

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金) 研究成果報告書

平成 25 年 4 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011~2012

課題番号：23790322

研究課題名(和文) 転写因子 Bach2 に対するユビキチン化修飾の生理的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of physiological role of the Bach2 ubiquitination

研究代表者

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

研究成果の概要(和文)：

Bach2 タンパク質がユビキチン化修飾により B 細胞の活性化応答が制御される可能性を検討した。しかし、リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* の系では、ユビキチン化システムのアダプター候補因子 MIPP と Klh19 が Bach2 タンパク質をユビキチン化に関与する結果は得られなかった。そこで、さらにプロテオミクス解析を行った結果、Bach2 がリン酸化修飾を受けることを突き止めた。アミノ酸置換変異型 Bach2 の解析から Bach2 タンパク質のリン酸化に最も影響のあるアミノ酸を同定した。

研究成果の概要(英文)：

In immune response, B cell fate might be regulated by the amount of ubiquitinated Bach2 proteins. However, *in vitro* recombinant protein assay revealed that MIPP and Klh19, which are adaptor proteins in ubiquitination system, didn't enhance the ubiquitination of Bach2 protein. Furthermore, by proteomics analysis using MS spectrometry and mutagenesis for Bach2 protein, phosphorylation sites on Bach2 protein were identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：遺伝子、発現制御、転写因子、Bach2、ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 効果的な免疫応答を実現するために、B 細胞は抗体を初期設定の IgM から IgG など他のアイソタイプ抗体にクラススイッチする必要がある。免疫応答の際に、抗原で活性化された B 細胞から抗体分泌を担う形質細胞へ最終分化する過程では、初期設定のまま「IgM を分泌する形質細胞」へ分化するか、CSR を経て「ほかのアイソタイプ抗体を分泌する形質細胞」へ分化するかという運命決定

がなされる。クラススイッチを実行させる遺伝子発現調節ネットワークでは、転写因子 Bach2 が中心的な役割を担うことを私たちは報告した。Bach2 ノックアウトマウス由来の B 細胞はクラススイッチが障害される。その原因は、クラススイッチに必須の酵素 AID の遺伝子発現の誘導障害である。Bach2 の直接標的遺伝子は形質細胞分化に必須の転写因子 Blimp-1 の遺伝子であることを突き止めて

いた。クラススイッチを実行する B 細胞では AID 遺伝子発現の時間的余裕を生み出すために、Bach2 が Blimp-1 遺伝子の発現を抑制する遺伝子回路が駆動されることを示した。一方でクラススイッチしない B 細胞では Bach2 の活性が低下し、Blimp-1 遺伝子発現が誘導される。クラススイッチする B 細胞では Bach2 タンパク質量が「高く」維持され、逆に IgM 分泌形質細胞へ分化する B 細胞では Bach2 蛋白質量が「低い」。従って Bach2 の蛋白質質量変化が遺伝子ネットワーク切り換え機構の本質である可能性を示唆していた。

(2) Bach2 のタンパク質分解を制御するユビキチン化システム

Bach2 タンパク質レベルでの活性調節の解明を目指した。酸化ストレスやヘム結合によって、Bach2 タンパク質のユビキチン化修飾が亢進し、Bach2 タンパク質の分解が促進される。B 細胞株をもちいて Bach2 複合体を精製した結果、Cullin3 を同定した。Cullin3 は、ユビキチン化システムにおける RING 型 E3 リガーゼ複合体の足場タンパク質である。Cullin3 はユビキチン化修飾されたタンパク質を認識するアダプターとして、BTB/Kelch ドメインタンパク質が 2 量体で結合することが判っている。Bach2 複合体には、BTB/Kelch ドメインタンパク質である K1h19 および MIPP が含まれることから、これらを Bach2 認識のアダプタータンパク質の候補と考えている。

2. 研究の目的

免疫応答の過程で B 細胞中の Bach2 タンパク質量によって細胞運命が決定される可能性がある。しかし、Bach2 の活性を制御する機構は不明である。そこで、Bach2 蛋白質の翻訳後修飾によって B 細胞の活性化応答が制御される可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) in vitro ユビキチン化 アッセイ

昆虫細胞株 Sf21 に Flag-Tag 付き Cullin3、HA-Tag 付き Roc1、Myc-Tag 付き K1h19、HA-Tag 付き MIPP を遺伝子導入。Flag-M2 アガロースビーズで Flag-Cullin3 複合体を精製。In vitro で Flag-Cullin3 複合体と His-Tag 付き Bach2 と反応させる。再度 Flag-M2 アガロースビーズで複合体を精製する。SDS 電気泳動および Western blot 解析により、Bach2 を検出しユビキチン化状態を検討する。

(2) プロテオミクス解析による Bach2 リン酸化 site の同定

始めに、Flag と HA 両方の Tag 付きの Bach2 (eBach2) を安定発現する B 細胞株 BAL17 を樹立した。次に、全細胞抽出した後に第一に Flag で eBach2 を精製し、第二に HA で精製した。SDS-PAGE で展開後、CBB 染色したアクリルアミドゲルから eBach2 のバンドを切り出した。トリプシン消化した後にカラム精製し、MS/MS 解析をおこなった。

(3) アミノ酸置換変異型 Bach2 の解析
実験 (2) で同定された Bach2 のリン酸化修飾されたアミノ酸に置換変異を導入した発現ベクターを作成した。次に、このベクターをヒト胎児腎細胞株 293T へ導入し、得られた細胞抽出液を SDS 電気泳動で展開。引き続き Western blot 解析で Bach2 のリン酸化状態を検討した。

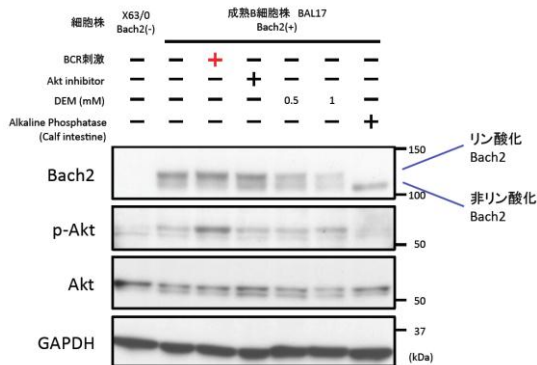
4. 研究成果

(1) in vitro ユビキチン化 アッセイを実施した結果、ユビキチン化された Bach2 タンパク質は検出されなかった。さらに、Bach2 と Cullin3 の結合は直接的であることが解り、タンパク質ユビキチン化のアダプタータンパク質の候補であった MIPP および K1h19 はそれらの相互作用に影響を与えないことが判明した。

(2) そこで、Bach2 タンパク質への翻訳後修飾であることが判っていたリン酸化の検討

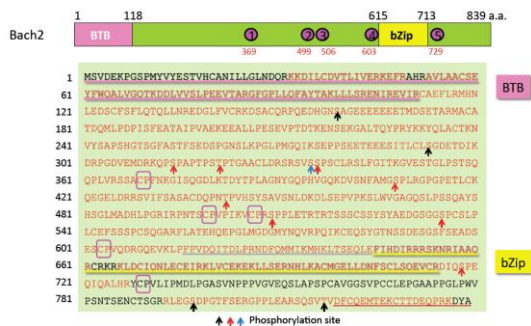
をおこなった。その結果、Bach2はB細胞受容体 (BCR) の下流でPI3 キナーゼ依存的にリン酸化されていることがわかった。

BCRシグナルによりBach2はリン酸化される

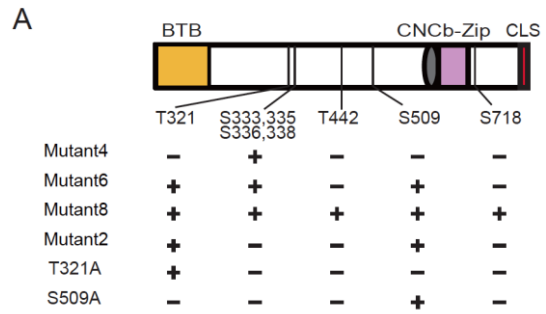


そこで、このときのリン酸化されるアミノ酸を同定する目的で、Flag および HA の両方のTagを付加した Bach2 (eBach2) をB細胞株に安定発現させた。同細胞株の全細胞抽出から精製した eBach2 をMS解析した結果、図の様に11か所のリン酸化されたアミノ酸と同定した。

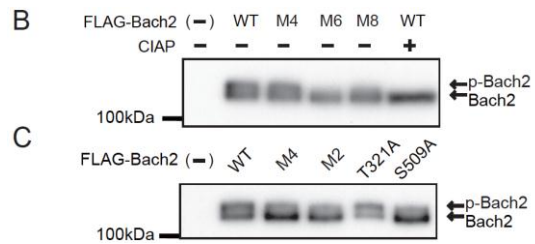
MS解析によるリン酸化セリン、スレオニンの同定



(3) MS解析の結果判明したリン酸化修飾されるアミノ酸のうち、既知のリン酸化酵素の標的配列と照らし合わせ、コンセンサス配列であるアミノ酸に関して幾つかの置換変異を導入した変異型 Bach2 の発現ベクターを作成した。



次に、これらの変異を導入した Bach2 をヒト胎児線維芽細胞株 293T へ発現させ、リン酸化程度を Western blot 解析にて検討した。



これらの結果から、509番目のセリンが Bach2 タンパク質のリン酸化状態に最も影響を及ぼすアミノ酸であることが判った。現在、B細胞において、このリン酸化修飾が、Bach2 タンパク質の活性における生理的な意味を検討中である。

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 6 件)

1. Harusato A, Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Mizushima K, Hirai Y, Higashimura Y, Katada K, Handa O, Ishikawa T, Yagi N, Kokura S, Ichikawa H, Muto A, Igarashi K, Yoshikawa T. BTB and CNC homolog 1 (Bach1) deficiency ameliorates TNBS colitis in mice: role of M2 macrophages and heme oxygenase-1. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Mar-Apr;19(4):740-753. 査読あり
doi: 10.1097/MIB.0b013e3182802968.

2. Casolari DA, Makri M, Yoshida C, Muto A, Igarashi K, Melo JV.

Transcriptional suppression of BACH2 by the Bcr-Abl oncoprotein is mediated by PAX5. Leukemia. 2013 Feb;27(2):409-415. 査読あり
doi: 10.1038/leu.2012.220.

3. Hama M, Kirino Y, Takeno M, Takase K, Miyazaki T, Yoshimi R, Ueda A, Itoh-Nakadai A, Muto A, Igarashi K, Ishigatsubo Y. Bach1 regulates osteoclastogenesis in a mouse model via both heme oxygenase 1-dependent and heme oxygenase 1-independent pathways. Arthritis Rheum. 2012 May;64(5):1518-1528. 査読あり
doi: 10.1002/art.33497.

4. Muto A, Itoh-Nakadai A, Igarashi K. [Structure and dynamics of gene regulatory network for humoral immune response]. Rinsho Ketsueki. 2011 Jun;52(6):376-386. Review. 査読あり

5. Harusato A, Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Mizushima K, Hirai Y, Yamada S, Tuji T, Yoriki H, Horie R, Inoue K, Fukumoto K, Handa O, Ishikawa T, Kokura S, Minamiyama Y, Ichikawa H, Muto A, Igarashi K, Yoshikawa T. Suppression of indomethacin-induced apoptosis in the small intestine due to Bach1 deficiency. Free Radic Res. 2011 Jun;45(6):717-727. 査読あり
doi: 10.3109/10715762.2011.574287.

6. 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. 2011 May 19;117(20):5438-5448. 査読あり
doi: 10.1182/blood-2010-07-296483.

[学会発表] (計 1 件)
武藤哲彦、田中 拓、落合 恭子、ブリドン アンドレイ、加藤 恭丈、仁尾 正記、星川 裕、野田 哲生、五十嵐 和彦
B 細胞最終分化過程における Prdm1 遺伝子のエピゲノム制御の解明
若手ワークショップ@鬼怒川、2013 年 1 月 24 日から 26 日 鬼怒川

[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

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：