

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 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590443

研究課題名（和文） 巨大転写因子を介した T 細胞の positive selection の分子機構の研究

研究課題名（英文） Analysis of positive selection process during T cell development via large transcription factor

研究代表者

高木 豪 (TAKAGI TSUYOSHI)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・周生期学部・主任研究員

研究者番号：70300879

研究成果の概要（和文）：我々の体は、免疫システムにより、外来の異物から守られている。特に獲得免疫の形成システムは厳密に制御されたものでなくてはならない。なぜなら、自己抗原を認識するような T 細胞などが形成されると、自己免疫疾患などの重大な影響を我々の体にもたらすためである。本研究では自己抗原を認識しない T 細胞がどのように選択されるのかその分子メカニズムを理解することを目標とした。具体的には、この選択に必須な転写制御因子がどのような標的遺伝子群に働きかけてプロセスを進行させているのか分子生物学的な手法を用いて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Our bodies are protected from foreign bodies with sophisticated immune system. Establishment of acquired immune system should be highly regulated. Because destruction of this process means that ourselves might be exposed to attack from our immune cells. It is very important to understand how suitable T cells are selected to develop. In this study, I revealed how the transcription factor, that is essential for this process, regulates downstream genes to achieve it.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：転写因子、positive selection、T 細胞、Zn-フィンガー

1. 研究開始当初の背景

免疫系には、自然免疫と適応免疫の二つがある。適応免疫は T 細胞などの免疫担当細胞を介するものであり、T 細胞はウイルスなどに感染した細胞の MHC に結合した抗原を T cell receptor (TCR) を介して認識し、感染細胞の速やかな除去を行う。多様な TCR のレ

パートリーを持つ T 細胞は胸腺において形成される。胸腺の中で T 細胞の前駆細胞は増殖、分化を繰り返す。そして CD4、CD8 double positive (DP) 細胞というステージに到達するまでに様々な TCR を有する細胞のプールが形成される。このプールの中から、MHC に結合した自己抗原を認識する細胞は負の選

択 (negative selection) を受け細胞死により除かれる。一方 MHC に結合した自己抗原を認識しない (しかし、MHC に対する認識能はある) 細胞は、正の選択を受け、生存し CD4 single positive (SP) 細胞、CD8 SP 細胞へと成熟、分化に向かう。このように、様々な個性を持つ細胞集団に一定の制限をかけながら形成するシステムは生物学的に非常に興味深い現象である。そのため、この胸腺における T 細胞の選択の分子メカニズムの解析が精力的に行われてきた。特に様々な遺伝子変異マウスの解析から様々な細胞内シグナル伝達因子が正、負の選択に関与していることが明らかにされてきた。しかし細胞外からのシグナルを最終的に核内に伝える転写制御因子がどのように胸腺での選択に関わっているのか十分分かっていなかった。

2. 研究の目的

私はこれまで、転写制御因子群の Schnurri ファミリーの機能解析を行ってきた。Schnurri-1、-2、-3 の三つの因子より構成されるこのファミリーはショウジョウバエにおいてサイトカインの BMP を介したシグナル伝達に関わる Schnurri の相同遺伝子群に相当する。実際 Schnurri-2 も脂肪細胞分化において BMP シグナルに応答し細胞質から核内に移行し PPAR γ の転写制御を行う。一方、Schnurri ファミリーは転写制御因子として非常にユニークな構造的な特徴を有している。一つには Schnurri ファミリーは 270kD を超える巨大な因子であるという点である。二つ目として Zn-フィンガー型 DNA 結合ドメインを二つ有していて、それぞれ独立に共通した DNA 配列を認識するという点である。このような構造的な特徴から Schnurri は核内で関連する複数の標的遺伝子群の転写制御領域に同時に結合しながら巨大転写制御複合体を形成していることが予想される。そして、これらの転写制御を一括して行うことで細胞分化を協調的、効率的に誘導している可能性が考えられる。

生体内における Schnurri ファミリーの機能を明らかにするために、これまでこれらの遺伝子変異マウスの解析を行ってきた。その結果 Schnurri-2 が様々な組織の分化、機能に重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。またこの一連の解析の中から、予想外にも、Schnurri-2 変異マウスにおいて胸腺における positive selection に異常があることを見出した。また非常に興味深いことに heterozygous の Schnurri-2 変異マウスにおいても軽度の positive selection の異常が観察された。このことから Schnurri-2 は positive selection においてその機能のみに限らず、細胞内における Schnurri-2 タンパク質の量自体も重要であり、positive

selection において master regulator 的な働きをしている可能性が十分考えられた。

このような経過から、本研究では positive selection に必須である転写制御因子 Schnurri-2 に着目して研究を行う。具体的には、Schnurri-2 がどのような標的遺伝子群の遺伝子領域に結合して転写制御を行っているのか分子生物学的手法により明らかにする。この研究を通して positive selection の分子機構の中で理解の遅れている核内イベントを解明することで、現象の総合的な解明に繋げることを目的としている。

3. 研究の方法

Positive selection に必須な転写制御因子 Schnurri-2 が、positive selection においてどのような遺伝子群の転写制御に関わっているのか明らかにするために chip-on-chip の手法を用いて明らかにする。

Positive selection は胸腺の DP 細胞のステージで起こるが、普通のマウスでは、positive selection を受ける細胞は DP 細胞の数パーセントと非常に少なく、野生型マウスの DP 細胞を精製して解析しても positive selection 特異的な Schnurri-2 の標的遺伝子群を見つけることは難しいと考えられる。そこで遺伝学的手法により positive selection を受ける DP 細胞の割合を多いマウスから DP 細胞を精製することにした。実際としてはニワトリの ovoalbumin を認識するマウスの TCR を発現するトランスジェニックマウス系統 (DO11.10) を用いることとした。マウス体内では、ニワトリの ovoalbumin は存在せず、またこの transgene 型の TCR はすべての DP 細胞で発現するため、理論的にはすべての DP 細胞が positive selection を受け得る potential を有している。

DO11.10 の DP 細胞、野生型マウスの DP 細胞、そして negative control 用の Schnurri-2 変異マウスの DP 細胞を CD8 抗体の付いたマイクロビーズを用いて精製を行った。精製した DP 細胞に対しホルマリン処理を行う。この処理により、Schnurri-2 タンパク質は核内で結合している標的遺伝子領域の DNA と共に架橋される。その後ソニケーション処理により、Schnurri-2 と標的遺伝子領域 DNA の複合体を短く断片化する。そして Schnurri-2 抗体を用いて Schnurri-2 と標的遺伝子領域 DNA の複合体を精製し、標的遺伝子領域 DNA を回収する。

回収した DNA 断片を増幅後、蛍光ラベルし、アフィメトリクス社のマウスプロモーター DNA アレーを用いてハイブリダイゼーションを行う。専用機器で蛍光シグナルを取り込みデータ化を行う。Schnurri-2 が実際にどの遺伝子領域に結合していたかは、ソフトウェアシステムの CisGenome を用いて行った。

4. 研究成果

CisGenome で解析を行った結果は以下の通りである。

Negative control の Schnurri-2 変異マウス DP より DO11.10 TCR Tg マウスの DP 細胞で多く回収された遺伝子領域の数 (DO11.10 DP > Schnurri-2 KO DP) は 530 であった。Positive selection を受ける細胞の割合の低い野生型マウスの DP 細胞に比べ、DO11.10 TCR Tg マウスの DP 細胞で多く回収された遺伝子領域の数 (DO11.10 DP > WT DP) は 555 であった。なお TCR α 、TCR β 領域が非常に多く見つかったが transgene としてゲノム中に大量のコピー数が存在していることからコンタミネーションの可能性を排除できないと考え、この集計からは除外した。

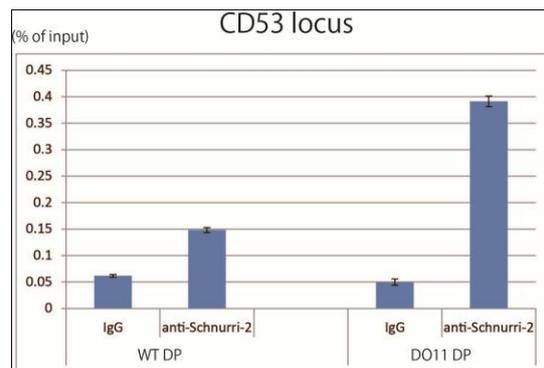
次に、(DO11.10 DP > Schnurri-2 KO DP) と (DO11.10 DP > WT DP) で共通している遺伝子領域がより、Schnurri-2 の標的遺伝子である可能性が高いと思われるので、これらの共通性について検討を行った。検討を行う際に、次のような条件で行った。(DO11.10 DP > WT DP) では野生型マウスの DP 細胞にも positive selection を受けている細胞が少ないが含まれているため、DO11.10 の DP 細胞と比較した場合に相殺されて、見つかる遺伝子領域の長さが短くなる傾向があると予想される。そこで、(DO11.10 DP > WT DP) と (DO11.10 DP > Schnurri-2 KO DP) で共通する遺伝子領域について、全く同じ長さか、(DO11.10 DP > Schnurri-2 KO DP) の方が (DO11.10 DP > WT DP) より長いものに限定した。その結果、共通する遺伝子領域が 33 となった。以下にその 33 を列記する。2010321M09 Rik (NM_175153), 9530098N22 Rik (NM_178786), Amph (NM_175007), Angpt (NM_009640), Atp2c1 (NM_175025), CD53 (NM_007651), Cdk5rap2 (NM_145990), Cnn3 (NM_028044), Ctnnd2 (NM_008729), Dmx1 (NM_001081371), Egl3 (NM_028133), Eltd1 (NM_133222), Golph3l (NM_146133), Got2 (NM_010325), Hnrdp (NM_0010077265), Lingo2 (NM_175516), Lysmd1 (NM_028134), Magi2 (NM_015823), Mrpl1 (NM_001039084), Nbea (NM_030595), Ndg1 (NM_183322), Neurog2 (NM_009718), Ptbp2 (NM_019550), Ptpn22 (NM_008979), Raly1 (NM_178631), Rai14 (NM_030690), Sema6a (NM_018744), Son (NM_019973), Sox3 (NM_009237), Stat4 (NM_011487), Sty11 (NM_018804), Tmc1 (NM_028953), Trpa1 (NM_177781)

次に、過去の論文における DNA マイクロアレー解析データから TCR シグナリングとは異なり、positive selection 特異的に発現が誘導されるということが報告されている遺伝子群と今回の 33 遺伝子領域を比較したとこ

ろ、CD53 が共通していた。このことから、positive selection において、Schnurri-2 が CD53 遺伝子領域に結合して、CD53 の遺伝子発現を誘導している可能性が考えられた。

実際、Schnurri-2 の野生型と変異型マウスから精製した DP 細胞における mRNA の発現をマイクロアレー解析を用いて比較した際、変異型マウスにおいて CD53 の発現が野生型の 1/3 に低下していた。

今回の chip-on-chip による解析データを確認するために、野生型 (WT) と DO11.10 TCR Tg マウスから精製した DP 細胞を用いて、Schnurri-2 抗体を用いて、再度クロマチン免疫沈降を行い、回収した Schnurri-2 結合 DNA 断片についてリアルタイム PCR 法を用いて実際に定量を行った (下図)。その結果、WT DP、DO11 DP 共に、コントロールの IgG を用いた場合より Schnurri-2 抗体を用いた場合に多くの CD53 遺伝子領域が回収された。また WT DP より positive selection を受けている細胞の割合の多い DO11 DP 細胞でより多くの CD53 遺伝子領域が Schnurri-2 抗体で免疫沈降されていることから、chip-on-chip のデータの再現性が確認できた。



今回の研究により、positive selection に必須な転写制御因子 Schnurri-2 は DP 細胞において positive selection の際に遺伝子発現の誘導が見られる CD53 の遺伝子領域に結合してその転写の誘導に関わることが示唆された。CD53 の Schnurri-2 による転写誘導が positive selection のプロセスに重要な役割を担っているのかどうかは、非常に興味深い問題である。これまでのところ CD53 遺伝子変異マウスの解析の報告はまだないため、今後このような遺伝子変異マウスを作製し、解析を行うことにより、より詳細な positive selection の分子メカニズムの解明に繋がると期待できる。

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)

()

研究者番号：

①Keizo Takao, Katsunori Kobayashi, Hideo Hagihara, Koji Ohira, Hirotaka Shoji, Satoko Hattori, Hisatsugu Koshimizu, Juzoh Umemori, Keiko Toyama, Hironori K Nakamura, Mahomi Kuroiwa, Jun Maeda, Kimie Atsuzawa, Kayoko Esaki, Shun Yamaguchi, Shigeki Furuya, Tsuyoshi Takagi, Noah M Walton, Nobuhiro Hayashi, Hidenori Suzuki, Makoto Higuchi, Nobuteru Usuda, Tetsuya Suhara, Akinori Nishi, Mitsuyuki Matsumoto, Shunsuke Ishii & Tsuyoshi Miyakawa

“Deficiency of Schnurri-2, a MHC enhancer binding protein, induce mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia”
Neuropsychopharmacology 査読有 (2013)
in press

②Tracy L. Staton, Vanja Lazarevic, Dallas C. Jones, Amanda J. Lanser, Tsuyoshi Takagi, Shunsuke Ishii & Laurie H. Glimcher

“Danpening of death pathway by schnurri-2 is essential for T cell development”
Nature 査読有 v472 (2011) p105-109
DOI:10.1038/nature09848

[学会発表] (計 2 件)

①高木豪, 東雄二郎

“de novo 型 Sip1 ヘテロ変異マウスを用いた Mowat-Wilson syndrome のモデル動物としての有用性の検討”

第 35 回日本分子生物学会年会
(20131211) 福岡

②高木豪, 石井俊輔

“Positive selection に必要な Schnurri-2 の chip on chip 法を用いた解析”

第 33 回日本分子生物学会年会
(20101214) 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 豪 (TAKAGI TSUYOSHI)

愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所・周生期学部・主任研究員

研究者番号：70300879

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者