

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：32305  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21590318  
 研究課題名（和文） 成熟マスト細胞における G A T A - 1 の機能解析

研究課題名（英文） Roles of Gata1 in mature mast cells

## 研究代表者

大根田 絹子（OHNEDA KINUKO）  
 高崎健康福祉大学・薬学部・教授  
 研究者番号：50323291

## 研究成果の概要（和文）:

本研究では、赤血球と巨核球の分化に必須であることが知られている転写因子 GATA1 について、その成熟マスト細胞での役割を検証した。成熟マスト細胞のモデルとして RBL-2H3 細胞を用いた実験では、GATA1 は GATA2 とともにホスホリパーゼ C- 1 (PLC- 1) 遺伝子の発現を制御することによって細胞内カルシウム濃度を調整し、抗原刺激による脱顆粒反応を促進していると考えられた。一方マウス骨髄マスト細胞では GATA1 ではなく主に GATA2 が PLC- 1 の発現を制御していることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）:

The aim of this study is to clarify the roles of GATA1 in mature mast cells. We show that GATA1 and GATA2 are involved in mast cell degranulation through the control of phospholipase C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1) expression. Knockdown of GATA1 and/or GATA2 by specific siRNA significantly reduced antigen-induced degranulation and Ca<sup>2+</sup> mobilization in the rat basophilic leukemia cell line RBL-2H3. RT-PCR analyses showed that PLC- $\gamma$ 1 expression was significantly decreased by this GATA factor repression. Chromatin immunoprecipitation and luciferase reporter assays demonstrated that GATA factors directly activate *PLC- $\gamma$ 1* gene transcription through a conserved GATA-binding motif that resides in the 5'-upstream sequence. Furthermore, we show that GATA2, but not GATA1 plays a major role in regulating PLC- $\gamma$ 1 expression in mast cells derived from mouse bone marrow.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：転写因子・細胞分化・マスト細胞

## 1. 研究開始当初の背景

転写因子 GATA1 は赤血球と巨核球の分化に必須であり、*Gata1* ノックアウト

(KO) マウスは赤血球分化障害のため胎生致死となる。研究代表者らは、以前条件付き *Gata1* ノックアウト (KO) マウスを

用いた解析により、成体マウスにおいても GATA1 が赤血球造血に必須であることを報告した。一方、GATA1 はマスト細胞にも発現しているが、その役割は十分に解明されていない。

赤血球分化の過程では、未分化な前駆細胞で GATA2 が *Gata1* 遺伝子の発現を促進し、分化が進行すると GATA1 が *Gata2* 遺伝子の発現を抑制することが知られている。その結果、細胞分化段階に応じて、主に働く GATA 因子が GATA2 から GATA1 に交替する、いわゆる「GATA スイッチ」と呼ばれている現象がおこる。一方、マスト細胞では、分化・成熟した皮下の末梢マスト細胞でも GATA2 の発現が免疫組織染色で確認されている。また、赤血球で GATA1 と協調的に作用して *Gata2* 遺伝子の発現を抑制することが知られている共役因子 FOG-1 がマスト細胞には発現していない。これらの知見より、GATA1 と GATA2 の相互作用は、赤血球とマスト細胞とで異なっていることが予想される。

## 2. 研究の目的

以上のような背景を踏まえて、本研究は、成熟マスト細胞における GATA1 の役割を明らかにすることを目的として行った。研究期間の前半では、赤血球において観察されている「GATA スイッチ」がマスト細胞にも存在するのかどうか注目し、GATA1 と GATA2 相互の発現制御機構を明らかにすることを目的とした。研究期間の後半では、マスト細胞に特徴的な生理機能として、抗原刺激による脱顆粒反応に注目し、GATA 因子の役割と、標的としているマスト細胞特異的遺伝子の同定を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) マスト細胞分化に伴う GATA1 の発現解析

野生型マウスの骨髄細胞を IL-3 と SCF 存在下で培養して、マウス骨髄マスト細胞 (BMMC) を作製した。培養開始から 7・14・21・28 日後に細胞を一部回収して RNA を抽出し、定量 PCR 法によって GATA1・GATA2 のほか、マスト細胞に発現する血球系転写因子、マスト細胞特異的な機能に関わるいくつかの遺伝子について、mRNA 量を定量した。

### (2) 誘導的 *Gata1* ノックアウトマウス由来骨髄マスト細胞の作製と解析

マウス *Gata1* 遺伝子のエクソン II-VI を挟んで loxP 配列が挿入された *Gata1* floxed マウスは、オランダ・エラスムス大学の Philipsen 博士より分与していただいた。このマウスと ROSA26-CreER<sup>T2</sup> マウスを交配し、得られた *Gata1*<sup>fl/y</sup>::Cre マウスから骨髄を採取した。全骨髄細胞を (1) と同じように培養して BMMC を作製した。培養液に 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) を添加し、経時的に細胞を回収して *Gata1* 遺伝子の組み換えを確認した。また、*Gata1* 欠失細胞の性状解析として、フローサイトメトリーによる c-kit と FcεRIα の発現解析と、サイトスピン標本による形態観察を行った。

### (3) マスト細胞における GATA1 と GATA2 の制御機構の解析

*Gata1* と *Gata2* 遺伝子には、種間でよく保存されている GATA 結合配列が複数知られており、赤血球ではそれらが GATA1 と GATA2 の発現において重要な役割をしている。本研究では、野生型マウスの BMMC を用いて、それらの GATA 結合部位に GATA1 あるいは GATA2 が結合しているのかどうか、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) により解析した。また、それらの領域のヒストン修飾状態についても ChIP により検討した。

### (4) マスト細胞における GATA1 標的因子の同定

マスト細胞株 (RBL-2H3) において、人為的に GATA1 の発現を変化させ、マスト細胞特異的な遺伝子の発現量を定量 PCR 法によって解析した。同時に、GATA1 の発現を変化させたときのマスト細胞の脱顆粒能と細胞内カルシウム濃度を測定し、対照細胞と比較した。RBL-2H3 細胞で発現が変化していた遺伝子については、(2) で作製した *GATA1* 欠失骨髄 BMMC でも同様の変化をしているか否かを解析した。

## 4. 研究成果

### (1) マスト細胞分化に伴う GATA1 の発現解析

野生型 BMMC における GATA1 の発現制御様式について、赤血球と比較しながら解

析した。GATA1mRNA の発現量は、BMSC 培養過程で変動が少なく、赤血球と比較しても低いレベルにあった。一方 GATA2mRNA 量は BMSC の培養において経時的に増加し、他のマスト細胞特異的に発現する遺伝子の mRNA 量の変化と同調していた。これらの結果から、細胞分化段階に依存する GATA1 と GATA2 の発現制御機構が赤血球とマスト細胞で異なっていると考えられた。

(2) 誘導的 *Gata1* ノックアウトマウス由来骨髄マスト細胞の作製と解析

*Gata1<sup>fl/y</sup>::Cre* マウスの骨髄より調製した BMSC(floxCre)の培養液に 4-OHT を添加したところ、5 日後には *Gata1* 遺伝子の組み換えが PCR で確認され、10 日後には GATA1mRNA の発現はほぼ消失した。ところが FACS による c-kit と FcεRIα の発現や、細胞形態(サイトスピンで確認)は GATA1 を欠失させても変化しなかった。また、これらの細胞をマスト細胞欠損マウスの腹腔に投与したところ、GATA 1 欠失 BMSC を移植した場合も野生型細胞と同様に最終分化したマスト細胞が観察された。これらの結果から、GATA1 は成熟マスト細胞の分化形質の維持ならびに末梢組織での最終分化に必須ではないと考えられた。

(3) マスト細胞における GATA1 と GATA2 の制御機構の解析

ChIP 解析では、種間で保存されている GATA 結合部位の大部分に GATA1 あるいは GATA2 の結合が確認された。ところが、赤血球・巨核球での GATA1 の発現に重要な血球特異的エンハンサー(G1HE)に関しては、内部に存在する GATA ボックスへの GATA1 及び GATA2 の結合は観察されなかった。さらに、この領域のクロマチン修飾状態を調べたところ、ヒストン H3、H4 とも低アセチル化状態であった。これらの結果を総括すると、マスト細胞には赤血球のような GATA スイッチ機構は存在しないと考えられた。

(4) マスト細胞における GATA1 標的因子の同定

マスト細胞株(RBL-2H3)において GATA 因子をノックダウンすると、抗原刺激によ

る脱顆粒能が低下する。この細胞で脱顆粒を制御しているいくつかの候補因子の発現を調べたところ、Phospholipase C-γ1 (PLC-γ1) の発現が有意に低下していた。*PLC-γ1* 遺伝子の制御領域には種間で保存されている 2 つの GATA 結合部位が存在し、GATA1 と GATA2 は、この領域に結合していた。また、この領域を含むレポーター解析では、GATA1 あるいは GATA2 を導入するとレポーター活性が上昇した。これらの結果から、GATA1 と GATA2 は *PLC-γ1* 遺伝子の発現を直接制御することによって、RBL-2H3 細胞の IgE 受容体刺激を介した脱顆粒に関与していると考えられた。

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 6 件)

Ishijima Y, Ohmori S, Uenishi A, Ohneda K. (2012) GATA transcription factors are involved in IgE-dependent mast cell degranulation by enhancing the expression of phospholipase C-γ1. *Genes Cells*. 17:285-301. 査読有  
Tran TC, Kimura K, Nagano M, Yamashita T, Ohneda K, Sugimori H, Sato F, Sakakibara Y, Hamada H, Yoshikawa H, Hoang SN, Ohneda O. (2011) Identification of human placenta-derived mesenchymal stem cells involved in re-endothelialization. *J Cell Physiol*. 226:224-235. 査読有  
Nagano M, Kimura K, Yamashita T, Ohneda K, Nozawa D, Hamada H, Yoshikawa H, Ochiai N, Ohneda O. (2010) Hypoxia responsive mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood are effective for bone repair. *Stem Cells Dev*. 19:1195-1210. 査読有  
Kim K, Suzuki N, Ohneda K, Minegishi N, Yamamoto M. (2010). Fractionation of mature eosinophils in GATA-reporter transgenic mice. *Tohoku J Exp Med*. 220:127-138. 査読有  
Ohneda K, Ohmori S, Ishijima Y, Nakano M, Yamamoto M. (2009)

Characterization of a functional ZBP-89 binding site that mediates Gata1 gene expression during hematopoietic development. *J Biol Chem.* 284:30187-30199. 査読有 Suzuki M, Moriguchi T, Ohneda K, Yamamoto M.(2009) Differential contribution of the Gata1 gene hematopoietic enhancer to erythroid differentiation. *Mol Cell Biol.* 29:1163-1175. 査読有

[学会発表](計 9 件)

Ohmori S et al., Differential contribution of the *Gata1* gene hematopoietic enhancer to the erythroid and mast cell lineages. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13-16 日 パシフィコ横浜

Ishijima Y et al., The roles of mast cells in diet-induced obesity in mice. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13-16 日 パシフィコ横浜

植栗幸洋 他 GATA1 は骨髄マスト細胞(BMMCs)の増殖と生存に必要である 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同年会 2010 年 12 月 7-10 日 神戸ポートアイランド

石嶋康史 他 GATA 転写因子は PLC- $\gamma$ 1 の発現調節を介してマスト細胞の脱顆粒に關与する 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同年会 2010 年 12 月 7-10 日 神戸ポートアイランド

Ohneda K et al., GATA1 is required for survival and proliferation of committed mast cells derived from adult mouse bone marrow. 5<sup>th</sup>

International Symposium on GATA factors. 2010 年 11 月 17-19 日 仙台

Ishijima Y et al., GATA transcription factors are involved in degranulation by enhancing the expression of phospholipase C- $\gamma$ 1 in RBL-2H3 cells. 5<sup>th</sup> International Symposium on GATA factors 2010 年 11 月 17-19 日 仙台

Ohmori S et al., Autonomous and network regulation of GATA factors in mast cells. 5<sup>th</sup> International

Symposium on GATA factors 2010 年 11 月 17-19 日 仙台

石嶋康史 他 GATA transcription factors are involved in degranulation of RBL-2H3 cells. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 9-12 日 パシフィコ横浜

大森 慎也 他 Autonomous and network gene regulation of GATA factors in mast cells. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 9-12 日 パシフィコ横浜

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

大根田 絹子 (OHNEDA KINUKO)  
高崎健康福祉大学・薬学部・教授  
研究者番号：50323291

### (2)研究分担者

石嶋 康史 (ISHIJIMA YASUSHI)  
高崎健康福祉大学・薬学部・助教  
研究者番号：10433640  
大森 慎也 (OHMORI SHINYA)  
高崎健康福祉大学・薬学部・助手  
研究者番号：10509194