

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659220

研究課題名(和文) B細胞分化を規定する多階層遺伝子発現制御の同定

研究課題名(英文) Identification of multi-level regulation of gene expression that determines B cell development

研究代表者

馬場 義裕 (Baba, Yoshihiro)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・准教授

研究者番号：20415269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞からプラズマ細胞への分化に伴いヒストンバリエットのゲノムへの取込みが減少することを明らかにした。Chip-sequenceとmRNA-sequenceにより、ヒストンバリエットが遺伝子発現に先立ち、その制御エレメントに結合することが確認された。さらに、ヒストンバリエットの恒常的発現がB細胞分化の抑制に繋がることを見出し、クロマチン動的構造変化とB細胞終末分化との機能的連関を示唆する結果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found that the deposition of histone variant was markedly decreased during B cell differentiation into plasma cells. We also confirmed by chip-seq and mRNA-seq that the histone variant bind to the regulatory element of genes that will be expressed during differentiation. Furthermore, constitutive expression of histone variant in B cells resulted in the inhibition of plasma cell generation. These findings suggest that B cell differentiation is controlled by dynamic change of chromatin structure.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：B細胞分化 クロマチン動的構造変化

1. 研究開始当初の背景

末梢 B 細胞は感染やワクチン接種時にプラズマ細胞へと分化し、抗体を分泌することにより液性免疫の役割を果たす。よって、プラズマ細胞への分化メカニズムを解明することは基礎生物学だけでなく、臨床医学の観点からでも重要である。

しかし、B 細胞に限らず、細胞分化の研究は「分化前と分化後の細胞の比較」に終始している。B 細胞からプラズマ細胞への分化に必須の遺伝子の同定には、各遺伝子のノックアウトマウスなどの解析により進展し、個々の遺伝子の役割が明らかにされてきた。しかし、実際は分化に伴って変動する遺伝子は複数あり、それらがどのように連動または同調して制御されているのかは全く不明である。

2. 研究の目的

個々の遺伝子の発現調節は、その遺伝子を含む広範なクロマチン領域全体の制御が必要とされる。そこで、分化を規定する遺伝子発現制御の全体像を理解するために、遺伝子発現を「群」としてとらえ、分化に先立つ遺伝子発現の仕組みを多階層的に解明することを目指す。具体的には、ナイーブ B 細胞からプラズマ細胞への分化をモデルに、分化に伴う H3.3 ヒストンバリエントを介したクロマチン構造変化、mRNA 転写を網羅的に解析し、その機能的相関と生理的意義を見出すことを到達目標とする。

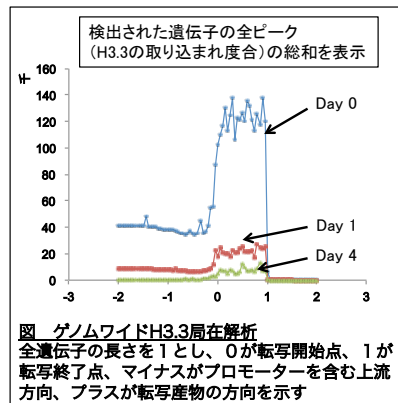
3. 研究の方法

H3 のヒストンバリエントのひとつである H3.3 のゲノム上の取り込みを指標とした網羅的解析を行なう。H3.3 は活性化遺伝子のゲノム上の gene body に取り込まれ、転写前の遺伝子ではプロモーター・エンハンサーに取り込まれる。つまり、これから転写される遺伝子のゲノム上のマーキングとなることが報告されている。本研究では、マウス脾臓から単離したナイーブ B 細胞に LPS 刺激し、プラズマ細胞へと分化させる系を用いる刺激前 (Day 0)、刺激後 1 日 (Day 1)、4 日 (Day 4) の細胞を採取し、プラズマ細胞への分化を確認すると、Day 1 ではプラズマ細胞に分化した細胞は検出できないが、Day 4 では 40~50% の細胞がプラズマ細胞へと分化した。そこで、これらサンプルを使って、H3.3 によるクロマチン免疫沈降法と大規模シークエンス (Chip-Seq) を組み合わせたアッセイを行ない、分化前後で H3.3 がゲノム上のどの位置に局在するのかを同定していく。H3.3 のクロマチンとの結合が遺伝子発現と相関することを確かめるためには、同一サンプルで mRNA の発現を調べる必要がある。そこで、上記で用いた細胞の一部から RNA を回収し、次世代シークエンサーを用いた mRNA-Seq の

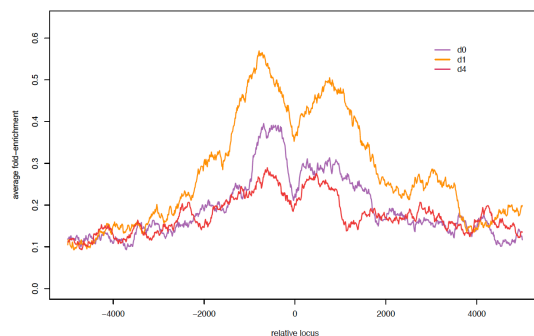
網羅的解析を行なう。また、分化依存的効果を検証するため、プラズマ細胞分化に必須の転写因子 *prdm1* 欠損 B 細胞を用いて同様の検証を行い、比較検討する。

4. 研究成果

マウス脾臓から単離したナイーブ B 細胞 (刺激前 (Day 0)) と LPS 刺激し、刺激後 1 日 (Day 1)、4 日 (Day 4) の細胞を採取し、FACS 解析により、約 40% のプラズマ細胞分化を確認した。これら細胞を用いて、抗 H3.3 抗体により Chip-seq を行なった。ナイーブ B 細胞 (day0) での H3.3 のゲノムワイドの取り込みが、プラズマ細胞分化に伴い著減していることを見出した (図: 未発表)。



さらに、Gene Ontology 解析により、Day1、Day4 では B 細胞分化や B 細胞シグナル分子に関連した遺伝子座特異的に H3.3 が取り込まれていた。さらに、*prdm1* 欠損 B 細胞では、Day4 においてプラズマ細胞分化に障害が認められると同時に、H3.3 のユニークなゲノム取り込みパターンを示した。これら位置情報の生理的意義については現在も解析中である。



mRNA-seq 解析により、Day4 サンプルではプラズマ細胞分化に必須の複数の遺伝子発現を確認している。このデータを基に、発現が①上昇②減少③変化無しに分類して、H3.3 のゲノム局在との相関を調べたところ、発現中の遺伝子および分化後に誘導される遺伝子座において、分化前の段階から H3.3 の有

意なゲノムへの結合が見られた (図 2)。これらは H3.3 の分化における遺伝子マーカーに關与することを示唆する。

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 5 件)

1. Hartmann J, Karl RM, Alexander RP, Adelsberger H, Brill MS, Rühlmann C, Ansel A, Sakimura K, Baba Y, Kurosaki T, Misgeld T, Konnerth A. STIM1 Controls Neuronal Ca(2+) Signaling, mGluR1-Dependent Synaptic Transmission, and Cerebellar Motor Behavior. *Neuron*. May 7;82(3):635-644. (2014) 査読有り
2. Masahata K, Umemoto E, Kayama H, Kotani M, Nakamura S, Kurakawa T, Kikuta J, Gotoh K, Motooka D, Sato S, Higuchi T, Baba Y, Kurosaki T, Kinoshita M, Shimada Y, Kimura T, Okumura R, Takeda A, Tajima M, Yoshie O, Fukuzawa M, Kiyono H, Fagarasan S, Iida T, Ishii M, Takeda K. Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch. *Nat. Commun.* Apr 10; 5: 3704 (2014) 査読有り
3. Furukawa Y, Teraguchi S, Ikegami T, Dagliyan O, Jin L, Hall D, Dokholyan N, Namba K, Akira S, Kurosaki T, Baba Y, Standley D. Intrinsic disorder mediates cooperative signal transduction in STIM1. *J. Mol. Biol.* 2014 May 15; 426 (10):2082-2097 (2014) 査読有り
4. Zhang H, Clemens RA, Liu F, Hu Y, Baba Y, Theodore P, Kurosaki T, Lowell CA. The STIM1 calcium sensor is required for activation of the phagocyte oxidase during inflammation and host defense. *Blood*. Apr 3;123(14):2238-2249 (2014) 査読有り
5. Baba Y, Matsumoto M, Kurosaki T. Calcium signaling in B cells: Regulation of cytosolic Ca²⁺ increase and its sensor molecules, STIM1 and STIM2. *Mol. Immunol.* Nov 15. pii: S0161-5890(13)00532-4. (2013) 査読無

[学会発表] (計 3 件)

- ① 馬場義裕、黒崎知博「B 細胞における SOCE の生理的役割」第 90 回日本生理学会大会 (タワーホール船堀, 東京) 2013 年 3 月 27-29 日 (3 月 28 日)
- ② 馬場義裕「The mechanism of calcium influx induced by ER calcium sensor STIM and its physiological function」第 85 回日本生化学学会大会 (福岡国際会議場, 福岡) 2012 年 12 月 14-16 日 (9 月 14 日)
- ③ 馬場義裕「Physiological significance for Calcium Influx in B cell」第 40 回日本臨床免疫学会 (京王プラザホテル, 東京) 2012 年 9 月 27-29 日 (9 月 27 日)

[図書] (計 3 件)

- ① 馬場義裕:「B 細胞からの IL-10 産生機序」臨床免疫・アレルギー科 vol. 60 (3) 346-350, 2013
- ② 松本真典、馬場義裕:「制御性 B 細胞における STIM 依存的カルシウム流入の役割」薬学雑誌 133(4): 419-425, 2013
- ③ 馬場義裕、黒崎知博:「B 細胞の Ca²⁺シグナルと自己免疫性炎症反応の抑制」医学のあゆみ (医歯薬出版社) vol 240 (3):243-244, 2012

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

馬場義裕 (BABA, Yoshihiro)
大阪大学 免疫学フロンティア研究セン
ター・分化制御研究室・特任准教授
研究者番号：20415269

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：