

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21083

研究課題名(和文) T細胞分化におけるコヒーシンの役割

研究課題名(英文) Role of cohesin in T cell development

研究代表者

我妻 慶祐 (Wagatsuma, Keisuke)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：10725071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：コヒーシン構成因子であるSmc3のT細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製し、T細胞分化について詳細に調べたところ、TCRb遺伝子再構成の制御にはコヒーシンが必須ではないことが明らかになった。一方で、T細胞分化に重要な転写因子であるE2AがDN胸腺細胞でfociを形成すること、およびそのfociの近傍でTCRb遺伝子再構成に必要なVとDJ領域の接近が誘導されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We generated Smc3 conditional knockout (cKO) mice, where the Smc3 locus could be deleted in various stages of T-lineages, and found that the cohesin is not essential for rearrangements of TCRb locus. Our data shows that transcription factor E2A form foci in the nuclei of DN thymocytes, and that Vb regions come close to DJb regions near the E2A foci before the rearrangements of TCRb locus. These results suggest that E2A controls TCRb rearrangements by bringing Vb close to DJb on the E2A foci in DN thymocytes.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞分化 エピジェネティクス 染色体高次構造

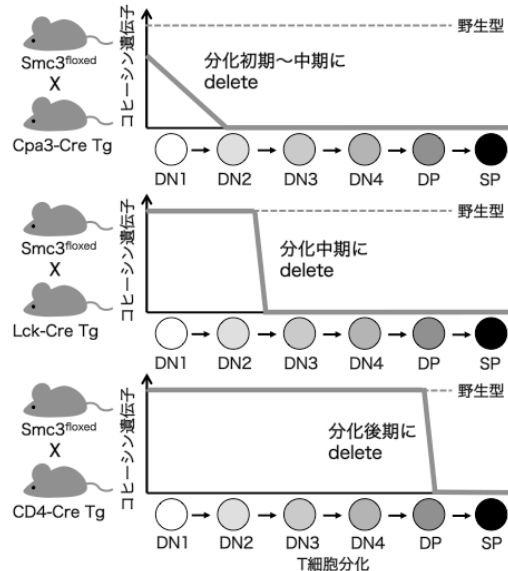
1. 研究開始当初の背景

さまざまな細胞が幹細胞から分化する過程や、成熟したのちにその特性を発揮する際には、エピジェネティックな遺伝子発現制御が重要な役割を担う。申請者は、リンパ球抗原受容体の遺伝子再構成においても、ヒストンアセチル化やクロマチンリモデリングなどのエピジェネティックな制御が重要であることを明らかにしてきた。さらに、遺伝子再構成が起こる際には、染色体上で離れて存在する V(D)J 遺伝子断片が、組換えを起こす細胞・時期特異的にルーピングを形成して近接することを明らかにした。このルーピングを司る因子を探索する過程で、コヒーシンの関与が示唆された。近年、コヒーシンがゲノムワイドに様々な遺伝子の発現制御に関与することが報告されてきているが、その制御機構は未解明な点が多い。

2. 研究の目的

生体内におけるコヒーシンの遺伝子発現制御機構を明らかにするため、T 細胞分化及び T 細胞受容体遺伝子再構成をモデルとして、コヒーシン コンディショナル・ノックアウト (cKO) マウスを用いて解析を行う。コヒーシンにより制御される T 細胞の分化ステージ及び T 細胞受容体遺伝子再構成の制御機構について明らかにする。

図1: T細胞分化過程で破壊時期の異なるコヒーシンcKOマウス



3. 研究の方法

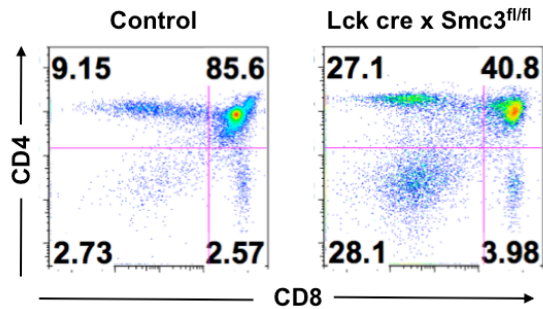
申請者らは T 細胞分化の初期 (Cpa3)、中期 (Cpa3 及び Lck)、及び後期 (CD4) に発現する遺伝子プロモーター制御下で Cre が発現する 3 種類の Cre-トランスジェニック (Tg) マウスとコヒーシンの活性化ドメインの 1 つである Smc3 遺伝子に loxP を挿入した Smc3^{flxed} マウス (理研 古関明彦博士より供与) を交配し、T 細胞分化過程で破壊時期の異なる 3

種類のコヒーシン cKO マウス (Smc3 cKO) を作製する (図 1)。これらのマウスを解析、比較することで T 細胞分化の初期から後期までの広い範囲におけるコヒーシンの機能を in vivo で検討する。まず、これらのマウスで、T 細胞分化の障害の有無を細胞表面マーカーをもとにフローサイトメトリー解析により検討する。分化に影響が認められれば、T 細胞受容体遺伝子再構成にどのような影響が見られるか解析する。

4. 研究成果

1) Smc3 cKO マウスでは、野生型マウスに比べて胸腺細胞数が著しく減少していた。フローサイトメトリー解析を行い、分化段階ごとの T 前駆細胞の割合を調べたところ、分化段階が後期の CD4/CD8 double positive (DP) 細胞が減少し、より未熟な CD4/CD8 double negative (DN) 細胞は増加していた (図 2) このことから、DN から DP への分化の進行にコヒーシンが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

図2: Smc3 cKO マウスにおける DP 細胞数の減少



そこで、cKOマウスではDN細胞からDP細胞への分化に必須で、染色体高次構造の変化が重要と考えられるTCRb遺伝子の再構成が障害されている可能性を考えた。しかし、cKOマウスからDN3細胞をセルソーターで単離し、TCRb遺伝子再構成を調べたところ、コントロールマウスとの顕著な差が認められず、cKOマウスでも正常に再構成が起きていたことから、TCRb遺伝子再構成の制御にはコヒーシンが必須ではないことが明らかになった。TCRaの遺伝子再構成にはコヒーシンが重要な役割をしていることが既に報告されている (doi: 10.1038/nature10312) ので、遺伝子座により異なる染色体高次構造変化の制御機構を介してTCR遺伝子再構成が制御されることが示唆された。

2) これまでの結果から、TCRb遺伝子再構成の制御にはコヒーシンが必須ではないことが明らかになった。そこで、TCRb遺伝子の染色体

高次構造変化を司る因子として、既にTCR β 遺伝子の再構成を制御することが明らかになっている転写因子を新たな候補として研究を展開することにした。Rag2KOマウスのDN胸腺細胞を TSt4/DLL4ストローマ細胞上で培養する *in vitro*系を用いて、レトロウイルスベクターを用いて候補転写因子のノックダウンを行うことで、TCR β の染色体構造を定量的に解析した。具体的には、染色体上のTCR β のVとDJ領域を検出するプローブを使用して3D-DNA FISHを実施し、高解像度顕微鏡で撮影したT細胞の核ごとの画像を核内ゲノム構造解析プログラム(TANGO)を使用してVとDJ領域の距離を計測した。その結果、T細胞分化に重要であることが知られているE2Aのノックダウンにより、TCR β のVとDJ領域の距離が離れることが明らかになった。これまでの報告によりDN胸腺細胞において、TCR β のVとDJ領域が接近し、遺伝子再構成が抑制されるDP胸腺細胞ではVとDJ領域が離れることが明らかになっており、DN胸腺細胞でVとDJ領域が接近することが再構成に重要であると考えられている。従って、E2AはDN胸腺細胞においてTCR β のVとDJ領域を接近させることでTCR β の遺伝子再構成を制御する可能性が考えられた。E2AによるTCR遺伝子の染色体構造の制御機構についてさらに詳細に調べるため、免疫染色と3D DNA FISHを組合せたImmuno-FISH法を用いて、核内のE2Aの局在とTCR β のVとDJ領域の距離の関係について現在解析を進めている。

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 2 件)

1. **Wagatsuma K**, Tani-ichi S, Liang B, Shitara S, Ishihara K, Abe M, Miyachi H, Kitano S, Hara T, Nanno M, Ishikawa H, Sakimura K, Nakao M, Kimura H, Ikuta K. STAT5 Orchestrates Local Epigenetic Changes for Chromatin Accessibility and Rearrangements by Direct Binding to the

TCR γ Locus. *J. Immunol.* 195, 1804-1814 (2015). 査読あり

2. Miyazaki M, Miyazaki K, Chen S, Chandra V, **Wagatsuma K**, Agata Y, Rodewald HR, Saito R, Chang AN, Varki N, Kawamoto H, and Murre C. The E-Id protein axis modulates the activities of the PI3K-AKT-mTORC1-Hif1 α and c-myc/p19Arf pathways to suppress innate variant TFH cell development, thymocyte expansion, and lymphomagenesis *Genes Dev.* 29, 409-425 (2015). 査読あり

[学会発表] (計 3 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. Kyoto T Cell Conference 第 26 回学術集会. 2016
2. 縣保年、**我妻慶祐** (発表者)、寺田晃士、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
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. Kyoto T Cell Conference 第 25 回学術集会. 2015

[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/~hqbioch1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 我妻 慶祐
(WAGATSYMA KEISUKE)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：10725071

(2) 研究分担者
(なし)

研究者番号：

(3) 連携研究者
(なし)

研究者番号：

(4) 研究協力者
(なし)