

研究テーマ**抗原受容体遺伝子における対立遺伝子排除の制御機構と生理的意義の解析**

1. はじめに

抗原受容体遺伝子の再構成は、T・B細胞ともに RAG1/2 という共通な組換え酵素によっておこる一方で、細胞系列や分化段階特異的に制御されている。これらの制御は、組換え部位のクロマチン構造が変化して、RAG1/2 に対し接近可能 (accessible) になることによると考えられており、エピジェネティックな遺伝子発現制御のよいモデル系となっている。一方、機能的な組換えは、通常片方の染色体に限っておこることが知られており、対立遺伝子排除と呼ばれている。これは、1つのリンパ球が1つの抗原にのみ反応するために重要な機構と考えられ、クローン選択説の基盤となる現象である。その分子機構としては、一方のアレルで組換えが成功し抗原受容体が発現すると、負の抑制シグナルが伝達され、残ったアレルの組換えが抑制されることが想定されているが、その標的分子等は明らかではなかった。そこで本研究では、抗原受容体遺伝子の対立遺伝子排除の分子機構を解明することを目的として、多くの抗原受容体遺伝子に結合配列を持つ HLH (helix-loop-helix) 転写因子 E2A に着目して研究を行なった。

2. 方法

マウスの胸腺細胞からクロマチンを調製し、E2A、CBP、アセチル化ヒストン H3、RAG1 に対する抗体でクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行ない、定量的 PCR によって T 細胞抗原受容体 (TCR β) 遺伝子の各領域におけるこれらの因子の結合やヒストンの修飾状態を解析した (図1)。

3. 結果

筆者らは、E2A が抗体 κ 鎖遺伝子の組換え部位に存在する E ボックスという配列に直接結合し、ヒストンアセチル化酵素である CBP/p300 を動員することによって、accessibility の指標である転写とヒストンアセチル化を上昇させ、組換えを誘導することを明らかにした(4)。さらに筆者らは、TCR β 遺伝子の転写制御領域にも E ボックスが存在することから、E2A が TCR β 遺伝子の再構成にも関与することを想定し、E2A の胸腺における主要なアイソフォームである E47 の欠損マウスを用いて解析を行なった(1)。その結果、E47 ホモ欠損マウスでは TCR β 遺伝子の再構成が顕著に障害されており、興味深いことに、ヘテロ欠損マウスでも組換えが野生型の 1/5 程度に低下していた。次に、転写とヒストンアセチル化を調べたところ、これらが E47 の量依存的に低下していたことから、組換え障害は accessibility の低下によると考えられた。さらに、E2A が TCR β 遺伝子の V β (Variable) 遺伝子領域に直接結合し、その領域では CBP がリクルートされ、ヒストンアセチル化も高いことがわかった (図1)。

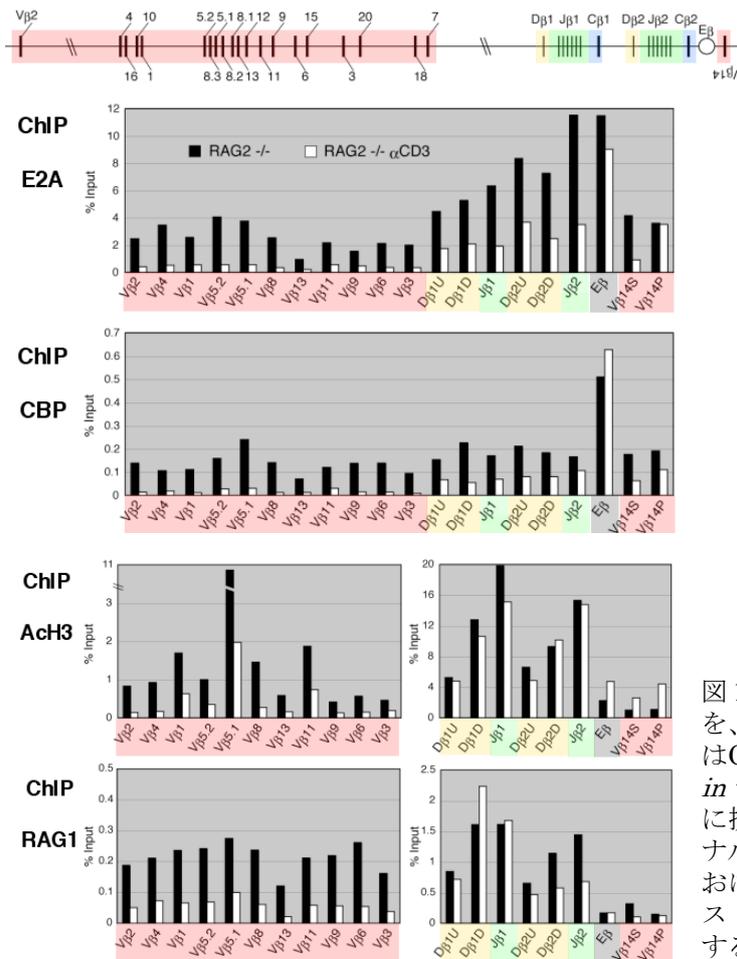


図1 上段にマウスTCRβ 遺伝子の構造を、下部にChIP解析の結果を示す。E2AはCBPとよく似た様式でTCRβ 遺伝子に *in vivo*で結合している。RAG欠損マウスに抗CD3抗体を投与するとpreTCRシグナルを惹起できるが、その際Vβ 遺伝子におけるE2AとCBPの結合が解除され、ヒストンアセチル化とRAG1の動員も低下する。

一方、preTCR シグナルを誘導すると、E2A の抑制因子である Id3 の発現が誘導され、E2A と CBP が V β 遺伝子から解離し、ヒストンアセチル化も低下したことから、E2A が負のフィードバックシグナルの標的因子である可能性が示唆された。そこで、フィードバックシグナルが強制的に誘導され、内在性の TCR β 遺伝子組換えが抑制されている TCR トランスジェニックマウスの胸腺細胞に、E2A をレトロウイルスによって過剰発現させたところ、抑制シグナルに打ち勝って組換えを誘導することができた (図2)。

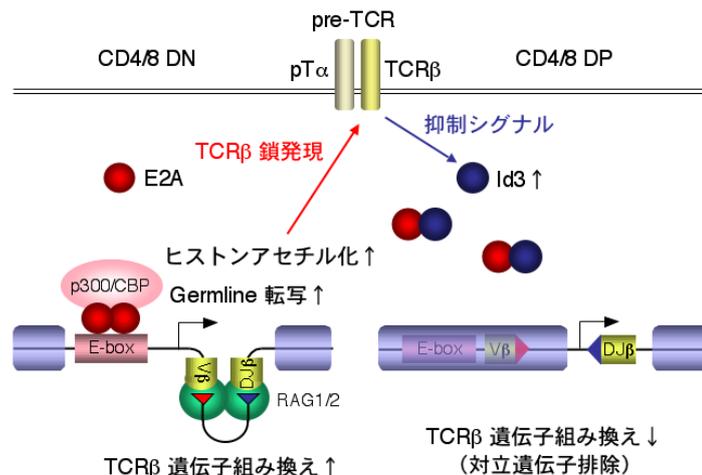


図2 E2AはTCRβ遺伝子にCBPを伴って結合し、ヒストンアセチル化の上昇を介して組み換えを誘導する。機能的な組み換えによりTCRβ鎖が発現し抑制シグナルが入ると、E2Aの抑制因子であるId3が誘導され、E2AやCBPの結合が低下し、さらなる組み換えが抑制される。

4. 考察

本研究により、E2A が CBP を伴って TCR β 遺伝子に結合し、accessibility の上昇を介して組換えを誘導することが明らかになった。また、accessibility の上昇は E2A の量に依存していたことから、両方のアレルが E2A を競合する結果として、組換えが両方のアレルで同時に起きる頻度が低くなる可能性が示唆された。さらに、負のフィードバックシグナルが、E2A を標的として組換えを抑制することも明らかになり、従来想定されて来た対立遺伝子排除の 2 つの分子機構が、E2A を介して連関している可能性があり興味深い。片アレルに限った遺伝子発現を示す例としては、他にも不活性 X 染色体やインプリンティングなどが知られているが、抗原受容体遺伝子は、父方、母方アレルに関わらずランダムな再構成によって多様性を産生しつつも、その発現は片アレルに限られるという相反した制約を受ける点が特徴的である。これを遂行するためのメカニズムとして、まず両方のアレルがエピジェネティックな活性化因子を競合し、組換えに成功するとその因子の活性を阻害することでさらなる組換えを抑制するという方法は合理的であると思われる。

5. 発表論文、参考文献

- 1) Agata Y, Tamaki N, Sakamoto S, Ikawa T, Masuda K, Kawamoto H, Murre C. Regulation of T Cell Receptor β Gene Rearrangements and Allelic Exclusion by the Helix-Loop-Helix Protein, E47. *Immunity* 27: 871-884, 2007.
- 2) Kitao H, Kimura M, Yamamoto K, Seo H, Namikoshi K, Agata Y, Ohta K, Takata M. Regulation of histone H4 acetylation by transcription factor E2A in Ig gene conversion. *Int Immunol* 20: 277-284, 2008.
- 3) Sakamoto S, Aoki K, Higuchi T, Todaka H, Morisawa K, Tamaki N, Hatano E, Fukushima A, Taniguchi T, Agata Y. The NF90-NF45 complex functions as a negative regulator in the microRNA processing pathway. *Mol Cell Biol* 29: 3754-3769, 2009.
- 4) Sakamoto S, Murai K, Tamaki N, Romanow W J, Yanagihara I, Murre C, Agata Y. E2A and CBP/p300 act in synergy to promote chromatin accessibility of the immunoglobulin κ locus in nonlymphoid cells. (Submitted)
- 5) 縣 保年. E2A は T 細胞抗原受容体遺伝子の再構成と対立遺伝子排除を制御する. *細胞工学* 27: 258-259, 2008.
- 6) 縣 保年. 転写因子 E2A と TCR β 遺伝子の対立遺伝子排除. *医学のあゆみ* 228: 1126-1127, 2009.