

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03487

研究課題名(和文) Regulome調節による獲得免疫リンパ球の確立とRag1/Rag2発現制御

研究課題名(英文) The Regulome controls adaptive lymphocyte development and DNA recombination Rag1/Rag2 expression

研究代表者

宮崎 正輝 (Miyazaki, Masaki)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：80403632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：獲得免疫は、B細胞の抗体とT細胞のT細胞受容体のV(D)J遺伝子再構成に依存する。この遺伝子再構成はRag1/2により行われるが、その発現制御は未解明である。

T前駆細胞とB前駆細胞でのE2Aを主体とした特異的な転写因子群のChIP-seq解析、ATAC-seq解析の結果から、T細胞特異的(R-TEn)またはB細胞特異的(R1BとR2B)なエンハンサー領域を見出した。欠損マウスの解析から、T、B細胞特異的なRagエンハンサー制御が重要であることがわかった。さらにそのエンハンサー活性は転写因子E2Aによる3次元ゲノム構造制御、スーパーエンハンサー形成に依存していることがわかり、報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T細胞受容体やB細胞の抗体の遺伝子再構成は、獲得免疫による多様で特異的な免疫反応に必須であり、この再構成を行うRag1/2の発現制御機構を解明することは、獲得免疫の本質をどうやって手に入れたのかを解明する重要な鍵となる。本研究ではT、B細胞におけるRag1/2遺伝子のエンハンサー領域を同定し、その領域が転写因子E2Aによるエンハンサー活性制御に依存していることを見出した。このことは、獲得免疫の特徴であるRag1/2発現が特定の転写因子により誘導され、これがVDJ遺伝子再構成という多様性獲得に大きく貢献しており、この分子機構が獲得免疫の始まりであると提唱したい。

研究成果の概要(英文)：Adaptive immunity relies on Rag-mediated assembly of T cell receptor (TCR) and immunoglobulin (Ig) genes. The expression of the Rag1 and Rag2 (Rag1/2) is stringently controlled in a cell type-specific manner during lymphocyte development. However, it remains unclear how Rag1/2 expression is regulated at a mechanistic level. Here, we used multiple in vivo approaches to identify T and B cell-specific regulatory elements that form Rag super-enhancers (SEs) and are essential for V(D)J recombination of TCR and Ig genes. Binding of E2A/E-proteins to the regulatory elements induces cohesin-mediated looping between enhancer, promoter, and anchor regions, resulting in large-scale topological changes for Rag SE formation. Also, E2A and E-protein binding facilitates compartment switching of the Rag1/2 gene cluster. Overall, our results demonstrate the importance of E-proteins in orchestrating the SEs that drive the tightly regulated Rag1/2 expression in adaptive immunity.

研究分野：免疫学 遺伝子発現制御

キーワード：獲得免疫 Rag1 Rag2 T, B細胞 遺伝子再構成 エンハンサー ゲノム構造 転写因子 E2A

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫機構はウイルスや細菌などの病原体に対する生態防御機構であり、自然免疫と獲得免疫の協調作用により炎症反応が起こる。自然免疫は病原体の共通のパターンを認識して炎症を起こす一方、獲得免疫は病原体の抗原を特異的に認識し特異的な炎症反応を惹起する。この機構はワクチンとして利用されている。T細胞とB細胞は獲得免疫の中心的な役割を担い、T細胞受容体(TCR)と抗体(Ig)のV(D)J遺伝子再構成によって、多種多様な抗原を認識することができる。このV(D)J遺伝子再構成は、Rag1/Rag2 (Recombination activating gene)分子により行われるため、Rag1/2は胸腺と骨髄内のT/B前駆細胞でのみ発現を認める。この事は、Rag1/2の発現が獲得免疫リンパ球への分化の一番の特質であり、この発現制御を解明することが【獲得免疫の始まり】の分子機構を解き明かす鍵となる。

2017年に申請者は、T細胞と自然リンパ球の違いは転写因子E2AとId2の転写制御バランスにより形成され、E2AはT細胞分化のためのエンハンサーレパトアを確立していることを報告した(Miyazaki Immunity 2017)。このことからT細胞と自然リンパ球の違いに着目し、獲得免疫の本質は、Rag1/2発現によるV(D)J遺伝子再構成であるというシンプルな考えに至った。そこで、Rag1/2の発現制御を解明する事で獲得免疫リンパ球への分化の開始点を明らかにすることを考えた。

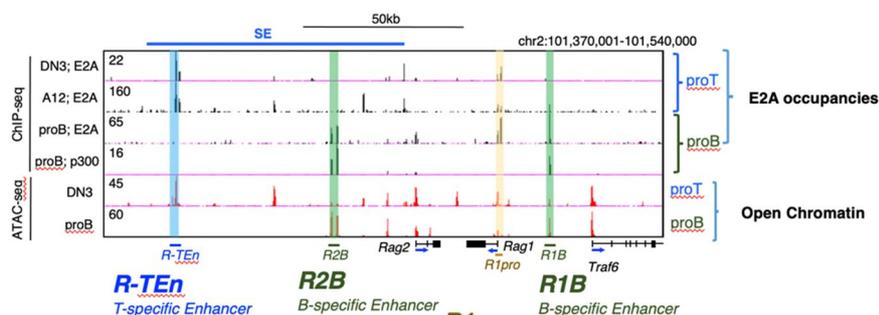
2. 研究の目的

本研究では、Rag1/2遺伝子の発現機構を解明する事で、造血幹細胞から獲得免疫リンパ球であるT、B細胞への分化の開始点とその制御因子を明らかにし、【獲得免疫の始まり】の分子機構を解明することを目的とする。そしてRag1/2遺伝子は、T、B細胞の分化段階でのみ発現しており、他の免疫細胞では全く発現していない。つまり、非常に細胞種特異的な遺伝子発現制御機構が存在すると考えられ、この制御機構の解明は、特異的な遺伝子発現はどのように制御しているのだろうか?という、最も基本的で重要な生物学的疑問点の解明にも繋がる。特に最近の研究から、転写因子とゲノム構造制御の協調作用が適切な遺伝子発現に必要であることがわかってきた事からも、こうしたリンパ球特異的なRag1/2発現においても転写因子とゲノム構造制御が貢献していることが予想される。

3. 研究の方法

2017年の報告で、E2AがT細胞と自然リンパ球の違いを作り出していることから、T/B前駆細胞でのE2Aの結合部位を手掛かりに、Rag1/2のエンハンサー領域を探した。また同時に、T、B前駆細胞でのATAC-seq(オープンクロマチン領域を同定)データを統合して解析した。Rag1/Rag2遺伝子座においては、pro-T細胞とpro-B細胞ではE2Aの結合部位が異なり、またATAC-seq

解析によるエンハンサー部位もそれぞれに一致することが示された(図1)。また自然リンパ球においては、これらのエンハンサーは形成されておら



【図1】

ず、やはり E2A によるエンハンサー機能調節が、遺伝子再構成を誘導することを強く示唆した。この T 細胞特異的(R-TEn)、または B 細胞特異的(R1B-, R2B-En) なエンハンサーが本当に機能しているのかを証明するため、CRISPR/Cas9 を用いてエンハンサー領域の欠損マウスを作製した。

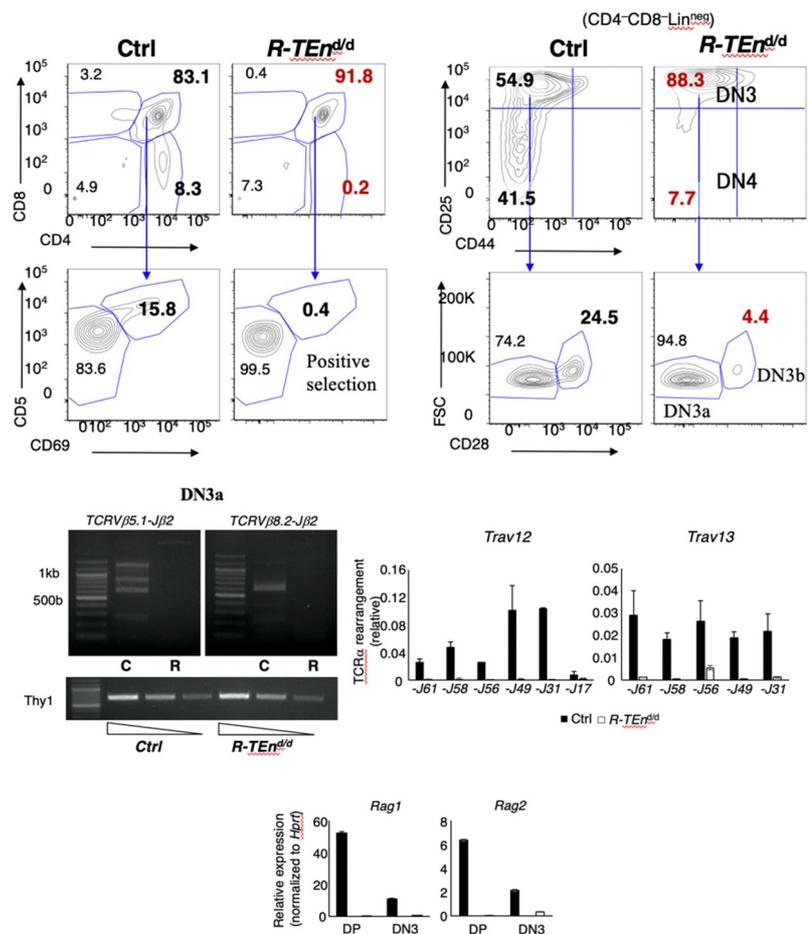
また、R-TEn における E2A の結合を特異的に阻害する為、E-box の変異マウス(R-TEn-E-box-mut)を作製した。そして、E2A によるエンハンサー活性、3次元ゲノム構造への影響、さらにはゲノムループ形成およびその維持に関わる分子であるコヒーシン、CTCF の ChIP-seq 解析を行った。また ROSE algorithm を用いて、スーパーエンハンサー解析を行った。

4. 研究成果

研究方法で示した様に、T 細胞特異的エンハンサー(R-TEn)欠損マウスと B 細胞特異的エンハンサー (R1B/R2B) 欠損マウスを解析した。R-TEn 欠損マウスでは、胸腺の未熟 T 細胞の数が減少し、分化障害による成熟 T 細胞

(CD4T 細胞と CD8T 細胞)の欠損を認めた。分化障害は、(図 2) 上段に示す様に CD4+CD8+ (DP) 細胞での positive selection の障害と、CD4-CD8-の DN3 細胞での β -selection の障害を認めた。またこれらは、Rag1/2 の顕著な発現低下による TCR β と TCR α の遺伝子再構成障害が原因であった(図 2)。興味深いことに、骨髄の B 細胞分化は全く障害を受けておらず、また Rag1/2 の発現低下も認めなかった。このことから、R-TEn は T 細胞特異的な Rag1/2 のエンハンサー領域であることが証明された。

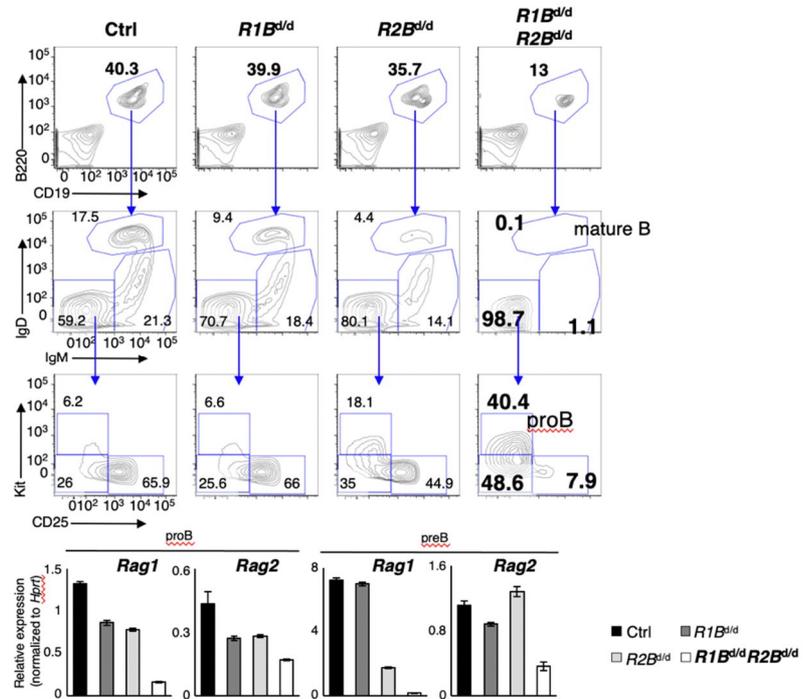
次に、R1B/R2B エンハンサー欠損マウスを解析した。図 3 に示す様に、R1B/R2B のそれぞれの単



【図 2】

の欠損マウスでは、B 前駆細胞での軽度の分化障害を認めるだけであったが、R1B/R2B 両方の欠損マウスでは、B 細胞分化が pro-B の段階で障害され、IgH の遺伝子再構成の障害と Rag1/2 の発現低下を認めた。また、R1B/R2B 欠損マウスでは、胸腺の T 細胞分化は正常であった。以上のことから、T, B 細胞とも Rag1/2 を発現して TCR と Ig の遺伝子再構成を行うにもかかわらず、全く異なる細胞種特異的なエンハンサー領域を利用して Rag1/2 の発現を厳格に制御していることがわかった。

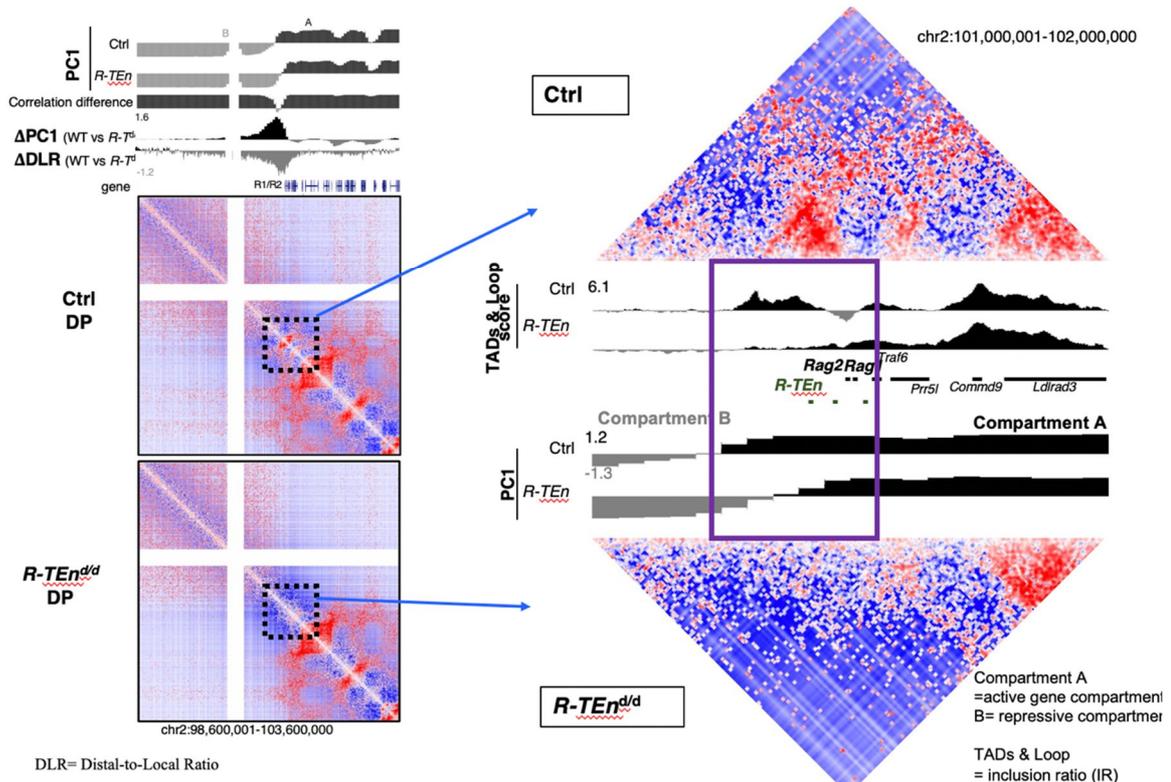
最近の研究から、転写因子によるエンハンサー制御と3次元ゲノム構造変換が遺伝子発現に重要であることがわかってきたことから、エンハンサー機能欠損がゲノム構造にどう影響があるのかを調べる為、R-TEn 欠損 DP 細胞を使って、in situ HiC 実験を行った。結果、野生型 DP 細胞では、エンハンサー領域を含めた Rag1/2 遺伝子座は、活性化 TAD(Topological associating domain)に含まれていたが、R-TEn 欠損 DP 細胞では TAD は形成されず、エンハンサー領域は不活性型コンパートメント



(compartment B)に含まれていた(図4)

このことは、エンハンサー活性により細胞種特異的なゲノム構造が形成され、それによって Rag1/2 遺伝子が発現できる様になることを意味している。

では、一体どんな転写因子がこの領域の活性を制御し、ゲノム構造を変容させているのだろうか？様々な遺伝子改変マウスのデータを解析した結果、この研究のきっかけであった E2A の可能性が高いことがわかった。そこで、R-TEn 領域の E2A の結合配列 (E-box) の変異マウス(R-TEn-E-box-mut)を作製した。この E-box 変異マウスでは、転写因子 E2A そのものの機能には影



【図4】

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyazaki K, Watanabe H, Yoshikawa G., Chen K., Hidaka R., Aitani Y., Osawa K., Takeda R., Ochi Y., Tani-ichi S., Uehata T., Takeuchi O., Ikuta K., Ogawa S., Kondoh G., Lin CY., Ogata H., Miyazaki M*	4. 巻 5
2. 論文標題 The transcription factor E2A activates multiple enhancers that drive Rag expression in developing T and B cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Immunology,	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.abb1455.	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 Nagasawa Masayuki, Tomimatsu Kosuke, Terada Koji, Kondo Kenta, Miyazaki Kazuko, Miyazaki Masaki, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Yoshida Tetsuya, Kageyama Susumu, Kawamoto Hiroshi, Kawauchi Akihiro, Agata Yasutoshi	4. 巻 526
2. 論文標題 Long non-coding RNA MANCR is a target of BET bromodomain protein BRD4 and plays a critical role in cellular migration and invasion abilities of prostate cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 128 ~ 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.043	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 Miyazaki Kazuko, Miyazaki Masaki	4. 巻 12
2. 論文標題 The Interplay Between Chromatin Architecture and Lineage-Specific Transcription Factors and the Regulation of Rag Gene Expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.659761	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 Yoshikawa Genki, Miyazaki Kazuko, Ogata Hiroyuki, Miyazaki Masaki	4. 巻 22
2. 論文標題 The Evolution of Rag Gene Enhancers and Transcription Factor E and Id Proteins in the Adaptive Immune System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5888 ~ 5888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115888	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masaki Miyazaki.
2. 発表標題 E2A specifies adaptive immunity by instructing large-scale topological changes for Rag gene super-enhancer formation.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎 正輝
2. 発表標題 The establishment of 3D genome structure for Rag1/Rag2 expression mediated by E2A/E-protein enhancer activity
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Miyazaki
2. 発表標題 The establishment of 3D genome structure for Rag1/Rag2 expression mediated by E2A/E-protein enhancer activity
3. 学会等名 FASEB Science Reserach Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Miyazaki.
2. 発表標題 E2A specifies adaptive immunity by instructing large-scale topological changes for Rag gene super-enhancer formation
3. 学会等名 第94回日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaki Miyazaki, Hiroshi Kawamoto, Kazuko Miyazaki.
2. 発表標題 Conserved two E-box sequences neighboring the Rag1-promoter is critically required for the initiation of Rag1 gene expression upon T and B cell lineage commitment; Distinct gene regulation mediated by enhancers and promoter for adaptive immunity.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学ホームページにて研究成果を報告 B細胞、T細胞による獲得免疫の始まりの謎を解明 https://medibio.tiisys.com/wp-content/uploads/2020/09/202908bsaibou.pdf</p> <p>一般講演 第11回Science Cafe; in Japan (2021. 3. 21) (ASCA corporation主催) 獲得免疫の始まり ; To B(T) or not to B(T). That is the question. https://www.asca-co.com/blog/science/entry20210531161755.html</p>

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
研究協力者	宮崎 和子 (Miyazaki Kazuko) (00311811)	京都大学・医生物学研究所・特定研究員 (14301)	
研究協力者	渡邊 仁美 (Watanabe Hitomi) (80624056)	京都大学・医生物学研究所・助教 (14301)	

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