

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06330

研究課題名(和文) Treg細胞における転写制御因子Id蛋白質による転写ネットワークの解明と炎症制御

研究課題名(英文) Analysis of transcriptional regulation in Treg cells by Id-protein

研究代表者

宮崎 和子 (Miyazaki, Kazuko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特定研究員

研究者番号：00311811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T(Treg)細胞におけるId2/Id3による転写制御機構を解明するために、本研究ではId2/Id3欠損Treg細胞を用いてATAC-seq解析を行い、クロマチンアクセシビリティを検討した。野生型Treg細胞と比較し、Id欠損Treg細胞では、エンハンサー領域のアクセシビリティが大きく変化し、Motif解析の結果から、E2Aの結合配列が高頻度に認められた。さらにE2Aの結合は、CXCR5やIL-10などのエフェクター分子のエンハンサーを直接制御していることが示唆された。これは、Id因子がE2Aの転写活性を拮抗阻害することに一致し、Id因子による転写制御の重要性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated the importance of transcriptional regulation by Id2 and Id3 in the immune suppression by regulatory T cell (Treg). Treg cell-specific deletion of Id2 and Id3 results in the spontaneous systemic Th2 inflammation, which closely resemble human allergic disease such as atopic dermatitis and bronchial asthma. To clarify the transcriptional regulation in Treg cell by Id-protein, we performed ATAC-seq analysis using Id-deficient Treg cells. We found the significant changes in chromatin accessibilities in regulatory regions in Id-deficient Treg cells, compared to wild-type Treg cells. A motif analysis for de novo open chromatin regions in enhancers showed E-box motif, which is supposed E2A binding. Together with the E2A ChIP-seq data, we suggest that Id-proteins antagonize E2A enhancer activity in regulatory regions of gene loci of effector molecules such as Cxcr5, Ctl4, and Il-10 to suppress the terminal differentiation of Treg cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写制御

## 1. 研究開始当初の背景

bHLH型転写因子であるE蛋白質は、リンパ球分化・活性化において重要な機能を担っており、その欠損は重症の免疫不全症を引き起こす。E蛋白質は、ホモ-またはヘテロダイマーを形成してエンハンサー領域にあるE-box配列に結合し、エンハンサー領域のプライミングを行うことで、標的遺伝子の発現を制御する。一方、Id蛋白質はHLHドメインは保持しているが、basic領域を欠損しており、E蛋白質とヘテロダイマーを形成することでそのDNA結合能を阻害する。Id2はNK細胞や樹状細胞の分化に必須であり、Id3はT細胞の選択やメモリー形成に重要な機能を担っている。さらに制御性T(Treg)細胞の活性化によりId蛋白質の発現が大きく変化することから、Treg細胞特異的にId2とId3を欠損させたマウス (Id2<sup>fl/fl</sup>Id3<sup>fl/fl</sup>Foxp3<sup>Cre</sup>) を作製し、Treg細胞による炎症制御におけるId2/Id3の機能を検討した。

驚いたことに Id2<sup>fl/fl</sup>Id3<sup>fl/fl</sup>Foxp3<sup>Cre</sup> マウスは、ヒトのアレルギー性疾患 (アトピー性皮膚炎、気管支喘息、好酸球性食道炎) と類似の病態を自然発症した。詳細なマウスの解析から、E-Id蛋白質による転写制御軸が、制御性T細胞の分化および活性化、局在および維持において必須であることが明らかとなり、報告した (Miyazaki et.al., Nat.Immunol.2014)。

Id蛋白質によるE蛋白質の転写活性制御がTreg細胞の炎症抑制に重要であり、Id2/Id3がナイーブTreg細胞から活性化型のエフェクターTreg細胞への分化を制御するGate Keeperとしての役割を持つことが示唆されたが、その制御における転写制御機構、つまり、エンハンサーレパトアや3次元的なクロマチン相互作用による転写制御メカニズムはまだ未解明のままである。本研究では、Treg細胞におけるId蛋白質による転写制御機構のエピジェネティック制御を明らかにすることに取り組んだ。

## 2. 【研究の目的】

Treg細胞におけるId蛋白質による転写制御機構のエピジェネティック制御を明らかにする。

(1) Id2/3欠損Treg細胞におけるクロマチンア

クセシビリティの同定 (Regulome解析)

(2) Id2<sup>fl/fl</sup>Id3<sup>fl/fl</sup>Foxp3<sup>Cre</sup> マウスのTreg細胞及び野生型Treg細胞において、Regulome解析と遺伝子発現解析を統合したエピジェネティック制御の解析

## 3. 【研究の方法】

(1) クロマチンアクセシビリティの検討

Id2<sup>fl/fl</sup>Id3<sup>fl/fl</sup>Foxp3<sup>Cre</sup>マウスおよび野生型マウスからTreg細胞を単離し、ATAC-seq (Assay for Transposase Accessible Chromatin unsequencing) を行って、Id2/Id3欠損及び野生型Treg細胞におけるオープンクロマチン領域を同定する。

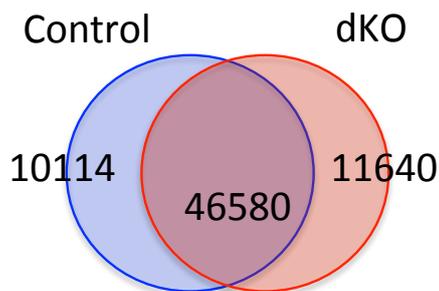
(2) Regulome解析

野生型Treg細胞と比較して、Id2/Id3欠損Treg細胞でクロマチンアクセシビリティの変化がみられる領域を同定し、遺伝子発現のデータやE2AやCTCFのChIPseqのデータと合わせて、調節領域を統合的に解析する。また同定した調節領域におけるモチーフ解析を行い、どのような転写因子群がそのオープンクロマチン領域に結合しエンハンサー機能に関与しているのかを検討する。

## 4. 【研究成果】

(1) オープンクロマチン領域の同定と遺伝子発現制御

野生型とId2/3 dKOマウスからTreg細胞を単離し、ATAC-seqを行った。その結果、野生型とId2/3dKOのそれぞれにおいて、およそ57000カ所のオープンクロマチン領域を同定した。そのうち、約47000カ所は、両方でオープンな領域であることが判明した。(図1)



【オープンクロマチン領域】

図1

野生型と Id2/3 dKO のそれぞれのオープンクロマチン領域のゲノム上での分布を検討したところ、両者とも約40%がイントロン、約35%が intergenic 領域、約20%がプロモーター領域に分布していた。(図2)

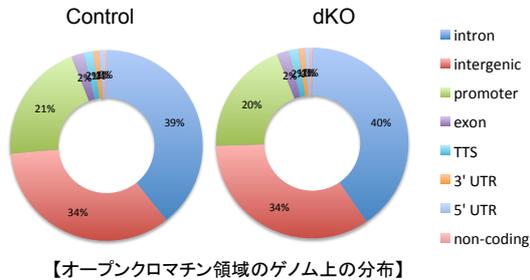
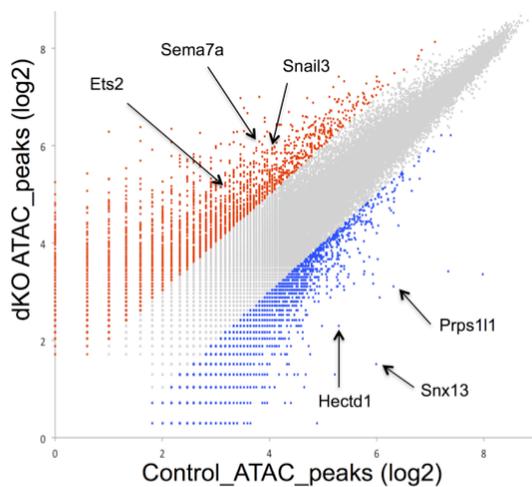


図2

野生型と Id2/3dKO の間でオープンクロマチン領域のシグナルを比較してみると、クロマチンアクセシビリティの変化が見られた。(図3)



【オープンクロマチン領域の比較】

図3

そして、Id2/3 欠損 Treg 細胞におけるクロマチンアクセシビリティのシグナルを、野生型 Treg 細胞のものと比較して3倍以上増加、または減少した領域の遺伝子発現と比較検討した。その結果、クロマチンアクセシビリティが3倍以上増加または減少した領域の遺伝子の発現量も有意に増加または減少しており、クロマチンアクセシビ

リティの変化と遺伝子発現の変化は有意に関連していた(図4)。このことは、E-Id 因子によるエンハンサー機能調節が、Treg 細胞における遺伝子発現プログラムを変化させ、それによりエフェクターTreg 細胞へと分化させている可能性を示唆する。

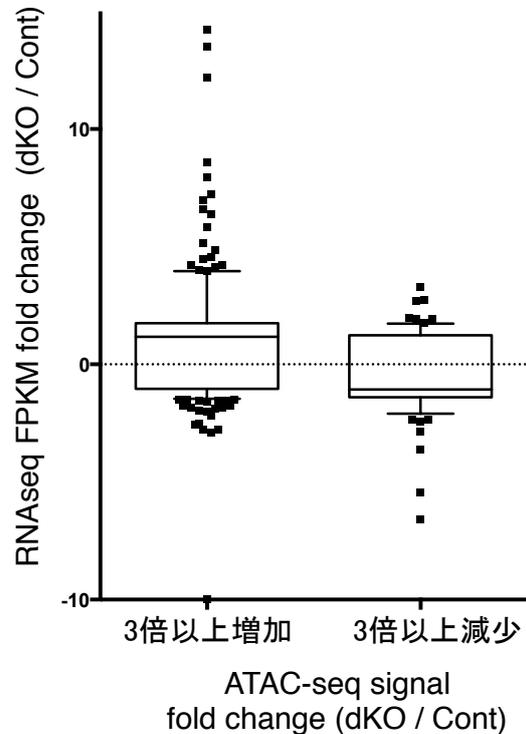


図4

## (2) オープンクロマチン領域における E2A の機能異常

野生型 Treg 細胞と Id2/Id3 欠損 Treg 細胞においてエンハンサー領域のクロマチンアクセシビリティが2倍以上増加または減少していた領域を抽出し、転写因子結合配列のモチーフ解析を行った。その結果、Id2/Id3 欠損 Treg 細胞においてクロマチンアクセシビリティが2倍以上増加した領域では、E2A, Erg, Runx1 の結合配列が有意に高頻度に認められた。一方、クロマチンアクセシビリティが2倍以上減少した領域においては Erg, BORIS, Runx1 の結合配列が見出された(図5)。Id2/Id3 欠損 Treg 細胞において E2A の結合配列である E-box 配列が高頻度にみられた結果は、Id2/Id3 の阻

害作用が欠損したことにより、E2A の DNA 結合能が亢進しエンハンサー機能が過剰になっている可能性を示唆しており、Id 因子により E2A の活性が制御されることの必要性を直接示す結果であった。

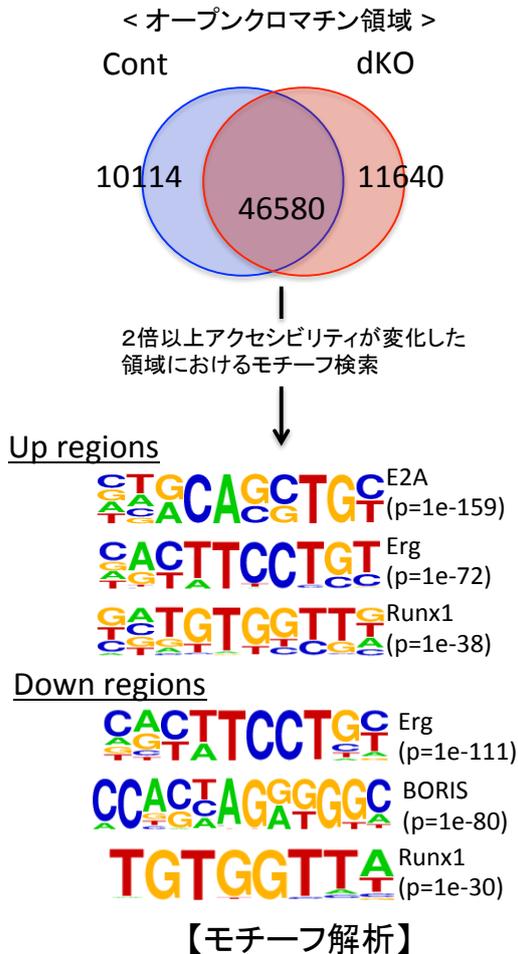


図5

- (3) E2A によるエフェクター分子の発現制御
- 遺伝子発現解析の結果、野生型と比較して Id2/Id3 欠損 Treg 細胞において発現量が2倍以上変化している遺伝子群のうち、特にエフェクター Treg (eTreg) 細胞で高発現するエフェクター分子などに注目した(図6)。結果、Id2/Id3 欠損により、Gzma(GranzymeA), IL-10, Pparg, Cxcr5, Cxcr3, Ctla4 などの eTreg で特徴的なエフェクター分子の高発現を認めた。

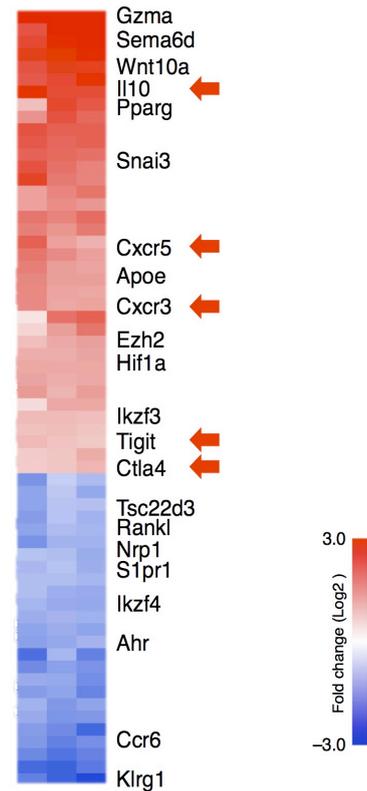


図6

加えて、遺伝子発現とクロマチンアクセシビリティの変化を組み合わせ解析を行った。UCSC ゲノムブラウザを利用して、RNAseq と ATACseq のデータをアップロードし、データを可視化することも行った。特に着目した遺伝子座に E2A が CTLA4, CXCR5, IL10 などの eTreg 細胞で高発現するエフェクター分子の発現調節を制御している可能性が示唆された(図7)。

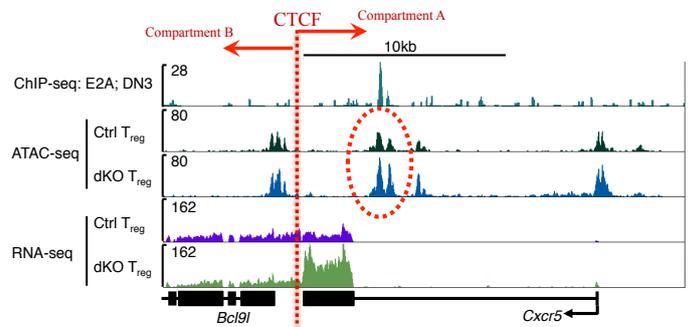


図7

以上の結果から、本研究により、ナチュラル

ル Treg 細胞から、活性化型の eTreg 細胞へと分化する過程において、E-Id 転写制御軸が Gate Keeper としての機能を果たしていること、そして、Treg の活性化に伴って、Id2/Id3 の発現量が増加し、それにより E2A のエンハンサー機能が亢進することで eTreg 細胞に必要なエフェクター分子の発現が上昇する、という生理的な転写制御機構の役割を解明することができた。

#### 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 1 件)

Miyazaki M\*, Miyazaki K\*, Chen K, Jin Y, Turner J, Moore AJ, Saito R, Yoshida K, Ogawa S, Rodewald HR, Lin YC, Kawamoto H, Murre C. The E-Id Protein Axis Specifies Adaptive Lymphoid Cell Identity and Suppresses Thymic Innate Lymphoid Cell Development. **Immunity**, 査読有, 2017,46(5),818-834. doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.022. (\* equally contribution)

[学会発表] (計 0 件)

[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

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

宮崎 和子 (MIYAZAKI, Kazuko)  
京都大学ウイルス・再生医科学研究所・  
特定研究員  
研究者番号：00311811

##### (2)研究分担者

##### (3)連携研究者

##### (4)研究協力者

( )