

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790271

研究課題名(和文)細胞分化を制御する連鎖的遺伝子発現ネットワークのダイナミクス

研究課題名(英文)Dynamic regulation of cell differentiation via gene regulatory networks organized by multiple transcription factors

研究代表者

落合 恭子(OCHIAI, Kyoko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10455785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分化は、時期特異的な転写因子の機能によって制御される。転写因子は、特異的DNA配列を認識することで、標的遺伝子を選択し遺伝子発現ネットワーク(GRN; Gene regulatory network)を起動させる。本研究は、転写因子FoxO1とその下流で活性化される転写因子による、連鎖的なGRNの詳細を明らかにすることを目的とする。現在までに転写因子FoxO1によるGRNは解明したため、下流転写因子によるGRN解析を進めている。これらの解析により、連鎖的GRNによる細胞分化誘導のメカニズム解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：Cell type specific transcription factor (TF) regulate cell differentiation via the organization of gene regulatory network (GRN). The aim of this research is focused on the chain reaction of GRNs caused by two different TFs, which have the relation of up- and downstream. The GRN organized by FoxO1, the upstream TF, have been clarified in our previous study. The GRNs organized by the downstream TF, which are the direct target of FoxO1 and activated via FoxO1-GRN, have analyzed. Our new GRNs model will present the molecular mechanism for promoting cell differentiation via multiple TFs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医科学一般

キーワード：遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗体遺伝子組換えの重要性

B細胞受容体はB細胞特異的に発現し、外来抗原と結合し細胞の増殖、分化、アポトーシスなどを誘導する様々な細胞内シグナルを伝達して細胞運命の決定を担う。B細胞受容体は抗体重鎖と軽鎖から成っており、プロB細胞で重鎖、プレB細胞で軽鎖遺伝子が組み換えられる。現在抗体遺伝子の組み換えがどのように細胞内伝達シグナルとその下流因子によって制御されるのが大きく注目されており、プレB細胞における軽鎖遺伝子組み換えはPI3K/AKTシグナルにより阻害され、Syk/BLNKシグナルにより促進されることが明らかである。軽鎖遺伝子組み換えに必須な転写因子FoxO1の分解はPI3K/AKTシグナルを介して誘導されるが、私はFoxO1がプレB細胞特異的にSyk/BLNKシグナルを活性化することで軽鎖遺伝子組み換えを促進することを明らかにした(Ochiai K. et al. *Nature Immunology* 2012)。本研究はこの背景を活かし、軽鎖遺伝子組み換えをはじめとするプレB細胞分化調節機構のさらなる理解を解明を図る。そのために、FoxO1とその活性化の標的遺伝子である転写抑制因子Bach2の機能に着目する。

(2) B細胞分化におけるBach2の機能

Bach2は、B細胞ではプロB細胞から高い発現が認められ、形質細胞分化時に生ずる抗体遺伝子のクラススイッチ組み換えに必須だが、現在Bach2の標的遺伝子は形質細胞分化誘導因子Blimp-1のみしか明らかになっておらず、プレB細胞での機能は全く不明である。私は、プレB細胞におけるFoxO1クロマチン免疫沈降-次世代シーケンス(以下ChIP-sequence)を行い、Bach2がFoxO1の標的遺伝子である可能性を見いだした。Bach2の発現がB細胞の一分化段階で誘導されるのは研究当初報告がない新しい知見であり、Bach2がプレB細胞での遺伝子組み換えを制御する可能性が浮上した。

2. 研究の目的

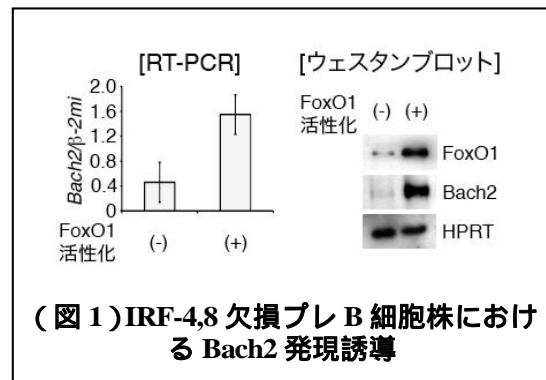
B細胞分化では抗体の多様性を高めるために様々な分化段階で抗体遺伝子組み換えが生じるが、プレB細胞で生じる抗体軽鎖遺伝子組み換えは転写因子FoxO1が形成する遺伝子発現ネットワークによって制御される。本研究では、FoxO1遺伝子発現ネットワークに加え、FoxO1下流因子である転写抑制因子Bach2による遺伝子発現ネットワークを統合解析することにより、従来までの研究をさらに発展させた三次元的な動的遺伝子発現ネットワークの構築を試みる。そして、『細胞

分化時の連鎖的遺伝子発現ネットワークのダイナミクス』を提示することを目指す。

3. 研究の方法

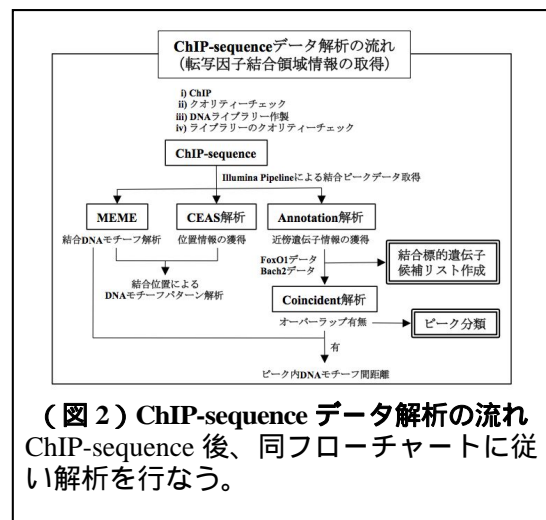
(1) 下流転写因子の標的結合領域の解析

本研究に先駆けて、既にIRF-4,8欠損プレB細胞株を用いたFoxO1のChIP-sequenceを行いFoxO1結合領域解析を終了している(Ochiai K. et al. *Nature Immunology* 2012)。同細胞株はFoxO1活性化に伴いBach2発現が顕著に誘導されるため(図1)、本研究を遂行するために理想的な材料であるので同細胞株を用いた解析を遂行する。



(図1) IRF-4,8欠損プレB細胞株におけるBach2発現誘導

ChIP-sequenceおよび解析は図2に示す流れで行い、sequence前に最も重要となるChIPサンプルおよびライブラリーのクオリティーは、既知のBlimp-1遺伝子上のBach2結合領域と非結合領域を比較し結合領域への優位なBach2の結合により判断する。



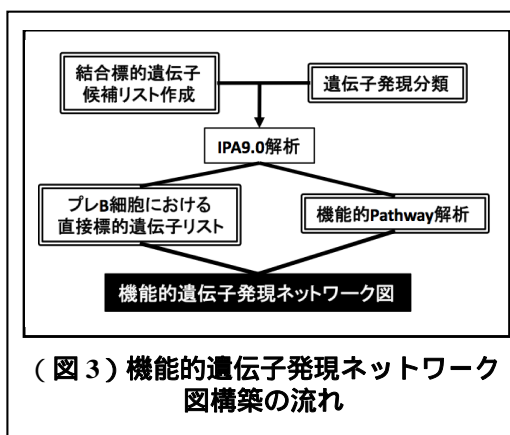
(図2) ChIP-sequenceデータ解析の流れ  
ChIP-sequence後、同フローチャートに従い解析を行なう。

ChIP-sequenceのデータはIllumina Pipelineにより解析後、結合領域が染色体上の位置情報から「ピーク」として示されるので、この生データを用いて「MEMEによる結合DNAモチーフ解析」および「CEAS解析による遺伝子上結合部位解析」を行い結合DNAモチー

フの基本的情報を取得する。さらに研究協力者によって開発された Annotation 解析ソフトを用い、ピーク上流・下流を含めた近傍遺伝子と距離などの詳細な情報を取得し、ピークがどの遺伝子を制御し得る領域なのかを決定し【結合標的遺伝子候補リスト】を作成する。また一般的に遺伝子の活性化や抑制マーカーとして知られるヒストン修飾についても、FoxO1 活性化初期と後期において ChIP-sequence を行い、FoxO1 または Bach2 の結合領域上での修飾状況の変化を解析する。

#### (2) 直接標的遺伝子の解析

FoxO1-Bach2 による標的遺伝子発現を検討するため、レトロウイルスベクターを用いた Bach2 ノックダウン (KD) 細胞株を樹立する。申請者は、既に同ベクターを用いた FoxO1KD 細胞株を樹立しているため迅速な遂行が可能である。これらの細胞株を用いてマイクロアレイを行い、GeneSpring GX ソフトを用いて【遺伝子発現分類】を作成する。Bach2 は転写抑制因子であり FoxO1 下流で制御されるが、Bach2 発現有無での FoxO1 標的遺伝子抑制能と活性化能双方の変化に留意する。【結合標的遺伝子候補リスト】には、プレ B 細胞では発現制御を受けないものも含まれるため、【遺伝子発現分類】のうちピークを持つ遺伝子群を IPA (Integrated Pathway Analysis) 9.0 解析ソフトを用いて抽出し、『プレ B 細胞における直接標的遺伝子リスト』を作成する (図 3)。直接標的遺伝子への FoxO1・Bach2 の結合は、随時定量 ChIP PCR にて検討する。さらに標的遺伝子を含む機能的 Pathway 解析を行い、『機能的遺伝子発現ネットワーク図』を作成する。



#### (3) 三次元的な動的遺伝子発現ネットワーク構築

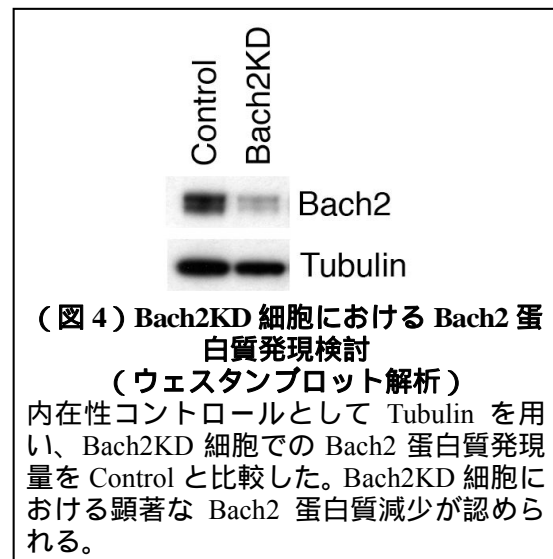
プレ B 細胞における機能的な動的遺伝

子発現ネットワーク図を構築する。「FoxO1 遺伝子発現ネットワーク」の活性化に伴い「Bach2 遺伝子発現ネットワーク」が起動、さらに分化進行に伴うヒストン修飾状況の変化を含めた統合解析を行い、連鎖する遺伝子発現ネットワークの連動による細胞分化のダイナミクスを提示する。

#### 4. 研究成果

##### (1) Bach2 KD 細胞の構築

KD 導入法として、レトロウイルスベクターを用いた short hairpin RNA (shRNA) を行なった。Bach2 遺伝子を標的とする、異なる三種の shRNA レトロウイルスベクターを構築した。そのうち、一つで高効率の KD 効果を得た (図 4)。同 shRNA 構築を用い、Bach2KD における遺伝子発現パターンを解析する。



##### (2) Bach2 の ChIP 条件の検討

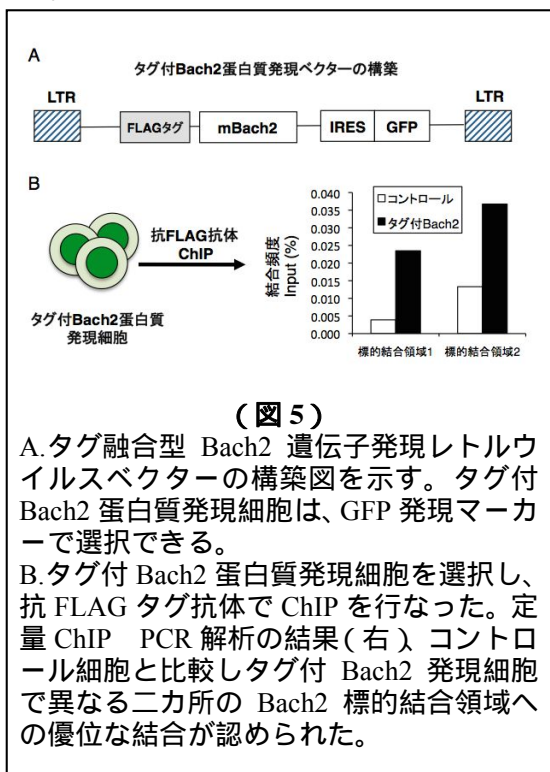
Bach2 ChIP-sequence に向け、ChIP に使用可能な抗 Bach2 抗体の検討を行なった。市販抗体数種に加え、オリジナル抗 Bach2 抗体 4 種を用いた検討を行なったが、効率的な抗体を得ることができなかった。

##### (3) タグ付 Bach2 蛋白質発現細胞株の樹立

(2)の解決策として、レトロウイルスベクターにタグ融合型 Bach2 遺伝子を組み込み (図 5A)、タグ付 Bach2 蛋白質発現細胞株を樹立した。この細胞株を用い、抗タグ抗体を使用した ChIP 方法に切り替えた (図 5B)。その結果、コントロール細胞と比較し、タグ付 Bach2 発現細胞株では、Bach2 標的結合領域への優位な結合を認められた。

現在は、同細胞株を用いた解析の検討を進めている。また、FoxO1 下流の他の転写因

子についても同様に解析を進め、連鎖的遺伝子発現ネットワーク構築を目指している。



## 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 3 件)

Marcus R. Clark, Malay Mandal, Kyoko Ochiai, Harinder Singh.

“Orchestrating B lymphopoiesis through interplay of IL-7R and pre-BCR signaling”

*Nature Reviews Immunology*, 査読有  
2014 Feb;14(2):69-80. Epub 2013 Dec 31

Kyoko Ochiai, Mark Maienschein-Cline, Jianjun Chen, Anita S. Chong, Aaron R. Dinner, Harinder Singh, Roger Sciammas.

“Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4”

*Immunity*, 査読有

2013 May 23;38(5):918-29. Epub 2013 May 16.

Kyoko Ochiai, Maienschein-Cline, Malay Mandal, Joseph R Triggs, Eric Bertolino, Roger Sciammas, Aaron R Dinner, Marcus R Clark, Harinder Singh.

“A self-reinforcing regulatory network triggered by limiting IL-7 activates pre-BCR signaling and differentiation”

*Nature Immunology*, 査読有

2012 Mar;13(3): 300-307. Epub 2012 Jan 22.

[学会発表](計 2 件)

落合恭子、五十嵐和彦

“Organization of Plasma Cell Differentiation via Epigenome-related Complex”

第 36 回日本分子生物学会

2013 年 12 月 6 日、神戸

Kyoko Ochiai, Hiroki Shima, Kazuhiko

Igarashi.

“Regulation of Mat2 $\alpha$ -mediated cell differentiation via nuclear organization”

Immunity & Tolerance, the LXXVIII Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology

New York, USA, May 29 – June 3, 2013.

[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

落合 恭子 (OCHIAI, KYOKO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 10455785

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: