

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02620

研究課題名(和文) Runx依存性遺伝子サイレンサーを介した遺伝子発現制御の新たな作動原理

研究課題名(英文) Novel regulatory mechanisms of gene expression via Runx-dependent gene silencer

研究代表者

香城 諭 (Kojo, Satoshi)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：70360542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：RUNXは、血液細胞分化に重要な役割を担う転写因子である。RUNXを介した遺伝子発現制御機構の一つに、RUNX依存性遺伝子サイレンサーによる標的遺伝子の発現抑制があるが、その制御機構についてはほとんど解明されていない。本研究では、Cd4遺伝子を対象とし、サイレンサーに近接する遺伝子領域を確認した。その結果、サイレンサー活性が高く遺伝子発現を抑制する状況において、サイレンサー部とエンハンサー領域のゲノム近接が認められ、サイレンサーによる遺伝子発現の抑制は、エンハンサーを対象として誘導されるものであると考えられた。また、その抑制メカニズムとして、エンハンサーRNAの発現制御が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子発現は生体を構成する細胞の機能や分化を司る極めて重要な生物学的プロセスである。また、免疫細胞は生体の防御を担う重要な細胞集団であり、その機能や分化機構を明らかにすることは重要な意味を持つ。本研究では、免疫細胞の一つT細胞の分化過程で生じる遺伝子発現について、新たな制御機構の存在を明らかにするものである。本機構は、免疫細胞分化のみならず様々な細胞で利用されている可能性もあり、生体の仕組みを理解するうえでの重要な発見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：RUNX is a transcription factor that plays an important role in hematopoietic cell differentiation. One of the regulatory mechanisms of gene expression via RUNX is the repression of target gene expression by RUNX-dependent gene silencers, but the regulatory mechanism is largely unknown.

In this study, we identified gene regions in close proximity to the silencer in Cd4 gene locus. As a result, genomic proximity between the silencer and enhancer regions was observed in situations where silencer activity is high, suggesting that silencer-induced suppression of gene expression is induced by targeting the enhancer. The regulation of enhancer RNA expression was also suggested as a mechanism of gene repression by silencer.

研究分野：分子免疫学

キーワード：転写因子RUNX 胸腺細胞分化 Cd4遺伝子 サイレンサー エンハンサーRNA 遺伝子発現

### 1. 研究開始当初の背景

**RUNX** ファミリー分子 (以下 **RUNX**) は、血球分化関連遺伝子の発現を転写レベルで制御する、造血系において極めて重要な転写因子群である。**RUNX** による遺伝子発現制御の一つに、**RUNX** 依存性遺伝子サイレンサー (以下サイレンサー) を介して発動するものがある。サイレンサーは、遺伝子近傍に存在し標的遺伝子の発現を負に制御するシスエレメントである。

**CD4** は **T** 細胞の分化に必須の細胞表面分子であり、**MHC** クラス II 分子への結合を介してヘルパー **T** 細胞の分化に寄与する。**T** 細胞の分化過程において、未熟な胸腺細胞である **CD4/CD8 double negative (DN)** ステージでは **CD4** の発現は抑制されており、続く **CD4/CD8 double positive (DP)** ステージにおいて発現が誘導される。**DN** ステージにおいて認められる **Cd4** 遺伝子の発現抑制は、転写因子 **RUNX** がゲノム上の **Cd4** サイレンサー領域に結合することによって行われる。しかしながら、**RUNX** とサイレンサーの相互作用による遺伝子発現抑制の分子実体については、現在までのところほとんど理解されていない。

### 2. 研究の目的

本研究を遂行するにあたり、**Cd4** サイレンサー (**S4**) を **Cd4** とは遺伝子発現パターンが異なる (サイレンサーの活性化時期が異なる) **Thpok** サイレンサー (**Sth**) に置換したマウスを作成した。このマウスでは、プロモーター・エンハンサー、細胞の分化ステージ、そして **RUNX** の発現が同一の条件における各サイレンサーの活性比較を行うことが可能となる。解析の結果、**DP** ステージにおいて各々のサイレンサー活性が異なり、**Cd4** 遺伝子の抑制状態が異なることが確認された。

本研究では、**Cd4** 遺伝子領域をモデル遺伝子座とし、上記サイレンサー置換マウスを使用することにより、**RUNX** 依存性遺伝子サイレンサーによる標的遺伝子 (**Cd4** 遺伝子) の発現抑制についてその分子機構を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) サイレンサーの標的 DNA 領域の同定

ここでは、サイレンサーが近接する **DNA** 領域を確認するために、サイレンサーの近傍に **LexA** タンパク質の結合配列を挿入した。また、**T** 細胞特異的に改変 **LexA** タンパク質を発現するトランスジェニックマウスとの交配によって、サイレンサー近傍領域を特異的に免疫沈降できる **iChIP** マウスを作成し、**iChIP-seq** 法を適用することによってサイレンサーに近接する **DNA** 領域を同定する。

#### (2) サイレンサー標的 DNA 領域の活性確認

ここでは、サイレンサー置換マウスを用い、サイレンサー活性の異なる条件下にて、サイレンサーの標的 **DNA** 領域のエピゲノム解析やエンハンサー **eRNA** (**eRNA**) の転写活性確認を行い、サイレンサーが制御する項目の確認を行う。

#### (3) eRNA 発現制御機構解析

ここでは、クロマチン免疫沈降法を利用し、サイレンサーの活性変化に伴い標的 **DNA** への結合が変動する活性制御因子を同定する。さらに、当該活性制御因子のノックダウンによって、**Cd4** 遺伝子発現への当該因子の関与を確認する。

### 4. 研究成果

#### (1) サイレンサーの標的 DNA 領域探索

サイレンサーは、標的遺伝子の発現を制御するために遺伝子発現の制御領域 (エンハンサー) に近接し、その活性を制御していると仮定した。これを確認するために、サイレンサーが近接する領域を **iChIP-seq** 法にて確認した。これは、サイレンサー領域を特異的に免疫沈降し、共に沈降する **DNA** 領域を確認することで近接領域を同定する方法である。**iChIP-seq** 法を実施した結果、サイレンサー活性が高く遺伝子発現を抑制している状況下 (**Sth**) において、サイレンサー領域は **Cd4** 遠位エンハンサー (**E4p**) に近接することが明らかとなった (図 1)。サイレンサー・プロモーター間の近接も確認されたが、サイレンサーの抑制活性との関係性が確認できなかったため、遺伝子発現抑制の際のサイレンサーの標的 **DNA** 領域は、**Cd4** 遠位エンハンサーであると結論づけた。

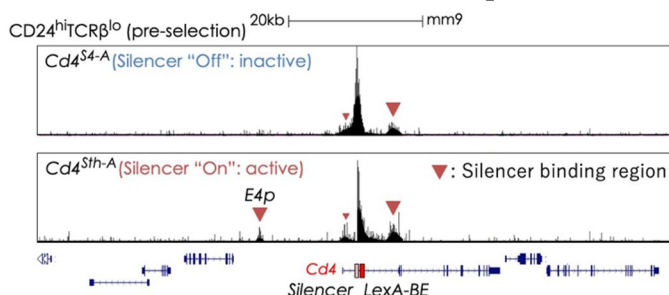


図1. iChIP-seq法によるサイレンサー近接領域の同定

(2) サイレンサー活性変動によるエンハンサー領域のエピゲノム状態変化

(1)において、サイレンサーの標的 DNA 領域が *Cd4* 遠位エンハンサーであると考えられたため、当該 DNA 領域のエピゲノム解析を実施した。クロマチン免疫沈降法解析にてエンハンサー活性の指標となるヒストン修飾を確認した結果、遺伝子発現の状態に関わらずヒストン修飾は変化しないことが確認された。また、遺伝子発現が抑制されている状況においても、ヒストン修飾の状態からは活性化エンハンサーの状態であると推定された。

(3) サイレンサー活性変動による eRNA 発現変化

サイレンサー活性が異なるにも関わらず、エンハンサー領域のヒストン修飾は変化しないと考えられた。そこで他の指標にてエンハンサー活性を確認すべく、当該エンハンサー領域から転写される eRNA の発現を確認した。その結果、サイレンサー活性が高い状態では、エンハンサーからの eRNA の発現が強く抑制されていることが明らかとなった(図2)。また、この eRNA の抑制は RUNX の抑制活性依存的なものであることも確認された。eRNA は、エンハンサーがプロモーターを活性化する際の機能分子として機能することが報告されていることから、RUNX/サイレンサーは、エンハンサーと近接し eRNA の発現を制御することによって遺伝子発現の制御に関与している可能性が考えられた。

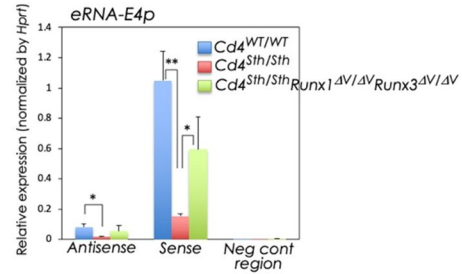


図2. エンハンサーからのeRNAの発現

(4) サイレンサーによる eRNA 発現制御機構

eRNA の発現制御機構を明らかにする目的で、クロマチン免疫沈降法を用いて RNA 転写に関わる因子のエンハンサー領域への集積を確認した。eRNA の転写に必須の RNA polymerase II (Pol II) の集積を確認したところ、サイレンサーが活性化されている状態において、減少が認められ、Pol II CTD の 7 番目のセリンがリン酸化された Pol II が特異的に減少していることが明らかとなった(図3)。Pol II のセリン 7 のリン酸化は、snRNA の転写の際に重要となる化学修飾であることから、snRNA 転写に関わるその他の因子の集積を確認したところ、Little elongation complex (LEC) の構成因子の一つである Ice1 の集積がサイレンサーの状態によって大きく変化することが確認された。具体的には、サイレンサーが遺伝子発現を抑制する状態では、Ice1 の集積は大きく減弱していた。これより、サイレンサーによって LEC の集積を制御することが eRNA の発現に関与すると考え、さらなる検討を実施した。

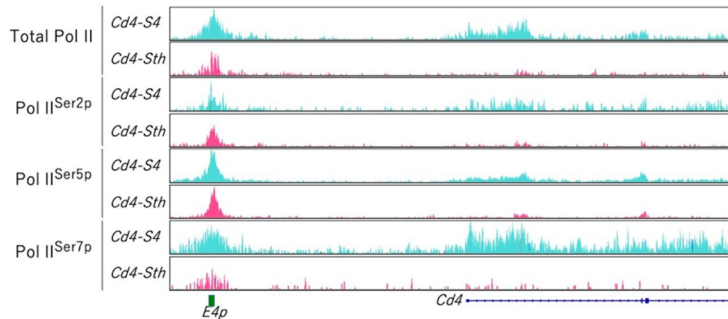


図3. RNA Polymerase IIの集積

(5) eRNA/Cd4 発現における LEC の関与

(4)の検討において、Little elongation complex の結合制御に RUNX/サイレンサーが関わっている可能性が示唆された。ここでは、Little elongation complex が eRNA の発現制御に寄与する可能性を検証するため、未熟な胸腺細胞株 1200M を使用した。1200M 細胞では、CD4 分子の発現は RUNX1 によって抑制されている。ここで Runx1 遺伝子をノックダウンすると、eRNA の発現を伴う Cd4 遺伝子発現の脱抑制が認められる。この状況において Ice1 遺伝子をノックダウンすることにより、Cd4 の発現への Ice1 (LEC) の関与を検討した。その結果、Ice1 のノックダウンに伴い eRNA 発現が低下し、CD4 発現が大きく減弱することが確認された(図4)。このことより、eRNA の発現制御を介した CD4 の発現制御に LEC が関与していると考えられた。つまり、RUNX/サイレンサーによって LEC を介した eRNA の発現制御を行うことによって、サイレンサーは Cd4 遺伝子の発現を制御している可能性が示唆された。

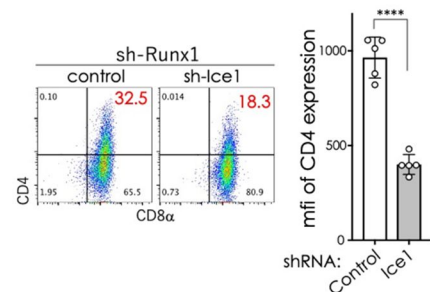


図4. Ice1ノックダウンによるCD4の発現低下

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Seo Wooseok, Shimizu Kanako, Kojo Satoshi, Okeke Arinze, Kohwi-Shigematsu Terumi, Fujii Shin-ichiro, Taniuchi Ichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Runx-mediated regulation of CCL5 via antagonizing two enhancers influences immune cell function and anti-tumor immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15375-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kojo Satoshi, Ohno-Oishi Michiko, Wada Hisashi, Nieke Sebastian, Seo Wooseok, Muroi Sawako, Taniuchi Ichiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Constitutive CD8 expression drives innate CD8+ T-cell differentiation via induction of iNKT2 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000642
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202000642	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Seo Wooseok, Shimizu Kanako, Kojo Satoshi, Okeke Arinze, Kohwi-Shigematsu Terumi, Fujii Shin-ichiro, Taniuchi Ichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Runx-mediated regulation of CCL5 via antagonizing two enhancers influences immune cell function and anti-tumor immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15375-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kojo Satoshi, Ohno-Oishi Michiko, Wada Hisashi, Nieke Sebastian, Seo Wooseok, Muroi Sawako, Taniuchi Ichiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Constitutive CD8 expression drives innate CD8+ T-cell differentiation via induction of iNKT2 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000642
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202000642	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyamoto Chizuko, Kojo Satoshi, Yamashita Motoi, Moro Kazuyo, Lacaud Georges, Shiroguchi Katsuyuki, Taniuchi Ichiro, Ebihara Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Runx/Cbf complexes protect group 2 innate lymphoid cells from exhausted-like hyporesponsiveness during allergic airway inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08365-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kojo Satoshi, Yasmin Nighat, Muroi Sawako, Tenno Mari, Taniuchi Ichiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Runx-dependent and silencer-independent repression of a maturation enhancer in the Cd4 gene	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-05803-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 香城 諭, 海老原隆, 太野路子, 室井佐和子, 谷内一郎
2. 発表標題 Runx3 C末端アミノ酸残基による免疫細胞分化制御
3. 学会等名 第29回Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥山一生, 山下 基, 太野路子, 香城 諭, 谷内一郎
2. 発表標題 Bcl11b ミスセンス変異によるT細胞分化異常の発症機序
3. 学会等名 第29回Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuki Okuyama, Motoi Yamashita, Michiko Ohno, Satoshi Kojo, Hideyuki Yoshida, Ichiro Taniuchi
2. 発表標題 Pathogenesis for T cell deficiency caused by a missense mutation of Bcl11b gene
3. 学会等名 48th Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuki Okuyama, Motoi Yamashita, Michiko Ohno, Satoshi Kojo, Hideyuki Yoshida, Ichiro Taniuchi
2. 発表標題 Pathogenesis for T cell deficiency caused by a missense mutation of Bcl11b gene
3. 学会等名 48th Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 香城 諭, 海老原隆, 太野路子, 室井佐和子, 谷内一郎
2. 発表標題 Runx3 C末端アミノ酸残基による免疫細胞分化制御
3. 学会等名 第29回Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥山一生, 山下 基, 太野路子, 香城 諭, 谷内一郎
2. 発表標題 Bcl11b ミスセンス変異によるT細胞分化異常の発症機序
3. 学会等名 第29回Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kojo S, Ohno-Oishi M, Muroi S, Taniuchi I
2. 発表標題 Constitutive CD8 expression during thymocyte development drives differentiation of innate-like CD8+ T cell and NKT2 subset.
3. 学会等名 47th Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Okuyama K, Kojo S, Muroi S, Taniuchi I
2. 発表標題 Interactome study of Bcl11b during T cell development
3. 学会等名 47th Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kojo S, Ohno-Oishi M, Wada H, Nieke S, Muroi S, Taniuchi I
2. 発表標題 Constitutive CD8 expression drives innate-like CD8+ T cell differentiation via NKT2 induction.
3. 学会等名 The 3rd International Conference on Innate Lymphoid Cells. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 香城 諭, 室井佐和子, 谷内一郎
2. 発表標題 An enhancer RNA is a crucial target of Runx-dependent silencer for Cd4 gene repression
3. 学会等名 第28回 Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新たなT細胞分化制御機構を発見 - Cd4サイレンサー非依存的なCd4遺伝子発現制御 -  
[https://www.riken.jp/press/2018/20180905\\_1/index.html](https://www.riken.jp/press/2018/20180905_1/index.html)

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------