

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790202
 研究課題名 (和文) 転写因子 Bach2 の標的遺伝子の機能的検証

研究課題名 (英文) Functional analysis of Bach2 target genes.

研究代表者

武藤 哲彦 (MUTO AKIHIKO)
 東北大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：80343292

研究成果の概要：

免疫担当細胞である B リンパ球は、外来抗原により活性化されると抗体を分泌する形質細胞へ最終分化を遂げる。その過程で IgM 型抗体から他の IgG 型抗体へアイソタイプが変換されるクラススイッチで抗原処理に多様性を生み出す。しかし、その過程での転写調節機構は不明であった。本研究では、転写因子 Bach2 を中心とした遺伝子制御ネットワークが、B リンパ球がクラススイッチするのに重要であることを見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：転写因子、遺伝子、免疫学、B リンパ球、抗体

1. 研究開始当初の背景

細胞分化のマスターレギュレーターとして、系列特異的な遺伝子発現を活性化させる転写因子の重要性が明らかにされてきた。一方、転写抑制因子の細胞分化への関与が近年明らかになりつつある。B 細胞特異的に発現する Bach2 は、転写抑制因子である。私は、これまでに Bach2 のノックアウトマウスの解析をおこない、抗体重鎖遺伝子のクラススイッチ組換え、体細胞突然変異の導入、および形質細胞分化といった B 細胞の活性化応答に Bach2 が関与することを報告した。また、私たちは、Bach2 の直接標的遺伝子として、

転写抑制因子 Blimp-1 を同定した。Blimp-1 は、形質細胞分化に必須の転写抑制因子である。B 細胞分化の後期では Blimp-1 を筆頭に様々な転写調節因子が構成する遺伝子ネットワークが注目されている。抗原で活性化された B 細胞の応答は、初期設定の IgM 型抗体を分泌する形質細胞への最終分化、細胞増殖と停止の調節、胚中心 B 細胞への分化、クラススイッチや体細胞突然変異といった抗体遺伝子改編反応とその結果として IgG や IgA 型のアイソタイプ抗体を分泌する形質細胞への最終分化、メモリー B 細胞への分化など多岐にわたる。しかしながら、これらの B

細胞分化・活性化応答と遺伝子ネットワークとの関係の全容は、未だ不明な点が多い。ここで重要なのは、**Bach2** ノックアウト B 細胞の障害が上記の B 細胞活性化応答で広く見られることである。従って、**Bach2** を中心とした遺伝子ネットワークは、B 細胞の活性化応答と分化に深く関与しており、この解明は転写調節機構の理解へとつながると考えられた。

2. 研究の目的

細胞分化の過程では、細胞系列に特異的な遺伝子発現の変化を伴う。言い換えれば、遺伝子ネットワークの変化も細胞分化の重要な側面である。従って、遺伝子発現を制御する転写因子の役割を明らかにすることから、細胞分化を捉えられると予想される。本研究では、転写因子 **Bach2** の解析を通して B 細胞分化の遺伝子発現プログラムの制御機構を解明したい。**Bach2** の直接標的遺伝子である **Blimp-1** は、B 細胞の最終分化に重要な転写因子であることから、**Bach2** による **Blimp-1** の転写抑制が、上記の B 細胞活性化応答のうちいずれの経路で機能するかを明らかにすることは、抑制因子による遺伝子プログラムの調節と細胞分化の関係の解明に迫ることが出来ると考えている。

3. 研究の方法

これまでに **Bach2** ノックアウトマウスの解析結果から、**Bach2** は、未熟 B 細胞から成熟 B 細胞への分化に関与する。また、抗原による B 細胞の活性化応答のうち、IgM 型抗体分泌の形質細胞への分化へは関与しないのに対し、胚中心 B 細胞への分化、抗体遺伝子のクラススイッチ反応、抗原に対する高親和性の抗体を産生するための体細胞突然変異の導入反応に関与することをあきらかにしてきた。本研究計画では、**Bach2** ノックアウトマウスの障害に基づいて、**Bach2** の下流の標的遺伝子である **Blimp-1** の機能を明らかにし、B 細胞の活性化応答における遺伝子ネットワークを明らかにしたい。そこで、以下の点を検討する。

(1) 生体内における **Bach2** による **Blimp-1** の転写抑制の解析。**Bach2** ノックアウト脾臓 B 細胞集団を LPS 刺激 (B 細胞の分化・増殖刺激) すると、**Bach2** の抑制が無いために **Blimp-1** の過剰な発現がみられる。しかし、個々の細胞で **Blimp-1** の発現が上昇するのか、**Blimp-1** を発現する細胞が増えているのか不明確であった。この問題を明らかにするために、**Blimp-1mEGFP** (**Blimp-1** 遺伝子に EGFP をマーカーとして挿入して発現をモニターできる) トランスジェニックマウスと **Bach2** ノックアウトマウスを交配したマウスを作成する。同マウスの脾臓から B 細胞を

採取し、初代培養系で形質細胞へ分化誘導し、フローサイトメーター (FACS) にて EGFP 蛍光を測定する。

(2) **Bach2** による **Blimp-1** の遺伝子抑制が必要となる局面の同定。**Bach2** ノックアウトマウスと **Blimp-1** ノックアウトマウスを交配し、**Bach2Blimp-1** 二重ノックアウトマウスを作成する。同マウスで、**Bach2** ノックアウトマウスの B 細胞障害のいずれが救済されるのかを検討し、**Bach2** による **Blimp-1** 遺伝子の抑制が B 細胞分化と活性化応答で必要となる局面を明らかにする。すなわち、**Blimp-1** は、形質細胞分化を促進すると同時に、抗体遺伝子のクラススイッチや体細胞突然変異の導入などの胚中心応答を抑制する役割が提唱されている。**Bach2** ノックアウト B 細胞は、これらの応答に障害があることから、**Blimp-1** の脱抑制的な発現が原因なのかを **Bach2Blimp-1** 二重ノックアウトマウスで **Bach2** ノックアウト B 細胞の障害の何れが救済されるのかを検討する。

① B 細胞分化段階の検討

② 抗体クラススイッチの検討

4. 研究成果

(1) **Bach2** 野生型 **Blimp-1mEGFP** マウスと **Bach2** ノックアウト **Blimp-1mEGFP** マウスから各々脾臓 B 細胞を採取し、初代培養系で 24 時間 LPS 刺激した。同細胞を形質細胞分化マーカーの CD138 に対する蛍光抗体で細胞染色し、EGFP の蛍光に基づいて FACS 解析をおこなった (図 1)。その結果、**Bach2** ノックアウト脾臓 B 細胞では、EGFP 陽性すなわち **Blimp-1** 発現細胞の出現頻度が高かった。従って、**Bach2** ノックアウト B 細胞集団で見られていた **Blimp-1mRNA** の高い発現は、細胞あたりの mRNA が高くなったのではなく、集団の中に出現する **Blimp-1** 陽性細胞の頻度が高いのであることがわかった。また、**Bach2** ノックアウト **Blimp-1EGFP** マウス由来の B 細胞のうち、**Blimp-1** 陽性細胞は、形質細胞分化マーカー CD138 が陽性であることから、野生型 B 細胞と同様に、形質細胞へ分化した細胞であると言える。

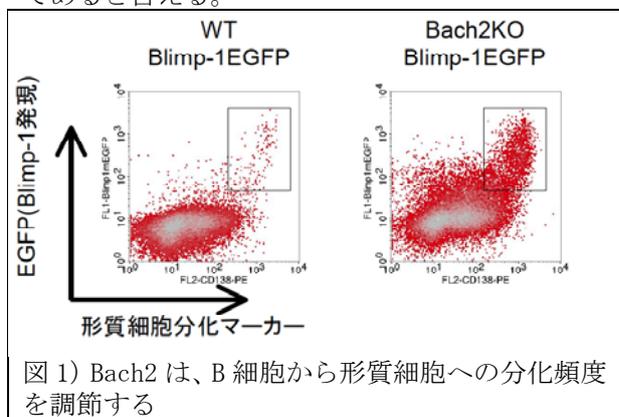


図 1) **Bach2** は、B 細胞から形質細胞への分化頻度を調節する

(2) Bach2Blimp-1 二重ノックアウトマウスの B 細胞の初代培養実験系でクラススイッチを検討した。その結果、Bach2 ノックアウト B 細胞では、クラススイッチ下 B 細胞が誘導されないのに対し、二重ノックアウトマウス由来の B 細胞からはスイッチした B 細胞が誘導された (図 2)。

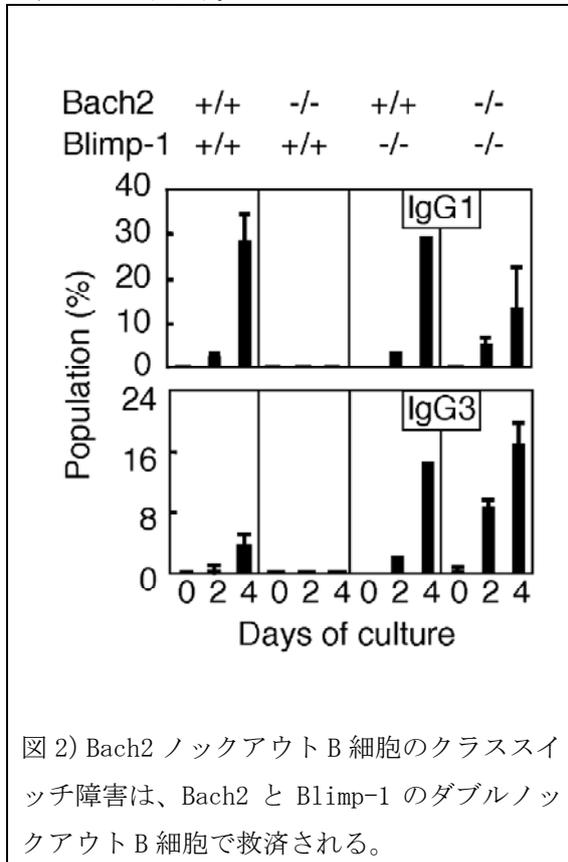


図 2) Bach2 ノックアウト B 細胞のクラススイッチ障害は、Bach2 と Blimp-1 のダブルノックアウト B 細胞で救済される。

このとき、クラススイッチに必須の酵素 AID の遺伝子発現の障害が救済され、誘導されることを明らかにした (図 3)。

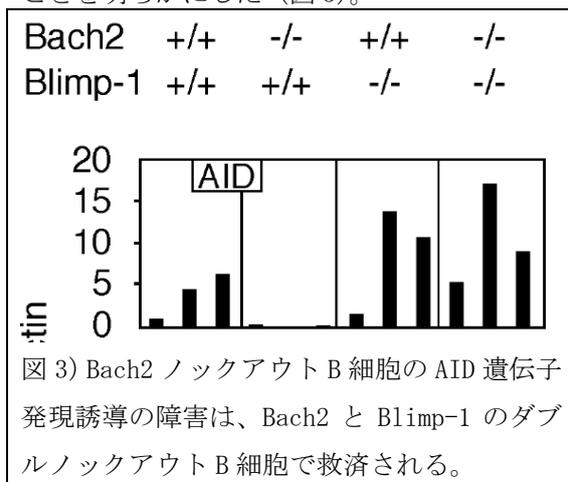


図 3) Bach2 ノックアウト B 細胞の AID 遺伝子発現誘導の障害は、Bach2 と Blimp-1 のダブルノックアウト B 細胞で救済される。

これらの結果は、B 細胞活性化応答時の Blimp-1 遺伝子の発現が Bach2 によって一時的に抑制されることは、B 細胞のクラススイッチ応答の実行には必須であることを示唆

している。さらに、クラススイッチ過程では、Bach2 が Blimp-1 遺伝子の発現を抑制し、Blimp-1 による転写因子 Pax5 の遺伝子への転写抑制を阻止することが、Pax5 によって AID 遺伝子が活性化されて発現するために必要であることを示した。このように、Bach2 により、クラススイッチする B 細胞への分化、形質細胞へ分化する B 細胞の運命決定を制御する遺伝子値とワークの一端を明らかにした。しかしながら、Bach2 ノックアウト B 細胞でみられる B 細胞分化の障害は、二重ノックアウトマウスの B 細胞では、回復しない。従って Blimp-1 以外の Bach2 標的遺伝子には、ほかにも B 細胞で重要な役割を担う遺伝子が含まれる可能性を示唆しており、引き続き標的遺伝子の探索と検証が今後も必要と考えられる。

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 5 件)

- ① Dohi, Y., Ikura, T., Hoshikawa, Y., Katoh, Y., Ota, K., Nakanome, A., Muto, A., Omura, S., Ohta, T., Ito, A., Yoshida, M., Noda, T., and Igarashi, K., Bach1 inhibits oxidative stress-induced cellular senescence by impeding p53 function on chromatin, *Nature Struct. Mol. Biol.*, vol.15, p1246-1254, 2008 年、査読有
- ② Ochiai, K., Muto, A., Tanaka, H., Takahashi, S., and Igarashi, K., Regulation of the plasma cell transcription factor Blimp-1 gene by Bach2 and Bcl6, *Int. Immunol.*, vol.20, p435-460, 2008 年、査読有
- ③ Kono, K., Harano, Y., Hoshino, H., Kobayashi, M., Bazett-Jones, DP., Muto, A., Igarashi, K., and Tashiro, S., The mobility of Bach2 nuclear foci is regulated by SUMO-1 modification, *Exp Cell Res.*, vol.314, p903-913, 2008 年、査読有
- ④ Ikura, T., Tashiro, S., Kakino, A., Shima, H., Jacob, N., Amunugama, R., Yoder, K., Izumi, S., Kuraoka, I., Tanaka, K., Kimura, H., Ikura, M., Nishikubo, S., Ito, T., Muto, A., Miyagawa, S., Takeda, S., Fishel, R., Igarashi, K., and Kaihya, K., DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics, *Mol. Cell. Biol.*, vol.27, p7028-7040, 2007 年、査読有
- ⑤ Igarashi, K., Ochiai, K., and Muto, A.,

Architecture and dynamics of the transcription factor network that regulates B-to-Plasma cell differentiation, J. Biochem., vol.141, p738-789, 2007年、査読有

〔学会発表〕(計 3件)

- ① 武藤哲彦、Bach2は形質細胞分化を抑制し活性化B細胞にクラススイッチを実行させる、分子生物学会・日本生化学会合同年会(BMB)、2008年12月11日、神戸
- ② 武藤哲彦、Bach2による形質細胞分化過程の転写ネットワークの調節、'08 遺伝情報DECODE・冬のワークショップ(転写研究会共催)、2008年1月21日、湯沢
- ③ 武藤哲彦、Bach2が支配するB細胞免疫応答遺伝子ネットワークの役割、分子生物学会・日本生化学会合同年会(BMB)、2007年12月12日、横浜

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biochem.med.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 哲彦 (MUTO AKIHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80343292

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：