

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659151

研究課題名(和文) Creマウスを用いた新たな in vivo 分子機能解析法の確立

研究課題名(英文) Analysis of AID expression by a novel Cre-based in vivo gene manipulation system.

研究代表者

長岡 仁 (NAGAOKA, Hitoshi)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20270647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：効率的にBリンパ球最終分化の分子機構を解析する為に、cre依存的に不可逆的に遺伝子制御を可能とする事を目指したウィルスベクターを作製した。また、Cre発現マウスとして、Bリンパ球最終分化に重要な分子AIDの遺伝子を用いたCre発現トランスジェニックマウスを解析した。Cre発現をモニターできるレポーターマウスと掛け合わせたものを用い、生理的条件下でのAID発現を個体レベルでシングルセルレベルで解析し、活性化Bリンパ球以外にTリンパ球等でもAIDが発現する事を明らかにした。更に、AIDの遺伝子のシス制御領域に変異を入れたトランスジェニックマウスを作製し、個体レベルでの発現制御機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We studied the Aicda (activation-induced cytidine deaminase's gene) gene regulation in vivo by using Aicda-cre BAC transgenic system. We found that the Aicda gene is expressed in some mature T cells in periphery in addition to the germinal center B cells. The AID expression associated with the development of a IL-10-producing subset of CD4 T cells, that indicates some specific stimuli may be operating for induction of AID. The manipulations of cis regulatory elements of Aicda on the transgenes revealed that indispensable role of C/EBP binding sites in the upstream region for AID expression, and the silencer activity of intronic E2F and Myb binding sites. These results provide a important information to understanding spatiotemporal regulation of Aicda gene.

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：リンパ球分化 免疫

## 1. 研究開始当初の背景

Cre-loxP システムを用いたコンディショナルノックアウトは胎児期致死性遺伝子の機能を細胞系列特異的に解明するための強力な手法であり、数々の成果を上げている。多種多様なプロモーターで制御されている Cre 発現トランスジェニックマウスや、ノックインマウスが作製され、生物学研究のリソースとして多くの場面で利用されている。研究パターンの一つとしては、ある遺伝子の floxed アレル(Cre 依存的にノックアウトになるアレル)を作ると、様々なタイプの Cre マウスを手に入れ、全身あらゆる細胞でのその遺伝子の機能を探る事が行われてきた。この手段はいろいろな細胞で発現するある重要遺伝子の機能を、平行移動的に他の臓器ではどうかと繰り返し見ていく分には有効である。しかし、ある特定の細胞、臓器、現象に興味があり、その中で働く一群の分子の機能を次々に調べて行きたい場合、数多くの遺伝子の floxed マウスを根気よく作るか、既存の物が有れば貰う以外無い。

活性化 B リンパ球内で起こる抗体遺伝子の改変反応は、RNA/DNA 編集活性を持つ酵素 AID により引き起こされるが、それ以外に数多くの DNA 修復因子や細胞分裂関連分子が重要な役割を果たしており、Topoisomerase I 等遺伝子破壊によって早期に胎生致死となる中心的分子も存在する。AID 遺伝子 *Aicda* は活性化 B リンパ球特異的に発現するが、その異所性発現が非特異的な遺伝子への変異導入活性を惹起し細胞腫瘍化に関わる可能性が示唆される。また、遺伝子改変以外に遺伝子発現制御機能を持つ可能性がある。つまり AID 分子は免疫に加え発癌・細胞分化などその他の高次生命機能に関与して居る可能性があり、マウスレベルでの効率的解析が必要とされた。

## 2. 研究の目的

Cre 依存的に遺伝子や RNA 緩衝効果を持つ低分子 RNA を発現誘導できるウイルス等を用いたシステムを開発し、Cre トランスジェニックマウスに導入する事で、これまで胚操作が必要だったコンディショナルトランスジェニックやノックアウトによる分子機能解析を迅速化する。それを用いてリンパ球分化時に重要な転写因子群の機能を確認し、方法

の有用性を証明する。同時に末梢 B リンパ球分化の異なる分化段階に Cre を発現するトランスジェニックマウスとして、AID 遺伝子の制御配列を持つものの検討を行う。

## 3. 研究の方法

(1) リンパ球最終分化解析に用いるため、AID 遺伝子制御領域支配下に Cre タンパク質を発現するマウスを、Rosa レポーターマウスと掛け合わせ、Cre タンパク質の発現を指標にリンパ球亜集団等での AID 発現パターンを詳細に解析する。

(2) AID 遺伝子 (*Aicda*) の制御領域を一部改変する事で、その制御を受ける Cre の発現パターン・発現強度が異なるトランスジェニックマウスを作製する。

(3) 変異型 LoxP サイトを入れ子の状態に配置したコンストラクトをウィルスベクターを用いて作製し、導入細胞が Cre による組換えで RFP 陽性から GFP-microRNA に不可逆的に切り替わるシステムを作製する。

## 4. 研究成果

*Aicda* 遺伝子全体をカバーするバクテリア人工染色体(BAC)の AID コード領域を改変し、AID の代わりに Cre 及びヒト hCD2 タンパク質を発現する様に遺伝子操作されたトランスジェニックを持つ *Aicda-cre* マウスを、Cre 発現をモニターできる Rosa-tdRFP(もしくは R26R)マウスと掛け合わせて RFP(LacZ)/hCD2 発現パターンを解析した。この *Aicda-cre* マウスでは hCD2 及び Rosa マーカーダブル陽性 B 細胞の 80-90%が胚中心 B 細胞の表現型を示した。また、腸管柔毛内の IgA 陽性形質細胞はほぼ完全に Rosa マーカー陽性を示した。更に、詳細な解析から B リンパ球の 5-8%が未熟 B 細胞の時期に Cre を発現していた。未熟 B リンパ球での内因性の AID 発現は RT-PCR においても確認されたが、その発現量は胚中心 B リンパ球の 10 分の一以下であった。これらの事は *Aicda-cre* Tg マウスが B リンパ球内で *Aicda* 遺伝子の正常な発現パターンに従って Cre を発現する極めて感度の高いインディケーターマウスである事を示唆した。

このインディケーターマウスでの Cre 発現の特異性を更に検討するため、B リンパ球以外での Cre 発現を検討した。その結果、生理的状态では活性化 B リンパ球特異的と考えら

れていた *Aicda* 遺伝子発現が、末梢での T リンパ球の一部でもエフェクター/メモリー細胞への分化に伴い発現する事を見出した。 *Aicda* 発現を経たエフェクター/メモリー型 T リンパ球の割合は生後 20 週齢頃から加齢とともに増加し、最高で末梢 CD4 陽性 T リンパ球の 25%にも達し、決して僅かな例外的現象ではない。 T リンパ球での内因性の AID mRNA の発現は、RT-PCR でも確認され、トランスジーンによるアーティファクトの可能性は除外された。 T リンパ球における AID 発現の意義を検討する為、 *Aicda* 遺伝子の発現履歴を持つ T リンパ球の機能を、産生するサイトカインのパターンを調べる事で検討した。その結果、これらの細胞は IL-10 と IFN- $\gamma$  を産生する特殊なリンパ球分画である事が明らかになった。このことから AID 発現はこのリンパ球分画への分化に関連して起こる何らかの特異性を持った現象であると考えられる。

以上の結果から、 *Aicda*-cre マウスでは cre は活性化 B リンパ球内で高率に発現される一方で、生理的状态でも未熟リンパ球や T リンパ球にも低いレベルで発現する事が確認された。この事は、これまで抗体遺伝子改変に働く特異的分子と思われていた AID が活性化 B リンパ球以外にも特異的/生理的な刺激に伴い発現され機能していることが示唆された。近年 AID は、自己反応性未熟 B リンパ球の排除や、細胞がん化、遺伝子のエピジェネティックな制御に関連しているという事が複数のグループから示されているが、我々の研究成果はその可能性を示すと共に、発現量や範囲が限定的である事からその限界も示す重要な発見と言える。

*Aicda* 遺伝子の *in vivo* での制御機構を明らかにすると同時に、未熟 B リンパ球や T リンパ球、活性化 B リンパ球でより選択的に Cre を発現できるトランスジェニックマウスを得るために、 *Aicda* 遺伝子の制御領域を改変した BAC トランスジーンを作製した。改変は、我々が以前 *in vitro* レポーター解析で明らかにした *Aicda* 遺伝子上流の region4 エンハンサー及び、 region2-intronic silencer を含むシス制御配列に導入した。それらコンストラクト DNA を用いてトランスジェニックマウスを新たに 4 系統作製し解析した。その結果、 region4 エンハンサー領域の C/EBP 結合配

列が *Aicda* 発現に必須である事、また、 region2 内のサイレンサー配列の欠失で活性化 B リンパ球集団内での Cre 発現細胞の頻度の上昇が認められる事が明らかになった。一方でサイレンサーの欠失だけでは未熟 B リンパ球や T リンパ球での発現の増強は観察されなかった。これらの結果は *in vitro* 解析で見出された制御配列が *Aicda* 遺伝子制御に *in vivo* でも働いている事を示す重要な知見である。同時に発現強度の異なる *Aicda* プロモーター支配下に Cre を発現するマウス系統を得ることができた。

Cre 依存的に microRNA を発現するコンストラクトをレトロウイルスベクターで作製した。本コンストラクトは cre 発現前には RFP 陽性であるが、Cre により不可逆的に組換えが起こり、GFP 陽性に変化し、しかも GFP の 3' UT 領域に microRNA 配列を導入することができる。本ウイルスベクターを用いて効率を検討したが、蛍光タンパク質の発現が極めて低く、実用には更なる改良が必要と考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 6 件)

Kimura, M, Yoshioka, T, Saio, M, Banno, Y, Nagaoka, H, Okano, Y. Mitotic catastrophe and cell death induced by depletion of centrosomal proteins. *Cell Death Dis* 2013; 4:e603. DOI: 10.1038/cddis.2013.108, 査読有り

Huong le, T, Kobayashi, M, Nakata, M, Shioi, G, Miyachi, H, Honjo, T, Nagaoka, H. In Vivo Analysis of *Aicda* Gene Regulation: A Critical Balance between Upstream Enhancers and Intronic Silencers Governs Appropriate Expression. *PLoS One* 2013; 8:e61433. DOI 10.1371/journal.pone.0061433, 査読有り

Honjo, T, Kobayashi, M, Begum, N, Kotani, A, Sabouri, S, Nagaoka, H. The AID Dilemma: Infection, or Cancer? *Adv Cancer Res* 2012; 113:1-44. DOI: 10.1016/B978-0-12-394280-7.00001-4, 査読無し

Kawamata, T, Lu, J, Sato, T, Tanaka, M, Nagaoka, H, Agata, Y, Toyoshima, T,

Yokoyama, K, Oyaizu, N, Nakamura, N, Ando, K, Tojo, A, Kotani, A. Imatinib mesylate directly impairs class switch recombination through down-regulation of AID: its potential efficacy as an AID suppressor. *Blood* 2012; 119:3123-7. DOI: 10.1182/blood-2011-01-327932, 査読有り

Sato, K, Handa, H, Kimura, M, Okano, Y, Nagaoka, H, Nagase, T, Sugiyama, T, Kitade, Y, Ueda, H. Identification of a Rho family specific guanine nucleotide exchange factor, FLJ00018, as a novel actin-binding protein. *Cell Signal* 2012; 25:41-9. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.09.015, 査読有り

Qin, H, Suzuki, K, Nakata, M, Chikuma, S, Izumi, N, Thi Huong, L, Maruya, M, Fagarasan, S, Busslinger, M, Honjo, T, Nagaoka, H. Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression in CD4 T Cells is Associated with a Unique IL-10-Producing Subset that Increases with Age. *PLoS One* 2011; 6:e29141. DOI: 10.1371/journal.pone.0029141, 査読有り

〔学会発表〕(計6件)

佐藤克哉 他 Rho 活性化因子 FLJ00018 と Four and Half LIM domain 1 との相互作用 第86回日本生化学会大会 2013年9月12日 横浜市

Nagaoka, H. et al., In vivo analysis of Aicda gene regulation: critical balance between upstream enhancer and intronic repressor for the appropriate expression, 15th International Congress of Immunology, 2013年8月25日 Milan, Italy

佐藤克哉 他 Rho 特異的活性化因子 FLJ00018 とアクチンの相互作用による FLJ00018 の機能抑制 第85回日本生化学会大会 2012年12月16日 福岡市

Nagaoka, H et al., Activation-induced cytidine deaminase expression in CD4+ T cells is associated with a unique IL-10-producing subset that increases with age, *Genetic and Epigenetic Control of Cell Fate* 2012年11月6日 京都市

長岡 仁 他 AID 遺伝子が発現する T 細胞サブセットは IL-10 を発現し加齢とともに蓄積するユニークなサブセットである 第84回日本生化学会大会 2011年9月24日 京都市

吉岡 孝 他 RNF8 による PIK1 タンパク質の減少とがん細胞における異常 第84回日本生化学会大会 2011年9月22日 京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長岡 仁 (NAGAOKA, Hitoshi)

岐阜大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20270647