

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293109

研究課題名(和文) クロマチン構造制御によるヘルパー/キラー系列決定機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of helper/cytotoxic lineage choice by chromatin structures

研究代表者

谷内 一郎 (Taniuchi, Ichiro)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・グループディレクター

研究者番号：20284573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、胸腺内でのヘルパー/キラー系列に重要なThpok遺伝子に着目し、3次元的なクロマチン構造変化を介したThpok遺伝子遺伝子の発現制御機構の解明を目的に研究を行った。新規研究手法であるinsertion CHIP(iChiP)法によりThpok遺伝子座はキラー系列特異的にシス制御領域が近接した位置に配置されるクロマチン構造をとることを明らかにした。

またBcl11b転写因子により初期のクロマチン構造のT細胞型への変換が後のThpok遺伝子発現制御に必須であること、ゲノムオーガナイザーであるSATB1が胸腺細胞の系列決定に重要な遺伝子群の発現制御に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Helper versus cytotoxic lineage choice by T lymphocyte precursors serves as a good model to investigate how external environmental cue, TCR signals in this case, is integrated into genetic programming that govern cell fates. Since regulation of Thpok gene is a key to segregate these two fates, we examined how Thpok is regulated.

By using insertion CHIP, we found that cis-regulatory regions in the Thpok gene is assembled into the close proximity specifically in cytotoxic lineage. We also revealed that priming of Thpok gene by Bcl11b transcription factor, more specifically its C-terminal end Zinc-finger motif, during early thymocyte differentiation is essential for later coupling of TCR signals with appropriate Thpok expression. Lastly, our data unraveled that a genome organizer SATB1 plays essential roles in regulating expression of lineage specifying genes such as Thpok, Runx3 and Foxp3, to specify effector T cell subset.

研究分野：分子免疫学

キーワード：T細胞分化 転写因子 クロマチン

1. 研究開始当初の背景

CD4ヘルパーT細胞とCD8キラーT細胞は胸腺内で共通の前駆細胞 CD4+CD8+DP 胸腺細胞より分化する。この系列決定はT細胞抗原受容体(TCR)と主要組織適合抗原(MHC)との反応性とよく相関し(MHC 拘束性)、外部環境を感知する信号を細胞運命制御機構に変換する核内制御機構を解明する良いモデルであり、またその解明は免疫学領域の長年の課題でもある。

これまでの研究により、ThPOK 転写因子の発現の有無がヘルパー/キラー系列の主要な決定因子であると認識されており、本研究科課題では *Thpok* 遺伝子の発現制御機構の解明を目的に、特に局所クロマチン構造の改変を介した制御機構に着目して研究を開始した。またこれまでに、*Thpok* サイレンサーが *Thpok* 遺伝子のヘルパー系列特異的な発現を規定していることを解明し、Runx 転写因子の *Thpok* サイレンサーへの結合はサイレンサー活性に必須であるが十分ではない結果を得ていた。したがって、*Thpok* サイレンサーの制御機構の解明には、新規サイレンサー結合因子の同定と機能解明が重要であった。

2. 研究の目的

Thpok 遺伝子の発現を制御するシス制御領域として負の制御を担う *Thpok* サイレンサーと正の制御を担う二つのエンハンサー領域を同定してきた。これら相反する機能を持つ制御領域がどのように *Thpok* 遺伝子の発現を制御するか理解する上で、これら制御領域間の相互作用を測定することは重要である。そこで本研究課題では以下の二つの課題を設定した。

(1)ゲノム領域間相互作用を計測する新規手法として開発された挿入的クロマチン免疫沈降法(insertion ChIP: iChIP法)を用いて、高次クロマチン構造変化を介した *Thpok* 遺伝子発現制御機構を解明する。

(2)新規サイレンサー結合因子として同定した Bcl11b 転写因子、SATB1 について、T細胞分化制御における機能を解明する。

3. 研究の方法

(1)iChIP法を実施するために *Thpok* 遺伝子座内の制御領域近傍に LexA 配列を挿入した変異マウス、FLAG 配列で標識された LexA 結合タンパク質を発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、交配により作出したダブル Tg マウスより T細胞分画を調整し、iChIP-seq 及び iChIP-qPCR 法を実施した。

(2)Bcl11b 及び SATB1 の機能解析については、Cre-loxP を用いたコンディショナルノックアウト(CKO)マウスを用いた解析を行った。Bcl11b については他に C 末端の Zinc-finger (ZF) 構造を欠損する変異体、リン酸化修飾を受ける 25 の Ser/Thr 塩基のうち 20 残基を Ala に置換した変異体、SUMO 化修飾を受ける塩基を欠損する変異体につい

て、それぞれノックイン変異マウスを作製することで機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) *Thpok* 遺伝子の高次クロマチン構造形成を解析する目的で、iChIPにより免疫沈降された DNA を次世代シーケンサーにより網羅的に解読する iChIP-seq 法を行い、まずは *Thpok* 遺伝子座内の *Thpok* サイレンサーと会合するゲノム領域の解読を行った。その結果、サイレンサー領域は CD8 キラーT細胞特異的に P2-プロモーター領域と会合している結果を得た(図1)。この会合については iChIP-qPCR 法にて再現性を確認した。次に近位 *Thpok* エンハンサー側からも検討を加える目的で近位 *Thpok* エンハンサー近傍に LexA 配列を挿入した変異マウスを用いて同様に iChIP-qPCR を実施し、CD8 キラーT細胞特異的に近位エンハンサーとサイレンサーが近接した位置に配置される高次クロマチン構造が形成されることを確認した。両領域からの iChIP 法により同様の結果が得られたことから、高次クロマチン構造の変換によって CD8T 細胞での安定的な *Thpok* 遺伝子の発現抑制が制御されていることが判明した。

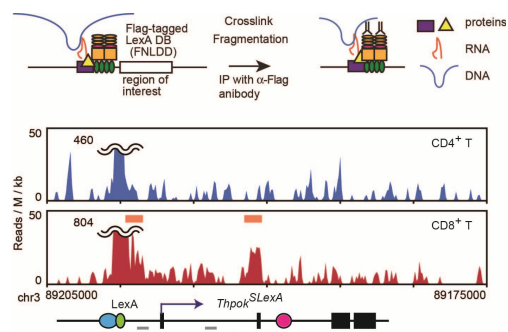


図1. iChIP-seq による *Thpok* 遺伝子座の高次クロマチン構造の検出

次に iChIP-seq の結果を全ゲノムレベルで解析し、*Thpok* 遺伝子座と会合するゲノム領域の網羅的な検出を行った。その結果異なる染色体上に位置するゲノム領域との相互作用では、T細胞分化に重要な分子をコードする遺伝子群が有意に *Thpok* 遺伝子座と会合している結果を得た(図2)。

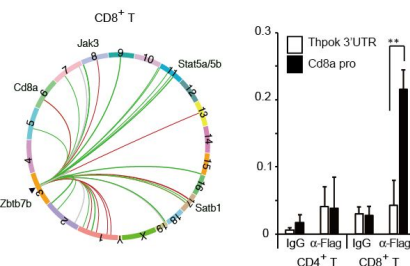


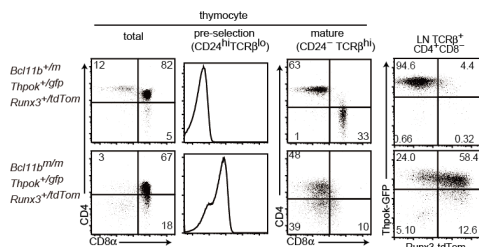
図2. iChIP-seq による全ゲノム領域での相互作用検出と iChIP-qPCR による確認。

iChIP 法は原理的には目的のゲノム領域と会合する RNA を検出することも可能であり、現在 iChIP-RNA-seq を行い、Thpok サイレンサー領域と会合する RNA の網羅的探索を行っている。

また *Thpok* 遺伝子座内のシス制御領域が近位に配置された後の制御機構を解明する目的で、*Thpok* 遺伝子座上でシス制御領域の位置を再構成する実験系を構築し、相反する機能を持つ制御領域の位置関係の重要性を検討した。その結果、プロモーターに対するエンハンサーとサイレンサーとの相対的な位置関係により、エンハンサー活性が影響を受ける結果を得た。

(2) Bcl11b 転写因子の C 末端 ZF 構造を欠損する Bcl11b 変異をホモに有するマウスでは、Bcl11b 欠損マウスと同様に生後 2 日で死亡するが、Bcl11b 欠損マウスと異なり胸腺細胞分化は DN2 期で停止しないことから、この変異体は低機能変異と考えられた。レシピエント個体での T 細胞分化再構成系を用いた解析により、C 末端 ZF 欠損により DP 胸腺細胞での *Thpok* 遺伝子の脱抑制が生じ、その結果 T 細胞分化は CD4 系列に傾倒することが明らかとなった(図 3)。驚いたことに、Bcl11b を介した DN DP 移行期の *Thpok* 遺伝子の抑制は *Thpok* サイレンサー非依存性であることが判明した。また C 末端 ZF 欠損により、CD8T 細胞系列特異的に発現しかつその分化に必須である *Runx3* 遺伝子の発現も異常をきたし、その結果本来ならば成熟 T 細胞サブセットでは排他的な発現パターンを示す *Thpok* 遺伝子と *Runx3* 遺伝子を同時に発現する T 細胞が生じることを見出した(図 3)。また Cd4-Cre を用いた DP 胸腺細胞での Bcl11b の不活性化の結果、C 末端 ZF 構造欠損と同様の TCR の MHC 拘束性を外れた *Thpok*/*Runx3* の発現誘導がやや遅れて生じ、その結果 I 型、II 型 MHC 特異的な T 細胞が共に本来とは相反する系列へと分化誘導(redirected differentiation)され、ヘルパー/キラー系列の振り分けが混沌化した状態(lineage scrambling)となることが発見した。これらの結果から、Bcl11b が胸腺細胞初期過程で *Thpok* 遺伝子を事前調整する過程(priming)がその後の系列決定過程で TCR 信号を正確に *Thpok* 遺伝子の発現に転換するために必須であるという新たな概念を提唱する成果を得た。

図 3. Bcl11bC 末端 ZF 欠損変異による *Thpok*/*Runx3*



遺伝子座の異常発現と異常な T 細胞分化。

また Bcl11b の 25 の Ser/Thr 塩基のうち 20 残基を Ala に置換した変異や SUMO 化修飾を受ける塩基を欠損させた変異を持つ変異マウスの解析では、明らかな T 細胞分化異常は見受けられず、リン酸化や SUMO 化といった翻訳後修飾は Bcl11b 転写因子の機能制御に重要でないことを示す知見を得た。

CKO を用いた SATB1 の機能解析では、SATB1 の欠損により *Thpok* 遺伝子、*Runx3* 遺伝子の発現低下が生じ、その結果 I 型及び II 型 MHC 特異的な T 細胞が共に部分的な redirected differentiation に陥る結果となった。SATB1 は *Thpok* 遺伝子発現制御では、サイレンサー、エンハンサー両領域の活性発露に関与しており、ゲノムオーガナイザーとしてクロマチン構造の変換を介した制御を行うと考えられた。また胸腺内の制御性 T 細胞の分化には *Foxp3* 遺伝子の発現が必須であるが、SATB1 の欠損により *Foxp3* 遺伝子の発現誘導が著しく障害される結果となった。ところが胸腺細胞成熟過程での SATB1 の機能欠損では、逆に *Foxp3* 遺伝子の脱抑制が生じた。このことが

ら SATB1 を介した *Foxp3* 遺伝子の制御機構は初期過程と維持過程では相反する制御機構が存在することを見出した。また SATB1 は *Cd4* 遺伝子、*Cd8* 遺伝子の制御領域に会合し、両遺伝子の活性化にも重要であることを発見した。

このように SATB1 は T 細胞分化に重要な機能を果たす多くの遺伝子を制御することが明らかとなった。

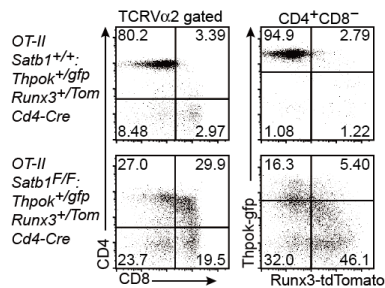


図 4. SATB1 欠損による *Thpok*/*Runx3* 遺伝子の発現異常と MHC-II 拘束性細胞の分化異常。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕計 24 件 主なもの 8 報を記載) Kakugawa K, 他 11 名, and Taniuchi I (13 番目). (2017) Essential roles of SATB1 in specifying T lymphocyte subsets.

Cell Rep. 19:1176-1188,2017. 査読有.
Seo W and Taniuchi I. (2017) Regulation of hematopoiesis and immune responses by long noncoding (lnc) RNAs. Int Immunol. doi: 10.1093/intimm/dxx021. 査読有.

Seo W, Muroi S, Akiyama K and Taniuchi I.(2017) Distinct requirement of Runx complexes for TCR enhancer activation at distinct developmental stages. Sci Rep. 7:41351. doi: 10.1038/srep41351. 査読有.

Kitagawa Y, 他 11 名, Taniuchi I(11 番目)and Sakaguchi S. (2017) Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. Nat. Immunol.18:173-183. 査読有.

Qiang S, 他 14 名 Taniuchi I(12 番目) and Xue Xue H-H.(2017)Runx3 guards cytotoxic CD8+ effectors against Tfh deviation in acute viral infection. Nat. Immunol. in press. 査読有.

Taniuchi I (2016) Views on helper/cytotoxic lineage choice from a bottom-up approach. Immunol Review. 271:98-113. 査読有.

Hao B, 他 8 名, Taniuchi I(7 番目)and Krangel MS. (2015) An anti-silencer- and SATB1-dependent chromatin hub regulates Rag1 and Rag2 gene expression during thymocyte development. J.Exp.Med. 212:809-24. 査読有.

Mishima Y, 他 16 名, Taniuchi I(18 番目)and Iwama A. (2014) Histone acetylation mediated by Brd1 is crucial for Cd8 gene activation during early thymocyte development. Nat Commun. 2014 Dec 18;5:5872. 査読有.

[学会発表] (計 20 件、主なもの 5 件を記載)

谷内 一郎. 胸腺内 T リンパ球分化機構. 第 26 回日本サイトメトリー学会. 2016 年 7/23-24. 九州大学医学部百年講堂 (福岡市).

Taniuchi I. Shaping T cell pool by SATB1 in the thymus and in the periphery. CSHL meeting. 2016 年 4/26-30. Cold Spring Harbor, USA.

谷内 一郎. ThPOK 転写因子による CD4 ヘルパー T 細胞分化制御. 第 38 回 分子生物学会. 2015 年 12/1-12/4. 神戸国際会議場 (神戸市)

Taniuchi I. Linking environmental cues with mechanisms that control specification of T lymphocyte lineage requires a proper positioning of regulatory regions. EMBO conference. 2015 9/29-10/2. Paris, France.

Taniuchi I. Transcriptional Regulation

of T cell development in the thymus. Keystone Symposium. 2015.3/29-4/3. Snowbird, USA.

[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.ims.riken.jp/labo/20/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷内 一郎 (TANIUCHI Ichiro)
理化研究所・免疫転写制御研究グループ・
グループディレクター
研究者番号: 20284573