

STAT5 Orchestrates Local Epigenetic Changes for Chromatin Accessibility and Rearrangements by Direct Binding to the TCR $\gamma$  Locus

(STAT5 は T 細胞受容体 $\gamma$ 遺伝子座に直接結合することでクロマチンのアクセシビリティと再編成のための局所的なエピジェネティクス変化を制御する)

我妻 慶祐、谷一 靖江、梁 冰霏、設楽 宗一朗、石原 宏、阿部 学、宮地 均、北野 さつき、原 崇裕、南野 昌信、石川 博通、崎村 建司、中尾 光善、木村 宏、生田 宏一

インターロイキン7受容体(IL-7R)は転写因子STAT5を活性化し、T細胞受容体(TCR) $\gamma$ 遺伝子座のアクセシビリティと再編成を制御する。STAT結合配列がJ $\gamma$ プロモーターとE $\gamma$ エンハンサーに保存されているが、TCR $\gamma$ 遺伝子再編成におけるその生体内機能は未だ不明である。この問題を明らかにするため、3つのSTATモチーフを含む940塩基対のJ $\gamma$ 1プロモーター領域を欠失したJ $\gamma$ 1P $^{\Delta/\Delta}$ マウスと、J $\gamma$ 1プロモーター内の3つのSTATモチーフに点変異を導入したJ $\gamma$ 1P $^{mS/mS}$ マウスを作製した。まず、J $\gamma$ 1P $^{mS/mS}$ マウス胸腺細胞において、STAT5のJ $\gamma$ 1プロモーターへの結合が完全に障害されていることを確認した。次に、J $\gamma$ 1P $^{\Delta/\Delta}$ およびJ $\gamma$ 1P $^{mS/mS}$ マウス胸腺細胞において、クロマチンのアクセシビリティの指標であるgermline転写、ヒストンH3アセチル化、H3リジン4(H3K4)のメチル化(H3K4me1、H3K4me2、H3K4me3)を解析したところ、いずれもJ $\gamma$ 1遺伝子に特異的に著しく低下していた。H3K4me3は転写活性の活発な領域でそのレベルが高いだけではなく、組換え酵素のRAG2が直接認識して結合することが知られている。したがって、STAT5がJ $\gamma$ 1プロモーターのSTATモチーフへ結合することで、J $\gamma$ 1領域のクロマチンのアクセシビリティが増大するだけではなく、H3K4me3を介してRAG2がJ $\gamma$ 1領域に直接リクルートされることが示唆される。また、クロマチンリモデリング因子SWI/SNFの触媒サブユニットBRG1のJ $\gamma$ 1領域への結合も著しく低下していた。SWI/SNFはTCR $\beta$ や免疫グロブリン重鎖(IgH)遺伝子座にリクルートされ、それらの遺伝子座のアクセシビリティと組換えに必須であることが報告されていることから、TCR $\gamma$ 遺伝子座においても同様の働きをしていることが考えられる。さらに、J $\gamma$ 1P $^{\Delta/\Delta}$ およびJ $\gamma$ 1P $^{mS/mS}$ マウス胸腺細胞においてJ $\gamma$ 1遺伝子のDNA二重鎖切断と組換えが特異的に著しく低下しており、J $\gamma$ 1遺伝子と組換えをおこすV $\gamma$ 2、V $\gamma$ 5遺伝子を発現する $\gamma\delta$ T細胞が、胸腺や小腸上

皮で大きく減少していた。同様に  $J\gamma 1P^{\Delta/\Delta}$  および  $J\gamma 1P^{mS/mS}$  マウス胎仔胸腺細胞において  $J\gamma 1$  遺伝子の組換えが著しく低下しており、成体における  $V\gamma 3$  陽性表皮内  $\gamma\delta T$  細胞が減少していた。これらの結果は、 $J\gamma 1P^{\Delta/\Delta}$  および  $J\gamma 1P^{mS/mS}$  マウスで  $J\gamma 1$  遺伝子のアクセシビリティが特異的に著しく低下していることと一致している。最後に、 $J\gamma 1$  プロモーターと  $E\gamma 1$  エンハンサーのループ形成を Chromosome Conformation Capture (3C)法を用いて解析したところ、コントロールマウス胸腺細胞では  $J\gamma 1$  と  $E\gamma 1$  が結合していたが、 $J\gamma 1P^{mS/mS}$  マウスではそれが著しく障害されていた。このことより、 $J\gamma 1$  遺伝子と  $E\gamma 1$  のループ形成によって  $J\gamma 1$  遺伝子の組換えが制御されることが示唆され、そのループ形成には  $J\gamma 1$  プロモーターへの STAT5 のリクルートが必須であることが明らかになった。しかし、 $E\gamma 1$  と  $J\gamma 1$  プロモーターのループ形成の役割を明らかにするため、 $E\gamma 1$  領域を欠失したマウス( $E\gamma 1^{-/-}$ )を作成し germline 転写を解析したところ、大きな影響は認められなかった。 $E\gamma 1$  は DNase I Hypersensitivity site (HsA)と冗長的に TCR $\gamma$ 遺伝子座を制御することが知られていることから、 $E\gamma 1^{-/-}$  マウスでは  $E\gamma 1$  の機能を HsA や他の制御領域が補償している可能性が示唆される。以上の結果から、STAT5 が  $J\gamma$ プロモーターの STAT モチーフへ結合することが、 $J\gamma$ 領域の局所的なアクセシビリティと  $J\gamma$ と  $E\gamma$ クロマチンのループ形成に必須であり、TCR $\gamma$ 遺伝子座の組換えを誘導することが示された。一方で TCR $\gamma$ 遺伝子座全体の広汎なアクセシビリティと組換えの制御には  $E\gamma$  が重要な役割を担っていると考えられる。

論文の全文は以下のリンク先で 2016 年 8 月よりオープンアクセスとして公開される予定である。

<http://www.jimmunol.org/content/195/4/1804.long>

(The Journal of Immunology, August 15, 2015, vol. 195, no. 4, 1804–1814,  
doi: 10.4049/jimmunol.1302456)

## 引用文献

1. Yancopoulos, G. D., and F. W. Alt. 1985. Developmentally controlled and tissue-specific expression of unarranged  $V_H$  gene segments. *Cell* 40: 271-281.
2. Krangel, M. S. 2003. Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond. *Nat. Immunol.* 4: 624-630.
3. Inlay, M., F. W. Alt, D. Baltimore, and Y. Xu. 2002. Essential roles of the  $\kappa$  light chain intronic enhancer and 3' enhancer in  $\kappa$  rearrangement and demethylation. *Nat Immunol* 3: 463-468.
4. Bories, J. C., J. Demengeot, L. Davidson, and F. W. Alt. 1996. Gene-targeted deletion and replacement mutations of the T-cell receptor  $\beta$ -chain enhancer: the role of enhancer elements in controlling V(D)J recombination accessibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7871-7876.
5. Bouvier, G., F. Watrin, M. Naspetti, C. Verthuy, P. Naquet, and P. Ferrier. 1996. Deletion of the mouse T-cell receptor  $\beta$  gene enhancer blocks  $\alpha\beta$  T-cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7877-7881.
6. Sleckman, B. P., C. G. Bardon, R. Ferrini, L. Davidson, and F. W. Alt. 1997. Function of the TCR  $\alpha$  enhancer in  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells. *Immunity* 7: 505-515.
7. Sakai, E., A. Bottaro, L. Davidson, B. P. Sleckman, and F. W. Alt. 1999. Recombination and transcription of the endogenous Ig heavy chain locus is effected by the Ig heavy chain intronic enhancer core region in the absence of the matrix attachment regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1526-1531.
8. Villey, I., D. Caillol, F. Selz, P. Ferrier, and J. P. de Villartay. 1996. Defect in rearrangement of the most 5' TCR-J $\alpha$  following targeted deletion of T early  $\alpha$  (TEA): implications for TCR $\alpha$  locus accessibility. *Immunity* 5: 331-342.
9. Whitehurst, C. E., S. Chattopadhyay, and J. Chen. 1999. Control of V(D)J recombinational accessibility of the D $\beta$ 1 gene segment at the TCR $\beta$  locus by a germline promoter. *Immunity* 10: 313-322.
10. Jhunjhunwala, S., M. C. van Zelm, M. M. Peak, and C. Murre. 2009. Chromatin architecture and the generation of antigen receptor diversity. *Cell* 138: 435-448.
11. Bertolino, E., K. Reddy, K. L. Medina, E. Parganas, J. Ihle, and H. Singh. 2005. Regulation of interleukin 7-dependent immunoglobulin heavy-chain variable gene rearrangements by transcription factor STAT5. *Nat. Immunol.* 6: 836-843.

12. Johnson, K., T. Hashimshony, C. M. Sawai, J. M. Pongubala, J. A. Skok, I. Aifantis, and H. Singh. 2008. Regulation of immunoglobulin light-chain recombination by the transcription factor IRF-4 and the attenuation of interleukin-7 signaling. *Immunity* 28: 335-345.
13. Reynaud, D., I. A. Demarco, K. L. Reddy, H. Schjerven, E. Bertolino, Z. Chen, S. T. Smale, S. Winandy, and H. Singh. 2008. Regulation of B cell fate commitment and immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Ikaros. *Nat. Immunol.* 9: 927-936.
14. Inlay, M. A., H. Tian, T. Lin, and Y. Xu. 2004. Important roles for E protein binding sites within the immunoglobulin κ chain intronic enhancer in activating VκJκ rearrangement. *J. Exp. Med.* 200: 1205-1211.
15. Maki, K., S. Sunaga, and K. Ikuta. 1996. The V-J recombination of T cell receptor- $\gamma$  genes is blocked in interleukin-7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* 184: 2423-2427.
16. Durum, S. K., S. Candèias, H. Nakajima, W. J. Leonard, A. M. Baird, L. J. Berg, and K. Muegge. 1998. Interleukin 7 receptor control of T cell receptor  $\gamma$  gene rearrangement: role of receptor-associated chains and locus accessibility. *J. Exp. Med.* 188: 2233-2241.
17. Ye, S. K., K. Maki, T. Kitamura, S. Sunaga, K. Akashi, J. Domen, I. L. Weissman, T. Honjo, and K. Ikuta. 1999. Induction of germline transcription in the TCR $\gamma$  locus by Stat5: implications for accessibility control by the IL-7 receptor. *Immunity* 11: 213-223.
18. Ye, S. K., Y. Agata, H. C. Lee, H. Kurooka, T. Kitamura, A. Shimizu, T. Honjo, and K. Ikuta. 2001. The IL-7 receptor controls the accessibility of the TCR $\gamma$  locus by Stat5 and histone acetylation. *Immunity* 15: 813-823.
19. Lee, H. C., S. K. Ye, T. Honjo, and K. Ikuta. 2001. Induction of germline transcription in the human TCR $\gamma$  locus by STAT5. *J. Immunol.* 167: 320-326.
20. Tani-ichi, S., M. Satake, and K. Ikuta. 2009. Activation of the mouse TCR $\gamma$  enhancers by STAT5. *Int. Immunol.* 21: 1079-1088.
21. Pray-Grant, M. G., J. A. Daniel, D. Schieltz, J. R. Yates, and P. A. Grant. 2005. Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* 433: 434-438.
22. Maki, K., S. Sunaga, Y. Komagata, Y. Kodaira, A. Mabuchi, H. Karasuyama, K.

- Yokomuro, J. I. Miyazaki, and K. Ikuta. 1996. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack  $\gamma\delta$  T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7172-7177.
23. Yao, Z., Y. Cui, W. T. Watford, J. H. Bream, K. Yamaoka, B. D. Hissong, D. Li, S. K. Durum, Q. Jiang, A. Bhandoola, L. Hennighausen, and J. J. O'Shea. 2006. Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 1000-1005.
24. Lee, E. C., D. Yu, J. Martinez de Velasco, L. Tessarollo, D. A. Swing, D. L. Court, N. A. Jenkins, and N. G. Copeland. 2001. A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* 73: 56-65.
25. Yagita, K., K. Horie, S. Koinuma, W. Nakamura, I. Yamanaka, A. Urasaki, Y. Shigeyoshi, K. Kawakami, S. Shimada, J. Takeda, and Y. Uchiyama. 2010. Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 3846-3851.
26. Kondo, S., Y. Takahashi, S. Shiozawa, H. Ichise, N. Yoshida, Y. Kanegae, and I. Saito. 2006. Efficient sequential gene regulation via FLP-and Cre-recombinase using adenovirus vector in mammalian cells including mouse ES cells. *Microbiol. Immunol.* 50: 831-843.
27. Kanegae, Y., G. Lee, Y. Sato, M. Tanaka, M. Nakai, T. Sakaki, S. Sugano, and I. Saito. 1995. Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucleic Acids Res.* 23: 3816-3821.
28. Lee, H. C., K. Tomiyama, S. K. Ye, K. Kawai, and K. Ikuta. 2002. Seeding of dendritic epidermal T cells in the neonatal skin is reduced in 129 strain of mice. *Immunol. Lett.* 81: 211-216.
29. Tani-Ichi, S., M. Satake, and K. Ikuta. 2011. The pre-TCR signal induces transcriptional silencing of the TCR $\gamma$  locus by reducing the recruitment of STAT5 and Runx to transcriptional enhancers. *Int. Immunol.* 23: 553-563.
30. Ikuta, K., T. Kina, I. MacNeil, N. Uchida, B. Peault, Y. H. Chien, and I. L. Weissman. 1990. A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells. *Cell* 62: 863-874.
31. Tani-ichi, S., H. C. Lee, S. K. Ye, and K. Ikuta. 2010. Accessibility control of TCR V $\gamma$  region by STAT5. *Int. Immunol.* 22: 693-703.

32. Agata, Y., T. Katakai, S. K. Ye, M. Sugai, H. Gonda, T. Honjo, K. Ikuta, and A. Shimizu. 2001. Histone acetylation determines the developmentally regulated accessibility for T cell receptor  $\gamma$  gene recombination. *J. Exp. Med.* 193: 873-880.
33. Liang, B., T. Hara, K. Wagatsuma, J. Zhang, K. Maki, H. Miyachi, S. Kitano, C. Yabe-Nishimura, S. Tani-Ichi, and K. Ikuta. 2012. Role of hepatocyte-derived IL-7 in maintenance of intrahepatic NKT cells and T cells and development of B cells in fetal liver. *J. Immunol.* 189: 4444-4450.
34. Mueller, P. R., and B. Wold. 1989. In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science* 246: 780-786.
35. Kimura, H., Y. Hayashi-Takanaka, Y. Goto, N. Takizawa, and N. Nozaki. 2008. The organization of histone H3 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Cell Struct. Funct.* 33: 61-73.
36. Hagège, H., P. Klous, C. Braem, E. Splinter, J. Dekker, G. Cathala, W. de Laat, and T. Forné. 2007. Quantitative analysis of chromosome conformation capture assays (3C-qPCR). *Nat. Protoc.* 2: 1722-1733.
37. Oestreich, K. J., R. M. Cobb, S. Pierce, J. Chen, P. Ferrier, and E. M. Oltz. 2006. Regulation of TCR $\beta$  gene assembly by a promoter/enhancer holocomplex. *Immunity* 24: 381-391.
38. Ji, Y., W. Resch, E. Corbett, A. Yamane, R. Casellas, and D. G. Schatz. 2010. The in vivo pattern of binding of RAG1 and RAG2 to antigen receptor loci. *Cell* 141: 419-431.
39. Liu, Y., R. Subrahmanyam, T. Chakraborty, R. Sen, and S. Desiderio. 2007. A plant homeodomain in RAG-2 that binds hypermethylated lysine 4 of histone H3 is necessary for efficient antigen-receptor-gene rearrangement. *Immunity* 27: 561-571.
40. Matthews, A. G., A. J. Kuo, S. Ramón-Maiques, S. Han, K. S. Champagne, D. Ivanov, M. Gallardo, D. Carney, P. Cheung, D. N. Ciccone, K. L. Walter, P. J. Utz, Y. Shi, T. G. Kutateladze, W. Yang, O. Gozani, and M. A. Oettinger. 2007. RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature* 450: 1106-1110.
41. Chakraborty, T., T. Perlot, R. Subrahmanyam, A. Jani, P. H. Goff, Y. Zhang, I. Ivanova, F. W. Alt, and R. Sen. 2009. A 220-nucleotide deletion of the intronic

- enhancer reveals an epigenetic hierarchy in immunoglobulin heavy chain locus activation. *J. Exp. Med.* 206: 1019-1027.
- 42. Schatz, D. G., and Y. Ji. 2011. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 251-263.
  - 43. Cui, K., C. Zang, T. Y. Roh, D. E. Schones, R. W. Childs, W. Peng, and K. Zhao. 2009. Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell* 4: 80-93.
  - 44. Li, B., M. Carey, and J. L. Workman. 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell* 128: 707-719.
  - 45. Osipovich, O., R. M. Cobb, K. J. Oestreich, S. Pierce, P. Ferrier, and E. M. Oltz. 2007. Essential function for SWI-SNF chromatin-remodeling complexes in the promoter-directed assembly of *Tcrb* genes. *Nat. Immunol.* 8: 809-816.
  - 46. Osipovich, O. A., R. Subrahmanyam, S. Pierce, R. Sen, and E. M. Oltz. 2009. SWI/SNF mediates antisense IgH transcription and locus-wide accessibility in B cell precursors. *J. Immunol.* 183: 1509-1513.
  - 47. Majumder, K., O. I. Koues, E. A. Chan, K. E. Kyle, J. E. Horowitz, K. Yang-Iott, C. H. Bassing, I. Taniuchi, M. S. Krangel, and E. M. Oltz. 2015. Lineage-specific compaction of *Tcrb* requires a chromatin barrier to protect the function of a long-range tethering element. *J. Exp. Med.* 212: 107-120.
  - 48. Xiong, N., C. Kang, and D. H. Raulet. 2002. Redundant and unique roles of two enhancer elements in the TCR $\gamma$  locus in gene regulation and  $\gamma\delta$  T cell development. *Immunity* 16: 453-463.
  - 49. Itohara, S., P. Mombaerts, J. Lafaille, J. Iacomini, A. Nelson, A. R. Clarke, M. L. Hooper, A. Farr, and S. Tonegawa. 1993. T cell receptor  $\delta$  gene mutant mice: independent generation of  $\alpha\beta$  T cells and programmed rearrangements of  $\gamma\delta$  TCR genes. *Cell* 72: 337-348.
  - 50. Subrahmanyam, R., and R. Sen. 2010. RAGs' eye view of the immunoglobulin heavy chain gene locus. *Semin. Immunol.* 22: 337-345.
  - 51. Kang, J., M. Coles, and D. H. Raulet. 1999. Defective development of  $\gamma\delta$  T cells in interleukin 7 receptor-deficient mice is due to impaired expression of T cell receptor  $\gamma$  genes. *J. Exp. Med.* 190: 973-982.
  - 52. Shimazaki, N., A. G. Tsai, and M. R. Lieber. 2009. H3K4me3 stimulates the

- V(D)J RAG complex for both nicking and hairpinning in trans in addition to tethering in cis: implications for translocations. *Mol. Cell* 34: 535-544.
- 53. Abarrategui, I., and M. S. Krangel. 2006. Regulation of T cell receptor- $\alpha$  gene recombination by transcription. *Nat. Immunol.* 7: 1109-1115.
  - 54. Abarrategui, I., and M. S. Krangel. 2007. Noncoding transcription controls downstream promoters to regulate T-cell receptor  $\alpha$  recombination. *EMBO J.* 26: 4380-4390.
  - 55. Du, H., H. Ishii, M. J. Pazin, and R. Sen. 2008. Activation of 12/23-RSS-dependent RAG cleavage by hSWI/SNF complex in the absence of transcription. *Mol. Cell* 31: 641-649.
  - 56. Cedar, H., and Y. Bergman. 2011. Epigenetics of haematopoietic cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 478-488.
  - 57. Durant, M., and B. F. Pugh. 2006. Genome-wide relationships between TAF1 and histone acetyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 26: 2791-2802.
  - 58. Kwon, J., K. B. Morshead, J. R. Guyon, R. E. Kingston, and M. A. Oettinger. 2000. Histone acetylation and hSWI/SNF remodeling act in concert to stimulate V(D)J cleavage of nucleosomal DNA. *Mol. Cell* 6: 1037-1048.
  - 59. Hassan, A. H., K. E. Neely, and J. L. Workman. 2001. Histone acetyltransferase complexes stabilize SWI/SNF binding to promoter nucleosomes. *Cell* 104: 817-827.
  - 60. Payer, E., A. Elbe, and G. Stingl. 1991. Circulating CD3 $^{+}$ /T cell receptor V $\gamma$ 3 $^{+}$  fetal murine thymocytes home to the skin and give rise to proliferating dendritic epidermal T cells. *J. Immunol.* 146: 2536-2543.
  - 61. Mallick-Wood, C. A., J. M. Lewis, L. I. Richie, M. J. Owen, R. E. Tigelaar, and A. C. Hayday. 1998. Conservation of T cell receptor conformation in epidermal  $\gamma\delta$  cells with disrupted primary V $\gamma$  gene usage. *Science* 279: 1729-1733.
  - 62. Osipovich, O., and E. M. Oltz. 2010. Regulation of antigen receptor gene assembly by genetic-epigenetic crosstalk. *Semin. Immunol.* 22: 313-322.