

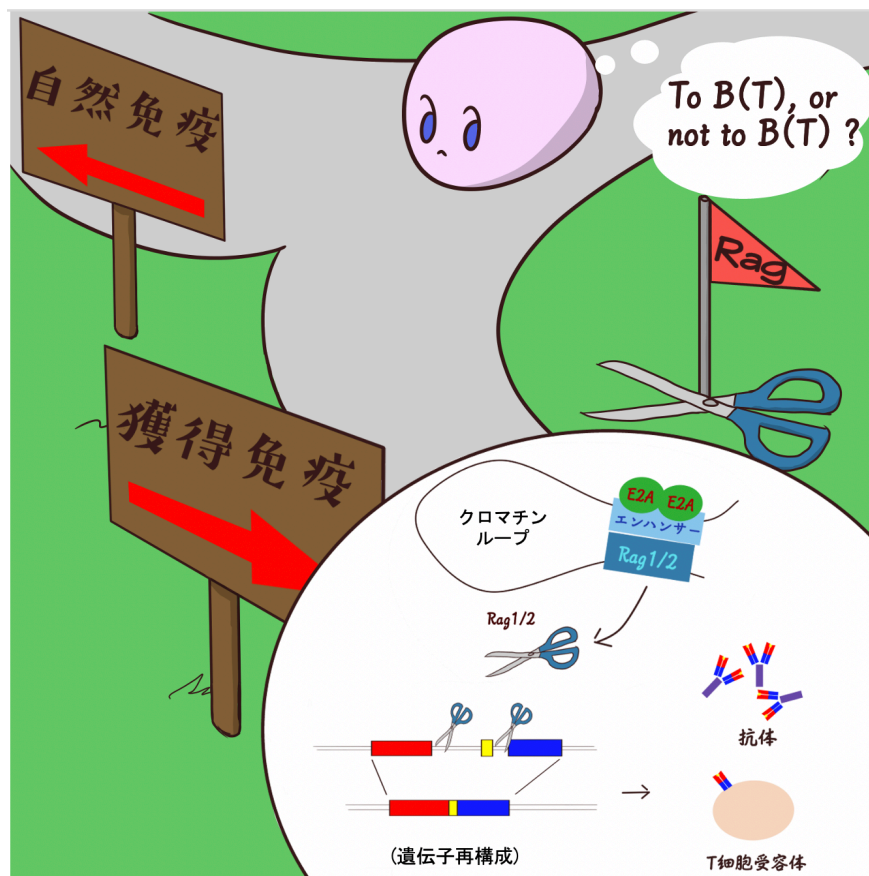
B 細胞、T 細胞による獲得免疫の始まりの謎を解明 —転写因子 E2A が Rag 遺伝子を制御する—

概要

免疫は、獲得免疫と自然免疫が協力して働くことでウイルスなどの病原体から体を守ります。この中で、抗体や T 細胞受容体によって、特異的な抗原を感知して炎症反応を起こすことができるのが、獲得免疫の特徴です。この反応は、ワクチン接種によりウイルスなどに対する特異的な抗体を作るときにも重要となります。この抗体や T 細胞受容体は、Rag1/Rag2 という分子による遺伝子再構成によって作られますが、この Rag1/Rag2 分子の発現がどの様に調節されているのかは、明らかではありませんでした。

京都大学ウイルス・再生医科学研究所の宮崎和子研究員(再生免疫)、宮崎正輝同准教授(再生免疫)、渡邊仁美同助教(統合生体プロセス)、化学研究所の緒方博之教授らの研究グループは、Rag1/Rag2 分子の発現を制御する分子機構を明らかにしました。研究グループは、様々な遺伝子改変マウスを作製し、Rag1/Rag2 の発現を調節するエンハンサー領域(DNA 上で遺伝子の発現を調節する領域)を見つけ、そのエンハンサー領域が転写因子 E2A によりコントロールされることを証明しました。今回の研究は、長年議論されてきた【獲得免疫の始まり】を解明する重要な手がかりです。

本成果は、2020 年 9 月 5 日に、米国の国際学術誌「Science Immunology」にオンライン掲載されました。



1. 背景

私たちの体には、免疫システムと呼ばれる、ウィルスや細菌などの感染から体を守る機能があります。免疫システムには、自然免疫と獲得免疫の二つがあり、この二つが協力して病原体から体を守っています。自然免疫は、主に病原体の構造を認識するのに対し（非特異的反応）、獲得免疫はウィルスなどの細かいタンパク質（抗原）の違いを認識し、特異的な反応を起こします。獲得免疫は、B細胞とT細胞が特異的な抗原を感知して起こす反応で、ウィルスに対する感染防御や、癌免疫反応、アレルギー反応などが獲得免疫によって行われます。この特異的な反応は、遺伝子を組み換えることで作られた特殊な受容体（抗体、T細胞受容体）により行われます。この遺伝子の組換えを行っているのが、Rag1, Rag2 という分子です。Rag1/Rag2 分子は、B細胞と T 細胞だけが発現できる非常に特殊な分子です。言い換えると、獲得免疫（B,T 細胞）の始まりは、Rag1/Rag2 分子が発現するかどうかで決まる、とも言えます。では、この分子は、どうして獲得免疫の細胞だけ発現して、他の細胞は発現しないのでしょうか？ そして、この Rag1/Rag2 の発現をコントロールする因子は、長年議論されてきた、『獲得免疫と自然免疫の分かれ道はどういう因子によって調節されているのか？』の答えになるとも考えられます。

2. 研究手法・成果

遺伝子の発現は、エンハンサーと呼ばれる DNA ゲノム上の領域により調節されています。そこでまず、Rag1/Rag2 の発現を調節するエンハンサーを見つけるため、T細胞とB細胞における過去のゲノム解析の再解析を行いました。結果、Rag1/Rag2 遺伝子の近くには、エンハンサーと考えられる領域がいくつか存在し、そして、B細胞とT細胞では異なる領域がエンハンサーとして機能している可能性が考えられました。そこで、それらの領域が本当にエンハンサーとして Rag1/Rag2 の発現に必須であるのかを確かめるため、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを利用して、それぞれの領域を欠損する遺伝子改変マウスを作製しました（参考図表1）。結果、B細胞特異的なエンハンサー欠損マウスではB細胞でだけ Rag1/Rag2 の発現が障害され、T細胞特異的なエンハンサー欠損マウスではT細胞でだけその発現が障害されていました。このことは、同じ獲得免疫リンパ球であり、共に Rag1/Rag2 を発現する B細胞と T細胞が、全く異なる調節を受けていることを意味する、非常に興味深い結果でした。

これらのエンハンサー領域には、B細胞に特異的な転写因子や、T細胞に特異的な転写因子が多数集まっていたことから、どの因子が一番重要なのかを検討しました。多くの因子の中で、転写因子 E2A は B細胞でも T細胞でも共通の因子としてエンハンサー領域に結合していたことから、E2A に着目しました。転写因子 E2A は、E ボックスと呼ばれる特徴的な DNA 配列に結合し、標的の遺伝子の発現を誘導します。そこで、エンハンサーにおける E2A の重要性を示すために、T細胞のエンハンサー領域の E ボックス配列だけを入れ替えた、E ボックス変異マウスを作製しました。これにより、E2A は結合できないが、他の因子は結合できるエンハンサーができたことになります。予想した通り、E ボックスの変異マウスでは Rag1/Rag2 の発現が障害されていたことから、転写因子 E2A が Rag1/Rag2 の発現に非常に重要な因子であることが証明できました。このことから、獲得免疫の細胞になるのか、それとも自然免疫の細胞になるのかは、転写因子 E2A の働きで決まるとも言え、長年の議論に答える結果と言えます。

さらに、このエンハンサーがどのようにして Rag1/Rag2 遺伝子の発現調節を行うのかについて、⁽¹⁾クロマチン免疫沈降法(ChIP-seq), ⁽²⁾網羅的オープンクロマチン解析(ATAC-seq), ⁽³⁾クロマチン相互作用解析法 (in situ HiC) を用いて検討しました。結果、転写因子 E2A がこのエンハンサー領域に結合することで、コヒーシオンや CTCF といった⁽⁴⁾クロマチンルーピングを誘導する分子を呼び寄せ、この遺伝子座が⁽⁵⁾スーパーエンハン

サーと呼ばれる特殊な構造を形成し、それによりエンハンサーと遺伝子のプロモーターが相互作用し、Rag1/Rag2 が発現することがわかりました（参考図表2）。

これまで、有顎脊椎動物（ヤツメウナギより上位）は Rag1/Rag2 遺伝子を持っていることから、これらの脊椎動物では、人間と同じ様な獲得免疫のシステムを持っていると考えられてきました。そこで我々は、“果たして今回見つけたエンハンサーは、進化の過程でどうなっているのだろうか？”という疑問を持ちました。そのため、様々な動物の遺伝子の配列を比較しました。面白いことに、今回見つけた Rag1/Rag2 のエンハンサー領域は、陸生動物（哺乳類、鳥類、爬虫類）は持っていました、水生動物（魚類、両生類）は持っていませんでした。このことは、水から陸へと生活環境を変えたことと、獲得免疫の中心である Rag1/Rag2 の発現調節に何らかの関連性がある可能性を示しており、生物の多様な進化と獲得免疫の進化に繋がりがあられるのかもしれない。

3. 波及効果、今後の予定

人間の体は、数百種類の細胞で成り立っていると言われています。なぜ同じ DNA を持つ細胞がこれだけ多くの多様な機能を持てるのか？ これは、体の中の細胞が数百種類の異なる遺伝子発現プログラムを持っているためです。多様な細胞が、このプログラムに従い、それぞれの特異的な機能を発揮することで生物個体として生きていけるのです。細胞ごとに特異的なエンハンサー領域を使うことで、色々な遺伝子の発現量、発現パターンなどを作り出し、異なる遺伝子発現プログラムを実行できるのです。

今回の研究は、【獲得免疫の始まり】の解明に繋がる重要な発見であり、細胞ごとに違う遺伝子発現プログラムがどうやって転写因子によってコントロールされているのか、その分子機構の解明の一端を担うものです。こうした研究を積み重ねることで、生物がどのように維持され、そしてどう進化してきたのか、免疫細胞を調べることで明らかにしていきたいと思います。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、科学研究費補助金、持田記念医学薬学振興財団、武田科学振興財団の支援を受けて行われました。

<研究者のコメント>

この研究は、これまで私達が取り組んできた、【獲得免疫の始まりを解明する】というテーマの重要なマイルストーンになる研究だと思っています。生物は本当に精巧に作られたシステムであり、生物は進化の過程で驚くほど洗練されて今生き残っているのだ、と改めて実感しました。

多くの共同研究の先生方のご協力により、この研究を論文にすることができたことを深く感謝致します。

<用語解説>

（1）**ChIP-seq 法**；クロマチン免疫沈降法と次世代シーケンサーを組み合わせた技術で、抗体により免疫沈降した DNA 断片を使い、クロマチン修飾によるエピジェネティクス解析や転写因子の結合部位を網羅的に解析する技術。

（2）**ATAC-seq 法**；トランスポゼースを使い、次世代シーケンサーを利用し、オープンになっているクロマチン領域を網羅的に解析する技術。エンハンサーやプロモーター領域の解析に非常に有用な実験法。

（3）**in situ HiC 法**；クロマチン相互作用（例えば、エンハンサーとプロモーターのループの形成など）を全ゲノムを対象に網羅的に解析する方法。これにより、ゲノムの3次元構造を解析することが可能となる。

(4) **クロマチンルーピング**；同じ染色体にあるゲノムの領域が輪を作って、物理的な距離を縮めるためにつくる構造（図2のような輪）。遠くにあるエンハンサーとプロモーターが相互作用するために必要であるが、全ての構造がそのためにあるとは限らない。最近、その分子機構が徐々に解明され、教科書が大きく書き換わることが期待される。

(5) **スーパーエンハンサー**；ChIP-seq 解析のデータを利用して、エンハンサーを活性化を基準に分類した時に見える、遺伝子の発現活性の高い領域に認められるエンハンサー領域。細胞種によって異なる領域に形成され、細胞の特徴に必要な遺伝子の近くに形成されることが多く、細胞の特性と一致することから注目を集めている。

<参考図表>

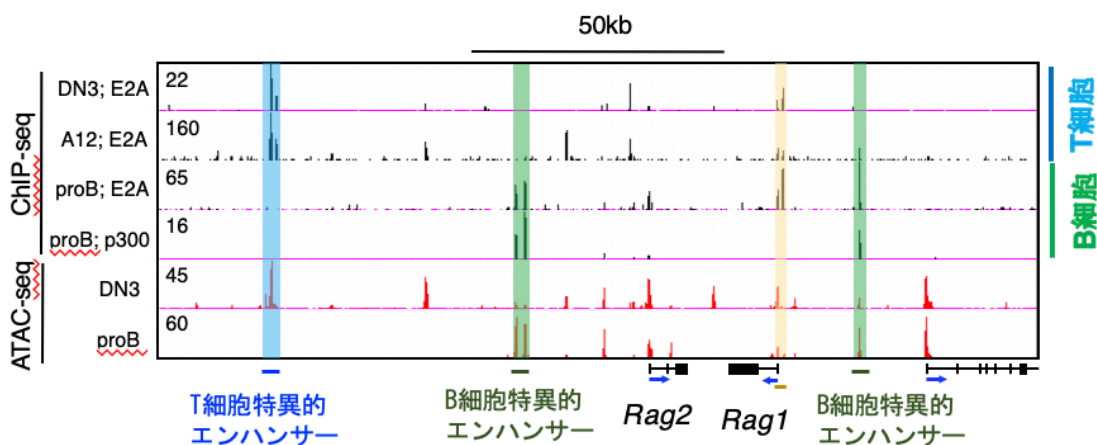


図1 Rag1/2遺伝子座におけるT, B細胞特異的なエンハンサー

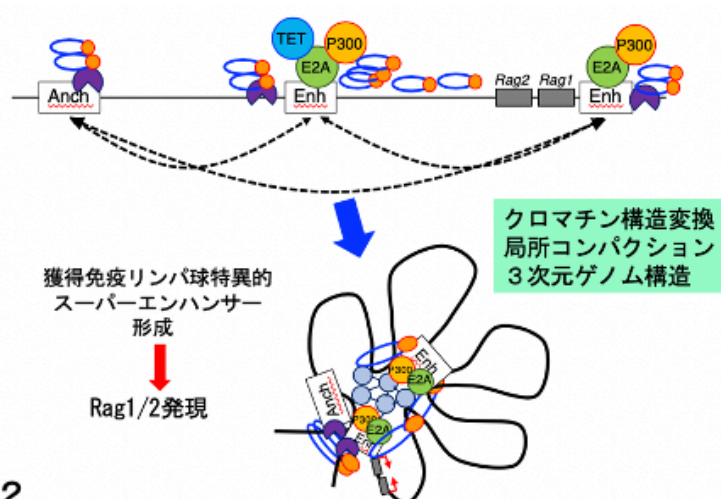


図 2

T, B細胞における、E2Aによるクロマチン構造変換と特異的なスーパーエンハンサー形成

<論文タイトルと著者>

タイトル：The transcription factor E2A activates multiple enhancers that drive Rag expression in developing T and B cells. (転写因子 E2A は、エンハンサーを活性化することで、T, B 細胞の分化段階での Rag 遺伝子の発現を作動させる。)

著 者：Kazuko Miyazaki, Hitomi Watanabe, Genki Yoshikawa, Kenian Chen, Reiko Hidaka, Yuki Aitani, Kai Osawa, Rie Takeda, Yotaro Ochi, Shizue Tani-ichi, Takuya Uehata, Osamu Takeuchi, Koichi Ikuta, Seishi Ogawa, Gen Kondoh, Yin C Lin, Hiroyuki Ogata and Masaki Miyazaki

掲 載 誌：Science Immunology DOI : 10.1126/sciimmunol.abb1455