

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15289

研究課題名(和文)ケミカルジェネティクスを用いた可逆的な遺伝子不活法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel method to reversibly inactivate gene products by using chemical genetics

研究代表者

黒崎 知博(Kurosaki, Tomohiro)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任教授(常勤)

研究者番号：50178125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：特定の遺伝子の活性を、「ある時空間のみ変異させ」、将来どのような効果をもたらすかの検定の重要性は言うまでもない。本研究では、「Syk遺伝子の活性」を「胚中心(GC)の特定の時期のみ変異させ」ることを目的に研究を行った。この目的達成のために、1)野生型Sykでは効果がなく変異Sykのみで、効果発現する阻害剤を同定した。又、2)胚中心のみで誘導的に発現するCreを有するマウスを樹立した。

研究成果の概要(英文)：Development of a new method to reversibly inactivate specific genes in a tempo-spatial way is very important for biological research. Here, as a model system, we have tried to reversibly inactivate the Syk tyrosine kinase in the germinal center phase. We have identified the chemical component which inhibits the mutant Syk, but not wildtype Syk. We have also established mice harboring inducible Cre only in the germinal center B cell phase.

研究分野：免疫学

キーワード：ケミカルジェネティクス 時空間的制御 Syk 胚中心 Cre

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物研究において、どの「時期」での、どの「細胞」の、どのような「イベント」が、時間を経た将来の運命決定に必須なのかを明らかにすることは、非常に重要な課題である。しかしながら、現在ルーチンに用いられている遺伝子ターゲティング法では、遺伝子欠損を不可逆的・永続的にさすという内在的欠陥を有している。従って、B細胞の場合胚中心(GC)反応を経て、メモリー細胞が形成されるわけであるが、GCの過程で生じる変化が、メモリー細胞機能にどのような影響を与えるかは非常に重要な命題にもかかわらず、この命題へのアプローチが困難を極めている(図1)。

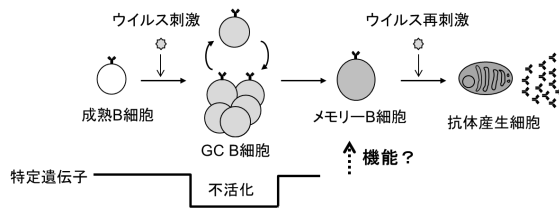


図1: 時空間特異的遺伝子不活化マウスの作成

2. 研究の目的

本研究は阻害剤及び遺伝学的手法を用いた研究の長所・短所が、互いに相補的であることに着目し、例えば、阻害剤の場合、可逆的阻害を行えること、遺伝学的手法の場合、特定の細胞・時期のみでの発現を行えること、この2つの方法をcombineし、現行の研究手法では不可能な、あらたな *in vivo* 研究手法を生み出そうとするものである。従って具体的研究目的としては、

- 1) Syk というチロシンキナーゼ酵素をターゲット遺伝子として、Syk 遺伝子に変異を導入して、変異遺伝子のみで、阻害をすることのできる阻害剤を見つける。すなわち、この阻害剤は変異 Syk 以外のチロシンキナーゼには阻害効果を示さないという変異 Syk 特異性を担保するようになる。
- 2) Syk は、多種の免疫細胞で発現しており、阻害剤を *in vivo* で投与する場合、胚中心細胞(GC)細胞で発現している Syk のみを阻害することは不可能である。従って、その弱点を克服するために、GC細胞のみで変異 Syk を発現させるために、先ず GC細胞特異的誘導型 Cre 発現マウスを樹立し、GC細胞のみで変異 Syk を発現させるようにする。

3. 研究の方法

- 1) 変異 Syk と阻害剤のコンビネーションは、先ず、Syk 欠損 DT40 B細胞に変異 Syk を発現させ、どの阻害剤が変異 Syk のみで十分な阻害がみられ、野生型の Syk では阻害がみられないかどうかの検討をおこなう。
- 2) GC細胞のみで発現している候補遺伝子を従来の data の中から探し、実際特異的発現がみられるかどうかを、QT-PCR で確かめる。そののち、その候補遺伝子の BAC クローンを単離し、そのプロモーター領域の下流に ERT2Cre を導入する。できた、ERT2Cre 挿入 BAC クローンを用いてトランスジェニックマウスを作成する。

4. 研究成果

- 1) 変異 Syk の作成
Syk キナーゼドメイン V, VII 領域の M442, S505 を変異させ M442A, S505A の single 変異、及び double 変異を作成し、Syk 欠損 DT40 B細胞に導入した。先ず、阻害剤非存在下で、これら変異 Syk が野生型 Syk と同様に機能することを、BCR 依存性カルシウム流入、BCR 依存性細胞内チロシンリン酸化タンパク質、という2つのパラメーターで確かめた。
- 2) 阻害剤スクリーニング
次に、変異 Syk 発現 DT40細胞を用いて PPI 阻害剤のデリバティブをスクリーニングした。この時、常に野生型 Syk で阻害がかかるかどうかとも同時検定した。種々調べた結果、M442A/S505A double 変異 Syk と、阻害剤としては 2,3-DMB-PPI が一番効率的に変異型 Syk のみ阻害をかける薬剤であることが明らかになった。
- 3) 個体レベルで変異 Syk が働くことの確認
更に個体レベルで M442A/S505A double 変異 Syk が働くことを確認するために、Syk 欠損造血幹細胞を単離し、retrovirus vector を用いて M442A/S505A double 変異 Syk を導入した。コントロールとして野生型 Syk を用いた。Syk 欠損造血幹細胞の一番大きな発生異常は未熟 B細胞の発生がほとんど障害されることである。野生型 Syk, 変異型 Syk 共に、この B細胞の発生障害をレスキューできることが判明した。このことは、2,3-DMB-PPI 阻害剤非存在下では、変異 Syk も野生型 Syk も機能しうることが判明した。
- 4) GC細胞特異的プロモーターを用い

た ERT2Cre BAC トランスジェニックマウスの作成
 従来の発現データを詳細に検討した結果、ナイーブ B 細胞、及びメモリー B 細胞、プラズマ細胞で発現しておらず、GC B 細胞で特異的に発現している、典型的な遺伝子は SIPR2 というケモカイン遺伝子であることが判明した。これは、公知のデータから得られた情報であったが、実際、私たちが単離した細胞でも同様の傾向が認められた。従って、SIPR2 遺伝子のプロモーターの下流に、tamoxifen で誘導のできる ERT2Cre を発現させると、GC 細胞特異的、かつ tamoxifen 導入時のみに Cre が発現することが期待された。
 従って、SIPR2 遺伝子を含む BAC クローンを単離し、このプロモーター下流に ERT2Cre を挿入し、この挿入した BAC クローンを受精卵にインジェクトし、トランスジェニックマウスを作成した。

- 5) 樹立したトランスジェニックマウスが有効に働くことの確認
 4) で樹立したトランスジェニックマウスが、1) 実際に tamoxifen 誘導的に GC B 細胞のみで発現していること、2) このマウスは Cre が発現すると flox で挟まれている遺伝子を不可逆的に delete するために、GC 細胞から派生した progeny 細胞も、flox で挟まれた遺伝子は delete したままになっているという fate mapping にも用いられるという利点を有している。この 2 点がうまく働いているかどうかを、Rosa locus に flox で delete されたら tomato (赤色発色) 遺伝子がオンになるマウスと掛け合わせることで、確かめる。たしかに、GC 細胞でのみ、ほぼ 100% tomato が発現し、GC 細胞から作られたメモリー B 細胞も tomato が発現していることが確かめられた。

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 23 件)

- Inoue T, Moran I, Shinnakasu R, Phan TG, Kurosaki T. Generation of memory B cells and their reactivation. *Immunol Rev.* 283(1):138-149. (2018) doi: 10.1111/imr.12640. (査読有)
- Ise W, Fujii K, Shiroguchi K, Ito A, Kometani K, Takeda K, Kawakami E, Yamashita K, Suzuki K, Okada T, Kurosaki T. T Follicular Helper Cell-Germinal Center B Cell

Interaction Strength Regulates Entry into Plasma Cell or Recycling Germinal Center Cell Fate. *Immunity.* 48(4):702-715.e4. (2018) doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.027. (査読有)

- Igarashi K, Kurosaki T, Roychoudhuri R. BACH transcription factors in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 17(7):437-450.(2017) doi: 10.1038/nri.2017.26.(査読無)
- Shinnakasu R, Kurosaki T. Regulation of memory B and plasma cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* 45:126-131.(2017) doi: 10.1016/j.coi.2017.03.003. (査読無)
- Shinnakasu, R., Inoue, T., Kometani, K., Moriyama, S., Adachi, Y., Nakayama, M., Takahashi, Y., Fukuyama, H., Okada, T., Kurosaki, T. Regulated selection of germinal center cells into the memory B cell compartment. *Nat. Immunol.* 17(7):861-9. (2016) doi: 10.1038/ni.3460.(査読有)

[学会発表] (計 16 件)

- 黒崎知博。「Bリンパ球運命決定機構」セミナー、3月23日、2018年、東海大学。
- 黒崎知博。「液性免疫記憶オペレーション機構」2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、12月6日～9日 (発表は7日) 2017、神戸ポートアイランド、神戸。
- Kurosaki, T. "Selection of Germinal Center B Cells into the Memory B Cell or Plasma Cell Compartment", KAI International Meeting 2017, Nov 8-10(Nov 10), 2017, Seoul, South Korea
- Kurosaki, T. "Selection mechanism of germinal center cells into plasma fate" The 19th Germinal Centre Conference, Sep 14-17(Sep 16), 2017, San Servolo, Venice, Italy
- 黒崎知博。「液性免疫オペレーション機構」免疫サマースクール。7月31日～8月3日 (発表は31日) 2017、湘南国際村センター、神奈川。

6. Kurosaki, T. "Selection of germinal-center B cells into memory B cell or plasma cell Compartment" The 6th NIF Winter School on Advanced Immunology. Jan 22-26, 2017(Jan 23), Singapore
7. 黒崎知博。「メモリーB細胞の生成と活性化～感染症への予防～」セミナー、11月25日、2016年、三重大学。
8. Kurosaki, T. "Fate decisions of germinal center B cells into the memory B cell or plasma cell compartment" 4th Antibody Symposium, Nov-14, 2016, Singapore.
9. Kurosaki, T. "Fate decisions of germinal center B cells into the memory B cell or plasma cell compartment" The International Symposium for Advanced Immunology Commemorating the 10th anniversary of IFRc and the 77th anniversary of Prof. Tadimitsu Kishimoto's birth, Nov.1-2 (Nov 2), 2016,Osaka ,Japan
10. Kurosaki, T. "Overview of germinal center immunity" The 13th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity (IWAA2016), Oct 11-13(Oct 12), 2016, Kyoto, Japan
11. Kurosaki, T. "Memory B cell generation mechanisms" The Centro de Biologia Molecular Severo Ochoa (CBMSO, CSIC-UAM) Sep 8,2016, Madrid, Spain
12. Kurosaki, T. "Instructive selection of germinal center B cells into the memory compartment" International congress of Immunology 2016, August 21-26 (Aug 26), 2016, Melbourne Australia
13. 黒崎知博。「液性免疫オペレーション機構」第18回 日本免疫学会サマースクール。7月11日～7月14日（発表は11日）2016年、函館
14. Kurosaki, T. "Instructive selection of germinal center B cells into the memory compartment" Antibody and Fc Receptor Biology: Bench to Bedside A Special Symposium to Honor Jeffrey V. Ravetch on his 65th

Birthday, May 9, 2016, The Rockefeller university, New York, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

化学工業日報(朝刊 5 面)「メモリーB 細胞分化に柔軟性 類似抗原も認識、ワクチン開発に期待」2016年5月16日

ホームページ等

http://lymph.ifrec.osaka-u.ac.jp/research_j.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒崎 知博(Kurosaki Tomohiro)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任教授(常勤)

研究者番号: 50178125