

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation
- 研究開発課題名： (日本語) 定量的エピゲノム解析法の開発と細胞分化機構の解明
(英語) Development of quantitative epigenome analysis and understanding of cell differentiation mechanisms
- 研究開発担当者 (日本語) 大学院医学系研究科 教授 五十嵐和彦
所属 役職 氏名： (英語) Kazuhiko Igarashi, Professor, Graduate School of Medicine
- 実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語)
開発課題名： (英語)
- 研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

ChIP-Seq 技術は、免疫沈降した DNA のシーケンス反応を行い、ゲノム上にはり付いたタグ数をカウントすることでヒストン修飾量や転写因子結合量を判定する方法である。本年度は、昨年度に引き続き以下の検証実験と応用実験を進め、基本技術として完成させた。マウス初代 B リンパ球から形質細胞の分化を効率良く誘導する系（既に樹立済み）を用いて、Irf4 の定量的結合部位マップを完成させた。同系を用いて、ヒストン H3 K4me3, H3 K9me3, H3K27Ac の定量的結合部位マップを完成させた。新たに機能を証明しつつある新規クロマチン因子について、結合マップを作成した。

上記実験で得られる情報を有効に活用してドライバーエピゲノム領域を特定するために、bisulfite-シーケンス法を用いてマウス成熟 B 細胞および形質細胞のメチル化 DNA 領域を比較できるデータセットを得た。そこでこのデータセットの情報科学解析を進めた。特に Irf4 結合部位とヒストン修飾の関係について新たな知見を得た。

これらデータセットを統合解析することで B リンパ球から形質細胞へ至る過程でのクロマチン動態と分化制御に密接に関わるドライバーエピゲノム領域の特定を進めた。この領域は Irf4 や Bach2 が作用するスーパーエンハンサーやスーパーサイレンサーである可能性を念頭にデータを調べた。さらに、新規クロマチン因子によるヘテロクロマチン化の標的である可能性も検討し、この仮説を支持する結果を得た。

24 年度の解析により、形質細胞分化と共に代謝酵素 X の発現が強く誘導されることを見いだした。さらに前年度の B1-8Hi 細胞を用いたノックダウン実験で、同酵素が形質細胞分化に重要であることを示す結果も得ている。本酵素が形質細胞分化に伴い誘導されることは、形質細胞分化時のエピゲノム大規模改変への関与が考えられる。そこで、本酵素と核内で相互作用するタンパク質のネットワークを質量分析などにより調べた。同酵素が、B 細胞や形質細胞で重要とされる転写因子群に加え、クロマチンリモデリング因子、ヒストン修飾因子、核膜因子、輸送因子などと相互作用することを見いだした。

試験管内高効率形質細胞分化誘導系を用いて、B リンパ球と形質細胞の核タンパク質のプロファイリングを進めて来た。この中から機能不明でありクロマチン機能が想定されるものについて、ノックダウン実験等を進め、機能を検討した。詳細な機能解析は今後の課題となった。

まこれまでにヘテロクロマチン形成に関わるものが予想される新規クロマチン因子の発現が形質細胞分化とともに強く誘導されることを見だし、しかもこれは Bach2 および Irf4 の直接標的であることも ChIP-Seq 実験等により証明した。そこで同遺伝子の B リンパ球特異的ノックアウトマウスを作成し、形質細胞分化が障害されることを見いだした。このノックアウト細胞の遺伝子発現プロファイリングを実施し、B リンパ球において他の血液細胞に特異的とされる遺伝子群の発現が上昇することを見いだした。Bach2 や IRF4 はこのクロマチン因子の発現を調節することで、形質細胞分化を促進するとともに、他系列の特性をサイレンシングするという機能を有することが考えられる。

We modified the ChIP-Seq method so that more accurate and reproducible results can be obtained. Using this modified method, we carried out mapping of Irf4 binding sites during the course of plasma cell differentiation using the B1-8Hi cell system, with which we could induce plasma cell differentiation in vitro at extremely high efficiency compared with previous cell systems. We also mapped using this cell system distribution of histone modifications including H3K27Ac and H3K9Me3. We also tried to map binding sites of new chromatin factor we identified previously as a target of IRF4 and Bach2. To identify the so called driver epigenome regions, we further carried out bisulfite reaction-mediated DNA sequencing of DNA methylation. By integrating these data sets, we identified several driver epigenome regions which appear to be regulated by Irf4 and/or Bach2 during the course of plasma cell differentiation. We think two of the important findings is that Irf4 and Bach2 counteract each other at the level of histone modification on many of these chromatin regions, and that the new chromatin factor appears to regulate higher order structure of these chromatin regions.

During the course of this project, we found that an enzyme for the synthesis of epigenetic metabolite is highly induced during the differentiation of plasma cell differentiation. This enzyme was found virtually essential for plasma cell differentiation by its knockdown in the B1-8Hi cell system. This enzyme may facilitate global changes in the epigenomic status upon plasma cell differentiation. To further investigate this possibility, we purified this enzyme from primary B cells and cultured plasma cells, and identified interacting proteins using mass spectrometry analysis. Chromatin related proteins such as histone modifiers, readers, and writers, as well as proteins interacting with nuclear membrane and transporters were found as putative interacting proteins of this enzyme. In parallel, we also compared nuclear proteins in B cells and plasma cells using quantitative mass spectrometry. Several factors which were found in the both analyses were further characterized in terms of plasma cell differentiation using knockdown in primary B cells. Further analyses will be carried out in the near future.

Another interesting chromatin-related factor was also analyzed. This factor was direct downstream of both Bach2 and Irf4 according to the above ChIP-Seq analyses. Its expression was strongly induced during the course of plasma cell differentiation from B cells in vitro. To understand its function, we generated B cell-specific knockout using several lines of B cell-specific Cre line. The results clearly showed that this factor is essential for plasma cell differentiation. Critical plasma cell genes were not induced in the absence of this factor. Importantly, genes which are important for other hematopoietic lineages were de-repressed in the absence of this factor, suggesting that this factor regulates gene expression pattern by silencing B and other lineage-related genes in plasma cells.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2 件、国際誌 12 件）

1. Igarashi, K., Kurosaki, T. and Roychoudhuri, R. BACH transcription factors in innate and adaptive immunity. **Nature Rev. Immunol.** in press (2017)
2. Sato, Y., Katoh, Y., Matsumoto, M., Sato, M., Ebina, M., Itoh-Nakadai, A., Funayama, R., Nakayama, K., Unno, M. and Igarashi, K. Regulatory signatures of liver regeneration distilled by integrative analysis of mRNA, histone methylation, and proteomics. **J. Biol. Chem.** in press (2017)
3. Alam, M.M., Okazaki, K., Nguyen, L.T., Ota, N., Kitamura, H., Murakami, S., Shima, H., Igarashi, K., Sekine, H. and Motohashi H. Glucocorticoid receptor signaling represses the antioxidant response by inhibiting histone acetylation mediated by the transcriptional activator NRF2. **J. Biol. Chem.** in press (2017)
4. Noujima-Harada, M., Takata, K., Miyata-Takata, T., Sakurai, H., Igarashi, K., Ito, E., Nagakita, K., Taniguchi, K., Ohnishi, N., Omote, S., Tabata, T., Sato, Y. and Yoshino, T. Frequent downregulation of BACH2 expression in Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma. **Cancer Sci.** in press (2017)
5. Itoh-Nakadai, A., Matsumoto, M., Kato, H., Sasaki, J., Uehara, Y., Sato, Y., Ebina-Shibuya, R., Morooka, M., Funayama, R., Nakayama, K., Ochiai, K., Muto, A. and Igarashi, K. A Bach2-Cebp gene regulatory network for the commitment of multipotent hematopoietic progenitors. **Cell Rep.** 18, 2401-2414 (2017)
6. Kobayashi, M., Kato, H., Hada, H., Itoh-Nakadai, A., Fujiwara, T., Muto, A., Inoguchi, Y., Ichianagi, K., Houjo, W., Tomosugi, N., Sasaki, H., Harigae, H. and Igarashi, K. Iron-heme-Bach1 axis is involved in erythroblast adaptation to iron deficiency. **Haematologica**, 102, 454-465 (2016)
7. Ebina-Shibuya, R., Watanabe-Matsui, M., Matsumoto, M., Itoh-Nakadai, A., Funayama, R., Nakayama, K., Muto, A., and Igarashi, K. The double knockout of Bach1 and Bach2 in mice reveals shared compensatory mechanisms in regulating alveolar macrophage function and lung surfactant homeostasis. **J. Biochem.** 160, 333-334 (2016) (selected as a featured article)
8. Shima, H., Inagaki, A., Imura, T., Yamagata, Y., Watanabe, K., Igarashi, K., Goto, M., and Murayama, K. Collagen V Is a Potential Substrate for Clostridial Collagenase G in Pancreatic Islet Isolation. **J. Diabetes Res.** 2016:4396756 (2016)
9. Igarashi, K. and Itoh-Nakadai A. Orchestration of B lymphoid cells and their inner myeloid by Bach. **Curr. Opin. Immunol.** 39, 136-142 (2016)
10. Roychoudhuri, R., Clever, D., Li, P., Wakabayashi, Y., Quinn, K.M., Klebanoff, C.A., Ji, Y., Sukumar, M., Eil, R.L., Yu, Z., Spolski, R., Palmer, D.C., Pan, J.H., Patel, S.J., Macallan, D.C., Fabozzi, G., Shih, H.Y., Kanno, Y., Muto, A., Zhu, J., Gattinoni, L., O'Shea, J.J., Okkenhaug, K., Igarashi, K., Leonard, W.J., and Restifo, N.P. BACH2 regulates CD8⁺ T cell

- differentiation by controlling access of AP-1 factors to enhancers. *Nature Immunol.* 17, 851-860 (2016)
11. Matsumoto, M., Kondo, K., Shiraki, T., Brydun, A., Funayama, R., Nakayama, K., Yaegashi, N., Katagiri, H. and Igarashi, K. Genomewide approaches for BACH1 target genes in mouse embryonic fibroblasts showed BACH1-Pparg pathway in adipogenesis. *Genes Cells* 21, 553-567 (2016)
 12. Tanaka, H., Muto, A., Shima, H., Katoh, Y., Sax, N., Tajima, S., Brydun, A., Ikura, T., Yoshizawa, N., Masai, H., Hoshikawa, Y., Noda, T., Nio, M., Ochiai, K. and Igarashi, K. Epigenetic regulation of the Blimp-1 gene in B cells involves Bach2 and histone deacetylase 3. *J. Biol. Chem.* 291, 6316-6330 (2016)
 13. 五十嵐和彦 代謝経路とエピジェネティクス制御系のクロストークとストレス応答 心身医学 57, 343-349 (2017)
 14. 五十嵐和彦 エピエネティック代謝物の地産地消 五十嵐和彦、井倉毅 最新医学 72, 685-692 (2017)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 松本光代、佐藤好宏、佐藤正規、舟山亮、中山啓子、海野倫明、五十嵐和彦 網羅解析を通して門脈結紮時における肝再生の分子メカニズムにせまる NGS 現場の会第五回研究会 (2017年5月22-24日 仙台 仙台国際センター展示場) ポスター発表
2. Yoshihiro Sato, Hideo Ohtsuka, Koji Fukase, YasutakeKatoh, Mitsuyo Matsumoto, Masayuki Ebina, KyoheiAriake, KunihiroMasuda, MasamichiMizuma, NaoakiSakata, Kei Nakagawa, Hiroshi Hayashi, TakanoriMorikawa, FuyuhikoMotoi, Takeshi Naitoh, Kazuhiko Igarashi, Michiaki Unno Investigation of the molecular mechanism of liver regeneration following portal vein branch ligation by the multi-omicsapproach The 117th Annual Congress of Japan Surgical Society, Yokohama, Japan April 24, 2017 (oral presentation)
3. Hiroki Shima, Mitsuyo Matsumoto, Masayuki Ebina, Akihiko Muto, Yuho Sato, Kyoko Ochiai, Sayaka Kumagai, and Kazuhiko Igarashi The expression of methionine adenosyltransferase MAT2A is regulated through mRNA stability mediated by methyl-6-adenosine in its 3' UTR. 6th Meeting of Asian Forum of Chromatin and Chromosome Biology, India, Mar 04, 2017 (oral presentation)
4. 島弘季、松本光代、蝦名真行、武藤哲彦、熊谷さやか、五十嵐和彦 メチル基ドナーSAMを合成するMAT2Aの発現は、mRNAのメチル化を介した転写後調節によってフィードバック制御される AMED-CREST「エピゲノム」平成28年度領域会議 (2017年2月3日 東京都千代田区 CIV研修センター秋葉原) ポスター発表
5. 島弘季、松本光代、蝦名真行、武藤哲彦、熊谷さやか、五十嵐和彦 S-アデノシルメチオニン合成酵素MAT2Aの発現は3' UTRアデニンメチル化が介するmRNA安定性により制御される 第89回日本生化学会大会 (2016年11月30日、12月2日 横浜市 パシフィコ横浜) 口頭およびポスター発表

6. K. Igarashi, “Regulatory mechanisms and biological significance of the local production of S-adenosylmethionine for local consumption in nuclei” 11th Asian Epigenomics Meeting, Sep 30 - Oct 1, 2016, JNCASR, Bangalore, India. (oral presentation)
7. Akihiko Muto, Sax Nicolas, Mitsuyo Matsumoto, Kazuhiko Igarashi. Elucidation of Gene Regulatory Network in Activated B cells by Single-Cell Analysis 第 89 回 日本生化学会大会 (2016 年 9 月 26 日 月曜日 仙台市 東北大学川内北キャンパス) 口頭発表
8. 五十嵐和彦 ”Inner myeloid の遺伝子制御ネットワークとその環境応答機構” 日本生化学会大会シンポジウム「細胞外環境を転写とエピゲノムへ統合する分子機構」 2016 年 9 月 26 日
9. 島弘季、松本光代、蝦名真行、武藤哲彦、熊谷さやか、五十嵐和彦 S-アデノシルメチオニン合成酵素 MAT2A の発現は 3'UTR アデニンメチル化が介する mRNA 安定性により制御される 第 89 回日本生化学会大会 (2016 年 9 月 25 日 仙台市 仙台国際センター) 口頭およびポスター発表
10. 五十嵐和彦 “代謝経路とエピジェネティクス制御系のクロストークとストレス応答” 第 57 回日本心身医学会総会 特別講演 仙台国際センター 2016 年 6 月 5 日
11. 五十嵐和彦 “S-アデノシルメチオニン (SAM) の地産地消機構とその意義” 第 34 年会日本生化学会北陸支部大会シンポジウム「転写産物のダイナミクスとそこからかいま見る生命像」金沢大学 2016 年 5 月 28 日
12. 武藤哲彦 活性化 B 細胞の多様化と形質細胞分化を調節する Bach2 遺伝子ネットワークの解明 日本生化学会 東北支部 第 82 回例会 (2016 年 5 月 21 日 弘前市 弘前大学医学部 基礎大講堂) 口頭発表
13. 五十嵐和彦 S-アデノシルメチオニン (SAM) の地産地消機構とその意義 日本薬学会第 136 年会シンポジウム「メタボライトとエピゲノム」招待講演 (2016 年 3 月 28 日 横浜市)
14. 五十嵐和彦 S-アデノシルメチオニン地産地消機構 ver2 ～クロマチンと RNA の制御～ 京都大学放射線生物研究センター 招待講演 (2016 年 3 月 4 日 京都市)
15. 五十嵐和彦 細胞分化・応答を制御する遺伝子制御ネットワーク ～肝臓と B リンパ球へのアプローチ～ 第 28 回がん・エピゲノム研究会 特別講演 (2016 年 1 月 27 日 仙台市)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

無し

(4) 特許出願

無し