

120. 転写因子の Bifunctional 機能決定の分子機構解明

落合 恭子

Key words : 転写因子, GRN, Bifunctional 機能, 複合体

東北大学 大学院医学系研究科
生物化学分野

緒言

細胞分化は転写因子機能によって制御される。転写因子は、細胞特異的または分化段階特異的に標的遺伝子発現を制御することにより細胞分化の方向性を決定する。これまでに我々は、転写因子クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-sequence) 法と遺伝子発現解析の双方を実施し、細胞分化誘導時における転写因子直接標的遺伝子を同定した。そして、転写因子と標的遺伝子が構築する GRN (Gene regulatory network) が細胞分化制御に機能することを明らかにした。GRN は、転写因子機能による細胞分化制御の本質であり、ときに自己が制御する遺伝子群によって自己機能増強または減弱を誘導するフィードバックループを形成する。このとき、多くの転写因子は標的遺伝子活性化と抑制という二極性機能、すなわち Bifunctional 機能を保持する。しかしながら、その詳細な分子機構についての報告は乏しい。本研究では、一転写因子がどのように Bifunctional 機能を発揮するのか、転写因子複合体精製を用いた協調的機能因子のスクリーニングによりその分子機構解明を試みた。

研究開始当初、B 細胞分化初期段階であるプレ B 細胞において重要機能を担う転写因子 FoxO1 (Forkhead box protein O1) の Bifunctional 機能解明を計画した¹⁾。しかしながら、複合体精製に必要な細胞数を確保することが困難であったため、他転写因子 IRF4 (Interferon regulatory factor 4) の Bifunctional 機能解析を実施した。IRF4 は、B 細胞後期分化である形質細胞分化に必須の転写因子である。IRF4 機能解析にあたり、我々は FoxO1 標的遺伝子解析につづき形質細胞分化過程における IRF4 標的遺伝子解析を既に報告した²⁾。そして同解析により、IRF4 標的遺伝子には FoxO1 同様に活性化標的遺伝子と抑制標的遺伝子が存在することから、IRF4 は Bifunctional 機能を保持することが明らかとなった。

方法および結果

1. 高頻度形質細胞分化誘導系の確立

IRF4 が優位に細胞分化誘導に機能する条件における Bifunctional 機能を検討するため、プライマリー細胞を用いた *in vitro* 高頻度形質細胞分化誘導系を立ち上げた。IRF4 は、細胞内で高濃度タンパク質状態となったとき形質細胞分化誘導に関与する遺伝子群を優位に制御する²⁾ (図 1A)。そこで、分化誘導に伴う IRF4 タンパク質量と分化頻度を検討した。B 細胞受容体トランスジェニック B1-8^H マウス脾臓より B 細胞を採取し、種々のサイトカインを用いて形質細胞分化を誘導した。分化誘導に伴う IRF4 タンパク質レベルをウェスタンブロット法を用いて検討したところ、刺激後 3 日目で顕著な蓄積を認めた (図 1B)。さらに、フローサイトメトリー (FACS: Fluorescence-activated cell sorting) を用い、分化誘導刺激後 3 日目の細胞を形質細胞分化マーカーである Syndecan 陽性率で分化頻度を検討した。また、このときの IRF4 タンパク質を FACS 細胞内染色で共染色した。その結果、高 IRF4 発現を認める細胞割合はおよそ 75 % でありその大部分が Syndecan 陽性であった (図 1C)。野生型マウス脾臓 B 細胞を用いた形質細胞分化誘導系ではおよそ 20 % 程度の分化誘導率にとどまることから、本分化誘導系は極めて高効率な形質細胞分化を誘導できることがわかった。また、本実験系における分化刺激後 3 日目の細胞は、IRF4 タンパク質蓄積状態と分化誘導率から判断して IRF4 が分化誘導に優位に機能していることが考えられた。そこで、同実験系を用いた IRF4 機能解析を進めた。

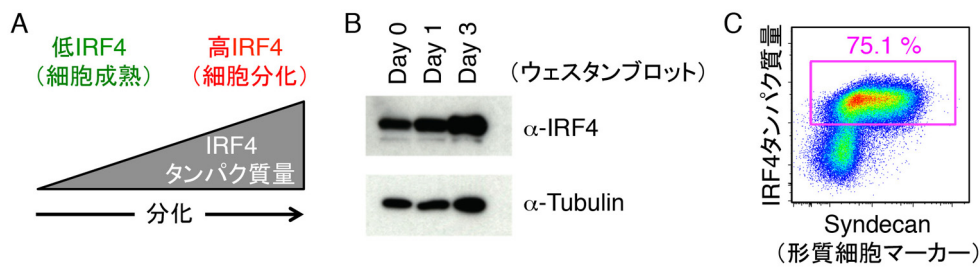


図1. 高 IRF4 発現誘導を伴う高頻度形質細胞分化誘導系の確立.

A) 形質細胞分化と IRF4 タンパク質量との関係性. 形質細胞分化過程では, IRF4 タンパク質量に応じて細胞成熟と細胞分化が誘導される. B) B1-8^{hi} マウス脾臓 B 細胞分化誘導における経時的 IRF4 タンパク質量変化 (ウェスタンブロット). C) 分化誘導 3 日目における IRF4 タンパク質量と形質細胞分化マーカーの発現 (FACS 解析). B1-8^{hi} マウス脾臓 B 細胞分化誘導系では, 高 IRF4 発現誘導とそれに伴う高頻度形質細胞分化誘導が確認された.

2. IRF4 複合体解析

IRF4 Bifunctional 機能に協調的に機能する因子群をスクリーニングするため, 分化刺激後 3 日目の細胞から IRF4 複合体を精製した. まず, 細胞全抽出液を調整し抗 IRF4 抗体を用いて内在性 IRF4 免疫沈降を実施した (図 2A). IRF4 タンパク質の特異的沈降を確認するため, 免疫沈降サンプルをウェスタンブロット法で確認したところ, コントロール IgG と比較し優位な IRF4 タンパク質沈降が認められた (図 2B). 次に, 同サンプルを用いて LC-MS/MS (液体クロマトグラフィー質量分析) 法により IRF4 複合体因子を同定した. その結果, Bifunctional 機能に関連すると考えられる因子群を検出した (図 2C). すなわち, 遺伝子活性化因子としてヒストンアセチル化酵素 p300, 遺伝子抑制因子としてヒストン脱アセチル化酵素 Hdac を見出した.

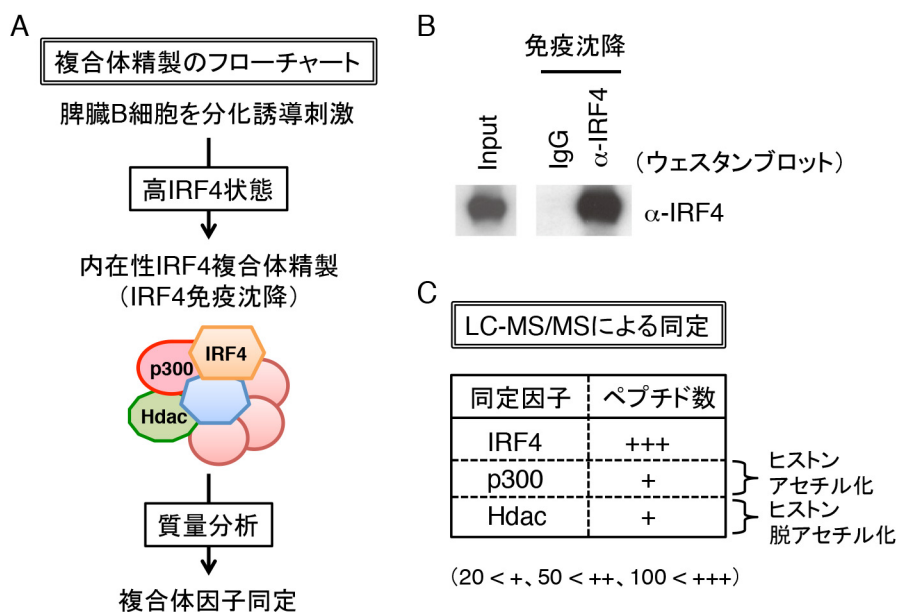


図2. 内在性 IRF4 複合体の精製.

A) 複合体精製のフローチャート. B) 抗 IRF4 抗体により精製した IRF4 複合体サンプルの IRF4 沈降確認 (ウェスタンブロット). コントロール IgG と比較し抗 IRF4 抗体での特異的 IRF4 沈降が認められた. C) LC-MS/MS 法による IRF4 複合体因子同定. 同定因子について検出されたペプチド数をそれぞれ示す. ヒストンアセチル化酵素 p300, ヒストン脱アセチル化酵素 Hdac が同定された.

考 察

近年, 遺伝子発現制御においてエピゲノム制御の概念が定着してきた. そして, 遺伝子発現状態はヒストン修飾状態と関連性があることが明らかとなっている. これらのヒストン修飾は, 転写因子をはじめとする DNA 結合因子によるヒストン修飾関連因子のリクルートによって生ずる. 先行する研究から, IRF4 による標的遺伝子活性化はヒストン H3 リジン 27 アセチル化修飾 (H3K27Ac) と関連する可能性があった²⁾. 本研究で IRF4 複合体解析より見出した IRF4 結合因子 p300 は, H3K27Ac をはじめとするヒストンアセチル化を誘導する酵素である. 一方, Hdac はヒストン脱アセチル化酵素であり, H3K27Ac 脱アセチル化は遺伝子活性化状態をオフにすることが明らかとなっている. このことから, IRF4 Bifunctional 機能は H3K27 修飾を主体とするエピゲノム制御の関与が示唆された. 今後は, IRF4 直接標的遺伝子上における IRF4 結合と H3K27 修飾状況を比較検討し, IRF4 Bifunctional 機能の証明と分化制御における意義を明らかにする必要がある.

本研究に使用した B 細胞受容体トランスジェニック B1-8^{hi} マウスは, 大阪大学の黒崎知博教授より分与いただきました. 末筆となりましたが, 本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します.

文 献

- 1) Ochiai, K., Maienschein-Cline, K., Mandal, M., Triggs, J. R., Bertolino, E., Sciammas, R., Dinner, A. R., Clark, M. R. & Singh, H. : A self-reinforcing regulatory network triggered by limiting IL-7 activates pre-BCR signaling and differentiation. *Nat. Immunol.*, **13** : 300-307, 2012.
- 2) Ochiai, K., Maienschein-Cline, K., Chen, J., Chong, A. S., Dinner, A. R., Singh, H. & Sciammas, R. : Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity*, **38** : 918-929, 2013.