

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790478

研究課題名（和文） 胸腺細胞初期分化過程でのBcl11bの機能解析

研究課題名（英文） Analysis of Bcl11b function during thymocyte Differentiation

研究代表者

田中 宏和 (TANAKA HIROKAZU)

独立行政法人理化学研究所・免疫転写制御研究グループ・基礎科学特別研究員

研究者番号：50569556

研究成果の概要（和文）：

CD4+CD8+DP 胸腺細胞のヘルパー/キラー系列へ分化運命を決定する CD4+ヘルパー系列特異的な ThPOK 転写因子の発現制御機構の解析を行い、キラー系列への分化過程で ThPOK の発現を抑制する ThPOK サイレンサーを同定した。そこで、本研究課題では ThPOK サイレンサーの活性制御を理解するために ThPOK サイレンサー結合蛋白質の同定を試みた。アフィニティー精製により ThPOK サイレンサー結合蛋白質として見出した Bcl11b の機能欠損マウスでは、CD8+キラー系列細胞での ThPOK の脱抑制と CD4+系列への運命転換が検出された。このことから、Bcl11b が ThPOK サイレンサーの活性制御を介して、分化運命決定機構に機能していると結論した。

研究成果の概要（英文）：

It has been shown that any post-selection DP thymocytes differentiate into CD4-lineage upon expression of ThPOK, whereas they become CD8-lineage cells in the absence of ThPOK. Therefore it is crucial to understand how helper-lineage specific expression of *ThPOK* gene is regulated. We have identified a *ThPOK* silencer in the *ThPOK* gene that is essential to repress *ThPOK* gene during differentiation of MHC class I selected cells toward the cytotoxic-lineage.

In order to reveal regulation of *ThPOK* silencer activity, we performed pull down affinity purification with the functional shorter silencer sequences. After molecular and biological screening of several candidates obtained by the above approach, Bcl11b transcription factor appeared to play an essential role in activating *ThPOK* silencer. Genetic analysis of Bcl11b conditional knock-out mice showed that de-repression of ThPOK in both pre-selection thymocyte and in MHC class I selected cells, resulting in cell fate conversion of MHC class I selected cells to CD4⁺ helper lineage cells. These results suggested that Bcl11b is central to regulate helper/cytotoxic lineage decision by lymphocytes via regulation of ThPOK silencer activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：リンパ球分化、T細胞、転写因子

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫系での自己・非自己形成の重要な機構として古くから研究されている DP 胸腺細胞の正と負の選択では、主要組織適合抗原(以下 MHC)上に提示される抗原と T 細胞抗原受容体(以下 TCR)との反応性に端を発するシグナル(以下 TCR シグナル)により、胸腺細胞の生存(正の選択)と細胞死(負の選択)が規定される。正と負の選択の分子機構の理解には、TCR シグナルから核内での細胞運命決定に至る経路を解明する必要があるが、最終的な核内標的分子が不明であることから未だにその解明は進んでいない。一方、正に選択された DP 胸腺細胞では、TCR シグナルの MHC 拘束性を感知して、ヘルパー T 細胞と細胞傷害性 T 細胞への系列決定を誘導する核内細胞運命決定機構が存在する。即ち、TCR シグナルが核内で細胞運命決定機構に変換されるという点において、DP 胸腺細胞の正と負の選択機構と系列決定機構は極めて類似しており、共通の制御機構・分子によって制御されている可能性が大いに考えられる(図1参照)。

申請者は、胸腺細胞の系列決定を制御する転写因子ネットワークの解析において顕著な功績をあげ、特にヘルパー T 細胞への分化を誘導する ThPOK 転写因子の発現が ThPOK サイレンサーにより抑制されることを突き止めた。即ち、ThPOK サイレンサーの機能制御に関与する分子は TCR シグナルの質的・量的な変化を感知するセンサーとして機能し、正と負の選択の際にも同様に TCR シグナルを核内で正と負の選択決定に変換する機構に関与する可能性が考

えられる。従って、ThPOK サイレンサーに結合するタンパク複合体を同定し、TCR シグナルが細胞運命を決定する核内プログラムに変換される機構を解明することは、中枢性免疫系自己の確立の分子機構の解明への大きな糸口となると期待される。

2. 研究の目的

申請者らは胸腺細胞の系列決定を制御する転写因子ネットワークの解析において、特にヘルパー T 細胞への分化を誘導する ThPOK 転写因子の発現が ThPOK サイレンサーにより抑制されることを突き止めた。即ち、ThPOK サイレンサーの機能制御に関与する分子は TCR シグナルの質的・量的な変化を感知するセンサーとして機能し、TCR シグナルを核内で正と負の選択決定に変換する機構に関与する可能性が考えられる。従って、ThPOK サイレンサーに結合するタンパク複合体を同定し、TCR シグナルが細胞運命を決定する核内プログラムに変換される機構を解明することは、中枢性免疫系自己の確立の分子機構の解明への大きな糸口となると期待される。上記の理由から、ThPOK サイレンサーの結合因子複合体を単離し、TCR シグナルの標的分子を同定することを目的としている。

3. 研究の方法

ThPOK サイレンサー結合因子を単離する目的にて平成 20 年度に実施した研究により、ThPOK サイレンサーの機能に重要な約

40bp の塩基配列を同定した。この配列を含んだ合成 DNA を用い EMSA 法を行い、試験管内で ThPOK サイレンサー結合因子複合体との結合が確認出来たことから、マウス胸腺細胞を材料にプルダウン法により ThPOK サイレンサー結合因子複合体の粗精製を行った。この方法で濃縮されたタンパク質について、質量分析法によりタンパク質の同定を行う(図1参照)。次に、これらの候補タンパク質に関して、1) ウェスタン法によりプルダウン法での候補タンパク質の濃縮の確認、2) 共免疫沈降により既存の ThPOK サイレンサー結合因子である Runx1 との結合の有無、3) クロマチン免疫沈降法 (ChIP) 法による細胞内での ThPOK サイレンサーへの結合、という3点を指標に候補分子の絞り込みを行う(図1参照)。少なくとも4種類の ThPOK サイレンサー結合因子を同定出来たことから、この手法は有効であることは確認済みである。

上記の方法で同定した新規 ThPOK サイレンサーの結合因子の機能解析を行った。同定した分子が既知の場合、遺伝子変異マウスの表現型が発表されているか文献検索した。また、ThPOK 遺伝子の発現は ThPOK サイレンサーの活性により正の選択前の胸腺細胞 (CD69-DP 胸腺細胞) において既に抑制されていることから、この場合は CD69-DP 胸腺細胞での ThPOK 遺伝子の発現を qPCR にて測定した。この際、ThPOK サイレンサー結合因子の遺伝子変異マウスが発表されている場合には可能な限り遺伝子変異マウスの入手を試みた。既存の研究試料が得られない或は存在しない場合は、独自に遺伝子変異マウスを作製した。

これらの基準を満たした転写因子については、遺伝子変異マウスを用いて具体的な分子メカニズムを解析した。

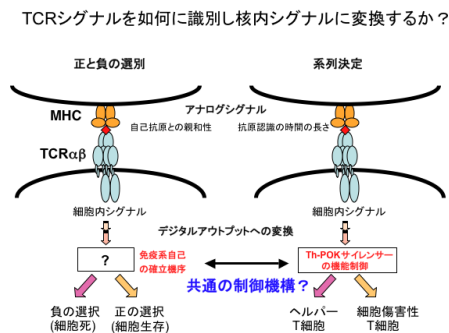


図1.正と負の選別機構と細胞系列決定機構の類似性

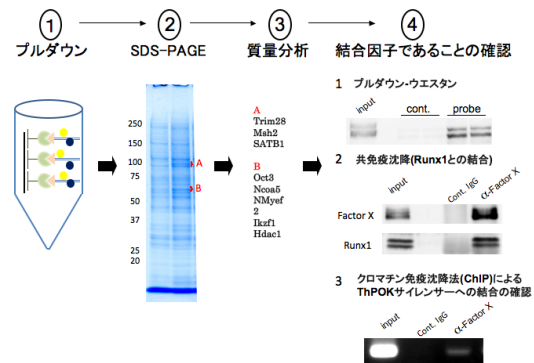


図2. ThPOKサイレンサー結合因子の同定のフローチャート

4. 研究成果

Bcl11b 遺伝子変異マウス、ThPOK-gfp レポーターマウスを用い、Bcl11b 転写因子機能障害による、ThPOK 発現、MHC クラス I 拘束性細胞及び MHC クラス II 拘束性細胞の分化への影響を解析した。その結果、正の選択前の DP 胸腺細胞及び CD8+T 細胞で ThPOK 遺伝子の脱抑制による発現、MHC クラス I 拘束性細胞 CD4+系列への部分的な運命転換が検出された。このことから、Bcl11b が ThPOK サイレンサーの活性制御を介して、分化運命決定機構に機能していると結論した。

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)

① Roles of VWRPY motif-mediated gene repression by Runx proteins during T-cell development.

Seo W, Tanaka H, Miyamoto C, Levanon D, Groner Y, Taniuchi I.

Immunol Cell Biol. 2012 Feb 28. 査読有

② Transcriptional control of T-cell development.

Naito T, Tanaka H, Naoe Y, Taniuchi I.

Int Immunol. 2011 Nov;23(11):661-8.

Review. 査読有

[学会発表] (計1件)

①田中宏和: "The role of Bcl11b in lineage

commitment of CD4+CD8+ DP thymocytes via
regulation of ThPOK silencer activity”
日本免疫学会学術集会 千葉 11月27日
(2011)

〔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

田中 宏和 (TANAKA HIROKAZU)
独立行政法人理化学研究所・免疫転写制御研
究グループ・基礎科学特別研究員
研究者番号：50569556