

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：14301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590307
 研究課題名（和文） 分化抑制因子（Id）の機能特異性を生み出す分子基盤の検索
 研究課題名（英文） Analysis of the functional difference among various Id proteins
 研究代表者 菅井 学
 （SUGAI MANABU）
 京都大学・医学研究科・講師
 研究者番号：90303891

研究成果の概要（和文）：申請者は、Id2 遺伝子欠損マウス、Id3 欠損マウスにおいて、B 細胞活性化状況が異なることに起因すると思われる免疫反応の異常を見いだしている。この差異を生み出す分子基盤を明らかにする目的にて、Id2^{-/-}B 細胞、Id3^{-/-}B 細胞と、コントロール B 細胞の遺伝子発現プロファイリングを行った。その結果、Id2、Id3 欠損により発現量に変化の見られる多数の遺伝子群が明らかになったが、それぞれの Id 機能特異性に依存した遺伝子発現制御機構の詳細の解明には、更なる解析が必要である。

研究成果の概要（英文）：We have found the differences in activation status between Id2^{-/-} and Id3^{-/-} B cells. To identify the molecular mechanism to explain the phenotypic difference observed in these mice, we performed the DNA array experiments using mRNA probes from Id2^{-/-} or Id3^{-/-} B cells. Drastic changes in gene expressions were observed between them. To elucidate the functional differences of Id2 and Id3 to modulate B cell activation program require more complicated analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|---------|---------|---------|
| 2009年度 | 1500000 | 450000 | 1950000 |
| 2010年度 | 1000000 | 300000 | 1300000 |
| 2011年度 | 1100000 | 330000 | 1430000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3600000 | 1080000 | 4680000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：発現制御・免疫学・遺伝子

1. 研究開始当初の背景

分化抑制因子 Id(Inhibitor of Differentiation)は、細胞分化の抑制という機能以外に、生物学的に重要な様々な現象に関与していることが最近の知見から明らかになりつつある。ほ乳類に見いだされているすべての Id 遺伝子は、basic helix-loop-helix(bHLH)型転写因子を負に制御するという性質をもち、これが生体内での Id 機能発現に必要な唯一重要な特性であるという考え方が主流である。その一方で、Id の関与する種々生命現象は、単純な bHLH 型転写因子の機能阻害のみでは説明出来ない点も多く、Id の生体内での機能の詳細はいまだ不明である

2. 研究の目的

例えば Id2、Id3 遺伝子発現はともに、B 細胞抗原刺激等の共通のシグナルによって誘導される。しかし、それぞれの遺伝子破壊マウスに見られる B 細胞機能異常と、それに伴って認められるマウスの病態は、全く異なっている。Id3 欠損マウスは Sjogren's syndrome を発症することが知られているが、Id2 欠損マウスはこのような自己免疫疾患様の表現系は示さず、アレルギー様素因を示す。本研究では、分化抑制因子 Id2 欠損マウスにみられる B 細胞活性化亢進と、Id3 欠損マウスに見られる B 細胞活性化障害という現象に焦点を絞り、B 細胞におけるそれぞれの Id の役割を明らかにすることを足がかりとして、各種 Id 遺伝子の機能的相違を生み出す分子基盤をみいだすことを目的とする。この実験によって得られた種々 Id の機能を、様々な Id の関与する生命現象において検証しながら、細胞増殖、細胞分化、細胞老化といった現象における各種 Id の役割と機能を明らかにする。

3. 研究の方法

Id2^{-/-}B 細胞もしくは Id3^{-/-}B 細胞と、コントロール B 細胞を in vitro にて分化誘導し、その時の遺伝子発現変化を遺伝子マイクロアレイにてスクリーニングすることにより Id2 もしくは Id3 欠損により発現に変化のみられる遺伝子を同定する。これらの情報と、生化学的なアプローチを組み合わせて比較検討することによって、B 細胞における Id2(Id3)の機能を総合的に判断するのに重要な情報を得る。

4. 研究成果

Id2欠損B細胞、Id3欠損B細胞は、野生型B細胞と比べ、遺伝子発現に変化を認める。また、Id2欠損B細胞、Id3欠損B細胞ともに同じような発現変化を認める遺伝子はほとんどなかったことから、Id2とId3はE2Aといった共通の転写因子の機能を抑えるといった従来から考えられてきた機能以外に、Id2特異的、Id3特異的機能を持つ可能性が示唆された。しかし、Id2,Id3の機能的複合体に特異的な因子を単離するには至っていない。Id2、Id3が様々なB細胞分化状態の維持にどのように関与しているのかを再度詳細に検証する目的にて、種々分化段階のB細胞株をもちいたinducible lineを樹立した。Id遺伝子の発現誘導によって、細胞の活性化状態等の変化を認めたが、Id2、Id3間で、程度の違い以上の差を見いだす事は出来なかった。したがって、この系(過剰発現の系)を用いてId2とId3の機能的相違を見いだす事は難しいということが明らかになった。次に、活性化B細胞由来のB細胞株にId2、Id3を発現させ、それぞれの複合体を分離しその構成成分を調べた。ここでも二つの複合体間に大きな違いを見いだす事は出来なかった。

これらのことから、Id2とId3欠損マウスに認めら

れる表現系の差を生み出す分子基盤を明らかにするためには、さらに踏み込んだ解析が必要であり、『もう少し分化状況に明らかな違いを認める細胞を用いて解析する』といった工夫が必要と思われた。

Id2 欠損 B 細胞と Id3 欠損 B 細胞では、細胞分化や種々シグナルに対する反応性に明らかな違いがみとめられることから、次は野生型 B 細胞と Id2 欠損マウス由来、もしくは Id3 欠損マウス由来の B 細胞を材料として、Id2 複合体、Id3 複合体を解析する事を予定している。

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 6 件)

査読有り

1. Sugai, M. #, Aoki, K., Osato, M., Nambu, Y., Ito, K., Taketo, M. M., and Shimizu, A. # : Runx3 Is Required for Full Activation of Regulatory T Cells To Prevent Colitis-Associated Tumor Formation *J. Immunol.* **186** (11), 6515 (2011) DOI: 10.4049/jimmunol.1001671

査読有り

2. Sugai, M. #, Watanabe, K., Nambu, Y., Hayashi, T. and Shimizu, A.: Functions of Runx in IgA class switch recombination *J Cellular Biochemistry*, *112*; 409-414 (2011) DOI: 10.1002/jcb.22971

査読有り

3. Sakata-Goto, T., Takahashi, K., Kiso, H., Huang, B., Tsukamoto, H., Takemoto, M., Hayashi, T., Sugai, M. Nakamura, T., Yokota, Y., Shimizu, A., Slavkin, H. and Bessho, K. Id2 controls chondrogenesis acting downstream of

BMP signaling during maxillary morphogenesis, *Bone*, **50**; 69-78 (2012) DOI: 10.1016/j.bone.2011.09.049

査読有り

4. Ishikawa, C., Sawada, S., Nakachi, S., Senba, M., Sugai, M. and Mori, N.: Constitutive expression of activation-induced cytidine deaminase in adult T-cell leukemia cells *Carcinogenesis* **32**, 110-119 (2011) DOI 該当なし

査読有り

5. Watanabe, K., Sugai, M. #, Nambu, Y., Osato, M., Hayashi, T., Kawaguchi, M., Komori, T., Ito, Y., Shimizu, A. #: Requirement for Runx proteins in IgA class switching acting downstream of TGF- β 1 and retinoic acid signaling *J. Immunol.* **184**, 2785-2792 (2010) DOI: 10.4049/jimmunol.0901823

査読有り

6. Suto, H., Katakai, T., Sugai, M., Kinashi, T., Shimizu, A. : CXCL13 production by an established lymph node stromal cell line via lymphotoxin-beta receptor engagement involves the cooperation of multiple signaling pathways *Int. Immunol.* **21**, 467-476 (2009) DOI: 10.1093/intimm/dxp014

[学会発表] (計 1 件)

2011年日本免疫学会学術集会2011年11月27日
Functions of SIP1 in B cell development and AID gene expression 林 達成¹, 南部 由希子¹, 眞野 浩人¹, 東 雄二郎², Kristin Verschueren³, Danny Huylebroeck³, 清水 章¹, 菅井 学¹

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅井 学 (SUGAI MANABU)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：90303891