

転写因子GATA2とPU.1による高親和性IgE受容体の発現と転写制御

大森 慎也¹, 大根田 絹子²

1. はじめに

IgEによるアレルギー性疾患はマスト細胞や好塩基球が責任細胞である。これらの細胞上に発現する高親和性IgE受容体(FcεRI)にIgEが結合すると、細胞内シグナルが活性化されて脱顆粒反応が起こり、ヒスタミンやロイコトリエンを含むケミカルメディエーターがアレルギー原因物質として放出される。マスト細胞や好塩基球に発現するFcεRIは、ヒト・マウスともにα鎖、β鎖、そしてγ鎖のホモ二量体により構成される複合体(四量体:αβγγ)として機能する(図1A)。FcεRIを構成する各鎖のうち、α鎖はIgEとの結合に必要であり、γ鎖は脱顆粒反応におけるシグナル伝達に重要な役割を果たす。ヒトβ鎖はFcεRIの細胞表面発現と、γ鎖を介する細胞内シグナルの増強作用を持つことが報告されている¹⁾。マウスFcεRIのβ鎖はIgE依存性のマスト細胞活性化の調節機能を持つ²⁾。気管支喘息や慢性蕁麻疹に対して用いられる抗ヒトIgEモノクローナル抗体製剤のオマリズマブは、血中の遊離IgEの減少とともにFcεRIを間接的に減少させることで効果を発揮する³⁾。このようにFcεRIもアレルギー疾患治療での有力な分子標的候補の一つと考えられている。しかしFcεRIの発現レベルを直接制御する分子標的薬は開発されておらず、そのような候補化合物を見いだせば新たな作用機序によるアレルギー性疾患治療の可能性につながると考えられる。

FcεRI構成因子の遺伝子発現制御には、これまでに転写因子であるGATA1やGATA2, PU.1などが関与するこ

とが報告されている^{4,5)}。GATA1, GATA2, およびPU.1は、正常な血球分化過程においても必須の役割を果たす。GATA1は赤血球分化のマスターレギュレーターとして知られており、GATA2は造血幹細胞や造血前駆細胞の増殖と生存、またマスト細胞の機能発現および分化形質の維持に必須である⁶⁻⁸⁾。PU.1(遺伝子名: *Spi1*)は、骨髓球およびB細胞の分化過程で重要な役割を果たしている^{9,10)}。骨髓球系前駆細胞においてGATA因子とPU.1は、それぞれの発現レベルやDNA結合活性を相互に抑制し、転写共役因子のリクルートを競合することで互いの活性を阻害する^{11,12)}。一方、分化したマスト細胞ではGATA因子とPU.1はともに発現しており、FcεRIβをコードする*Ms4a2*遺伝子の発現を正に制御することが報告されている^{4,5,8)}。その詳細な制御メカニズムについては不明な点が残されている。本稿では、マウス*Ms4a2*遺伝子の発現活性化におけるGATA因子とPU.1の役割について、最近の研究成果を中心に概説する¹³⁾。

2. 骨髓由来マスト細胞でのGATA2およびPU.1による*Ms4a2*遺伝子の制御機構

FcεRIを発現しIgE抗体刺激による脱顆粒反応を示すマウス骨髓由来マスト細胞(BMMCs)の樹立を行った。Cre-LoxPシステムにより薬剤誘導的にGATA2およびPU.1をノックアウトできるマウス(G2^{Cre}::CreERT2およびPU.1^{Cre}::CreERT2)から骨髓細胞を採取し、stem cell factor(SCF)とインターロイキン3(IL-3)存在下で培養しBMMCsを樹立した。4-hydroxy Tamoxifen(4-OHT)添加によりCre組換え酵素を誘導すると、GATA2欠失BMMCsではPU.1の発現レベルは上昇し、PU.1欠失BMMCsではGATA2の発現レベルが上昇した¹³⁾。このことから、GATA2とPU.1はBMMCsにおいて相互に発現レベルを抑制していることがわかった¹³⁾。一方FcεRIβ(*Ms4a2*) mRNAの発現レベルは、GATA2欠失およびPU.1欠失のいずれにおいても著しく低下したことから、GATA2とPU.1はBMMCsにおいて*Ms4a2*の発現を正に制御することがわかった。またこの解析で、GATA2もしくはPU.1の欠損による影響は、他方の因子(PU.1もしくはGATA2)の増加によっても代償されなかったことから、GATA2とPU.1に機能的な冗長性はなく、それぞれが異なる機序により

¹高崎健康福祉大学薬学部(〒370-0033 群馬県高崎市中大類町60)

²東北大学東北メディカル・メガバンク機構ゲノム予防医学分野(〒980-8573 宮城県仙台市青葉区星陵町2-1)

Expression and transcriptional regulation of high-affinity IgE receptor by transcription factors GATA2 and PU.1

Shin'ya Ohmori¹ and Kinuko Ohneda² (¹Takasaki University of Health and Welfare, 60, Nakaorui-machi Takasaki, 370-0033,

²Tohoku University Tohoku Medical Megabank Organization, 2-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai, 980-8573)

本論文の図版はモノクロ(冊子版)およびカラー(電子版)で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920587

投稿受付日: 2020年6月1日

© 2020 公益社団法人日本生化学会

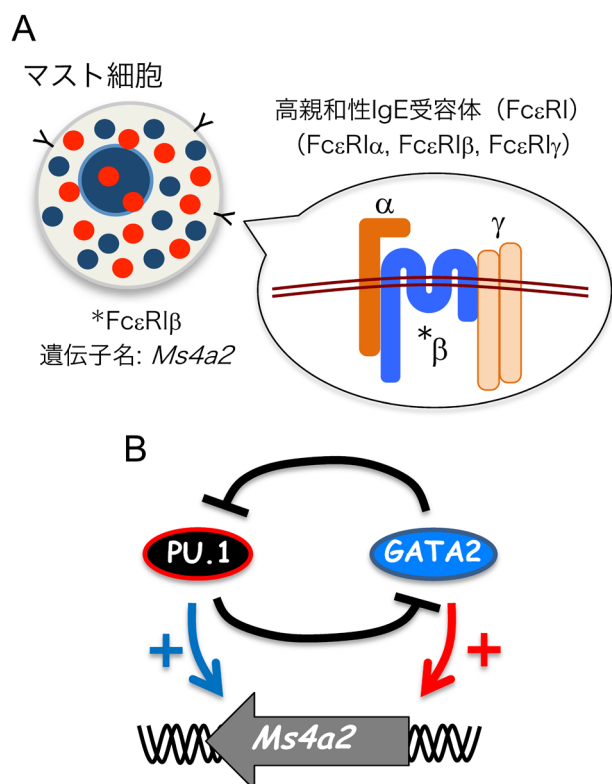


図1 骨髄由来マスト細胞でのGATA2およびPU.1による*Ms4a2*遺伝子の制御機構

(A)マスト細胞や好塩基球に発現する高親和性IgE受容体 (FcεRI) は、α鎖、β鎖、そしてγ鎖のホモ二量体により構成される。(B)GATA2とPU.1は相互に発現抑制し、FcεRI (*Ms4a2*) の発現をそれぞれ異なるメカニズムで正(+)に制御する。

Ms4a2 の発現を制御していることが示唆された (図1B)。

3. *Ms4a2* 遺伝子座でのGATA2とPU.1の役割

GATA2とPU.1が*Ms4a2*遺伝子の転写制御においてどのような役割を担っているのかを明らかにするために、公開されているクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq) データの情報を元に、BMMCsを用いたクロマチン免疫沈降定量PCR (q-ChIP) 解析を行った。その結果、GATA2は*Ms4a2*遺伝子のプロモーター付近 (−60bp) と転写開始点から下流+10.4kbpの領域に実際に結合することを確認した (図2上段)。一方PU.1は、GATA2が結合する+10.4kbp領域と上流−12kbpの2か所に結合が認められた (図2上段)。興味深いことに、PU.1を欠失させると+10.4kbp領域でのGATA2結合は著しく減少し、−60bpにおけるGATA2結合も同時に減弱した (図2下段)。この結果からPU.1がクロマチン高次構造を変換させることでGATA2結合を促進している可能性を考えた。そこでPU.1やGATA2と相互作用し、クロマチン構造変換に関わることが報告されているLDB1 (LIM domain binding 1)

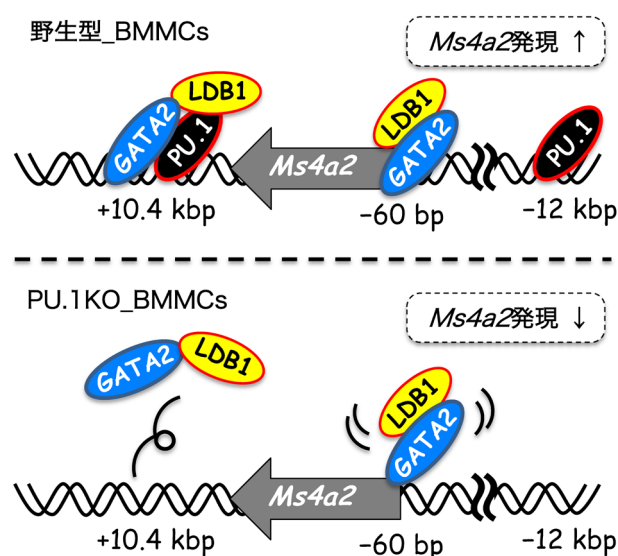


図2 *Ms4a2* 遺伝子座でのGATA2, PU.1, LDB1の役割

BMMCsの*Ms4a2*遺伝子座において、GATA2とLDB1はプロモーター付近 (−60bp) と下流+10.4kbpの領域に結合する。PU.1は、GATA2が結合する+10.4kbp領域と上流−12kbpの2か所に結合する (上段)。PU.1欠失BMMCsでは、+10.4kbp領域と−60bp領域でのGATA2とLDB1の結合が大きく減少し、*Ms4a2*の発現レベルが低下する (下段)。

をsiRNAによってノックダウンした。その結果、*Ms4a2* mRNA発現は著しく減少した。このことから、LDB1が*Ms4a2*の発現制御に関わっていることが示唆された¹³⁾。次に、*Ms4a2*遺伝子座へのLDB1の結合について定量的ChIPアッセイによって解析した。その結果、LDB1はGATA2と同様に+10.4kbp領域と−60bp領域に結合しており (図2上段)、この結合はPU.1の欠失によってGATA2とともに著しく減少した (図2下段)。これらの結果は*Ms4a2*遺伝子座において、PU.1に依存したLDB1のリクルートによりオープンなクロマチン構造が維持され、GATA2結合が促進されて*Ms4a2*発現が活性化されることを示唆している。

4. *Ms4a2* 遺伝子の新規制御領域の同定と機能解析

本解析で見いだしたGATA2, PU.1, LDB1が結合する+10.4kbp領域は、*Ms4a2*遺伝子の発現調節において必須な制御領域であると考え、ゲノム編集法により欠失させて*Ms4a2* mRNAの発現レベルを調べた。その結果、ヘテロ接合型の変異株 (wt/Δ) では*Ms4a2*の発現が40%程度まで減少し、ホモ接合型の変異株 (Δ/Δ) では完全に消失した (図3A)。さらにΔ/Δでは、*Ms4a2*遺伝子のプロモーター付近 (−60bp領域) に対するGATA2の結合が消失しており、PU.1の−12kbp領域に対する結合も減少していた (図3B)。この結果は、+10.4kbp領域がGATA2の−60bp領域への集積やPU.1の−12kbp領域への結合を制御し、*Ms4a2*

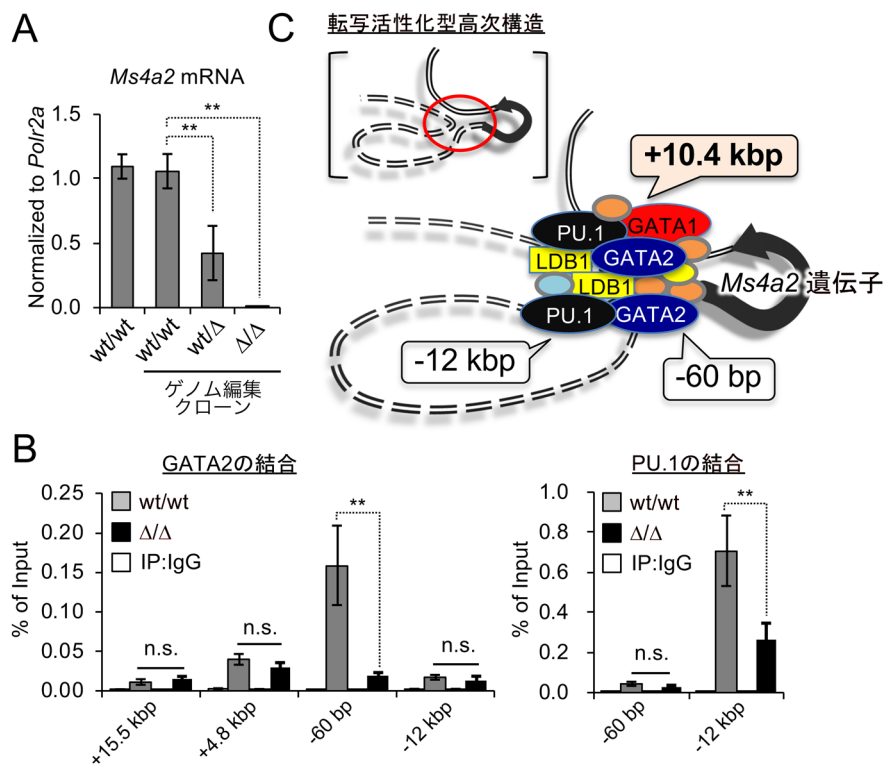


図3 *Ms4a2* +10.4kbp 領域の機能解析

(A) GATA2, PU.1, LDB1 が結合する *Ms4a2* +10.4kbp 領域をゲノム編集法によって欠失させ、*Ms4a2* の発現量を定量 RT-PCR で解析した (*Polr2a* 発現量により補正)。wt/wt: 野生型株。wt/Δ: ヘテロ接合型の変異株。Δ/Δ: ホモ接合型の変異株。左の wt/wt は、ゲノム編集を行っていない野生型を示す。Δ/Δ では *Ms4a2* の発現が完全に消失した。(B) 定量 ChIP 解析による *Ms4a2* 遺伝子座での GATA2 と PU.1 の結合の分布。Δ/Δ では、プロモーター (-60 bp) における GATA2 の結合が大きく減少し、-12kbp における PU.1 の結合も減弱した (インプット DNA により補正)。(C) GATA 因子および PU.1, LDB1 による *Ms4a2* の発現制御機構モデル図。GATA2 はプロモーター付近で基本転写調節に関与し、PU.1 は LDB1 とともにクロマチン高次構造の形成に関与していることが示唆された。また *Ms4a2* +10.4kbp 領域は、*Ms4a2* 遺伝子座への GATA2 と PU.1 のリクルートに必須であることが明らかとなった (文献 13 より改変)。

の発現において中心的な役割を果たしていることを示している。また、本稿では割愛したが転写レベルでの *FcεRIβ* の発現低下により、細胞膜上の *FcεRIα* タンパク質の発現も減少することがわかった¹³⁾。この結果は *FcεRIβ* の発現低下が細胞膜上の *FcεRI* 複合体の総数を減少させることを示す。

5. おわりに

本研究の結果から、1) マスト細胞においても GATA 因子と PU.1 は互いに抑制関係にあり、*Ms4a2* 遺伝子の発現を協調的に制御していること、2) クロマチンループ因子である LDB1 も正の制御因子として必要であること、3) GATA2 はプロモーター付近で基本転写調節に関与しており、PU.1 は LDB1 とともにクロマチン高次構造の形成に関与していること、4) *Ms4a2* +10.4kbp 領域は、*Ms4a2* 遺伝子座への GATA2 と PU.1 のリクルートに必須であること

が明らかとなった (図 3C)¹³⁾。今回の解析過程において、*FcεRIβ* の転写レベルでの発現低下が、細胞膜上の *FcεRIα* タンパク質の発現量低下をもたらすことがわかった。このことは *Ms4a2* 遺伝子の発現のみを制御することで *FcεRI* 複合体の量を制御できることを示している。本解析によって *Fc* 受容体の発現制御機構の一端が、転写とクロマチン構造レベルで明らかとなった。今後、この解析を進め、*FcεRI* 複合体を分子標的とした新たなアレルギー治療薬の開発のための分子基盤を確立していきたいと考えている。

文 献

- 1) Kraft, S., Rana, S., Jouvin, M.H., & Kinet, J.P. (2004) The role of the *FcεRIβ* chain in allergic diseases. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **135**, 62–72.
- 2) Furumoto, Y., Nunomura, S., Terada, T., Rivera, J., & Ra, C. (2004) The *FcεRIβ* immunoreceptor tyrosine-based activation motif exerts inhibitory control on MAPK and IκB kinase phosphorylation and mast cell cytokine production.

- J. Biol. Chem.*, **279**, 49177–4917787.
- 3) MacGlashan, D.W. Jr., Bochner, B.S., Adelman, D.C., Jardieu, P.M., Togias, A., McKenzie-White, J., Sterbinsky, S.A., Hamilton, R.G., & Lichtenstein, L.M. (1997) Down-regulation of Fc(epsilon)RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J. Immunol.*, **158**, 1438–1445.
 - 4) Inage, E., Kasakura, K., Yashiro, T., Suzuki, R., Baba, Y., Nakano, N., Hara, M., Tanabe, A., Oboki, K., Matsumoto, K., et al. (2014) Critical Roles for PU.1, GATA1, and GATA2 in the expression of human FcεRI on mast cells: PU.1 and GATA1 transactivate FCER1A, and GATA2 transactivates FCER1A and MS4A2. *J. Immunol.*, **192**, 3936–3946.
 - 5) Ohneda, K., Moriguchi, T., Ohmori, S., Ishijima, Y., Satoh, H., Philipsen, S., & Yamamoto, M. (2014) Transcription factor GATA1 is dispensable for mast cell differentiation in adult mice. *Mol. Cell. Biol.*, **34**, 1812–1826.
 - 6) Pevny, L., Lin, C.S., D'Agati, V., Simon, M.C., Orkin, S.H., & Costantini, F. (1995) Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development*, **121**, 163–172.
 - 7) Tsai, F.Y., Keller, G., Kuo, F.C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F.W., & Orkin, S.H. (1994) An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*, **371**, 221–226.
 - 8) Ohmori, S., Moriguchi, T., Noguchi, Y., Ikeda, M., Kobayashi, K., Tomaru, N., Ishijima, Y., Ohneda, O., Yamamoto, M., & Ohneda, K. (2015) GATA2 is critical for the maintenance of cellular identity in differentiated mast cells derived from mouse bone marrow. *Blood*, **125**, 3306–3315.
 - 9) Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J., & Singh, H. (1994) Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*, **265**, 1573–1577.
 - 10) McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G.E., Paige, C.J., et al. (1996) Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.*, **15**, 5647–5658.
 - 11) Arinobu, Y., Mizuno, S., Chong, Y., Shigematsu, H., Iino, T., Iwasaki, H., Graf, T., Mayfield, R., Chan, S., Kastner, P., et al. (2007) Reciprocal activation of GATA-1 and PU.1 marks initial specification of hematopoietic stem cells into myeloerythroid and myelolymphoid lineages. *Cell Stem Cell*, **1**, 416–427.
 - 12) Burda, P., Vargova, J., Curik, N., Salek, C., Papadopoulos, G.L., Strouboulis, J., & Stopka, T. (2016) GATA-1 inhibits PU.1 gene via DNA and histone H3K9 methylation of its distal enhancer in erythroleukemia. *PLoS One*, **11**, e0152234.
 - 13) Ohmori, S., Ishijima, Y., Numata, S., Takahashi, M., Sekita, M., Sato, T., Chugun, K., Yamamoto, M., & Ohneda, K. (2019) GATA2 and PU.1 Collaborate To Activate the Expression of the Mouse Ms4a2 Gene, Encoding FcεRIβ, through Distinct Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.*, **39**, e00314–e00319.

著者寸描

●大森 慎也 (おおもり しんや)

高崎健康福祉大学薬学部講師。博士 (医学)。

■略歴 2006年筑波大学大学院医科学研究科医科学専攻修了。東北大学大学院医学系研究科医化学分野技術員を経て、08年より現職。

■研究テーマと抱負 GATA転写因子によるマスト細胞 (肥満細胞) の分化や機能の制御機構解析。マスト細胞の活性化における遺伝子発現機構を明らかにし、創薬研究の発展に繋がってきたい。

■ウェブサイト <https://www.takasaki-u.ac.jp/faculty/yakugaku>

■趣味 釣り, ゴルフ, 野球観戦。

●大根田 絹子 (おおねだ きぬこ)

東北大学東北メディカル・メガバンク機構ゲノム予防医学分野教授。博士 (医学)。

■略歴 東北大学医学部卒業 (1987年), 同大学院修了 (医学博士)。ノースカロライナ大学チャペルヒル校, カリフォルニア大学サンフランシスコ校博士研究員, 熊本大学医学部博士研究員, 筑波大学人間総合科学研究科講師, 高崎健康福祉大学薬学部教授を経て, 2019年9月から現職。

■研究テーマと抱負 マスト細胞特異的な遺伝子発現制御機構の解明。細胞外環境を受容する多くのアンテナを持ち, 多彩な生理活性物質を産生するマスト細胞において, 未だBlack boxとなっている細胞系列特異的な遺伝子発現制御機構を解明したい。

■ウェブサイト <https://www.megabank.tohoku.ac.jp/tommo/member/member07>

■趣味 猫好き。読書。