DNA 複製非依存的脱メチル化が誘導される。この脱メチル化の分子機構に関しては、いくつかの仮説は提起されているものの、関与する酵素や反応過程も不明である。T 細胞サブセット分化は、T 細胞活性化ともなう細胞増殖も誘導されるため、脱メチル化誘導のタイミングからは、どちらの脱メチル化機構が関与しているのか判別できない。

CFSE により分化誘導前の細胞を染色し、FACS を用いて染色強度で細胞を分離する方法を用いて、分化誘導後 36 時間で、細胞分裂していない細胞と 1 回分裂した細胞を分取し、DNA 脱メチル化の状態を解析した。CD4SP 細胞から Th2 細胞に分化させた場合、細胞分裂していない細胞でも、25%程度の脱メチル化が認められ、DNA 複製を介さない脱メチル化機構の関与が示唆された (図 2)。

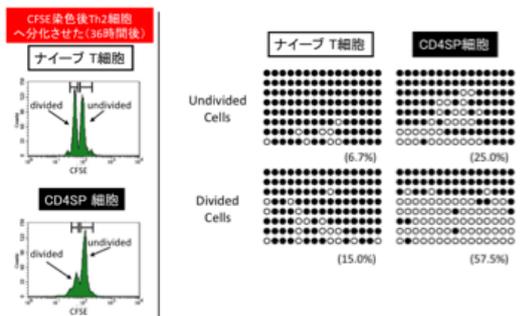


図2 CFSE染色により、細胞分裂前と1回分裂後の細胞におけるDNA脱メチル化の解析
CD4SP細胞をTh2細胞に分化誘導した場合、分裂前の細胞において、強い脱メチル化が見られ、DNA複製非依存的と考えられた(白丸:脱メチル化したシトシン残基)。

メチルシトシン結合タンパク質群はメチル化されたシトシン残基を認識し、転写抑制を担うDNAメチル化酵素やヒストン脱アセチル化酵素を染色体上にリクルートすることが知られている。MBD2はメチルシトシン結合タンパク質のひとつであり、クロマチン免疫沈降法を用いて、CNS1領域への結合を解析した。CD4SP細胞のCNS1領域にMBD2の結合が認められ、CD4SP細胞の分化に伴う迅速な脱メチル化に関与す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10件)

- ① 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 non-coding sequence CNS-1. *J. Immunol.* (印刷中) 査読有
- ② Kaminuma, O., Kitamura, F., Miyatake, S., Yamaoka, K., Miyoshi, H., Inokuma, S., Tatsumi, H., Nemoto, S., Kitamura, N., Mori, A., and Hiroi, T. T-box 21 transcription factor is responsible for distorted T(H)2 differentiation in human peripheral CD4⁺ T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 813-23. e3, 2009. 査読有
- ③ Toma-Hirano, M., Namiki, S., Shibata, Y., Ishida, K., Arase, H., Miyatake, S., Arai, K. and Kamogawa-Schifter, Y. Ly49Q ligand expressed by activated B cells induces plasmacytoid DC maturation. *Eur. J. Immunol.* 39, 1344-52, 2009. 査読有
- ④ Ohtomo, T., Miyatake, S., Kajiyama, Y., Umezumi, M., Kaminuma, O. and Mori, A. Airway eosinophilic inflammation is attenuated in conserved noncoding sequence-1 deficient mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 146 Suppl 1, 2-6. 2008. 査読有

- ⑤ Klein-Hessling, S., Bopp, T., Jha, M. K., Schmidt, A., Miyatake, S., Schmitt, E. and Serfling, E. Cyclic AMP-induced chromatin changes support the NFATc-mediated recruitment of GATA-3 to the interleukin 5 promoter. *J. Biol. Chem.* 283, 31030-7, 2008. 査読有
- ⑥ Chen, J., Namiki, S., Toma-Hirano, M., Miyatake, S., Ishida, K., Shibata, Y., Arai, N., Arai, K., and Kamogawa-Schifter, Y. The role of CD11b in phagocytosis and dendritic cell development. *Immunol. Lett.* 120, 42-48, 2008. 査読有
- ⑦ Suzuki, K., Kaminuma, O., Hiroi, T., Kitamura, F., Miyatake, S., Takaiwa, F., Tatsumi, H., Nemoto, S., Kitamura, N. and Mori, A. Downregulation of IL-13 gene transcription by T-bet in human T cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 146 Suppl 1, 33-5, 2008. 査読有
- ⑧ Kaminuma, O., Kitamura, F., Kitamura, N., Hiroi, T., Miyoshi, H., Miyawaki, A., Miyatake, S. Differential Contribution of NFATc2 and NFATc1 to TNF- α Gene Expression in T Cells. *J. Immunol.* 180, 1319-26, 2008. 査読有
- ⑨ Toma-Hirano, M., Namiki, S., Miyatake, S., Arai, K. and Kamogawa-Schifter, Y. Type I interferon regulates pDC maturation and Ly49Q expression. *Eur. J. Immunol.* 37, 2707-14, 2007. 査読有
- ⑩ Kitamura, N., Kitamura, F., Kaminuma, O., Miyatake, S., Tatsumi, H., Nemoto, S. and Mori, A. IL-4 gene transcription in human T cells is suppressed by T-bet. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 143 Suppl 1, 68-70, 2007. 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① 宮武昌一郎、青木和久 T細胞サイトカイン産生における脱メチル化制御の役割 第18回 kyoto T cell Conference 2008.6.13-14 京都
- ② Aoki, K. and Miyatake, S. Different cytokine expression and DNA demethylation profiles between CD4 single positive thymocytes and peripheral naive T cells. The 38th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2008.12.1-3, Kyoto
- ③ Kaminuma, O., Kitamura, F., Kitamura, N., Miyatake, S., Hiroi, T. C-terminal transactivation domain is required for NFAT-mediated TNF- α synthesis by T cells. The 38th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology

- 2008.12.1-3, Kyoto
- ④青木和久、宮武昌一郎 胸腺と末梢の CD4 陽性 T 細胞におけるサイトカイン発現パターンの差異は DNA 脱メチル化制御の差異による 第 31 回日本分子生物学会年会 2008.12.9-12 神戸
- ⑤宮武昌一郎、尾田真子、佐藤憲子、青木和久、正井久雄 サイトカイン遺伝子領域における複製開始点および複製タイミングの解析 特定領域研究「染色体サイクルの制御ネットワーク」第 3 回領域会議 2007.5.21-23 石川県加賀
- ⑥宮武昌一郎 アレルギー学の基礎 第 31 回専門医教育セミナープログラム 日本アレルギー学会 2007.6.12 横浜
- ⑦Aoki, K. and Miyatake, S. Analysis of DNA demethylation coupled with CD4+ T cell subset differentiation The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2007.11.20-23, Tokyo
- ⑧宮武昌一郎、青木和久、正井久雄 Th2 サイトカイン遺伝子領域における複製開始点および複製タイミングの解析 第 30 回日本分子生物学会年会 2007.12.11-15 横浜
- ⑨青木和久、宮武昌一郎 T 細胞の分化に伴う DNA の脱メチル化による遺伝子発現制御 第 30 回日本分子生物学会年会 2007.12.11-15 横浜

[図書] (計 2 件)

- ①青木和久、宮武昌一郎 (2008) Th2 分化制御メカニズム 細胞工学「T 細胞サブセット：どこまで感染症や免疫疾患との関わりが理解されてきたのか？」秀潤社 27, 125-131
- ②青木和久、宮武昌一郎 (2008) サイトカインのエピゲネティック調節 臨床免疫・アレルギー科 科学評論社 49, 195-202

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮武 昌一郎 (MIYATAKE SHOICHIRO)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・参事研究員
研究者番号：30239420

(2) 研究分担者

青木 和久 (AOKI KAZUHISA)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員
研究者番号：00280785
佐藤 憲子 (SATO NORIKO)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・分子疫学分野・准教授

(3) 連携研究者