

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390068

研究課題名(和文)染色体ダイナミクスによる新しいエピジェネティックな遺伝子発現制御機構

研究課題名(英文) Novel epigenetic regulation of the gene expression program by chromosome dynamics

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) 15,200,000円

研究成果の概要(和文)：コヒーシンやCTCFは、染色体構造変化を介して細胞分化を制御する。T細胞へ分化誘導可能な細胞株を用いてChIP-Seq解析を行い、コヒーシンRad21とCTCFが、Tcf7やBcl11bなどのT細胞分化のマスター遺伝子に結合することを見出した。Rad21とCTCFをノックダウンすると、Tcf7とBcl11bの発現が上昇し、T細胞分化が促進された。一方、TCR 遺伝子の染色体短縮に必須であるE2Aをノックダウンすると、Bcl11bやNotchの標的遺伝子の発現が低下し、T細胞分化が抑制されたことから、Rad21/CTCFとE2Aは、T細胞分化をそれぞれ負と正に制御することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cohesin essential for chromosome cohesion and the insulator component CTCF regulate the expression of genes, which are critical for cell differentiation, by chromosome dynamics. To identify genes that are regulated by these proteins and also critical for T cell differentiation, we performed ChIP-Seq analyses using the EBF-KO progenitor cell line, which differentiates to T cells upon Notch stimulation, and found that the cohesin subunit Rad21 and CTCF bound to the genes such as Tcf7 and Bcl11b, master regulators of T cell differentiation. We thus depleted Rad21 and CTCF by knockdown and found that Tcf7 and Bcl11b expression was further increased and T cell differentiation was facilitated. In contrast, when we depleted E2A essential for TCR locus contraction, Bcl11b and Notch target genes were downregulated and T cell differentiation was abrogated. These results suggest that Rad21/CTCF and E2A regulate T cell differentiation in a negative or positive manner, respectively.

研究分野：分子生物学、免疫学

キーワード：染色体ダイナミクス エピジェネティクス コヒーシン Rad21 CTCF E2A ChIP-Seq 染色体構造変化

## 1. 研究開始当初の背景

同一のゲノム情報を持つ幹細胞が様々な種類の細胞に分化するためには、ヒストン修飾をはじめとするエピジェネティックな遺伝子発現制御が重要な役割を果たす。我々はこれまで、リンパ球分化における抗原受容体遺伝子の再構成を対象に研究を行い、再構成が細胞系列や分化段階特異的に起こるのは、組換え部位のクロマチンがヒストンアセチル化によって特異的にオープンになることによることを明らかにした (Agata et al. J.Exp.Med. 2001, Ye, Agata et al. Immunity 2001)。さらに、多くの抗原受容体遺伝子に結合配列を持つ転写因子 E2A に着目し、E2A が p300/CBP を組換え部位にリクルートし、ヒストンアセチル化を上昇させることによって組換えを誘導することや (Agata et al. Immunity 2007)、E2A がヒストンアセチル化に加えて、染色体上に離れて存在する V 領域と DJ 領域をルーピングによって接近させることでも組換えを誘導することを明らかにした。

染色体のルーピングを司る因子としては、近年のゲノムワイドな解析から、インスレーターの構成因子である CTCF と、染色体分配に関わるコヒーシンといった蛋白複合体が染色体上の多くの領域に共局在し、ループ構造形成に関与することが示唆された。これらの結果から、従来ゲノム複製後の姉妹染色分体接合や染色体分配に関わると考えられていたコヒーシンが、染色体のルーピングを介して何らかの遺伝子の発現を制御することで細胞の分化も制御する可能性を示唆された。

これを支持するように、ES 細胞を用いた shRNA によるノックダウン解析から、コヒーシンが ES 細胞の分化制御にきわめて重要であることが明らかにされた (Nature 467:430, 2010)。具体的には、コヒーシンによって、Nanog や Oct4 といった ES 細胞の未分化状態の維持に重要な転写因子の転写が活性化され、逆に Hox や Tbx などの分化進行に重要な転写因子の転写は抑制されること、そしてコヒーシンはこれらの標的遺伝子のエンハンサーとプロモーターに直接結合して、ルーピングを引き起こすことで転写を制御していることがわかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、コヒーシンや CTCF が ES 細

胞だけではなく造血系前駆細胞においても、その未分化状態の維持や分化進行の鍵となる転写因子の発現制御を通じて、細胞の運命決定に重要な働きをするか明らかにすることを目的とする。そのために造血系前駆細胞の培養系を用いてこれらの因子をノックダウンし、ChIP-Seq、マイクロアレイ、Chromosome Conformation Capture(3C)アッセイ等によって遺伝子発現パターンや染色体構造変化等について網羅的かつ複合的な解析を行い、分化制御の鍵となる転写因子やそのネットワークを同定し、その分化制御機構を解明することを目指す。

## 3. 研究の方法

### 1) ChIP-Seq 解析によるコヒーシンと CTCF の結合ゲノム領域の解析

in vitro で T 細胞へ分化誘導可能な造血系前駆細胞として、B 細胞分化に必須である転写因子 EBF の欠損マウスから伊川らが樹立した EBF KO proB 細胞を用いた。(この細胞は、Notch リガンドを発現するストローマ細胞 TSt-4/D111 上で IL-7 濃度を下げて培養すると、T 細胞へ分化を誘導することができる。) 分化誘導前と誘導後の細胞において、コヒーシンの主要サブユニット Rad21 と、CTCF が結合する遺伝子領域をゲノムワイドに同定するために ChIP-Seq 解析を行った。具体的には、これらの因子に対する ChIP を行い、免疫沈降されたゲノム DNA を PCR で増幅後、次世代シーケンサーによって直接塩基配列を決定する。得られたリード配列をゲノム配列上にマッピングし、どのような遺伝子に対応するか解析した。

### 2) コヒーシンと CTCF のノックダウンによる遺伝子発現変化の解析

Rad21 と CTCF に対する miRNA 発現レトロウイルスベクターを作製し、分化誘導前と誘導後の細胞において、これらの因子をノックダウンし、mRNA のマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現 profile の変化を調べた。ES 細胞を用いた解析から、コヒーシンによって転写が活性化、あるいは抑制される標的遺伝子は、ともに分化制御に重要な転写因子であったことから、造血系前駆細胞でもこれらの因子のノックダウンによって発現が変化する遺伝子には、そのような分化に重要な転写因子が含まれていると予想された。そこで主に転写因子に注目し絞り込みをかけた。

### 3) コヒーシンと CTCF のノックダウンによる細胞分化能の解析

これらの細胞で、まず分化停止した状態でコヒーシンと CTCF をノックダウンし、細胞の未分化能に変化が出ないか、表面マーカー等の FACS 解析を行うとともに、ノックダウンした細胞で分化誘導を行い、細胞の分化能に影響がないか解析した。

## 4. 研究成果

### 1) ChIP-Seq 解析によるコヒーシンと CTCF の結合ゲノム領域の解析

コヒーシンと CTCF が結合する遺伝子をゲノムワイドに同定するために、未分化な EBF KO proB 細胞と、Notch リガンドを発現するストローマ細胞上で IL-7 濃度を下げ 6 日間培養することで、DN2 T 細胞へと分化誘導させた EBF KO proB 細胞で、コヒーシンのサブユニット Rad21 と CTCF に対する ChIP-Seq 解析を行った。その結果、分化誘導前で 7,383、誘導後では 10,721 の Rad21 の結合部位が同定でき、同様に分化誘導前で 26,224、誘導後では 28,180 の CTCF 結合部位が同定できた。

### 2) コヒーシンと CTCF のノックダウンによる遺伝子発現変化の解析

Rad21 と CTCF に対する miRNA 発現レトロウイルスベクターを作製し、分化誘導前と誘導後の細胞において、これらの因子をノックダウンし、mRNA のマイクロアレイ解析を行った。その結果、ChIP-Seq で同定された Rad21 と CTCF が結合する遺伝子の中に、Tcf7、Gata3、Dtx1、Bcl11b などの T 細胞の分化誘導に伴って発現が上昇する T 細胞分化のマスター遺伝子が存在することがわかった (図 1)。

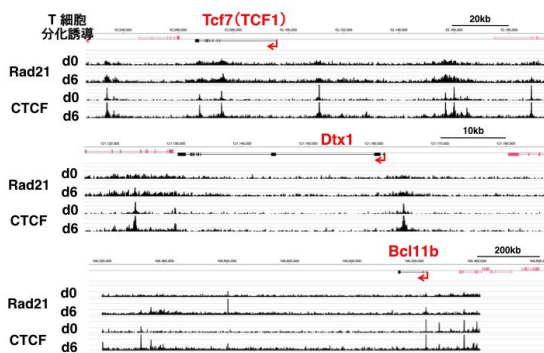


図1 Rad21 と CTCF は T 細胞分化のマスター遺伝子に結合する

### 3) コヒーシンと CTCF のノックダウンによる細胞分化能の解析

そこで Rad21 と CTCF の T 細胞分化誘導に

おける機能を解析するために、これらの因子をノックダウンしたところ、Tcf7、Gata3、Dtx1、Bcl11b の発現がさらに上昇するとともに、T 細胞への初期分化が促進された (図 2,3)。以上のことから、コヒーシンと CTCF はこれらの T 細胞分化のマスター遺伝子の発現を負に制御することにより、分化を抑制する可能性が示唆された。

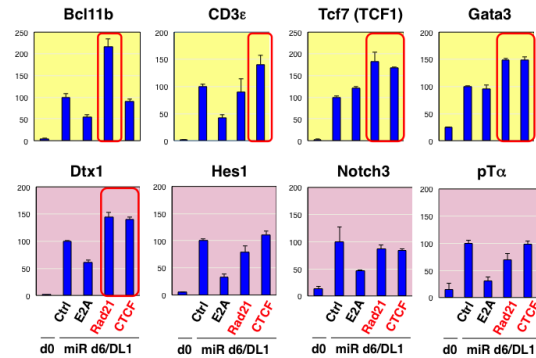


図2 Rad21/CTCF KD によって T 細胞分化制御遺伝子の発現が上昇する

一方、我々がこれまで抗原受容体遺伝子の再構成を対象に解析を行い、染色体上の離れた領域を、染色体ルーピングで接近させることによって組換えを誘導する E2A 転写因子についても併せて解析を行った。その結果、E2A をノックダウンすると Bcl11b や、Dtx1、Hes1 等の Notch の標的遺伝子の発現が低下し、T 細胞への初期分化が抑制されたことから、E2A は T 細胞分化制御遺伝子の発現を正に制御することにより、T 細胞の初期分化を促進することが示唆された (図 2,3)。

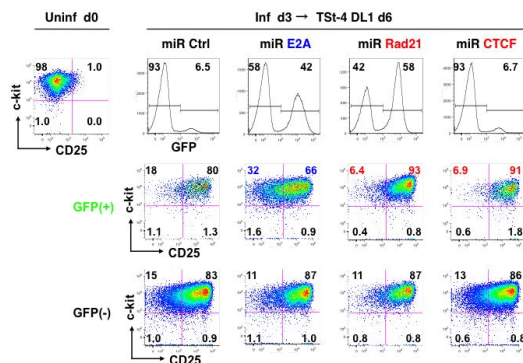


図3 E2A と Rad21/CTCF は T 細胞初期分化を促進、抑制する

## 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 10 件)

- 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 Dev.* 29, 409-425 (2015) 査読有
2. 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
  3. 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
  4. Sato T, Chiba T, Ohno S, Sato C, Sugoh T, Miyashita K, Akatsuka H, Hozumi K, Okada Y, Iida Y, Akatsuka A, Agata Y, Chiba M, Kohu K, Satake M, Tanabe H, Saya H, Habu S. Reciprocal control of G1-phase progression is required for Th-POK/Runx3-mediated CD4/8 thymocyte cell fate decision. *J Immunol.* 189, 4426-4436 (2012) 査読有
  5. Higuchi T, Sakamoto S, Kakinuma Y, Kai S, Yagy K, Todaka H, Chi E, Okada S, Ujihara T, Morisawa K, Ono M, Sugiyama Y, Ishida W, Fukushima A, Tsuda M, Agata Y, Taniguchi T. High expression of nuclear factor 90 (NF90) leads to mitochondrial degradation in skeletal and cardiac muscles. *PLoS One* 7(8):e43340 (2012) 査読有
  6. Sakamoto S, Wakae K, Anzai Y, Murai K, Tamaki N, Miyazaki M, Miyazaki K, Romanow WJ, Ikawa T, Kitamura D, Yanagihara I, Minato N, Murre C, Agata Y. E2A and CBP/p300 act in synergy to promote chromatin accessibility of the immunoglobulin  $\kappa$  locus. *J Immunol.* 188, 5547-5560 (2012) 査読有
  7. Kawamata T, Lu J, Sato T, Tanaka M, Nagaoka H, Agata Y, Toyoshima T, Yokoyama K, Oyaizu N, Nakamura N, Ando K, Tojo A and Kotani A. Imatinib mesylate directly impairs class switch recombination through downregulation of AID. *Blood* 119, 3123-3127 (2012) 査読有
  8. Miyazaki M, Rivera RR, Miyazaki K, Lin YC, Agata Y, Murre C. The opposing roles of the transcription factor E2A and its antagonist Id3 that orchestrate and enforce the naive fate of T cells. *Nat Immunol.*, 12, 992-1001 (2011) 査読有
  9. Nozaki M, Wakae K, Tamaki N, Sakamoto S, Ohnishi K, Uejima T, Minato N, Yanagihara I, Agata Y. Regulation of TCR V $\gamma$ 2 gene rearrangement by the helix-loop-helix protein, E2A. *Int Immunol.*, 23, 297-305 (2011) 査読有
  10. Kawai Y, Hamazaki Y, Fujita H, Fujita A, Sato T, Furuse M, Fujimoto T, Jetten AM, Agata Y, Minato N. Claudin-4 induction by E-protein activity in later stages of CD4/8 double-positive thymocytes to increase positive selection efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 108, 4075-4080 (2011) 査読有
- [学会発表](計2件)
1. 安齋悠樹、山下政克、伊川友活、増田喬子、河本 宏、湊 長博、懸 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)
  2. 若江亨祥、坂本修士、山下政克、中山俊憲、湊 長博、懸 保年. 発生段階特異的な TCR 遺伝子再構成における転写抑制因子 Gfi-1 の役割. 第 19 回 Kyoto T Cell Conference (2011 年 6 月 10-11 日, 京都)
- [図書](計0件)
- [産業財産権]
- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)
- [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

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  
伊川 友活 ( IKAWA TOMOKATSU )  
理化学研究所 統合生命医科学研究センタ  
ー・免疫細胞再生研究 YCI ラボ・研究員  
研究者番号：60450392

佐藤 史顕 ( SATOH FUMIAKI )  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：20467426