

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19890041  
 研究課題名（和文） アレルギー炎症における転写制御因子 Gfi-1 の役割解析  
 研究課題名（英文） Functional analysis of transcription factor Gfi1 for the regulation of allergic inflammation  
 研究代表者  
 氏名（ローマ字）：新中須 亮（SHINNAKASU RYO）  
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・産学官連携研究員  
 研究者番号：00451758

## 研究成果の概要：

Th2 細胞は、アレルギー炎症の発症において中心的な役割を果たしている。Th2 細胞分化に必須である GATA3 の発現は、転写レベルだけでなく翻訳後修飾によっても制御されているが、その分子機構は不明であった。本研究において、私は、Gfi-1 が GATA3 の翻訳後修飾に関与することを見出した。Gfi-1 は、ユビキチン/プロテアソーム系を介した GATA3 蛋白分解を抑制することで、GATA3 蛋白の安定化する。このことから、Gfi-1 は、アレルギー性疾患の病態形成に重要である可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：免疫学・アレルギー・ぜんそく

## 1. 研究開始当初の背景

Th2 細胞分化に必須の転写因子である GATA3 の発現は、STAT6 による転写活性化と ERK-MAPK 経路を介した GATA3 蛋白の安定化誘導によって調節されていることを、我々はこれまでに報告してきた。しかしながら、ERK-MAPK がどのような分子メカニズムによって、GATA3 蛋白の安定化を誘導し

ているのかについては未だ明らかになっていなかった。そこで我々は、ERK-MAPK シグナルを介して発現が誘導され、GATA3 蛋白の安定化に寄与する分子を同定するため、DNA マイクロアレイ解析を行い、転写因子 Growth factor independent-1 (Gfi1) をその候補遺伝子の 1 つとして見いだしていた。

## 2. 研究の目的

アレルギー疾患の病態に深く関わっている、Th2細胞の分化に必須の転写因子 GATA3の発現は、IL-4受容体からのシグナルによる転写活性化とT細胞抗原受容体 (TCR) 下流で活性化するRas-ERK-MAPK経路を介したタンパク分解制御によって調節されていることが申請者らの研究で分かっている (Yamashita et al., J. Biol. Chem. 2005)。しかしながら、ERK-MAPKがどのような分子メカニズムによって、GATA3のユビキチン化依存的な分解をコントロールしているのかは未だ明らかになっていなかった。申請者は、ERK-MAPK下流でGATA3の蛋白安定化に寄与する分子を同定する目的でDNAマイクロアレイ解析を行い、転写制御因子Gfi-1を候補分子として見出した。そこで、本研究では、Gfi-1によるGATA3蛋白安定化の分子機構について解析を行うとともに、Th2細胞分化およびアレルギー反応におけるGfi-1の役割について検討を行った。

### Gfi1 (Growth factor independent-1)



#### Structure:

1. SNAG domain : Trans repression domain
2. Zinc Finger : Six Zinc Fingers ; 3rd,4th,5th ...DNA binding  
Others ...Unknown

Null mice : Reduction of T cells number, Disorder of HSC self-renewal,  
Neutropenia and abnormality of DC/macrophage differentiation etc.

Function in Th2 cells : Promoting cell proliferation of Th2 cells  
(Zhu et al., Immunity 16, 2002, Zhu et al., PNAS 103, 2006)

## 3. 研究の方法

### (1) Gfi-1によるGATA3蛋白安定化機構の解析

これまでの申請者らの研究から、GATA 3 蛋白の分解はユビキチン/プロテアソーム系により担われていることが明らかとなっている。ここでは、Gfi-1 遺伝子欠損 Th2 細胞およびGfi-1 遺伝子導入細胞について、GATA3 蛋白発現量の検討、GATA3 蛋白のユビキチン化状態、分解速度などについて検討を行い、Gfi-1 が GATA3 蛋白の安定性を制御しているのか検討を行った。また、Gfi-1 が直接 GATA3 蛋白の安定性を制御しているのかどうか評価するために、GATA3 と Gfi-1 の複合体形成能などについても検討を行った。

### (2) Gfi-1 遺伝子欠損マウスの Th2 細胞分化誘導におけるサイトカイン産生能の検討

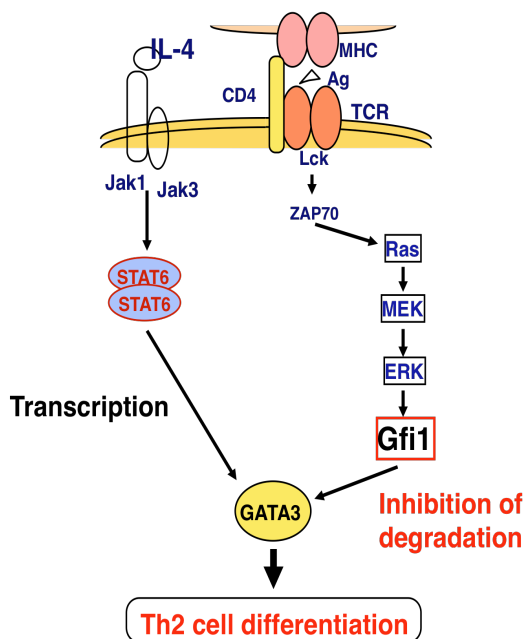
Gfi-1 遺伝子欠損マウス由来の Th2 細胞では、GATA3 蛋白の発現量が変化し、そのために Th2 細胞分化誘導に影響を与えている可能性があったことから、Gfi-1 遺伝子欠損マウスのナイーブ CD4T 細胞を Th2 細胞分化条件下で培養した細胞について、細胞内染色法、ELISA 法、定量的 RT-PCR 法などの手法を用いて検討を行い、Gfi-1 による Th2 細胞分化にともなうサイトカイン産生誘導能における役割について検討を行った。また、Th1 細胞分化についても解析を行った。

### (3) Gfi-1 によるクロマチンヒストン修飾状態への影響に関する検討

Gfi-1 はこれまで、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) やメチル基転移酵素である G9a と協調して働くことが報告されていることから、Gfi-1 が欠損することにより、ヒストン修飾状態が変化している可能性が考えられる。そこで、Gfi-1 遺伝子欠損マウスの Th2 細胞分化に伴う、Th2 サイトカイン遺伝子座、IFN $\gamma$  遺伝子座のヒストン修飾状態についてクロマチン免疫沈降法を用いて解析を行った。

#### 4. 研究成果

Gfi-1 遺伝子欠損 Th2 細胞および Gfi-1 遺伝子導入細胞について、GATA3 蛋白の発現量、ユビキチン化状態、分解速度などについて検討を行った結果、Gfi1 が GATA3 蛋白安定性の制御に寄与していることが明らかとなった。Gfi-1 遺伝子欠損マウスのナイーブ CD4T 細胞を Th2 細胞分化条件下で培養した細胞について、細胞内染色法、ELISA 法、定量的 RT-PCR 法、クロマチン免疫沈降法などの手法を用いて検討を行った結果、IL-5 産生誘導能の著しい低下、IFN $\gamma$  産生能の亢進がみとめられ、それに伴い、活性化したクロマチン状態の指標となるヒストン H3 の 9 番目リジン残基のアセチル化と 4 番目リジン残基のメチル化状態の IL-5 遺伝子座での低下、IFN $\gamma$  遺伝子座での亢進もみとめられた。そこで、Gfi1 遺伝子欠損 Th2 細胞に GATA3 を強制発現したところ、IL-5 産生能と IFN $\gamma$  産生抑制能の回復、さらに、ヒストン修飾状態の回復がみとめられた。以上の結果より、ERK-MAPK シグナルにより発現誘導される Gfi-1 は、ユビキチン/プロテアソームシステムによる GATA3 蛋白分解を制御することにより、GATA3 蛋白の安定化の誘導を行っていることが明らかとなった。



#### 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 2 件)

- ① Shinnakasu, R., Yamashita, M., Kuwahara, M., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Motohashi, S., and Nakayama, T.: Gfi1-mediated stabilization of GATA3 protein is required for Th2 cell differentiation. Gfi1-mediated stabilization of GATA3 protein is required for Th2 cell differentiation. J. Biol. Chem. 283 28216-28225, 2008, 査読有
- ② Yamashita, M. Kuwahara, M., Suzuki, A., Hirahara, K., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Motohashi, S., Iwama, A., and Nakayama, T.: Bmi1 regulates memory CD4 T cell survival via repression of the Noxa gene. 205, 1109-1120, 2008, 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Shinnakasu, R., Yamashita, M., Kuwahara, M., Kitajima, M., and Nakayama, T.: Gfi1 は GATA3 蛋白質の安定化を介して Th2 細胞分化を制御する / Gfi1-mediated stabilization of GATA3 protein is required for Th2 cell differentiation., 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008 年 12 月, 京都
- ② 山下政克、新中須亮、桑原誠、中山俊憲: Gfi1 は GATA3 蛋白質の安定化を介して Th2 細胞分化を制御する, 第 31 回日本分子生物学会年会, 第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008 年 12 月, 神戸

〔図書〕（計 1 件）

① 新中須 亮、山下政克、中山俊憲，秀潤社，細胞工学，2008，P150-P155

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新中須 亮 (SHINNAKASU RYO)  
千葉大学・大学院医学研究院  
産学官連携研究員  
研究者番号：00451758

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし