

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670136

研究課題名(和文)真に機能的な転写因子複合体の精製とその構成因子の機能解析

研究課題名(英文)Purification of the functional transcription factor complex and analyses of the factors that constitute the complex

研究代表者

縣 保年 (Agata, Yasutoshi)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：60263141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：E2A転写因子は核内でdot状の構造体(foci)を形成し、染色体ルーピングを介してT細胞受容体遺伝子の組換えを誘導する可能性が想定された。その分子機構を明らかにすることを目的として、E2Aの機能的複合体の構成因子を同定した。そのうちヒストンアセチル化酵素であるCBP/p300が、E2A fociと共局在し、E2A fociの形成に必要であった。さらに、E2AあるいはCBP/p300のノックダウンによりE2Aによる染色体ルーピングが阻害された。以上の結果から、E2A fociはCBP/p300に依存して形成されること、E2AとCBP/p300は染色体ルーピングに必要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：E2A transcription factor was found to form nuclear dot-like structures called E2A foci, we thus postulated that E2A induces TCR gene rearrangement by chromosome looping. To elucidate the molecular mechanism underlying E2A foci formation, we identified factors that constitute the functional E2A transcription factor complex. Among them, histone acetyltransferases CBP/p300 were found to colocalize with E2A foci and to be required for E2A foci formation. Knockdown of E2A or CBP/p300 leads to abrogation of chromosome looping. These results indicate that E2A foci formation is dependent on CBP/p300 and E2A or CBP/p300 are essential for chromosome looping.

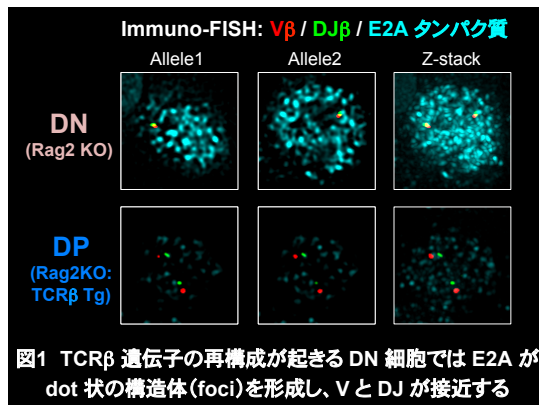
研究分野：生化学、分子生物学、免疫学

 キーワード：E2A 転写因子 核内構造体 染色体高次構造 染色体ルーピング 転写因子ファクトリー 3D-FISH I
 mmuno-FISH

1. 研究開始当初の背景

細胞分化における遺伝子の転写や組換えの制御には、ヒストン修飾をはじめとするエピジェネティックな制御が重要な役割を果たす。我々はこれまで、抗原受容体遺伝子の再構成を対象に研究を行い、多くの抗原受容体遺伝子に結合配列を持つ bHLH 転写因子 E2A が、ヒストンアセチル化酵素である p300/CBP をリクルートすることによって組換えを誘導することを報告して来た (Agata et al. *Immunity* 2007, Sakamoto et al. *J.Immunol.* 2012)。

一方、細胞分化における遺伝子発現の変化には、染色体のルーピングによってエンハンサーとプロモーター等の転写制御領域の接近状態が変化することも重要であることが明らかにされつつある。我々は、E2A 転写因子がヒストンアセチル化を上昇させることに加え、染色体ルーピングによっても組換えを誘導することを見出した。さらに、染色体ルーピングが起きる時期特異的に、E2A が転写因子ファクトリーと考えられる dot 状の核内構造体 (E2A foci) を形成することがわかった。そこで、核内構造を維持したまま染色体領域を可視化する 3D-DNA FISH と、免疫染色法を組み合わせた Immuno-FISH 解析を行い、E2A がこのような「場」の形成を介して、染色体ルーピングによって標的遺伝子を会合させる可能性が示唆された (図 1)。



2. 研究の目的

そこで本研究では、E2A がどのようにして染色体ルーピングを起こし、組換えを誘導するか、その分子機構をさらに明らかにすることを目的として、E2A とクロマチン上で相互作用する真に機能的な複合体をクロマチン免疫沈降法 (ChIP) 条件下で精製し、質量分析によって構成因子を同定する。さらに同定された因子について、E2A foci の形成に関与するかノックダウンにより絞り込みをか

ける。得られた候補因子について 3D-FISH 等の染色体構造解析により E2A による染色体ルーピングに関わるか機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) E2A による染色体ルーピングに関わる因子を同定するため、クロマチンに結合した E2A と機能的に相互作用する複合体を ChIP 条件下で精製し、質量分析によって構成因子を同定した。

(2) 質量分析によって同定された E2A の機能的な複合体構成因子の中から、E2A foci の形成に必要な因子を miRNA によるノックダウンを行い、E2A foci の消失を指標に同定した。

(3) 同定された因子について miRNA によるノックダウンにより、E2A foci の消失とともに染色体ルーピングが阻害されるか 3D-FISH により検討した。

4. 研究成果

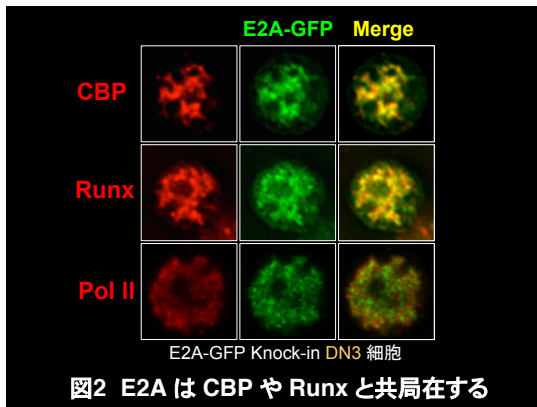
(1) クロマチンに結合した E2A と機能的に相互作用する複合体の構成因子の同定

E2A とクロマチン上で相互作用する真に機能的な複合体を ChIP 条件下で精製し、質量分析によって構成因子を同定することを計画した。そのためには、均一で比較的多数の細胞が必要であり、通常は適した細胞株に目的遺伝子を安定的に発現させた細胞を用いるが、T 細胞受容体遺伝子の再構成に伴う染色体構造変化を誘導できる細胞株は存在しないため、組換え酵素である RAG2 ノックアウトマウスの胸腺細胞を用いる予定であった。しかしながら、当該マウスの繁殖に問題が生じ、解析に必要と思われる個体数 (30-50 匹程度) を得ることが困難であった。

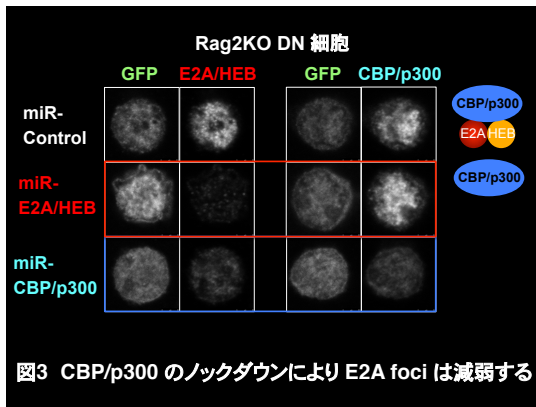
そこで T 細胞系の細胞株を多数解析し、E2A が核内で dot 状の構造体を形成し、さらにその細胞株で発現している E2A の標的遺伝子が、E2A の dot 状構造体に近接するものを選択した。それらの細胞株を用いて E2A とクロマチン上で相互作用する機能的な複合体を ChIP 条件下で精製し、質量分析を行ったところ、ヒストンアセチル化酵素である CBP/p300 や、染色体ルーピングに関わる Mediator などの転写制御因子や、Runx などの転写因子を同定した。

(2) E2A foci の形成に必要な複合体構成因子の同定

さらにこれらの因子が E2A foci と共局在することを免疫染色で確認した (図 2)。



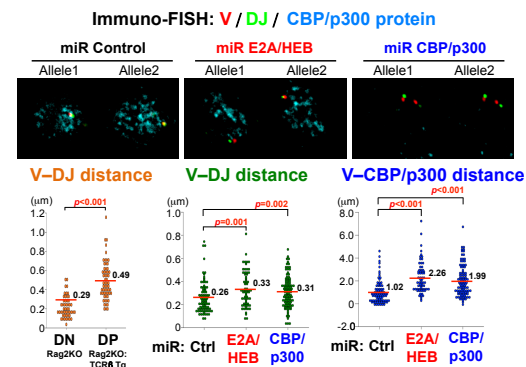
そこで RAG2 ノックアウトマウスの胸腺細胞で、レトロウイルスを用いて miRNA によるノックダウンを行った。その結果、E2A のノックダウンで E2A foci は減弱したが、CBP/p300 は影響を受けなかったのに対して、CBP/p300 をノックダウンすると CBP/p300 の減弱とともに E2A foci も減弱することが認められた (図 3)。このことは、CBP/p300 が E2A foci の形成に必要なことを示唆している。



(3) E2A foci の形成に必要な複合体構成因子の染色体ルーピングへの関与の検討

RAG2 ノックアウトマウスの胸腺細胞で、レトロウイルスを用いて miRNA によるノックダウンを行い、T 細胞受容体遺伝子の染色体ルーピングを Immuno-FISH 解析により検討した。その結果、E2A と CBP/p300 どちらのノックダウンによっても、染色体ルーピングが阻害されることが認められたことから、CBP/p300 が E2A による染色体ルーピングに必要なことが示唆された。

以上の結果から、E2A foci は CBP/p300 に依存して形成されることや、E2A と CBP/p300 は染色体ルーピングに必要なことが明らかになった。このことは、ヒストンのアセチル化が染色体構造変化に影響する可能性を示唆するものであり、今後その分子機構に関してさらなる検討を行ってきたい。



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)

- Ikawa T, Masuda K, Endo TA, Endo M, Isono K, Koseki Y, Nakagawa R, Kometsani K, Takano J, Agata Y, Katsura Y, Kurosaki T, Vidal M, Koseki H, Kawamoto H. Conversion of T cells to B cells by inactivation of polycomb-mediated epigenetic suppression of B lineage program. *Genes & Development* 30, 2475-2485 (2016) 査読有
doi: 10.1101/gad.290593.116
- Tomita K, Tanaka H, Kageyama S, Nagasawa M, Wada A, Murai R, Kobayashi K, Hanada E, Agata Y, Kawauchi A. The Effect of D-Aspartate on Spermatogenesis in Mouse Testis. *Biol Reprod.* 94(2): 30, 1-7 (2016) 査読有
doi: 10.1095/biolreprod.115.134692.
- Ikawa T, Masuda K, Huijskens M.J.A.J., Satoh R, Kakugawa K, Agata Y, Miyai T, Germeraad W.T.V., Katsura Y, Kawamoto H. Induced Developmental Arrest of Early Hematopoietic Progenitors Leads to the Generation of Leukocyte Stem Cells. *Stem Cell Reports* 5, 716-727 (2015) 査読有
doi:10.1016/j.stemcr.2015.09.012.
- Miyazaki M, Miyazaki K, Chen S, Chandra V, Wagatsuma K, Agata Y, Rodewald HR, Saito R, Chang AN, Varki N, Kawamoto H, Murre C. The E-Id protein axis modulates the activities of the PI3K-AKT-mTORC1-Hif1a and c-myc/p19Arf pathways to suppress innate variant TFH cell development, thymocyte expansion, and lymphomagenesis. *Genes &*

Development 29, 409-425 (2015) 査読有
doi: 10.1101/gad.255331.114.

5. Doi K, Imai T, Kressler C, Yagita H, **Agata Y**, Vooijs M, Hamazaki Y, Inoue J, Minato N. Crucial role of the Rap G protein signal in Notch activation and leukemogenicity of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep.* 5, 7978-7985 (2015) 査読有
doi: 10.1038/srep07978.

6. Nishimura Y, Tanaka H, Ishida T, Imai S, Matsusue Y, **Agata Y**, Horiike K. Immunohistochemical localization of d-serine dehydratase in chicken tissues. *Acta Histochem.* S0065-1281(13)00244-4 (2014) 査読有
doi: 10.1016/j.acthis.2013.12.011.

[学会発表] (計 4 件)

1. 寺田晃士、我妻慶祐、田中裕之、伊川友活、増田喬子、河本 宏、縣 保年. 転写因子 E2A と CBP/p300 が形成する核内構造体を足場とした TCR β 遺伝子再構成の制御機構. 第 26 回 Kyoto T Cell Conference (2016 年 5 月 21 日, 京都)
2. 縣 保年、我妻慶祐、寺田晃士、安齋悠樹、田中裕之、伊川友活、増田喬子、河本 宏、木村 宏. E2A 転写因子 foci を足場とした T 細胞受容体遺伝子座の染色体ダイナミクス. 第 10 回 日本エピジェネティクス研究会年会 (2016 年 5 月 20 日, 大阪)
3. 我妻慶祐、寺田晃士、安齋悠樹、田中裕之、伊川友活、増田喬子、河本 宏、湊 長博、縣 保年. E2A 転写因子ファクトリーを足場とした TCR β 遺伝子の染色体ダイナミクス. 第 25 回 Kyoto T Cell Conference (2015 年 5 月 15-16 日, 京都)
4. 安齋悠樹、山下政克、伊川友活、増田喬子、河本 宏、湊 長博、縣 保年. コヒーシオン/CTCF と E2A による T 細胞初期分化の制御. 第 24 回 Kyoto T Cell Conference (2014 年 5 月 16-17 日, 京都)

[図書] (計 0 件)

[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

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqbiochl/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

縣 保年 (AGATA YASUTOSHI)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 60263141

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

田中 裕之 (TANAKA HIROYUKI)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 10293820

我妻 慶祐 (WAGATSUMA KEISUKE)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 10725071

(4) 研究協力者

安齋 悠樹 (ANZAI YUKI)