

免疫転写制御研究チーム

Laboratory for Transcriptional Regulation

チームリーダー 谷 内 一 郎

TANIUCHI, Ichiro

生物の発生過程プログラムは時間的・空間的に厳密に制御された遺伝子発現により規定されていることより、転写制御機構の理解は分化プログラムの理解に必須といえる。近年は特にエピジェネティックな転写制御機構が注目され、精力的に研究されている。当研究チームは免疫系の発生・分化プログラムを転写制御の側面から研究し、分子レベルで免疫系の分化機構を理解し、さらには治療へ応用することを目指している。特にエピジェネティックな転写制御機構の意義とその調節機構に注目して研究を進めている。本年度は、免疫系の分化における Runx 転写因子ファミリーの役割とエピジェネティックな遺伝子発現制御におけるシス制御領域の機能解析を中心に、下記のプログラムについて研究を行った。

(本年度より研究室名を免疫発生研究チームから免疫転写制御研究チームへ変更)

1. 免疫系分化における Runx 転写因子ファミリーの機能解析

(1) Runx1 の C 末端 VWRPY 配列の機能解析 (谷内, 室井*, 秋山)

Runx ファミリー α サブユニットの C 末端に存在する VWRPY 配列は、DNA 結合領域である Runt domain と共に Runx タンパクの中で種を超えて良く保存されている機能領域であり、転写抑制因子である Groucho/TLE ファミリーとの結合に必須と考えられている。Runx1 は DN 胸腺細胞での CD4 遺伝子の転写抑制に必須であるが、その転写抑制の分子機構は良く分かっていない。そこで Runx1 の VWRPY 配列の機能を解析するため、遺伝子標的法にて作製された VWRPY 配列を欠損する変異 Runx1 を発現するマウス (Runx1 ^{Δ 446} マウス) の供与を受け、表現型解析を行った。その結果、DN 胸腺細胞、成熟 CD8+T 細胞といった異なる分化段階における異なる機序での CD4 遺伝子の抑制はいずれも Runx1 の VWRPY 配列に依存していることが判明した。ところが、VWRPY 配列欠損の CD25 の発現抑制に対する影響は部分的であった。また、VWRPY 配列の欠損により TCR や IL7R の発現が障害された。これらの結果は、VWRPY 配列は転写抑制のみならず転写活性化にも関与することを示唆し、転写抑制には VWRPY 配列に依存的な機構と非依存的な機構が存在すると考えられた。さらに、VWRPY 配列の欠損により、NKT 細胞の分化はほぼ完全に障害され、VWRPY 配列は NKT 細胞分化に必須であった。

(2) Runx3 と Runx1 或は Runx1 ^{Δ 446} とのダブルノックアウトマウスの作製と解析 (谷内, 秋山)

T 細胞分化における Runx ファミリーの機能相補性の有無を確かめるため、Runx1 と Runx3 のヌル変異のダブルノックアウトマウス、あるいは Runx1 ^{Δ 446} 変異と Runx3 のヌル変異のダブルノックアウトマウスを作製し解析した。その結果、Runx1 と Runx3 はポジティブ選択後の胸腺細胞の成熟過程に必須である結果を得た。また、Runx1 ^{Δ 446} 変異と Runx3 のヌル変異により、CD8 細胞が特異的に欠損したが、CD4 細胞は少ないながらも残存した。これらの

結果は、Runx1 と Runx3 は機能相補性があることを示しており、Runx1 の VWRPY 配列の欠損は Runx3 欠損の遺伝的背景では CD8+細胞の分化に特異的に影響することを示すものである。

(3) 組織特異的 CBF β 遺伝子変異マウスの作製 (谷内, 室井*)

CBF β タンパクは 3 種類ある Runx ファミリー α ユニット (Runx1, Runx2 と Runx3) の共通の β ユニットであり、Runx α ユニットの機能には必須と考えられている。CBF β ヌル変異マウスは胎生致死であるため、Cre-loxP の系を用い CBF β タンパクを組織特異的に欠損させることのできる変異マウスを作製した。現在、T リンパ球特異的 Cre Tg と交配中である。

(4) アイソフォーム特異的 CBF 変異マウスの作製と解析 (谷内, 直江, 室井*, 秋山)

CBF β 遺伝子からは RNA スプライシングにより CBF β 1 と CBF β 2 の 2 つのアイソフォームタンパクが産生される。遺伝子標的法にてスプライシングドナー配列特異的に変異を導入し、CBF β 1 或は CBF β 2 を特異的に欠損するマウスを作製・解析した。CBF β 2 の欠損により、胸腺内での T リンパ球の分化に異常を来す等、免疫系の分化や機能に異常を来すことが明らかになった。

(5) アイソフォーム特異的 Runx1 変異マウスの作製 (谷内, 西本, 室井*)

Runx1 遺伝子座からは異なるプロモーター (P1 と P2) から異なる転写物が産生され、それぞれ異なる N 末端配列を持つアイソフォームタンパクが産生される。それぞれの転写物は組織により異なる発現パターンを示し、例えば胸腺では P1 由来の転写が優位であり、脾臓では P2 由来の転写が優位である。これらアイソフォームタンパクの機能を解析する目的で P1 由来のアイソフォームあるいは P2 由来のアイソフォームを特異的に欠損する変異マウスを作製している。また P2 由来のアイソフォームに特異的な N 末端配列を P1 プロモーター支配下のエクソンにノックインすることで、P1 プロモーター下に P2 由来のアイソフォームを発現する変異マウスの作製も行っている。

(6) B 細胞特異的 Runx1, Runx3 変異マウスの作製 (谷内, 西本)

Runx1^{fl}ox 変異或は Runx3^{fl}ox 変異を CD19-Cre Tg マウスと交配し, B 細胞特異的に Runx1 或は Runx3 を欠損する変異マウスを作製し, 解析を行っている。

2. エピジェネティックな遺伝子発現制御におけるシス制御領域の機能解析

(1) TCR β 遺伝子座活性化における E β エンハンサーの機能解析 (谷内, 直江, 室井*, 秋山)

TCR β 遺伝子座におけるエンハンサーとしては唯一 E β エンハンサーのみが同定されている。E β エンハンサーを欠損するマウスでは TCR β 遺伝子の活性化が全く起こらないことより, E β エンハンサーは TCR β 遺伝子座活性化に必須であることが知られている。E β エンハンサーには 3 個の Runx 結合配列が存在し, 試験管内の実験等により, これら Runx 結合配列は E β エンハンサーの機能に必須であると考えられてきた。そこで, より生理的な機能を解析する目的で, 遺伝子標的法にてこれらの Runx 結合配列に異なる変異を導入した変異マウスを 3 種類作製し, それぞれの変異が TCR β 遺伝子座活性化の及ぼす影響を検討した。Runx 結合配列の変異を組み合わせることで TCR β 遺伝子の活性化が全く起こらないことより, Runx 配列は E β エンハンサーの機能に必須であると考えられた。また TCR β 遺伝子の転写活性化状態の維持における E β エンハンサーの機能を解析するため, E β エンハンサーを loxP 配列で挟んだ変異を持つマウス (E β ^{fl}ox マウス) を作製した。この E β ^{fl}ox マウスを, 異なる T 細胞分化段階で Cre タンパクを発現する 3 種類の Cre Tg マウスと交配した。その結果, E β エンハンサー欠損の影響は, TCR β 発現低下の時間的な推移という点で, 分化段階で異なっており, 成熟 T 細胞ではより長期間にわたり発現が維持される傾向がみられた。また, 成熟 T 細胞では E β エンハンサーの除去により, uniform ではなく variegated なパターンの発現低下がみられた。これらの結果より, 胸腺細胞の成熟過程で何らかのエピジェネティックな修飾が起こっていることが考えられた。

(2) TCR α 遺伝子活性化における E α エンハンサー内の Runx 結合配列の機能解析 (谷内, 室井*)

(1) の課題と同様なアプローチで E α エンハンサーを loxP で挟んだ E α ^{fl}ox 変異マウスや Runx 結合配列に変異を導入した変異マウスを作製している。

(3) IgH 遺伝子活性化における E μ エンハンサー内の Runx 結合配列の機能解析 (谷内, 室井*)

(1) の課題と同様なアプローチで E μ エンハンサーを loxP で挟んだ E μ ^{fl}ox 変異マウスや Runx 結合配列に変異を導入した変異マウスを作製している。

(4) CD4 サイレンサー内の機能配列の検索 (谷内, 室井*)

CD4 サイレンサー内の新たな機能配列を検索すべく, 遺伝子標的法を用い CD4 サイレンサーに特異的な変異を導入した変異マウスの作製を行っている。

(5) CD4 サイレンサー結合因子の検索 (谷内, 秋山)

酵母を用いた遺伝学的アプローチにより, CD4 サイレンサーの機能配列 1 に結合する因子の同定を試みている。

3. エピジェネティックな遺伝子発現制御における CAF1 複合体の機能解析

CAF1 (Chromatin Assembly Factor 1) 複合体は DNA 複製や特異なクロマチン構造の維持等に重要な役割を果たすと考えられており, エピジェネティックな遺伝子発現維持機構の主要な構成分子の 1 つと想定されている。中でも CAF1 複合体の p150 サブユニットは HP1 タンパクと結合し, ヘテロクロマチン構造の維持に重要な役割を果たすと考えられている。そこで, 遺伝子標的法にて CAF1p150 遺伝子座に loxP 配列を挿入し, Cre の発現により CAF1p150 遺伝子を不活性化できる変異マウスを作製した。現在, 組織特異的 Cre Tg マウスと交配中である。

* 共同研究員

Establishment of specific gene expression pattern is central in developmental program. It is therefore important to understand molecular mechanisms that regulate tissue- and stage-specific gene expression. It became apparent in last decade that the modification of chromatin plays essential roles in gene regulation. However, the physiological significance of chromatin-based gene regulation during development is not yet well characterized.

Our team is studying molecular mechanisms of lymphocyte development from a view of epigenetic gene regulation. We focus on Runx transcriptional factor family, a important player of epigenetic gene regulation in various types of cells. The functions of Runx family in immune system regulation are studied mainly by using gene-manipulated mice. We are also studying function of cis-regulatory element on chromatin modification in either activating or silencing of genes at TCR β or CD4 locus, respectively.

Research Subjects

1. Role of Runx transcriptional factors in immune system
2. Roles of cis-regulatory elements in epigenetic gene regulation
3. Roles of CAF1 complex in epigenetic maintenance of gene expression

Staff

Laboratory Head

Dr. Ichiro TANIUCHI

Research Scientist

Dr. Yoshinori NAOE

Dr. Sogo NISHIMOTO

Contract Technical Assistant

Ms. Sawako MUROI

Visiting Members

Ms. Kaori AKIYAMA
Ms. Chieko TEZUKA

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(総 説)

Taniuchi I., ELLMEIER W., and LITTMAN D. R.: “The CD4/CD8 lineage choice: New insights into epigenetic regulation during T cell development”, *Adv. Immunology* **83**, 55–89 (2004).

Taniuchi I. and Littman D. R.: “Epigenetic gene silencing by Runx proteins”, *Oncogene* **23**, 4341–4345 (2004).

谷内一郎: “CD4 サイレンサーによるエピジェネティックサイレンシング”, *細胞工学* **23**, 1162–1165 (2004).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Taniuchi I., Littman D. R., and Nakayama K.: “Roles of Runx sites with in E β enhancer for initiating and maintenance of TCR β locus activation”, 12th Int. Congr. of Immunology and 4th Ann. Conf. of FOCIS, Montreal, Canada, July (2004).

Taniuchi I., Ito Y., Egawa T., and Littman D. R.: “Roles of Runx proteins in thymocytes development”, Runx-2004 Meeting, (College of Medicine Institute for Tumor Research Chungbuk National University), Kumho, Korea, July (2004).

(国内会議)

直江吉則, Littman D. R., 中山敬一, 谷内一郎: “TCR β 遺伝子活性化における E β エンハンサー内の Runx 結合配列の機能解析”, 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 12 月 (2004).