

論文内容の要旨

論文題目：B 細胞特異的な新規 Ets ファミリー転写因子、
Prf の B 細胞分化および機能における役割

氏名 梶本修一

哺乳類の免疫系において主要な細胞種である B 細胞は、細胞の分化や刺激応答の研究モデルとして従来より詳細な解析が行われてきた。その中で、遺伝子発現を制御し最終的に分化の進行や刺激応答を引き起こす蛋白である転写因子については、特に活発な研究がおこなわれており、B 細胞特異的な遺伝子発現を司る転写因子が数多く同定され、その B 細胞の分化および機能発現における役割が研究されてきた。

免疫グロブリン(Ig)遺伝子の再構成は、B 細胞の分化の重要なステップの一つであるが、この再構成は Ig 遺伝子上の DNA シスエレメントおよびこれと相互作用する転写因子によって制御されていると考えられている。たとえば、免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子の再構成は、B 細胞の、特に preB 細胞とよばれる分化段階でのみ起こるが、当研究室における研究により、この遺伝子の 3'エンハンサー内に存在する転写因子 PU.1 の結合配列を変異させた組換え基質をトランスジーンとして導入したマウスでは、このトランスジーンの組換えが proB 細胞や T 細胞においても起き、組織特異性・分化段階特異性が失われることが明らかとなった。このことは、PU.1 結合配列に作用する蛋白が、何らかの機構により Ig κ 鎖遺伝子の DNA 構造を変化させることで、この遺伝子における組換えを組織特異的、分化段階特異的に制御していることを示唆している。私は、このような蛋白を単離しその機能を調べることで、Ig κ 遺伝子再構成の制御機構を解明することを目標とした。

まず私は、酵母細胞を用いた one-hybrid 法を用いて Ig κ 遺伝子 3'エンハンサーの PU.1 結合配列に結合する蛋白を、胸腺細胞の cDNA ライブラリーよりスクリーニングした。その結果、PU.1 と相同性の高く、かつ未知の蛋白をコードするクローンを得た。このクロー

ンの全長をスクリーニングしたところ、PU.1 および Spi-B の DNA 結合ドメインと約 60%の相同性を有する領域をもつ、273アミノ酸の蛋白をコードする遺伝子を得た。私はこの遺伝子を PU.1 関連因子(PU.1 related factor : prf)と名づけた。(Fig.1)

Prfの DNA 結合活性を、*in vitro*において合成した蛋白を用いて検定したところ、これまでPU.1の結合配列として知られている DNA 配列の多くを認識することが明らかとなった。これに対し、*prf*遺伝子の発現はPU.1 および Spi-B とは異なって B 細胞特異的であり、さらに B 細胞の分化段階においては、骨髄の pre-B 細胞において発現量が増加し、immature B 細胞においていったん減少したのち、末梢の B 細胞において再び発現が高まるという、特徴的な発現パターンを示すことが明らかとなった。(Fig.2)

転写因子 PU.1 は B 細胞やマクロファージなどで発現する数多くの遺伝子の制御領域に結合し、特に B 細胞とマクロファージの分化を決定していると考えられている。一方、Spi-B は B 細胞受容体を介したシグナル伝達系の構築に重要であると考えられている。Prf が PU.1、Spi-B と同じ DNA 配列を認識し、かつ PU.1、Spi-B と異なる発現パターンを示すことは、B 細胞の分化および機能発現において、Prf が PU.1 や Spi-B と相補する形で独自の役割を果たしていることを示唆した。

また、培養細胞を用いた転写活性の検定により、Prf は PU.1 と同様転写活性化能を持つことが明らかとなった。PU.1 は Igk 遺伝子 3'エンハンサー上で、近傍に結合する B 細胞特異的な転写因子 BSAP(B cell specific activator protein)によってその転写活性が抑制され、このことが Igk 遺伝子の分化段階特異的発現制御に重要であると考えられてきた。私はさらに Prf について BSAP との転写活性における関係を調べたところ、Prf は PU.1 と対称的に BSAP と協調的に転写を活性化することが明らかとなった。Prf が pre-B 細胞において発現していることと考え合わせると、従来考えられてきたモデルとは異なり、Igk 遺伝子の組換え、発現が pre-B 細胞において Prf によって活性化されている可能性が考えられた。

以上の結果をもとに、私は Prf の生理的機能を解明するため、*prf*遺伝子欠損マウスを作製し、その表現型を観察した。PU.1 や Spi-B についてはすでに遺伝子欠損マウスが作製されている。*PU.1* 遺伝子欠損マウスは胎生致死あるいは生後まもなく極度の貧血によって死亡し、B 細胞の発生が完全に停止する。*spi-B* 遺伝子欠損マウスについては B 細胞の T 細胞依存的抗原反応性が著しく低下し、免疫後の胚中心の形成が不安定になる。さらに、*spi-b* + *PU.1* マウスにおいては B 細胞受容体を介したシグナル伝達が損なわれ、B 細胞の選別が機能しなくなる結果、末梢の B 細胞数が減少する。以上のような報告から、Prf の欠損マウスにおいては B 細胞の分化異常、成熟 B 細胞の抗原刺激に対する反応性異常、そして免疫後の T 細胞依存的抗原反応の異常が観察されることを予想し、これらについて解析を行った。

作製した *prf* 遺伝子欠損マウスは正常に成熟し、末梢における B 細胞数にも変化は無かった。さらに骨髄および脾臓における B 細胞分化を、表面抗原を指標としたフローサイトメトリーにより解析したが、*prf* マウスと野生型マウスで大きな変化は認められなかった。また、免疫グロブリン κ 軽鎖を発現する細胞の比率にも大きな変化はなかった。以上の結果より、κ 軽鎖遺伝子の再構成・発現を含め、B 細胞の成熟過程において Prf が不可欠な働

きをしていることはないと考えられた。

さらに、*prf*^{-/-}マウスの成熟 B 細胞を脾臓より精製し、*in vitro*において種々の増殖刺激存在下で培養したところ、野生型とほぼ同様の増殖活性を示した。また DNP-KLH で *prf*^{-/-}マウスを免疫後、一次抗原反応によって産生される血清中の抗体量を検定したが、これも野生型とほぼ同じ抗体産生量を示した。このように、抗原刺激に対して *prf*^{-/-}マウスの B 細胞が正常に反応する一方、無免疫状態においては、血清中の IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} 各クラスの抗体量が野生型に比べ 2 倍程度に上昇していることが観察された (Fig.3)。このような現象は、自己免疫疾患のモデルマウスとして知られる MRL-*lpr/lpr* マウスや自己免疫様の表現型を示す遺伝子改変マウスなどにおいて見られる現象であり、*prf* 遺伝子欠損マウスにおける自己免疫現象の存在を示唆するものであった。

本研究において私は PU.1、Spi-B と同じ DNA 配列を認識する新規の転写因子 Prf を単離した。PU.1 は B 細胞への分化決定に、Spi-B は B 細胞の T 細胞依存的抗原反応にそれぞれ重要な転写因子であるが、これらに加えて、今回さらに同じ DNA 配列を認識する Prf が得られたことは、PU.1 ファミリー蛋白による B 細胞分化・機能制御を考える上で注目すべきことである。さらに Prf は Ets ドメイン以外においては PU.1、Spi-B と相同性が無く、これらと同じ DNA 配列を認識しながらも、PU.1 や Spi-B とは異なる活性を持っていると考えられた。実際 Prf が、BSAP との相互作用において PU.1 と対称的な転写活性を示したことはこのことを裏付けている。

Prf の発現が PU.1 や Spi-B と異なって B 細胞特異的であり、さらに B 細胞の分化段階において特徴的な発現パターンを示すことから、Prf は、PU.1 あるいは Spi-B の働きを調節することで、これらの蛋白だけでは行うことのできない、より精密な遺伝子発現制御にかかわっている可能性が高い。本研究により観察された *prf*^{-/-}マウスの表現型は非常に弱いものであったが、このことは Prf の本来の機能が PU.1 や Spi-B の機能をより詳細に調節することであるからとも考えられる。この可能性については、*PU.1* あるいは *spi-b* 遺伝子との二重遺伝子欠損マウスにおいて、より重篤な表現型が観察されることが期待される。その一方で、*prf*^{-/-}マウスにおいて血清中の IgG の抗体量が増加するという表現型が見られたことは、B 細胞の分化における Prf の独自の機能を示唆する点で興味ぶかい。

本研究において Prf という新規 PU.1 ファミリー蛋白が単離され、その解析がなされたことは、PU.1 ファミリー蛋白による B 細胞の分化および機能の制御メカニズムのより深い理解にとって大きな進歩であるといえる。

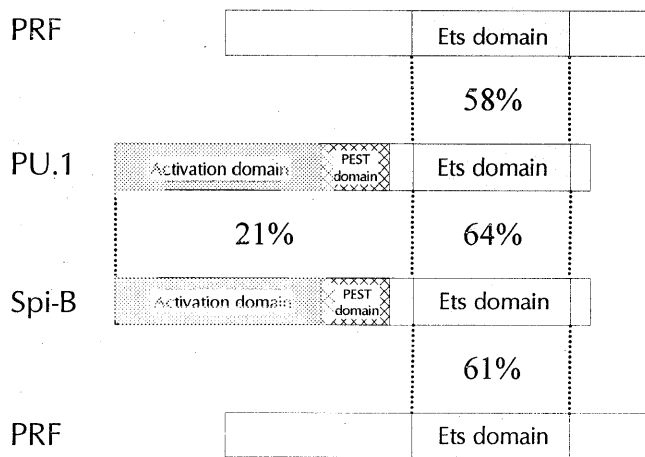


Fig.1 Prfの構造とPU.1、Spi-Bとの比較。数字はアミノ酸レベルの相同性。PrfはPU.1、Spi-Bと約60%の相同性のある配列(Ets domain)を持っているが、それ以外の領域は、既知の蛋白との相同性は無い。

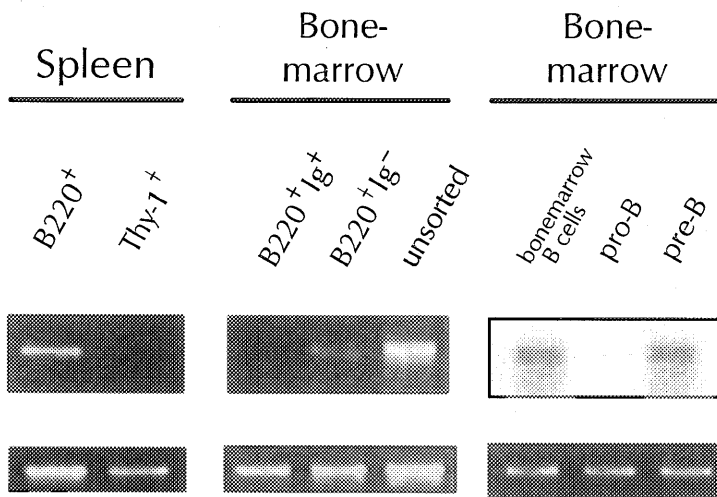


Fig.2 *prf* mRNAの発現。図に示した細胞集団をFACSにより分取し、RT-PCR法によって*prf* mRNAの発現を検出した。*prf*の発現はB細胞特異的であり、かつpre-Bで発現がみられた後にimmatureB(B220+Ig+)において発現が減少するという、特徴的なパターンを示す。

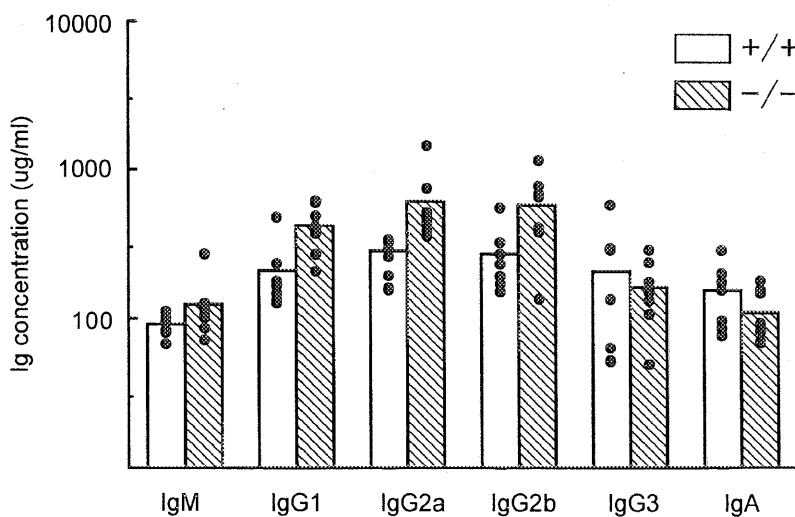


Fig.3 無免疫状態の*prf*遺伝子欠損マウスの血清中におけるIgG量の増加。無免疫状態の8週令マウスの血清中の各サブクラスの抗体濃度をELISA法により検定した。IgG1、IgG2a、IgG2bの各抗体量が2倍程度に増加している。