

機関番号：14301  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010年度  
 課題番号：20590298  
 研究課題名（和文）  
 エピジェネティクスと染色体ダイナミクスによる対立遺伝子排除の制御機構  
 研究課題名（英文）  
 Regulatory mechanisms of allelic exclusion by epigenetics and chromosome dynamics  
 研究代表者  
 縣 保年（AGATA YASUTOSHI）  
 京都大学・医学研究科・准教授  
 研究者番号：60263141

## 研究成果の概要（和文）：

転写因子 E2A は TCR $\beta$  遺伝子に直接結合し、ヒストンアセチル化を上昇させ組換えを誘導する。TCR $\beta$  遺伝子座の伸縮状態を 3D-FISH により解析したところ、組換えが起きる段階で V 領域と DJ 領域は接近し、組換えが抑制されると離れることがわかった。さらに E2A を過剰発現させると組換えが抑制される段階でも両領域が接近し、組換えが誘導された。これらの結果から、E2A はエピジェネティクスに加え、遺伝子座の収縮という染色体ダイナミクスを介しても組換えを誘導することが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

The E2A transcription factor binds directly to genetic regions in the TCR $\beta$  locus and induces rearrangement by increasing histone acetylation. We analyzed the contraction and decontraction status of the TCR $\beta$  locus by 3D-FISH and found that V and DJ regions come into the close proximity during the stage in which rearrangement normally occurs, but become separated away from each other during the stage in which further rearrangement is inhibited. We also found that E2A overexpression induces localization of the V and DJ regions into the close proximity even in the stage in which further rearrangement is inhibited, and finally induces the rearrangement. These results suggest that E2A has the ability of inducing rearrangement not only by epigenetic changes but also by chromosome dynamics including locus contraction.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子生物学、分子免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：エピジェネティクス、クロマチン、対立遺伝子排除、転写因子、遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

抗原受容体遺伝子の再構成は、T・B 細胞ともに RAG1/2 という共通な組換え酵素によって起こる一方で、細胞系列や分化段階特異的に制御されている。これらの制御は、組

換え部位のクロマチン構造が変化して、RAG1/2 に対し接近可能 (accessible) になることによると考えられており、エピジェネティックな遺伝子発現制御の良いモデル系となっている。我々は、この接近可能性

(accessibility) がヒストンのアセチル化によって決定されることを明らかにし (*J. Exp. Med.*, 193:873, 2001, *Immunity*, 15:813, 2001)、さらに、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 が組換え部位に直接結合し、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、ヒストンアセチル化を上昇させ、組換えを誘導することを明らかにした。

一方、機能的な組換えは、通常片方の染色体に限って起こることが知られており、対立遺伝子排除と呼ばれている。これは、1つのリンパ球が1つの抗原にのみ反応するために重要な機構と考えられ、クローン選択説の基盤となっている。その分子機構としては、一方のアリルで機能的な組換えが成功し抗原受容体が発現すると、負の抑制シグナルが伝達され、残ったアリルの組換えが抑制されることが想定されているが、その標的分子等は明らかでなかった。我々は、負の抑制シグナルによって E2A の抑制因子 Id3 が誘導されることで E2A が p300/CBP とともに組換え部位から解離し、ヒストンアセチル化の低下によって組換えが抑制されること、逆に E2A の過剰発現によって、抑制されていた組換えが誘導できることを明らかにした (図 1 *Immunity*, 27:871, 2007)。以上の結果から、E2A が対立遺伝子排除における負の抑制シグナルの標的因子であることが明らかとなった。

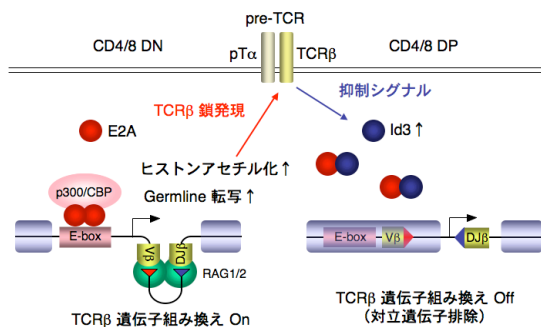


図1 E2Aはヒストンアセチル化を介してTCRβ組換えを誘導する。TCRβ鎖が発現し抑制シグナルが入るとId3が誘導され、E2AやCBPの結合が低下し、さらなる組換えが抑制される

一方、ヒストンアセチル化の上昇だけでは組換えを誘導することができなかったことから、E2A はヒストン修飾に加えて何か別の機構でも組換えを誘導することが示唆された。そのような分子機構として、E2A が染色体上に離れて存在する V 遺伝子領域と DJ 遺伝子領域をルーピング等の染色体ダイナミ

クスによって積極的に接近させることが必要であるという可能性を想定するにいたった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、抗原受容体遺伝子の再構成に関して、エピジェネティクスによる制御に加えて染色体ダイナミクスによる制御の分子機構を明らかにすることを目的として、遺伝子再構成に伴う染色体構造変化を 3次元構造の維持された細胞核に対する 3次元蛍光 in situ hybridization (3D-FISH) と Chromosome Conformation Capture (3C) アッセイによって解析した。さらにこれらの制御機構がお互いにどのような相互作用を持つのかについても明らかにすることも試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 3次元蛍光 in situ hybridization

(3D-FISH) による TCRβ 遺伝子座の伸縮状態の解析

TCRβ 遺伝子座の遠位 V 遺伝子を含む上流領域と、約 600kb 離れた DJ 遺伝子を含む下流領域に対応する BAC DNA をそれぞれラベルしてプローブとし、パラホルムアルデヒドで固定し 3次元構造の維持された細胞核に対してハイブリダイズさせたのち洗浄し、高解像度 3D セクショニング光学顕微鏡 (Delta Vision) により画像取得後、両プローブの中心点の距離を計測した。

### (2) レトロウイルスによる遺伝子導入と in vitro T 細胞培養

胎生 15 日の RAG2 欠損 : TCR Tg マウスの胸腺細胞に、E2A を発現させるレトロウイルスを感染させ、OP9-DLL1 細胞上で培養を行ない、CD4/8 DP 細胞へ分化を誘導したのち、ソーティングによって CD4/8 DP 細胞を精製して解析した。

### (3) Chromosome Conformation

Capture (3C) アッセイによる TCRβ 遺伝子座の染色体構造変化の解析

細胞をホルマリンで固定し、細胞核内で近接した染色体領域を架橋したのち、制限酵素で切断したゲノム DNA を ligation し、架橋された DNA 断片が連結されたものを TaqMan probe による定量的 PCR により定

量することで、3次元での染色体領域の接近状態を測定した。

#### 4. 研究成果

##### 1) TCRβ遺伝子座の伸縮状態と再構成との相関関係

TCRβ遺伝子座の伸縮状態と再構成との関係を調べるために、遠位V遺伝子を含む上流領域と、DJ遺伝子を含む下流領域に対応するBAC DNAをプローブとして、3D-FISHを行なった。解析した細胞は、RAG2欠損マウスの胸腺細胞と、RAG2欠損：TCRトランスジェニックTgマウスの胸腺細胞で、前者は主にCD4/8 Double Negative: DN細胞で、正常マウスにおいては組換えが進行中の細胞集団に相当し、後者は主にCD4/8 Double Positive: DP細胞で、正常マウスにおいては組換えが終了し対立遺伝子排除が成立している細胞集団に相当する。それぞれ目的の細胞集団をソーティングにより精製して解析した。その結果、前者のCD4/8 DN細胞では、V遺伝子領域とDJ遺伝子領域が接近し（遺伝子座の収縮）、後者のCD4/8 DP細胞では両遺伝子領域が離れて存在する（遺伝子座の伸展）結果が得られた（図2）。

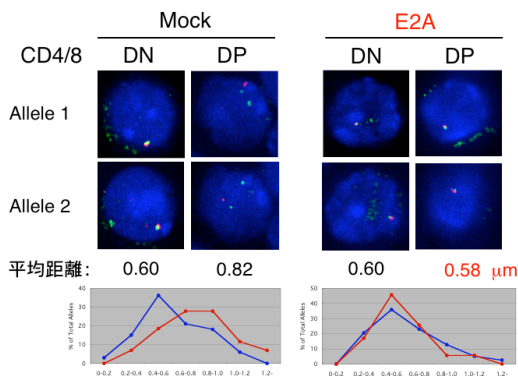


図2 E2AによるTCRβ遺伝子ルーピングの3D-FISH解析

いずれもRAG2欠損細胞であるため組換え自体は起きておらず、したがってこのような分化段階に応じた遺伝子座の収縮と伸展は、組換え自体にはよらないダイナミックな染色体構造変化によると考えられるとともに、組換えの起こる状態によく相関していた。

次に、この遺伝子座の収縮と伸展にE2Aが関与するか調べるために、RAG2欠損：TCR Tgマウスの胸腺細胞にE2Aをレトロウイルスにより過剰発現させ、内在性TCRβ遺伝子の組換えを誘導した時に（対立遺伝子排除の破綻）、遺伝子座の収縮が起こるか検

討した。その結果、E2Aを過剰発現させないCD4/8 DP細胞では、V遺伝子領域とDJ遺伝子領域は離れており、遺伝子座は伸展しているのに対して、E2Aを過剰発現させたCD4/8 DP細胞では、両遺伝子領域は接近し、遺伝子座は有意に短縮することがわかった（図2）。以上の結果から、E2Aはヒストンアセチル化の上昇に加え、遺伝子座の収縮という染色体構造変化を介しても遺伝子再構成を誘導することが強く示唆された。

##### 2) Chromosome Conformation Capture

###### (3C)アッセイによるTCRβ遺伝子座の伸縮状態の解析

さらにこのような遺伝子座の短縮・伸展状態をより高い解像度で解析するために、3Cアッセイとよばれる解析方法の導入を試みた。

（図3、4）。RAG2欠損マウスのCD4/8 DN胸腺細胞と、コントロールとしてRAG2欠損マウスに由来するproB細胞株とproT細胞株を用いて解析した結果、V遺伝子領域がCD4/8 DN胸腺細胞で特異的にDJ遺伝子領域と接近していることが明らかとなった。現在、これらの領域がCD4/8 DP細胞では離れて存在するか、さらにE2Aの過剰発現で再度接近するか、解析を行なっている。

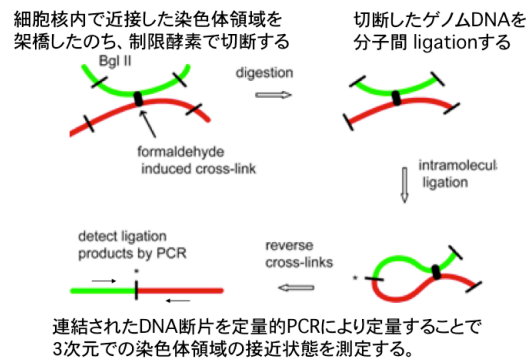


図3 3C (Chromosome Conformation Capture) アッセイ

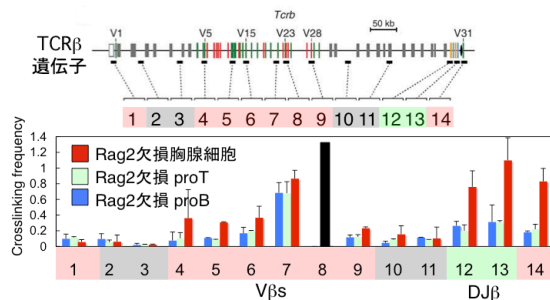


図4 3CアッセイによるTCRβ遺伝子のルーピングの解析  
Rag2欠損胸腺細胞において、Vβを含む領域8がDJβを含む領域12、13や他のVβ領域と特異的に接近している

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 4 件)

1. Sakamoto S, Aoki K, Higuchi T, Todaka H, Morisawa K, Tamaki N, Hatano E, Fukushima A, Taniguchi T, Agata Y. The NF90-NF45 complex functions as a negative regulator in the microRNA processing pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 29, 3754-3769, 2009 査読有
2. 縣 保年、転写因子 E2A と TCR $\beta$  遺伝子の対立遺伝子排除、医学のあゆみ、228(11), 1126-1127, 2009 査読無
3. Kitao, H., Kimura, M., Yamamoto, K., Seo, H., Namikoshi, K., Agata, Y., Ohta, K., Takata, M. Regulation of histone H4 acetylation by transcription factor E2A in Ig gene conversion. *Int. Immunol.*, 20, 277-284, 2008 査読有
4. 縣 保年、E2A は T 細胞抗原受容体遺伝子の再構成と対立遺伝子排除を制御する、細胞工学、27(3), 258-259, 2008 査読無

[学会発表] (計 6 件)

1. 若江亨祥、E2A negatively regulates TCR V $\gamma$ 3 rearrangement via transcriptional repressor, Gfi-1、第 14 回国際免疫学会、2010.8.26、神戸
2. 野崎昌俊、Regulation of V $\gamma$ 2 gene rearrangement by the helix-loop-helix protein, E2A、第 14 回国際免疫学会、2010.8.26、神戸
3. 野崎昌俊、bHLH 転写因子 E2A による V $\gamma$ 2 遺伝子再構成の制御機構、第 18 回 Kyoto T Cell Conference、2010.6.4、京都
4. 縣 保年、E2A and CBP/p300 act in synergy to promote chromatin accessibility of the immunoglobulin  $\kappa$  locus in nonlymphoid cells, Gene Expression & Signaling in the Immune System 2010.4.22, Cold Spring Harbor, USA
5. 縣 保年、Regulation of Allelic Exclusion at the TCR $\beta$  Locus by the Helix-Loop-Helix Protein, E47、Transcriptional Mechanisms of

Early Lymphocyte Development、2009.11.5、La Jolla, USA

6. 縣 保年、Regulation of Allelic Exclusion at the TCR $\beta$  Locus by the Helix-Loop-Helix Protein, E47、Gene Expression & Signaling in the Immune System、2008.4.23、Cold Spring Harbor, USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.imm.med.kyoto-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

縣 保年 (AGATA YASUTOSHI)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：60263141

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし