

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08534

研究課題名(和文)シグナル動態操作によるB細胞分化遺伝子群の発現制御

研究課題名(英文)Control of B cell differentiation by manipulation of signal dynamics

研究代表者

篠原 久明 (SHINOHARA, HISAAKI)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：10391971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：BCRシグナルではNF- κ Bの活性化に必要である要素が不確定であった。申請者は、TAK1がB細胞の活性化、細胞分化に必須の分子であることを生理学的に明らかにし、TAK1会合分子TAB2/3がNF- κ Bの活性化に必須であることを分子生物学的に示した。

数理モデル解析と細胞の入出力を定量的に計測し、IKKのSteepな活性動態は正のFeedback機構により制御されていることを明らかにした。また、ERKやIKKの活性動態を制御するユビキチン化酵素IAPを、遺伝子発現解析と反応速度数理モデルを駆使し同定した。更にBCR刺激によるエピジェネティックな制御もNF- κ Bによって媒介されることを明らかにしている。

研究成果の概要(英文)：In the BCR signal, the elements necessary for activation of NF- κ B were indeterminate. The applicant investigated physiologically and clarified that TAK1 is essential for B cell activation and cell differentiation (Immunol Cell Biol. 2016, Genes Cells. 2016). In addition, molecular based analysis showed that TAK1-associated molecule TAB 2/3 is essential for activation of NF- κ B (FEBS Lett. 2016).

Applicant quantitatively measured cell input / output and using mathematical model analysis, revealed that IKK's steep activity kinetics are controlled by "positive Feedback mechanism" (NPJ Syst Biol. 2016). In parallel with these, I find a ubiquitinating enzyme IAP controls the activity dynamics of ERK and IKK using gene expression analysis and reaction rate mathematical model (Sci Rep. 2016). Furthermore, it is clarified that epigenetic control by BCR stimulation is also mediated by NF- κ B (submitting).

研究分野：システム免疫学

キーワード：B細胞シグナル 反応速度数理モデル 分子活性動態

1. 研究開始当初の背景

B細胞は病原体を抗原受容体 (BCR) で認識し、BCR から誘導されるシグナルで細胞の機能が決定される。この過程に異常があれば癌や、自己免疫疾患、免疫不全などの疾患が誘引される。BCR シグナル単独では抗体を産生する細胞には分化できない。CD40 等の協同して機能する受容体からのシグナルも必要である。BCR と CD40 は転写因子 NF-κB を活性化するシグナル経路の多くを共有している。

NF-κB は機能、増殖、分化、生存を決定する転写因子の一つであり、生体の恒常性を維持する機能分子として重要である。免疫 B 細胞では、NF-κB は抗原受容体を介したシグナル伝達系によって活性化され、シグナル分子の機能が欠損すると免疫不全を招き、逆に過活性が起ると代謝性疾患、自己免疫疾患、癌を誘発することが報告されている。またこのシグナルを標的とした NF-κB 活性化を誘導するリン酸化酵素 IKK の阻害剤も開発されている。しかしながら、IKK はシグナルハブ (高度な連結要素) であり、かつ NF-κB 活性動態のボトルネック (律速) になっている。その機能阻害は発癌性が指摘されており危険である。活性化シグナル伝達の動態を規定する情報を理解することにより、制御可能な分子の検索が求められている。

2. 研究の目的

シグナル伝達の中心的役割を担う分子を標的とした現行の薬剤はシグナルそのものを抑制するため深刻な副作用が懸念される。シグナル動態操作による特異的な遺伝子群の発現制御が可能であれば脱分化 (癌)、過分化 (自己免疫疾患) 治療への新規戦略になりうる。数理モデル解析では理論上可能であることが示されている。

本課題でシグナル動態操作による特異的な遺伝子群の発現制御は本当に可能かどうかを明らかにする。申請者は B 細胞を用いた系で、分化誘導可能な刺激によるシグナルの活性動態に関与している分子を既に 6 遺伝子同定している。このシグナル動態を制御する候補分子の形成するシグナルネットワークと分化誘導に関わる機能解析を行い、シグナル動態操作による特異的な遺伝子群の発現制御が可能かどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

DT40 の解析から得ている NF-κB 活性動態を制御する候補分子 X について、文献情報及び数理モデル解析の知見を基に、NF-κB 活性動態の操作に必要な機能部位を推定する。DT40 を用いて遺伝子欠損の遺伝的背景に想定される活性動態を変化し得る変異は全て導入を試みる。この細胞を用いて分化誘導刺激によるシグナルで誘導される NF-κB の活性化動態と分化関連遺伝子群の発現動態を定量的・経時的に解析する。

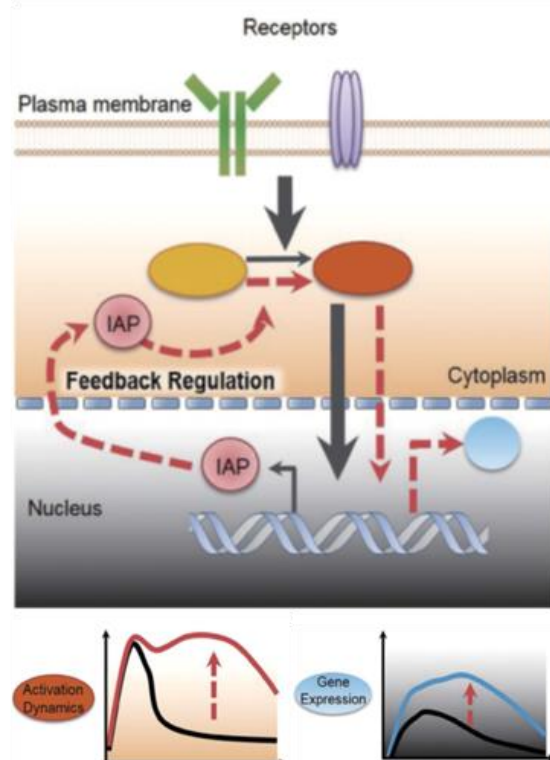
4. 研究成果

BCR シグナルでは NF-κB の活性化に必要な要素が不確定であった。申請者は、リン酸化酵素である TAK1 (MAP3K7) が B 細胞の活性化、細胞分化に必須の分子であることを生理学的に明らかにした (Immunol Cell Biol. 2016 Oct;94(9):821-829. doi: 10.1038/icb.2016.44.、Genes Cells. 2016 Nov;21(11):1233-1243. doi: 10.1111/gtc.12442.)。また TAK1 会合分子 TAB2/3 が NF-κB 活性化リン酸化酵素 IKK の活性化に必須であることを分子生物学的に示した (FEBS Lett. 2016 Sep;590(18):3264-9. doi: 10.1002/1873-3468.12342.)。

申請者は数理モデル解析と細胞の入出力を定量的に計測し、IKK の急勾配にあがる活性動態は「正のフィードバック機構」により制御されていることを明らかにした。IKK の急勾配にあがる活性動態は B 細胞の活性化を示す遺伝子発現の制御に重要であることを明らかにした (NPJ Syst Biol Appl. 2016 Oct 20;2:16024. doi: 10.1038/npjbsa.2016.24.)。

この解析と平行し、ERK や IKK の活性動態を制御する E3 ユビキチン化酵素として IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) を、遺伝子発現解析と反応速度論数理モデルを駆使し同定した。IAP は遺伝子発現を介してシグナル活性を持続増加させる正のフィードバック制御因子であることを解明した (図 1.)。

図 1

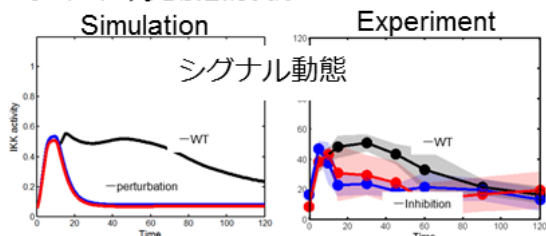


IAP により制御されている CD40 シグナルの活性動態は漸進的で緩やかな衰退をしめす

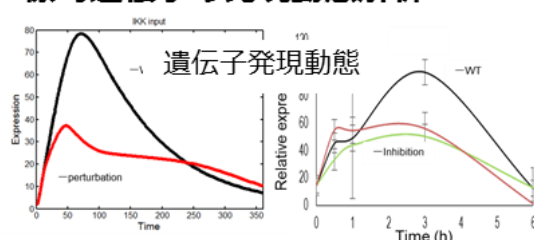
が、この動態は細胞生存に必要な遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった (Sci Rep. 2016 Jun 9;6:27706. doi: 10.1038/srep27706.) (図 2)。更に BCR 刺激

図2

シグナル動態解析



標的遺伝子の発現動態解析



によるエピジェネティックな制御も NF- κ B によって媒介されることを明らかにしている (投稿中)。

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 8 件)

- ① Shinohara H, Nagashima T, Cascalho MI, Kurosaki T. TAK1 maintains the survival of immunoglobulin λ -chain-positive B cells. *Genes to Cells*. 2016 Nov;21(11):1233-1243. doi: 10.1111/gtc.12442. Epub 2016 Oct 3. PubMed PMID: 27696624. 査読有
- ② Shinohara H, Kurosaki T. Negative role of TAK1 in marginal zone B-cell development incidental to NF- κ B noncanonical pathway activation. *Immunology and Cell Biology*. 2016 Oct;94(9):821-829. doi: 10.1038/icb.2016.44. Epub 2016 Apr 28. PubMed PMID: 27121163; PubMed Central PMCID: PMC5073155. 査読有
- ③ Shinohara H, Yasuda T, Kurosaki T. TAK1 adaptor proteins, TAB2 and TAB3, link the signalosome to B-cell receptor-induced IKK activation. *FEBS Letters*. 2016

Sep;590(18):3264-9. 査読有
doi: 10.1002/1873-3468.12342.
Epub 2016 Aug 18. PubMed PMID: 27497262. 査読有

- ④ Shinohara H, Inoue K, Yumoto N, Nagashima T, Okada-Hatakeyama M. Stimulus-Dependent Inhibitor of Apoptosis Protein Expression Prolongs the Duration of B Cell Signalling. *Scientific Reports*. 2016 Jun 9;6:27706. doi: 10.1038/srep27706. PubMed PMID: 27277891; PubMed Central PMCID: PMC4899755. 査読有
 - ⑤ Morimoto K, Baba Y, Shinohara H, Kang S, Nojima S, Kimura T, Ito D, Yoshida Y, Maeda Y, Sarashina-Kida H, Nishide M, Hosokawa T, Kato Y, Hayama Y, Kinehara Y, Okuno T, Takamatsu H, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Kurosaki T, Toyofuku T, Kumanogoh A. LRRK1 is critical in the regulation of B-cell responses and CARMA1-dependent NF- κ B activation. *Scientific Reports*. 2016 May 11;6:25738. doi: 10.1038/srep25738. PubMed PMID: 27166870; PubMed Central PMCID: PMC4863158. 査読有
 - ⑥ Inoue K, Shinohara H, Behar M, Yumoto N, Tanaka G, Hoffmann A, Aihara K, Okada-Hatakeyama M. Oscillation dynamics underlie functional switching of NF- κ B for B-cell activation. *npj Systems Biology and Applications*. 2016 Oct 20;2:16024. doi: 10.1038/npjbsa.2016.24. eCollection 2016. PubMed PMID: 28725478; PubMed Central PMCID: PMC5516862. 査読有
 - ⑦ 篠原 久明 B細胞抗原受容体シグナルにおけるNF- κ B活性化メカニズム 炎症と免疫 2015年 23巻 3号 72-79頁. 査読無
 - ⑧ 篠原 久明、井上 健太郎、岡田 眞里子 B細胞の免疫応答を制御するシグナル活性の閾値決定機構 感染・炎症・免疫 2015年 45巻 1号 78-81頁. 査読無
- [学会発表] (計 2 件)
- ① Iwamoto K, Shinohara H, Hayashi T, Nikaido I, Suzuki Y and Okada

M. Integrated analysis of the dynamic gene expression regulated by NF- κ B. International Conference on Systems Biology (ICSB 2016). September 16-20, 2016, Barcelona, Spain.

- ② Inoue K., Shinohara H., Okada-Hatakeyama M. System analysis for oscillation and switch-like response of NF- κ B in B cell. The Third BMIRC International Symposium on Frontiers in Computational Systems Biology and Bioengineering, March 5-6, 2015, Fukuoka

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 久明 (Shinohara Hisaaki)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：10391971

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

①井上 健太郎 (Inoue Kentarou)

②アレクサンダー ホフマン (Alexander
Hoffman)