

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19026

研究課題名(和文) 転写因子IRF4タンパク質分解制御から解明するメモリーB細胞分化誘導機構

研究課題名(英文) Orchestration of memory B cell differentiation controlled by the regulation of IRF4 protein degradation

研究代表者

落合 恭子(Ochiai, Kyoko)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10455785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、転写因子Bach2とIRF4によるメモリーB細胞維持機構の解明を試みた。Bach2はメモリーB細胞を維持し形質細胞分化を抑制するが、Bach2欠損マウス脾臓B細胞ではIRF4タンパク質の過剰蓄積が生じていた。高IRF4タンパク質レベルは形質細胞分化を促進するため、Bach2によるIRF4タンパク質分解制御機構が存在すると推測した。そこで、IRF4複合体精製によるタンパク質翻訳後修飾解析、さらにBach2直接標的遺伝子の同定を行った。これらの解析結果から、Bach2依存的なIRF4タンパク質制御機構がメモリーB細胞維持と形質細胞分化の運命決定に重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the molecular mechanism how transcription factors Bach2 and IRF4 regulate cell status between memory B cell and plasma cell. Importantly, Bach2 maintains memory B cell status and represses plasma cell differentiation. We found that IRF4 protein amount was robustly accumulated in Bach2-deficient mouse splenic B cells. Considering that high protein amount of IRF4 promotes plasma cell differentiation, it is suggested that Bach2 controls differentiation by regulating IRF4 protein stability. Since protein stability is often regulated by post-translational modification under signaling pathways, we analyzed post-translational modification of IRF4 upon differentiation stimuli. Furthermore, we identified Bach2 target genes which include signaling molecules. These data suggest that Bach2 is required for the decision whether cell maintains memory B cell status or differentiates to plasma cell by modulating IRF4 protein stability.

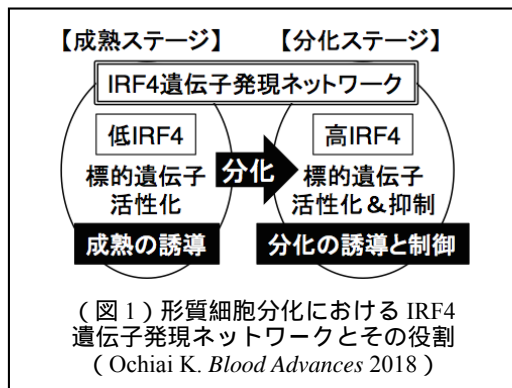
研究分野：血球系細胞分化制御

キーワード：細胞分化 転写因子

1. 研究開始当初の背景

(1)形質細胞分化過程における「成熟」と「分化」の制御

B細胞は、抗原刺激により活性化され抗体産生細胞である形質細胞へと分化するが、形質細胞分化過程は「成熟」と「分化」の異なるステージに分類することができる。成熟ステージでは、抗体遺伝子改編酵素AIDによって抗体アイソタイプのクラススイッチや抗原の親和性向上を生ずるための体細胞突然変異などの抗体遺伝子改変反応が生ずる。その後、抗体遺伝子の品質が確認された細胞のみが分化ステージへと移行し最終分化へと向かう。こうした複雑性を伴う形質細胞分化は、転写因子が構成する遺伝子発現ネットワークによって制御される。とりわけ、転写因子 IRF4 が制御する遺伝子発現ネットワークは成熟と分化の双方に必須である。その分子メカニズムについて申請者は、細胞内 IRF4 タンパク質濃度変化によって生み出される結合 DNA モチーフの多様性が成熟と分化の異なるステージを制御することを明らかにした(図1)。さらに、IRF4 は転写活性化機能に加え新規 DNA モチーフに抑制系転写因子と結合することで転写抑制に機能する。そのため、形質細胞分化過程における IRF4 機能制御は細胞運命に大きな影響をもたらす。本研究ではこれらの新事実を活かし、形質細胞機能の一部を保持するメモリーB細胞への分化誘導機構解明を試みる。



(2)メモリーB細胞への分化

メモリーB細胞は、経験済の抗原の再侵入に際して迅速に特異的抗体を産生することで抗原排除に機能する。近年の研究から、メモリーB細胞における転写因子発現パターンはナイーブB細胞と形質細胞の中間の状態であることが示唆された。特徴的なのは、メモリーB細胞ではB細胞特異的転写因子 Bach2 の発現量が低いことである。Bach2 の重要機能は形質細胞分化抑制であり、IRF4 は高発現レベルで形質細胞分化を誘導する。メモリーB細胞は低 Bach2 発現を特徴とするにもかかわらず形質細胞分化へ移行しないことから、メモリーB細胞では低 IRF4 状態が何らかの仕組みにより維

持されていることが示唆される。さらに、高頻度形質細胞分化誘導系であるB細胞受容体トランスジェニック(B1-8<sup>H</sup>)バックグラウンドの Bach2 野生型(WT)と Bach2 ノックアウト(KO)マウス脾臓B細胞を用いて分化誘導解析をおこなった。すると Bach2KO において、Irf4 転写量は誘導されないが、FACSによる高 IRF4 発現を伴う顕著な形質細胞分化誘導が認められた。すなわち、分化時に IRF4 タンパク質が安定化している可能性が浮上した。また、形質細胞分化が受容体シグナル伝達下流のリン酸化によって調節されることを発見しているが(Ando R. J. Biol. Chem. 2016)新たにプライマリーB細胞における IRF4 リン酸化(未発表データ)および形質細胞分化誘導時の IRF4 リン酸化酵素の発現低下が確認された。すなわち、分化にともなった IRF4 リン酸化レベル低下が IRF4 蓄積を誘導すると考えられる。

2. 研究の目的

ナイーブB細胞は抗原刺激により成熟ステージを経て形質細胞へと分化するが、一部の細胞は成熟ステージ後にメモリーB細胞となって生体内で長期にわたって生存し、同一抗原の再侵入に際して迅速な抗体産生の役割を担う。一方、転写因子 IRF4 は低タンパク質レベルで成熟ステージB細胞、高タンパク質レベルで形質細胞への分化を誘導するが、メモリーB細胞でも低タンパク質レベルで維持される可能性が浮上した。本研究では、IRF4 タンパク質分解制御機構を解明し、形質細胞分化過程における同機構活用による『メモリーB細胞への分化誘導』を目指す。

3. 研究の方法

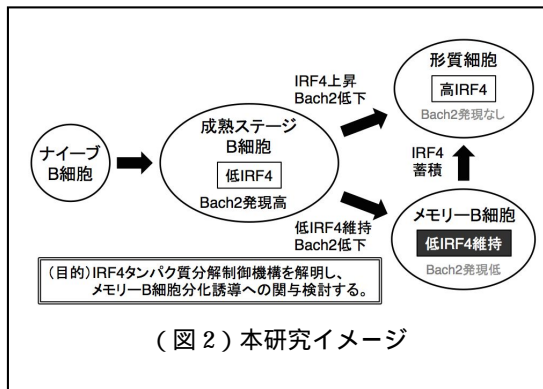
開始当初の本研究イメージを図2に示した。

(1)成熟ステージB細胞・メモリーB細胞・形質細胞のSingle-cell RNAseq 解析  
単離した細胞を用いた1細胞レベルでのトランスクリプトーム解析を実行する。各細胞特異的な遺伝子パターンを明らかにし、特にメモリーB細胞特異的な(a)受容体、(b)シグナル因子、(c)リン酸化酵素の発現解析に重点を置く。そして、メモリーB細胞特異的に活性化している【受容体→シグナル因子→リン酸化酵素】経路を構築する。

(2)IRF4 分解誘導シグナル候補の機能阻害と分化への影響  
(1)で構築した【受容体→シグナル因子→リン酸化酵素】経路を上流から順次阻害し、「IRF4 蓄積」と「形質細胞分化促進」の有無を検討する。

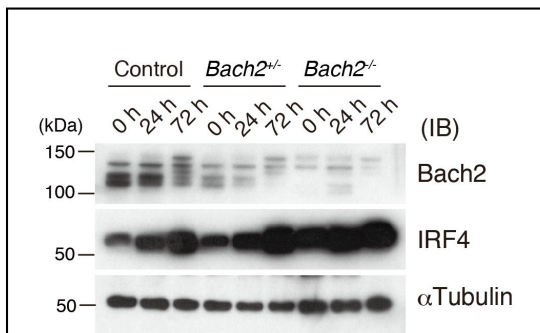
(3)IRF4分解誘導によるメモリーB細胞分化誘導の検討  
【受容体→シグナル因子→リン酸化酵素】経路の最下流因子であるリン酸化酵素機能に着目し、Constitutive active 型過剰発現による「低IRF4 維持」と「形質細胞分化阻害」

の誘導、および(2)で得たメモリーB細胞特異的遺伝子の発現解析をおこない、メモリーB細胞への分化有無を検討する。



#### 4. 研究成果

(1)脾臓成熟B細胞におけるIRF4発現比較  
背景にあるように、*Bach2*欠損マウス脾臓B細胞を分化誘導刺激すると高IRF4発現を伴った高頻度の形質細胞分化が生ずる。これは、同マウス脾臓B細胞では分化誘導前に形質細胞分化誘導転写因子Blimp-1の遺伝子発現が上昇することが一因と予想された。そこで、同マウス脾臓B細胞を用いて分化誘導前のIRF4発現レベルの追加検討をおこなった。すると、*Bach2*欠損マウス脾臓B細胞では分化誘導前に、既にIRF4タンパク質レベルが顕著に蓄積していた(図3)すなわち、*Bach2*による低IRF4タンパク質レベル維持が成熟B細胞やメモリーB細胞の分化抑制に重要であることが示唆された。そのため、Single-cell RNAseqに先立ちIRF4タンパク質制御機構の解析を優先することとした。



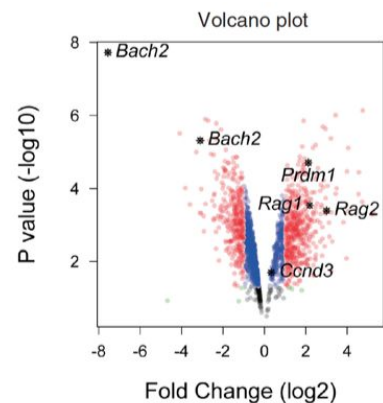
(図3) マウス脾臓成熟B細胞における*Bach2*とIRF4のタンパク質発現解析(ウェスタンブロット解析)

成熟B細胞を刺激なし(0h)または形質細胞分化誘導刺激を与えて24hまたは72h培養後タンパク質抽出した。 $\alpha$ Tubulinは内部標準として用いた。Control細胞と比較し、*Bach2*遺伝子ヘテロ(*Bach2*<sup>+/-</sup>)細胞では0h、24h、72hでIRF4タンパク質の蓄積傾向が見られた。一方、*Bach2*欠損(*Bach2*<sup>-/-</sup>)細胞では0hで既にIRF4タンパク質が顕著に蓄積しており、24hおよび72hではさらなる蓄積が認められた。

(2)*Bach2*によるIRF4タンパク質制御機構  
低IRF4レベルを維持する機構として、*Bach2*がIRF4タンパク質分解を促進すると予想した。その分子機構を解明するため、以下の2項目について解析を遂行した。

#### IRF4タンパク質アミノ酸修飾

タンパク質分解は、対象タンパク質アミノ酸のリン酸化修飾によって引き起こされる場合が多い。IRF4タンパク質にはリン酸化修飾されるセリン、スレオニン残基が多数存在する。これらのアミノ酸へのリン酸化の有無を検討するため、コントロールマウス採取した脾臓B細胞を分化誘導刺激し、低IRF4濃度および高IRF4濃度でのIRF4複合体を精製した。そして、質量分析で複合体因子の同定およびIRF4タンパク質修飾を調べた。IRF4複合体にはタンパク質リン酸化酵素、脱リン酸化酵素、分解関連因子が多数含まれていた。さらに、IRF4アミノ酸の複数リン酸化を検出した。現在、これらの複合体因子とIRF4リン酸化の関連性について詳細な解析を行なっている。*Bach2*による遺伝子発現制御との関連性  
*Bach2*欠損マウス脾臓B細胞でのIRF4タンパク質蓄積に、IRF4タンパク質分解経路に参与する遺伝子の脱制御が参与する可能性を検討した。コントロールおよび*Bach2*欠損マウスより脾臓B細胞を採取し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析をおこなった(図4)。

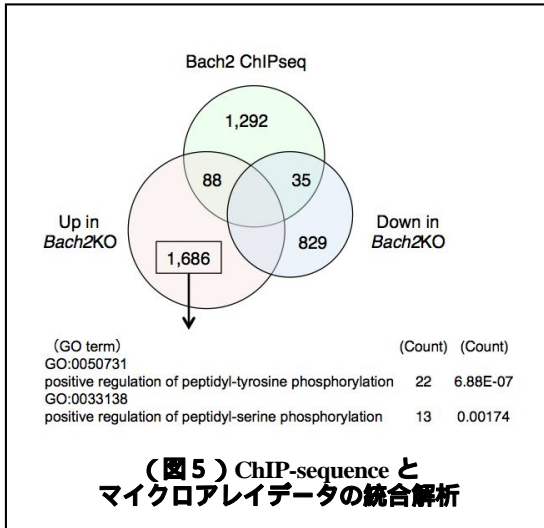


(図4) *Bach2*欠損成熟細胞における遺伝子発現解析(マイクロアレイ)

*Bach2*抑制標的遺伝子 *Prdm1*(*Blimp-1* 遺伝子)および *Ccnd3* の発現上昇が認められた。(Tamahara T. *Mol. Cell. Biol.* 2017)

さらに、マイクロアレイデータより*Bach2*の直接および間接的標的遺伝子を抽出するため、コントロールマウスより採取した脾臓B細胞を用いて*Bach2* ChIP-sequenceを遂行し、マイクロアレイ解析データと統合解析した(図5)。*Bach2*結合標的遺伝子は、活性化標的が35遺伝子、抑制標的が88遺伝子検出さ

れた。Bach2 非結合の間接的標的遺伝子は活性化標的が 829 遺伝子と抑制標的が 1,686 遺伝子検出された。各遺伝子群を Gene Ontology (GO) 解析したところ、間接的に抑制される 1,686 遺伝子群がタンパク質リン酸化と高い関連性があると考えられた。



これらの解析から IRF4 タンパク質分解制御機構を解明し、メモリーB 細胞維持における重要性を明らかにする予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Zinc finger-IRF composite elements bound by Ikaros/IRF4 complexes function as gene repression in plasma cell.

Kyoko Ochiai, Haruka Kondo, Yasunobu Okamura, Hiroki Shima, Yuko Kurokuchi, Kazumi Kimura, Ryo Funayama, Takeshi Nagashima, Keiko Nakayama, Katsuyuki Yui, Kengo Kinoshita and Kazuhiko Igarashi.

*Blood Advances*, 査読有  
2018 Apr 24;2(8):883-894.

DOI: 10.1182/bloodadvances.2017010413

The mTOR-Bach2 Cascade Controls Cell Cycle and Class Switch Recombination during B Cell Differentiation.

Toru Tamahara, Kyoko Ochiai, Akihiko Muto, Yukinari Kato, Nicolas Sax, Mitsuyo Matsumoto, Takeyoshi Koseki, Kazuhiko Igarashi.

*Molecular and Cellular Biology*, 査読有  
2017 Nov 28;37(24). pii: e00418-17.

DOI: 10.1128/MCB.00417-17

[学会発表](計 2 件)

Kyoko Ochiai

“Gene regulatory networks composed by transcription factors orchestrate plasma cell differentiation”

The 2017 Japan-NIH joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Disease  
2017

Kyoko Ochiai, Kazuhiko Igarashi

“Gene regulatory networks of B-to-plasma cell differentiation orchestrated by IRF4 and its partner transcription factors”

日本免疫学会  
2017

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合 恭子 (OCHIAI, KYOKO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 10455785

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )