

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 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249014

研究課題名（和文） ヘムによる液性免疫応答制御の解明

研究課題名（英文） Regulation of immune cell responses by heme

研究代表者

五十嵐 和彦（IGARASHI KAZUHIKO）

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00250738

研究成果の概要（和文）：

転写因子 Bach2 は B リンパ球における抗体遺伝子クラススイッチ組み換えや体細胞突然変異に重要である。本研究では補欠分子族ヘムが Bach2 に直接結合し、その DNA 結合活性を阻害し、細胞内での半減期を短縮することを見いだした。さらに、Bach2 のヘム制御領域がドメイン様構造をとることを見だし、その中でもヘム結合に直接関わるアミノ酸残基 3 ヶを特定した。これにより、ヘムが液性免疫応答のシグナル分子として機能することを提唱した。

研究成果の概要（英文）：

The transcription factor Bach2 is required in B cells for the antibody class switch DNA recombination and somatic hypermutation. In this project, we have established that the prosthetic group heme binds directly to Bach2 to inhibits its DNA binding activity and to induce rapid turnover within cells. We also identified a domain-like structure within Bach2 that mediates the regulation by heme. Three cysteine residues within this domain were critical for the heme-Bach2 interaction. These results suggest that heme functions as a signaling molecule in B cells to regulate immune responses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	17,300,000	5,190,000	22,490,000
2010 年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2011 年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
年度			
年度			
総計	37,100,000	11,130,000	48,230,000

研究分野：ライフサイエンス（共通基礎研究）

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学

キーワード：遺伝子、免疫学、発生分化、蛋白質、ストレス

1. 研究開始当初の背景

1. ヘムと転写制御 電子伝達や酸素代謝といった古典的機能に加え、ヘムがリガンドとしていくつかのタンパク質の機能制御やガス分子応答にも関わるということが報告され、今

までに想定されていなかった新しいヘム機能への関心が高まりつつある。申請者は、1994年に Bach1 および Bach2 を発見し(MCB 2004)、Bach1 が多細胞生物では初めてのヘムをリガンドとする転写因子であることを証

明した (EMBO J. 2001, 2002)。そして、様々な細胞系列において、細胞内ヘム濃度上昇とともに遊離ヘムが Bach1 に結合し、その DNA 結合活性が阻害され、核から細胞質へ転移すること (EMBO J. 2004)、さらにはユビキチン化と分解が誘導されること (MCB 2007) を発見した。Bach1 は Maf とヘテロ二量体を形成して DNA (Maf recognition element, MARE) に結合し、酸化ストレス防御遺伝子やグロビン遺伝子の転写を抑える。したがって、ヘムは、広汎な細胞で Bach1 を不活性化することにより、酸化ストレス防御遺伝子転写の脱抑制を引き起こす。さらには、癌抑制因子 p53 と結合して細胞老化を抑える (Nature Struct. Mol. Biol. 2008)。また、赤芽球では分化に伴って大量に合成されるヘムが Bach1 を不活性化し、その結果グロビン遺伝子の発現を誘導する (PNAS 2004, Nature Struct. Mol. Biol. 2004)。これは、ヘム生合成とグロビン遺伝子発現を共役する新機構として注目されている。一方、Bach2 は Bach1 と類似するが、そのヘムによる制御は全く不明であった。申請者らは最近、Bach2 もヘム結合能を有すること、そして Bach1 と同様にその DNA 結合活性やユビキチン化・分解がヘムにより制御されることを見いだした (未発表)。

2. Bach と液性免疫応答 Bach1 は広汎な細胞系列で発現するのに対して、Bach2 は B 細胞に特異的である (EMBO J. 1998)。申請者は、これらがいずれも B 細胞分化や液性免疫応答の制御に必須であることを見いだしてきた (Nature 2004)。B 細胞は、抗原刺激等に応答して活性化され、抗体産生細胞 (形質細胞) へと最終分化を遂げる。この際、一部の細胞では抗体重鎖遺伝子に DNA 組み換え (class switch recombination, CSR) が生じ、抗体のクラススイッチが起きる。また、抗原結合部位を規定する V(D)J エクソンに突然変異が多数導入され (somatic hypermutation, SHM)、抗原結合能の上昇が起きる。これら二つのイベントは、抗体機能の多様化と機能向上をもたらすものであり、生体防御に必須である。いずれも本庶教授らにより発見された RNA 編集酵素類似因子 AID により実行される (Honjo, T. Nat. Immunol. 9, 335-2008)。実は Bach2 ノックアウトマウスの B 細胞では、活性化刺激が入っても AID が誘導されず、CSR と SHM はほとんど生じない (Nature 2004)。すなわち、Bach2 は何らかの標的遺伝子 (たぶん AID の抑制因子遺伝子) を抑制することにより、AID の発現、さらには CSR と SHM を実行させるという、極めて重要な生理機能を有する。一方、Bach1 ノックアウトマウスでは液性免疫異常は全く認められないが、Bach1/Bach2 ダブルノックアウト (DKO) マウスでは、B 細胞分化がその初期段階 (pro-B や pre-B 細胞) から著しく障害されて、成熟 B 細胞が減

少する (未発表)。すなわち、Bach1 と Bach2 は、B 細胞初期段階においては互いに補完しあう形で分化に必須の機能を担う。いずれもヘム受容体として機能することを考えれば、ヘムがこれら転写因子を介して液性免疫を制御する可能性は十分に考えられる。一連の知見をさらに発展させ、ヘムによる免疫制御の分子機構と意義に迫ることが可能となりつつある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヘムによる Bach1 および Bach2 の制御に焦点をあて、「ヘムシグナルによる免疫応答制御」という概念を確立することである。B 細胞が刺激を受けて形質細胞へと分化する際、Bach2 が機能すれば CSR や SHM が生じてアイソタイプ抗体産生へ向かい、Bach2 が不活性化されるとそのまま IgM 産生へと向かうことを見いだしている (論文準備中、図 2)。また、造血幹細胞から B 細胞が分化する過程では、Bach1 と Bach2 が B 細胞分化にほぼ必須である。したがって、ヘムが Bach2 の不活性化を介して抗体種を調整する可能性、そして、ヘムが Bach1 と Bach2 を受容体として B 細胞分化、ひいては液性免疫応答の量と質を調整する可能性が示唆される。Bach1/Bach2 DKO マウスではマクロファージ系が増加すること (未発表) を考えると、IgM 型抗体産生やマクロファージ分化を促すことにより、ヘムは免疫系を獲得免疫系から自然免疫系へシフトさせる可能性もある。この一連の仮説を検証する。

3. 研究の方法

柱 1 では、B 細胞特異的ヘム生合成・分解系ノックアウトマウスを作成し、ヘム代謝システムと B 細胞免疫システムの関連を探る。柱 2 では、ヘム-Bach の結合様式とその機能的意義を解明する。Bach1 および Bach2 は、いずれも 5 配位と 6 配位の二種類 (それぞれ低、あるいは高アフィニティー) のヘム結合様式をもち、複数のヘムを結合する極めてユニークな転写因子である。ヘム結合様式の違いにより、ガス分子受容やタンパク質分解など、異なる制御が行われるものと予想される。ヘム結合に関わるヘム軸配位子を同定し、これら全てに変異を入れることにより、ヘム非応答性 Bach をデザインする。その機能変化を試験管内および細胞レベルで調べる。柱 3 では、ヘム非応答性 Bach2 等を用いて Bach2 KO や Bach1/Bach2 DKO マウスのレスキューを行う。B 細胞分化や免疫応答を比較解析することにより、ヘムが CSR や SHM の頻度、B 細胞・形質細胞・マクロファージ分化を調整することを示す。

得られる知見を総合し、ヘムシグナルを免疫システムの中に位置づける。

4. 研究成果

(1) 柱1の研究成果

転写抑制因子 **Bach2** は B 細胞に多く発現し、形質細胞分化のマスター制御転写因子 **Blimp-1** の遺伝子発現を抑制する。**Bach2** ノックアウトマウスの解析から、**Bach2** が形質細胞分化を抑制し（形質細胞への分化のブレーキとして機能）、クラススイッチ組換え(CSR)に必須であることが示されている。**Blimp-1** は、形質細胞分化を促進する一方で、クラススイッチに対しては抑制的に作用する。この機構により、抗原に应答して B 細胞が形質細胞へと分化する際、**Bach2** が迅速に不活性化される場合には直ちに **Blimp-1** が誘導され、CSR を経ずに IgM 産生形質細胞へと分化する。しかしながら、**Bach2** の転写活性がどのように制御されているかは不明であった。

Bach2 にはヘム結合可能な Cys-Pro モチーフ(CPモチーフ)が存在する。そこで、ヘムが **Bach2** と結合することで、成熟 B 細胞から形質細胞への分化が制御される可能性を考えた。この可能性を追求するために、生化学的および分子生物学的手法を組合せ、ヘムが **Bach2** と直接結合し、**Bach2** の DNA 結合を阻害することで、**Bach2** の転写抑制能を制御していることを明らかにした。更に、マウス脾臓 B 細胞を用い、FACS 解析及び ELISPOT アッセイなどを行った結果、ヘムが成熟 B 細胞から形質細胞への分化を促進するという全く新しい現象を発見し、*Blood* 誌に報告した。

(2) 柱2の研究成果

ヘムと **Bach2** の相互作用によって生じる現象を捉えることはできたが、ヘムとの結合が、**Bach2** の立体構造にどのような影響を与え、転写抑制能を阻害しているかは全く不明なままであった。この問題を解決するために、ヘムと **Bach2** の相互作用の実体を様々な機器解析をおこない検討した。

Bach2 のアミノ酸組成、及び二次構造予測の結果、**Bach2** は N 端に BTB ドメイン、C 端に b-Zip ドメインを持つ以外、ほとんどの領域が立体構造をとらない天然変性領域であると考えられている。全ての CPモチーフは天然変性領域に存在し、かつ「ヘム制御ドメイン」は、天然変性領域に含まれる。従って、このヘム制御ドメインに着目し、ヘムによる **Bach2** の構造変化について機器解析を用いて検討することで、ヘムが **Bach2** の転写活性をどのように調節しているかを明らかにできると考えた。まず、**Bach2** の様々な領域について分光学解析を行うことで、「全長 **Bach2** と類似した 5 配位と 6 配位両方のヘム結合を担う領域」を見いだした。更にこの領域は、**Bach2** のプロテアーゼを用いた限定分解によって、ドメイン構造として存在する可能性を

示し（以下、ヘム制御ドメインとする）、質量分析 (MALDI-tof:マトリックス支援レーザー脱離イオン化法)により領域を確認した。次にタンパク質の熱力学的な安定性を評価するため、ヘム制御ドメインを大腸菌で発現し、精製後、温度変化 (5-60°C) に伴う動的光散乱測定を行った。その結果、ヘムの共存/非共存での比較では、ヘム共存下のほうが変性の始まる温度が低く、ヘムの結合により **Bach2** タンパク質は熱力学的に不安定になることが明らかとなった。つまり、ヘム結合によって **Bach2** が構造変化し、疎水的なアミノ酸が露出し非特異的な多量体化が起こることが示唆された。ヘム制御ドメインについては、分析超遠心による分子量測定によりヘムの共存・非共存にかかわらず溶液内で単量体として存在することを確認している。更に、ヘムの共存・非共存における X 線小角散乱測定(SAXS)を行ない、ヘム制御ドメインの溶液内の構造変化について検討した。SAXS の情報の一つとして Kratky-plot が得られ、タンパク質がコンパクトか unfold しているかについて検討することができる。SAXS 測定の結果、ヘム制御ドメインはヘム存在下では、典型的な unfold 状態(天然変性タンパク質)を示し、ヘム存在化では、グラフにピークの出現が認められ、ヘム制御ドメインへのヘムの結合によって、部分的にしるまとまりをもつ構造に変化したこと示す結果が得られた。

以上の結果は、現在論文としてのとりまとめを進めており、近日中に発表できるものと考えている。

(3) 柱3の研究成果

柱の実験から、ヘム制御ドメインを同定した。また、この中に 6 配位結合に関わるシステイン残基 3 ヶを特定した。そこで、このドメイン全体を欠失する **Bach2** cDNA、およびシステイン 3 ヶに変異を有する **Bach2** cDNA を作成し、B 細胞特異的エンハンサー・プロモーターに連結した人工遺伝子を構築した。得られたものをマウス受精卵に微量注入し、定法に従って遺伝子導入マウスを得た。これまでに、これら変異 **Bach2** の B 細胞での発現を確認した。また、トランスジェニックマウスの B リンパ球分化などに関する基本的検討を終えている。研究期間はここで終了となったが、今後はこれらトランスジェニックマウスを **Bach2** KO や **Bach1/Bach2** DKO マウスと交配し、得られる B リンパ球のヘム応答性は免疫応答 (CSR や SHM の頻度、B 細胞・形質細胞・マクロファージ分化など) を詳細に解析していく予定である。

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2件)

1. Watanabe-Matsui, M., Muto, A., Matsui, T., Itoh-Nakadai, A., Nakajima, O., Murayama, K., Yamamoto, M., Ikeda-Saito, M., Igarashi, K., Heme regulates B cell differentiation, antibody class switch, and heme oxygenase-1 expression in B cells as a ligand of Bach2, Blood、査読有、117巻、2011年、5438-5448
2. Muto, A., Ochiai, K., Kimura, Y., Itoh-Nakadai, A., Calame, K.L., Ikebe, D., Tashiro, S. and Igarashi, K., Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch., EMBO J.、査読有、29巻、2010年、4048-4061

[学会発表] (計3件)

1. 五十嵐和彦、鉄代謝と転写制御のクロストークとその出力異常、第12回WAKOつくばフォーラム、2011年11月29日、筑波和光ホール
2. K. Igarashi, Regulation of erythroid and lymphoid differentiation by heme-binding transcription factors Bach1 and Bach2.、日本血液学会シンポジウム、2010年9月25日、横浜
3. 五十嵐和彦、Dense co-regulators network for HO-1 gene expression 6th International Congress on Heme oxygenases、Heme oxygenases in Biology&Medicine、2009年10月1日、マイアミビーチリゾートアンドスパ

[図書] (計1件)

1. 遺伝情報の発現制御～転写機構からエピジェネティクスまで～ 監訳 五十嵐和彦、深水昭吉、山本雅之 メディカルサイエンスインターナショナル 2012年、429

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

五十嵐 和彦 (IGARASHI KAZUHIKO)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00250738

(2)研究分担者

本橋 ほづみ (MOTOHASHI HOZUMI)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00282351

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

加藤 恭丈 (KATOH YASUTAKE)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40397914

村山 和隆 (MURAYAMA KAZUTAKA)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40400452

(3)連携研究者

()

研究者番号：