

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670019

研究課題名(和文)核内I $\kappa$ Bファミリーによる免疫成熟機構の解明研究課題名(英文)Molecular mechanisms of Nuclear I $\kappa$ B family proteins control immune maturation.

## 研究代表者

丸山 貴司 (MaruYama, Takashi)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10622524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：転写制御因子として知られる核内I $\kappa$ B-zetaとI $\kappa$ B-NSについて、獲得免疫を司るT細胞の成熟に焦点をあて、両者の意義についての研究を展開する。

T細胞特異的I $\kappa$ B-zeta欠損マウスでは、T細胞の成熟率が低下しているが、これは、細胞死の促進に寄与するところが大きいことが明らかとなった。一方で、I $\kappa$ BNS欠損マウスにおいては、T細胞の成熟率は正常であることを確認した。興味深い事に、T細胞特異的なI $\kappa$ BNS過剰発現マウスを作成したところ、軽度な炎症応答と共に、T細胞の成熟に異常が認められた。

I $\kappa$ B-zetaとI $\kappa$ BNSの転写制御活性については、それぞれが拮抗するものではないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study focus on T cells maturation in the thymus and the role of nuclear I $\kappa$ B-zeta and I $\kappa$ B-NS.

T cell specific I $\kappa$ B-zeta deficient mice show less maturation rate of T cells, because more apoptotic gene expression. On the other hands, T cell maturation rate from I $\kappa$ BNS deficient mice was comparable compared with control mice. Interestingly, T cell specific I $\kappa$ BNS over-expressing mice shows inflammatory phenotype and have problems of T cell maturation. Interestingly, transcriptional activity and mechanisms of I $\kappa$ B-zeta and I $\kappa$ BNS is difference and do not compete against target genes, including IFN- $\gamma$ , IL-17A and ELAM-1.

研究分野：免疫学

キーワード：I $\kappa$ B-zeta I $\kappa$ BNS T細胞 胸腺 成熟

## 1. 研究開始当初の背景

これまで、当講座で同定および機能解析がなされてきたI $\kappa$ B- $\zeta$ は、炎症応答に伴い転写後制御を介して誘導され、二次応答における選択的遺伝子発現制御に必須の因子である(*J. Biol. Chem.* 2001,276;27657-27662., *J. Biol. Chem.* 2008,283;32404-32411.). 最近、I $\kappa$ B- $\zeta$ は、IL-17 産生T 細胞(Th17)の分化誘導を促進させる事、また、I $\kappa$ B- $\zeta$ 欠損マウスにおいてはTh17 依存的な多発性硬化症に抵抗性を有する事が明らかとなった(*Nature*. 2010, 464;1381-1385.). しかし、I $\kappa$ B- $\zeta$ 欠損マウスはシェーグレン症候群様の自己免疫疾患を自然発症する事から(*Immunity*. 2013, 38; 450-460.), 免疫恒常性の維持機構にも、I $\kappa$ B- $\zeta$ が重要な役割を担うことが明らかとなってきた。

申請者は、当講座にて新たに作成されたT細胞特異的I $\kappa$ B- $\zeta$ 欠損マウスの解析を行った所、3 週齢のマウスにおいて、胸腺および末梢リンパ組織における成熟したT 細胞の割合(CD4 陽性あるいはCD8 陽性T 細胞)および絶対数が減少しているという基礎データを得た。胸腺におけるT 細胞の成熟異常は、これまで申請者が解析を行ってきた別のシェーグレン症候群モデルマウス(Id3 欠損マウス)においても認められている(Maruyama T et al., *Nature Immunology*. 2011,12;86-95.).

一方、I $\kappa$ B- $\zeta$ と最も相同性の高いアンキリンリピートを有するI $\kappa$ BNS は、I $\kappa$ B- $\zeta$ の転写活性化に必要な領域を欠く核内I $\kappa$ Bファミリータンパク質である。I $\kappa$ BNS は、NF- $\kappa$ B と複合体を形成する事が報告されており、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の活性に直接影響を与える事が推察される。T 細胞におけるI $\kappa$ BNS の発現は、T 細胞受容体を介した刺激に伴い上昇する事が報告されており、また、胸腺におけるT 細胞の成熟過程においてもその発現が認められる

事、さらに興味深いことにI $\kappa$ BNS の遺伝子欠損マウスは、I $\kappa$ B- $\zeta$ 欠損マウスと鏡像関係にある表現型を示すことから、I $\kappa$ BNSはI $\kappa$ B- $\zeta$ と拮抗することにより、T 細胞の成熟を担う事が推測される。

## 2. 研究の目的

本研究では、選択的遺伝子発現誘導に必須の役割を果たす核内I $\kappa$ B ファミリータンパク質I $\kappa$ B- $\zeta$ 及びI $\kappa$ BNS によるT 細胞の成熟機構の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、核内I $\kappa$ B ファミリータンパク質I $\kappa$ B- $\zeta$ およびI $\kappa$ BNS の胸腺内T 細胞の成熟過程における役割を明らかにするため、I. 核内I $\kappa$ B ファミリーによる胸腺内のT 細胞成熟への影響、II. I $\kappa$ B- $\zeta$ /I $\kappa$ BNSの標的遺伝子の探索、及びIII. 遺伝子発現制御領域に対するI $\kappa$ B- $\zeta$ /I $\kappa$ BNS の活性の解析を行う。I.の解析にあたっては、既に作製済の (A)遺伝子欠損マウス (B)Conditional transgenic マウスを活用し、I $\kappa$ B- $\zeta$ およびI $\kappa$ BNS の役割について、明らかにする。II. およびIII.の解析では、その分子機構を解明するものであり、これまで当講座でこれまで作成された遺伝子発現プラスミドや抗体、および申請者が行ってきた遺伝子発現制御を解析するための実験系、および、UCSC GenomeBrowser やGenomatix などのソフトウェアを使い、解析を進める。

## 4. 研究成果

I. I $\kappa$ BNS 欠損マウスについては、T 細胞の成熟に問題がないことが、改めて確認出来た。興味深いことに、新たに作成したT 細胞特異的I $\kappa$ BNS 過剰発現マウスについては、全身性の弱い炎症応答が認められると共に、T 細胞の成熟について異常がある事が明らかとなってきた(論文投稿準備中)。

また、T 細胞の成熟に重要なリコンビナーゼ Rag1 およびRag2 の発現について、各種遺伝子改変マウス由来の未成熟なT細胞を精製して解析を行った。すると、I $\kappa$ B- $\zeta$ およびI $\kappa$ BNS 欠損マウスにおいても、野生型マウスにおける未成熟なT 細胞においても、ほぼ同等の Rag1 およびRag2の発現が認められた。しかし、I $\kappa$ B- $\zeta$ 欠損マウスにおいては、アポトーシス関連の遺伝子発現が、T 細胞においても顕著に上昇していたことから、細胞死の制御が、T 細胞の成熟率に影響を与えていることが明らかとなってきた。一方、I $\kappa$ BNS 欠損マウス由来のT 細胞では、アポトーシス関連遺伝子の発現上昇は認められなかった。

II. 標的遺伝子の1つとして、炎症性サイトカインIFN-gamma に着目して研究を推進した。興味深いことに、T 細胞において、I $\kappa$ B- $\zeta$ はIFN-gamma の発現に対して抑制的に働くのに対し(学術論文 )、I $\kappa$ BNS はIFN-gamma の発現に対して促進的に働くことが明らかとなった。UCSCGenome Browser の解析より、IFN-gamma には、2つの種間高保存領域が存在するが、このうち、転写開始点に近い領域(プロモーター)において、I $\kappa$ B- $\zeta$ が直接働きかけて、転写活性を負に制御することが明らかとなった(学術論文 )。一方で、I $\kappa$ BNS については、転写活性を有しないものの、NF- $\kappa$ B の転写活性を制御することで、2次的にIFN-gamma のプロモーターにおける活性を制御していることが示唆された。

次世代シーケンサーを用いたI $\kappa$ B- $\zeta$ の Chip-sequence により、標的遺伝子の割り出しにも乗り出したが、Chip-sequence に適した抗体が得られず、現在までのところはうまく言っていない状況である。

III. ELAM-1 によるリポーターアッセイの結果から、I $\kappa$ B- $\zeta$ は、直接転写活性を有しているのに対して、I $\kappa$ BNS は、直接的な転写活性を

有していないことが明らかとなった。また、両者を同時に細胞に移入しても、I $\kappa$ B- $\zeta$ の転写活性には影響を与えないことから、両者は構造面において類似している分子であるが、その機能はことなり、それぞれが独立した機構によって、遺伝子発現を調整していることが示唆された。

以上より、I $\kappa$ BNS とI $\kappa$ B- $\zeta$ は、お互いが独立して遺伝子発現の制御を行っており、双方の過剰発現による拮抗などは認められないことが明らかとなった。

## 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2件)

MaruYama T, Kobayashi S, Ogasawara K, Yoshimura A, Chen W, Muta T.

Control of IFN-gamma production and regulatory function by the inducible nuclear protein I $\kappa$ B-zeta in T cells.

*J Leukoc Biol* 98 2015 385-393.

(査読有)

MaruYama T.

核内I $\kappa$ B-zeta による炎症応答の制御

*生化学* 87 2015 601-604.

(査読有)

[学会発表](計3件)

丸山貴司、牟田達史

I $\kappa$ B-zeta による免疫恒常性維持機構の解明

**第79回 日本生化学会中部支部**

(信州大学；長野県松本市)

2015 年5 月23 日

丸山貴司

IkBNS controls Th17 differentiation and  
Experimental Autoimmune  
Encephalomyelitis.

**FIMSA 2015** (Singapore、Singapore)

2015 年7 月1 日

丸山貴司

核内IkappaB-zeta による免疫恒常性維持機構の解明

**BMB2015** (神戸ポートアイランド：兵庫県神戸市)

2015 年12 月1 日

〔図書〕 (計1 件)

Niwa M, MaruYama T, Hlsamatsu K,  
Kobayashi K, Miyazaki T, Hirata A,  
Hatano Y, Tomita H, Hara A.

The Role of Microglial Galectin-3 in Central  
Nervous System Disease

***Microglia (Physiology, Regulation and  
Health Implications)*** Nova science

Publisher pp.205-216.

(ISBN: 978-1-63463-986-6)

2015年

〔その他〕

ホームページ等

<http://researchmap.jp/read0135243/>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

丸山貴司 ( MARUYAMA TAKASHI )

岐阜大学 医学研究科

助教

研究者番号：10622524