

受賞者

五十嵐 和彦

東北大学大学院医学系研究科 医科学専攻・生物化学分野

研究テーマ

液性免疫の発動を制御する転写因子分解システムの解明

1. 背景と目的

液性免疫の中心を担うBリンパ球は、抗原刺激にตอบสนองして抗体分泌能を有する形質細胞へと分化する。転写因子Blimp-1は形質細胞分化のマスター因子であり、その発現はBリンパ球では低く、形質細胞では高い。この発現パターンは、転写抑制因子Bach2により規定されている。すなわち、Bach2はBリンパ球で発現し、Blimp-1遺伝子に直接作用しその転写を抑える。Bach2ノックアウトマウスではBlimp-1の発現がより早期にシフトし、形質細胞分化が過剰に生じる(投稿中)。したがって、形質細胞分化の本質は、Bach2優位からBlimp-1優位へという『転写因子ネットワークの相転移』と考えられる。私たちは、Bリンパ球活性化にともなってBach2蛋白質の分解が生じることを見いだしている。したがって、Bach2分解こそがこの転写因子ネットワークの相転移、さらには形質細胞分化を制御する中枢システムをなしていると予想される。そこで本研究では、Bach2分解システムを同定し、その作用を検証し、液性免疫発動を制御する転写因子分解システムを解明し、免疫不全等の病態解明へ向けた新しい枠組みを構築することを目指した。

具体的には、これまでの研究から、形質細胞へと分化を始めた細胞ではBach2が消失していること、この変化にはBach2のユビキチン化とプロテアソームによる分解が関わることを見いだしていた。一方、Bリンパ球からBach2複合体を精製したところ、Cullin3と二つのKeap1様因子(Keap2, Keap3と仮称する)を見いだした。Keap1はCullin3とともにE3リガーゼとして作用すること、そしてKeap1が基質である転写因子Nrf2を認識し、ポリユビキチン化することが山本雅之教授らにより報告されている。したがって、Bach2もKeap2あるいはKeap3を含むCullin3複合体によりユビキチン化されることが予想された。そこで以下の実験を行い、この仮説を検証した。なお、実験結果によって当初予定した計画とは変更した部分もあり、特に当初予定した「非分解型Bach2を用いたマウスでの機能解明」は、培養細胞レベルでの検証に時間がかかり、マウス作製には至っていない。

2. 方法

1) Bach2とKeap2およびKeap3の相互作用の検証: 各cDNAを単独、あるいは組み合わせて培養細胞(293T細胞)にて発現し、いずれかのタンパク質を免疫沈降して他の因子が共に沈降するか否かを調べる。さらに、各因子の様々な欠失断片を同様に発現・沈降し、因子間の結合の特異性や相互作用部位を特定する。

2) Keap2およびKeap3のユビキチンリガーゼ活性の検証: 上記の実験でさらにエピトープ付加ユビキチンも共に発現させ、Bach2を免疫沈降した後にBach2に共有結合したユビキチン量をウエスタンブロット法にて測定する。そして、Keap2やKeap3によってBach2のユビキチン化が促進するか否かを調べる。

3) Bach2ユビキチン化を変動させるシグナル系の同定: B細胞株に対してB細胞受容体活性化、コリセプター活性化などを与え、あるいは各種シグナル伝達系阻害薬剤で処理し、内在性Bach2のユビキチン化レベルを免疫沈降法とユビキチンに対する抗体を用いたウエスタン法にて調べる。また、Bach2は補欠分子へ

ムを結合すること(論文投稿中)を鑑み、細胞内ヘム濃度を上昇、あるいは低下させる薬剤等で処理し、同様にBach2のユビキチン化を比較する。これにより、ユビキチン化を制御するシグナル経路を特定する。

4) Keap2およびKeap3のノックダウンがBach2のユビキチン化へ与える影響の検討: Bach2ユビキチン化経路での内在性Keap2およびKeap3の役割を明らかにするために、B細胞株でRNAi法によりこれら因子をノックダウンする。そして、内在性Bach2のユビキチン化量の変化を免疫沈降法・ウェスタンブロット法にて比較する。さらに、上記実験で明らかになるBach2のユビキチン化を変化させるシグナルに対する応答の変化も調べる。

3. 結果 研究成果

1) Bach2とKeap2およびKeap3の相互作用: 培養細胞中で過剰発現させたBach2とKeap2あるいはKeap3が結合することを確認した。この結合にはBach2のBTBDメイン、そしてKeap2およびKeap3のBTBDメインが必須であった。さらに、Bach2、Keap2、Keap3を共に発現すると、Cullin3もBach2に結合することがわかった。一方、Keap2およびKeap3もお互いに結合することを見いだした。このヘテロ二量体形成にもそれぞれのBTBDメインが必須であった。

2) Keap2およびKeap3のユビキチンリガーゼ活性: 予想通り、培養細胞中におけるBach2のユビキチン化が、Keap2およびKeap3を共に発現することにより著しく亢進することを見いだした。Keap2あるいはKeap3いずれかの単独発現ではこの効果は観察されなかったので、Keap2とKeap3はヘテロ二量体としてBach2ユビキチン化に関わることが予想された。しかしながら、BTBDメインを欠損するBach2もKeap2およびKeap3の共発現でユビキチン化が亢進したことから、非分解型Bach2をデザインする上ではさらなるドメイン解析が必要である。

3) Bach2ユビキチン化を変動させるシグナル系: B細胞受容体、コリセプターなど、各種受容体の刺激を検討したが、Bach2ユビキチン化への関与を見いだすことはできなかった。一方、補欠分子ヘムについては、その細胞内濃度上昇によりBach2ユビキチン化が亢進することを明らかにした。

4) Keap2およびKeap3のノックダウンがBach2のユビキチン化へ与える影響: 上記の過剰発現実験から、Keap2とKeap3はヘテロ二量体としてBach2ユビキチン化を亢進させることが考えられた。そこで内在性因子をノックダウンしてBach2ユビキチン化を調べたところ、Keap3のノックダウンではヘム応答性のユビキチン化が低下したが、予想外なことに、Keap2のノックダウンではむしろ著明に亢進するという結果を得た。

4. 考察とまとめ

本研究により、Keap2とKeap3がBach2のユビキチン化を制御することが明らかになったが、Keap2は当初の予想とは逆に、Bach2ユビキチン化の抑制因子として作用する可能性が考えられる。Keap2とKeap3がヘテロ二量体を形成することから、Keap3がユビキチン化促進因子(Cullin3 E3リガーゼシステムの基質認識アダプター分子)であり、その作用をKeap2が阻害することも考えられる。現在、完全試験管内再構成系を用いた実験を進めており、近く決着できると期待している。今後はこれら分解制御系の液性免疫応答における機能の解明が重要となるが、現在、Keap2とKeap3のB細胞特異的ノックアウトマウス作製を進めており、個体レベルで検証を進めていく予定である。また、この間、研究室ではBach2の量が多いと抗体クラススイッチすること、Bach2の量が低いとクラススイッチへ向かう頻度が低下することを遺伝学的に証明している(投稿中)。この制御にKeap2とKeap3が関与する可能性がある。

また、補欠分子ヘムがBach2ユビキチン化の促進シグナル分子となることも明らかになった。ヘムは、酸素代謝、電子伝達などに関わり、生命にとって必須の分子であるが、免疫におけるシグナル機能は全く報告されていない。ヘムとKeap2やKeap3の関係を追求することにより、新しい免疫シグナル経路を提唱できる可能性がある。この課題は研究室の主要テーマの一つとして育ちつつあり、今後も力を入れて取り組んでいきたい。

5. 発表論文

この研究に関する論文は現在作成中であり、近日中の投稿を目指している。

6. 謝辞

この助成金によりKeap2とKeap3に関する研究が着実に進み、その知見を踏まえて提案した文科省科学研究費補助金・基盤研究A「ヘムによる液性免疫応答の制御」(研究代表者・五十嵐)が21年度に採択されたことを付記し、あらためて病態代謝研究会からの助成に対して感謝を申し上げます。