

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590562

研究課題名(和文) 高次クロマチンネットワークによるT細胞分化の調節機構の解明

研究課題名(英文) Higher-order Chromatin Structure Controls T Helper Cell Differentiation

研究代表者

関亦 正幸 (SEKIMATA, Masayuki)

山形大学・医学部・教務補佐員

研究者番号：80250190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、染色体上の非コード領域間の相互作用により形成される高次クロマチン構造に着目した免疫ヘルパーT細胞の分化、および、免疫機能調節機構の解明を目標として研究を実施した。これまで無意味な配列と思われていた染色体上の非コード領域から、エンハンサーやサイレンサーなどの様々な機能領域を単離同定し、これらの領域が分化特異的にどのように遺伝子の発現、および、細胞分化を調節しているのかを明らかにした。さらに、これらの領域が分化特異的に形成する高次クロマチン構造を破壊できるマウスを作成し、高次クロマチン構造の個体レベルでの機能解明を試みた。

研究成果の概要(英文)：The formation of higher-order chromatin structure composed of cis-regulatory elements including enhancers, silencers, and insulators play important roles in regulating cell lineage-specific activation and repression of genes. Cytokine genes expressed in T-helper cells are particularly attractive models to study lineage specific regulation by higher-order chromatin structure. In this study, we identified several cis-regulatory elements at the mouse IFN-g gene locus including IFN-g and IL-22. These elements functionally regulated lineage-specific gene expression as enhancers and silencers. Moreover, we try to generate mice with a conditional deletion of an insulator located 70 kb upstream of the IFN-g gene that is a site for recruitment of the factor CTCF, which may enable us to define the epigenetic and functional consequences of lineage-specific gene expression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：遺伝子発現 エピジェネティクス 細胞分化 クロマチン

## 1. 研究開始当初の背景

免疫ヘルパーT細胞(Th)は、抗原刺激、および、置かれた環境要因に応じてナイーブ細胞から機能の異なる様々なサブセット(Th1, Th2, Th17, Treg など)へと分化する。これらのサブセットには、免疫応答のアクセラレーター、またはブレーキ役の両細胞が含まれている。従って、この細胞分化の破綻による免疫応答の調節の乱れが、アレルギーや自己免疫の引き金になると考えられている。以上の理由から、Th分化の調節機構の解明が急務となっている。

各Th細胞は、特有のサイトカインを産生することで病原体排除に最適な免疫応答を誘導する。例えば、Th1細胞はインターフェロンガンマ(IFN- $\gamma$ )を産生することで細胞性免疫に関与し、Th2細胞はインターロイキン4(IL-4)を産生することで抗体産生の調節に関与する。同時に、これらのサイトカインは自身にも作用して自己の分化誘導にも関与する。すなわち、IFN- $\gamma$ はTh1細胞分化を、IL-4はTh2細胞分化を強力に促進する。従って、Th分化の調節機構解明には、サイトカイン遺伝子の分化特異的発現調節を明らかにすることが鍵を握っている。

細胞分化は、分化を司っている遺伝子の転写のオン・オフで調節されている。この転写調節には、ゲノム上のシス調節領域(プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、インスレーターなど)が分化特異的に形成する高次クロマチン構造により調節されると考えられている。しかし、ゲノム上に無数存在するこれらのシス調節領域の中から、分化に必要な領域がどのように選択され、相互作用して高次クロマチン構造を形成し、細胞分化を調節できるのかは不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者が着目するIFN- $\gamma$ 遺伝子座のTh分化調節における役割の解明を研究目的とした。この遺伝子座にはTh1分化に必須のIFN- $\gamma$ 遺伝子の他に、Th17機能に必須の炎症性サイトカインIL-22遺伝子がクラスターを成して存在している。本研究では、この2つの遺伝子発現制御の解明を進めた。

IL-22は、IL-10ファミリーに属するサイトカインであり、IL-10R2とIL-22R1から成るヘテロ二量体を受容体とする。IL-10R2の発現が多岐にわたるのに対し、IL-22R1の発現は小腸・呼吸上皮細胞、皮膚角化細胞、肝臓細胞などの非造血系細胞に局限している。このことから、IL-22の標的となる細胞は、様々な病原体に暴露される上皮系細胞と考えられている。約1000種類もの細菌が生息している腸管において、主にTh17細胞から産生されるIL-22は、病原体からの防御機能や損傷組織の修復再生に重要なサイトカインである。ところが、長期にわたるIL-22の過剰産生は、IL-17やIFN- $\gamma$ などの他の炎症性サイトカインと協調作用することで、炎

症性腸疾患を引き起こすと考えられている。このような背景から、IL-22の遺伝子発現調節の分子機構を解明し、IL-22の適切な発現を調節できれば、炎症性腸疾患の治療に貢献できるのではないかと期待されている。

腸管粘膜において重要な役割を果たしているIL-22の発現調節においては、これまでにプロモーターについての解析が報告されているに過ぎない。そこで、本研究目標遂行のための第一歩として、IL-22遺伝子の発現制御に関与するプロモーター以外の未知なるシス調節領域を同定し、これらシス調節領域によるエピジェネティックなIL-22遺伝子発現調節機構の解明を進めた。

さらに、IFN- $\gamma$ 遺伝子の上流70kbに位置するインスレーターのマウス個体レベルでの機能を解明する目的で、インスレーター欠損マウスの作成を試みた。我々は、このインスレーターがTh1分化特異的にIFN- $\gamma$ プロモーターと相互作用することで高次クロマチン構造を形成し、分化調節に寄与していることを既に明らかにしている。インスレーター欠損マウスを作成することで、高次クロマチン構造の分化調節における役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

染色体上の非コード領域に存在する様々な機能的調節領域を、DNaseI超感受性部位決定法、および、相補性保存度の比較解析法を駆使して候補領域を絞り込む。これらの領域の転写活性に対する機能を、ルシフェラーゼレポーター測定により決定する。機能解析決定後、これらの領域にどのようなDNA結合因子が結合するかを、結合配列データベース検索、クロマチン免疫沈降法、EMSA法により決定し、転写制御における役割を解明する。

インスレーター欠損ES細胞を、ターゲティングベクターを用いた相同組換えにより樹立し、これを受精卵にインジェクションしてインスレーター欠損キメラマウスを作成する。生殖系列への移行を確認後、インスレーター欠損ヘテロマウスを作成し、ヘテロマウス同士の交配により最終的にインスレーター欠損ホモマウスを作成する。得られる欠損ホモマウスの表現型、および、免疫機能に与える影響を解析する。

## 4. 研究成果

### IL-22遺伝子シス調節領域の同定

シス調節領域には、主に二つの特徴があることが知られている。一つは、染色体DNA上のタンパク質非コード領域に存在しているにも関わらず、様々な生物種間で高度に保存されていることである。もう一つは、転写因子が結合できるように、細胞分化特異的に開いたクロマチン構造に変換していることである。そこで、これら二つの特徴に基づいて、IL-22遺伝子近傍に潜む未知のシス調節領域の単離を試みた。まず、ウェブ上で提供され

ている VISTA プログラムにより、ヒトとマウス間で高度に保存された配列を検索し、IL-22 遺伝子上流に3つの非コード保存配列 (Conserved Noncoding Sequence : CNS) を同定した。一方、IL-22 遺伝子の下流には CNS は認められなかった。これらの CNS はマウス IL-22 遺伝子の上流、-18、-25、-32kb 領域に、1kb 長程度の断片として存在していた。

同定した CNS のクロマチン状態を、我々がこれまでに解析報告した DNaseI 超感受性部位のデータと比較した (図1)。その結果、これらの CNS は Th 細胞分化特異的に開いたクロマチン構造をしていることが判明した。以上のことから、同定した3つ CNS が IL-22 遺伝子のシス調節領域として機能している可能性が示唆された。

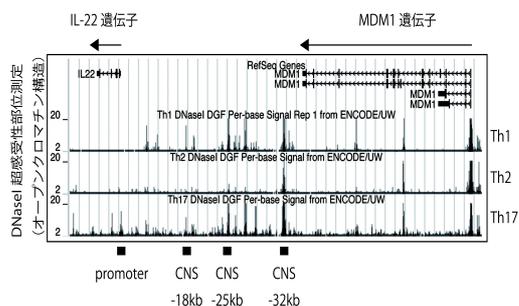


図1 シス調節領域の同定

#### シス調節領域の機能解析

同定した3つ CNS の機能を、ルシフェラーゼレポーターベクターを用いたマウス胸腺腫細胞 EL-4 細胞へのトランスフェクションによる活性測定法で解析した。マウス IL-22 プロモーターをクロニングして、その上流に各 CNS を組み入れたルシフェラーゼレポーターベクターを作製し、転写されるルシフェラーゼ酵素活性を指標としてこれら CNS の機能を解析した。その結果、CNS-32 のみに IL-22 プロモーター活性を強く促進するエンハンサー活性があることが判明した。一方、CNS-18、CNS-25 には、IL-22 プロモーターに対する強い転写抑制活性が認められたことより、これらの CNS はサイレンサーであると考えられた。

#### 転写因子 IκB-z による CNS-32 エンハンサー機能の調節

次に、CNS-32 エンハンサーの機能を発揮するために必要な分子機構の解明を行った。Genomatix プログラムを用いて、CNS-32 エンハンサーに結合し、その活性調節に関与すると思われる転写因子の検索を試みた。これまでに他の研究者による解析から、IL-22 プロモーターに結合する STAT3 (Signal Transduction and Activator of Transcription)、c-Maf、AHR (aryl hydrocarbon receptor)、RORγt (RAR-related Orphan Receptor Gamma)、Batf (Basic Leucine Zipper Transcription Factor, ATF-like)、IRF4 (Interferon Regulatory

Factor)などの転写因子が IL-22 遺伝子発現調節に重要な役割を果たしていることが知られている。これらの転写因子の結合配列も、CNS-32 エンハンサーに存在していることが Genomatix プログラムにより確認できた。今回、新たに転写因子 NF-κB の結合配列を、CNS-32 エンハンサーに新たに同定することができた。この NF-κB 結合配列は、様々な種間で高度に保存されていた。転写因子 NF-κB は広範囲な細胞に発現が認められ、様々な炎症反応に関与している分子である。一方、NF-κB の核内結合パートナー IκB-z 分子 (遺伝子名 NFKB1Z) は IL-1b 刺激後に誘導される NF-κB 調節因子である。興味深いことに、この IκB-z 分子と IL-22 の発現には相関関係がみられ、IL-22 を高発現することが知られている IL-1b 刺激 Th17 細胞では、IκB-z が高発現していることが報告されている。我々のフローサイトメーター解析においても、IL-1b 刺激 Th17 細胞では IL-22 の高発現が観察された。以上のことから、転写因子 IκB-z 分子は NF-κB と相互作用することで IL-22 遺伝子の転写調節に何らかの関与をしている可能性が示唆された。そこで、IκB-z 発現ベクターを用いて、共発現法によるルシフェラーゼレポーター活性を測定した。IL-22 プロモーターの影響を排除してエンハンサーの機能のみを純粹に観察するために、SV40 最小プロモーターの上流に IL-22 の CNS-32 エンハンサーを連結したレポーターベクターを新たに作製した。解析の結果、転写因子 IκB-z には濃度依存的な転写増強活性が認められた。以上の結果から、IκB-z は NF-κB と相互作用することで CNS-32 エンハンサーの NF-κB 結合サイトに結合し、IL-22 遺伝子発現を増強していることが明らかになった。

#### インスレーター欠損ノックアウトマウスの作成

IFN-γ 遺伝子インスレーター欠損 ES 細胞の作成を、ターゲティングベクターを用いた相同組換えにより行った。相同組換えの確認はサザンブロット法を用いて行い、3 クローンの独立したインスレーター欠損 ES 細胞株を樹立できた。これらの ES 細胞を受精卵にインジェクションし、インスレーター欠損キメラマウスの作成に成功した。生殖系列への移行を確認後、インスレーター欠損ヘテロマウスを作成し、ヘテロマウス交配により現在インスレーター欠損ホモマウスを作成しているところである。今後、得られる欠損ホモマウスの表現型、および、Th1 細胞免疫機能に与える影響を解析する予定である。

本研究により、世界に先駆け IL-22 遺伝子のエンハンサーとサイレンサーを同定することができた。さらに、このエンハンサーに結合すると思われる核内 NF-κB 調節因子 IκB-z (遺伝子名 NFKB1Z) が、エンハンサー活性の増強に関与していることを明らかに

した。IL-22 遺伝子の直上流に位置するプロモーターの解析は、これまで比較的容易に行われてきた。しかし、プロモーターだけでは遺伝子発現の単純なスイッチのオン・オフの制御は可能であるが、分化過程での時間・空間特異的な発現制御や発現量の微調整にはシス調節領域の働きが必須である。今回、IL-22 遺伝子特異的なエンハンサーとサイレンサーをはじめて同定できたことで、IL-22 遺伝子の発現量の微調整に必要なエピジェネティクス制御機構の解明がさらに進展するものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Yamagata University Genomic Cohort Consortium, Sekimata,A., Narimutsu, H.: Constructing a contemporary gene-environmental cohort: study design of the Yamagata Molecular Epidemiological Cohort Study. *J.Hum.Genet.*58:54-56(2013) 査読有  
Sekimata,M., Sekimata,A., Homma,Y.: CpG methylation prevents YY1-mediated transcriptional activation of the vimentin promoter. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*414:767-772 (2011) 査読有

〔学会発表〕(計4件)

関亦正幸: インスレーター因子 CTCF とマスター転写因子 T-bet による IFNG 遺伝子座の Th1 細胞特異的高次クロマチン構造と転写制御、第 78 回日本生化学会東北支部例会、山形、山形大学、2012 年 5 月 26 日

関亦明子、佐藤菜津美、中野明彦: 出芽酵母の細胞周期進行に關与する MDT1 遺伝子の欠損によるタンパク質輸送変異 *sec12-4 ts* の抑圧メカニズム、第 78 回日本生化学会東北支部例会、山形、山形大学、2012 年 5 月 26 日

佐藤菜津美、関亦明子: 出芽酵母タンパク質輸送変異 *sec12-4* の細胞周期關連因子 MDT1 欠損による細胞周期回復について、第 78 回日本生化学会東北支部例会、山形、山形大学、2012 年 5 月 26 日

関亦明子、佐藤菜津美、中野明彦: 細胞周期 G2/M 期進行に關与する MDT1 遺伝子の欠損による出芽酵母、温度感受性分泌変異 *sec12-4* の抑圧メカニズム、第 84 回日本生化学、京都、国立京都国際会館、2011 年 9 月 23 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://n-yu.jp/kansenbougyo/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

関亦正幸 (SEKIMATA Masayuki)  
山形大学・医学部・教務補佐員  
研究者番号: 80250190

(2)研究分担者

関亦明子 (SEKIMATA Akiko)  
山形大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50321823