

Title	Regulation of T Cell Receptor V γ 2 Gene Rearrangement by the Helix-Loop-Helix Protein, E2A
Author(s)	野崎, 昌俊
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58184
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	野崎 昌俊
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 24410 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学位論文名	Regulation of T Cell Receptor V γ 2 Gene Rearrangement by the Helix-Loop-Helix Protein, E2A (bHLH転写因子E2AによるV γ 2遺伝子再構成の制御機構)
論文審査委員	(主査) 教授 木村 正 (副査) 教授 平野 俊夫 教授 仲野 徹

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

抗原受容体遺伝子は抗体遺伝子と T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子に大別され、T・B 細胞の発生過程において再構成を受け、膨大な数の抗原に対する多様性を獲得する。この抗原受容体遺伝子の再構成は、T・B 細胞ともに RAG1/2 (recombination activating gene 1/2) という共通な組換え酵素によって起こるが、組換え部位のクロマチン構造が細胞系列や分化段階特異的に変化して、RAG1/2 に対し接近可能 (accessible) になることによって制御されている。さらにマウス TCR γ 遺伝子の再構成は、個体発生においても制御されており、V γ 3 遺伝子が胎児胸腺で特異的に再構成するのに対し、V γ 2 遺伝子再構成は主に成体胸腺で優位となる。V γ 2 遺伝子再構成には bHLH 転写因子 E2A が関与することが報告されているが、その分子機構については明らかではない。そこで我々は、E2A の胸腺における主要アイソフォームである E47 の遺伝子欠損マウスを用いて、V γ 2 遺伝子再構成の制御機構について解析を行なった。

〔 方法ならびに成績 〕

E47 野生型マウス、E47 ヘテロ欠損マウス、E47 ホモ欠損マウスの成体胸腺を用いて、リアルタイム PCR により V γ 2-J γ 1 再構成を定量したところ、E47 野生型マウスと比べて、E47 ヘテロ欠損マウスでは 80%程度、E47 ホモ欠損マウスでは 40%程度に低下しており、E47 の量依存的に V γ 2 遺伝子再構成の障害がみとめられた。その際、accessibility の指標である germline 転写をリアルタイム RT-PCR で、ヒストンのアセチル化を抗アセチル化ヒストン H3 (Lys18) 抗体を用いてクロマチン免疫沈降法 (ChIP Assay) にて解析したところ、germline 転写、ヒストンアセチル化ともに E47 の量依存的に低下していた。このことから、E47 欠損による V γ 2 遺伝子再構成の障害は accessibility の低下によると考えられた。次に、E2A が V γ 2 遺伝子に直接結合し accessibility を制御する可能性を想定し、TCR γ locus 全体における E2A の結合を抗 E2A 抗体を用いた ChIP-on-chip 解析、ならびに ChIP Assay で調べたところ、E2A が V γ 2 遺伝子領域および転写調節領域である HsA, Enhancer (Ey1) にも直接結合することがわかった。E2A は E-box と呼ばれる Consensus 配列 (CANNTG) に結合することが知られているが、V γ 2 遺伝子領域周辺にも多数の E-box が散在していた。結合部位の候補を複数選択し、gel-shift 法により詳細に調べた結果、E2A は V γ 2 遺伝子の組み換えシグナル配列 (Recombination Signal Sequence : RSS) 下流に存在する 2 つの E-box に結合しうることがわかった。さ

らに、これら 2 つの E-box の転写活性化における役割をレポーターアッセイにより検討したところ、どちらも E2A の過剰発現により転写を活性化させ、E-box に変異を導入すると転写活性化能が失われた。

[総 括]

E2A 欠損マウスでは V γ 2 遺伝子再構成が障害されており、E2A の量依存的に V γ 2 遺伝子の accessibility が低下した。さらに E2A は in vivo、in vitro において V γ 2 遺伝子領域、HsA, E γ 1 に結合しており、特に V γ 2 遺伝子領域内では V γ 2 遺伝子の RSS 下流に存在する 2 つの E-box に結合し、転写を活性化させた。以上より、E2A は V γ 2 遺伝子に直接結合し、accessibility を上昇させることにより V γ 2 遺伝子の再構成を正に制御することが明らかになった。V γ 2 遺伝子再構成の調節領域として、従来からプロモーター領域が候補としてあげられていたものの、これだけでは再構成機構を十分に説明できず、V γ 2 遺伝子再構成の制御機構はほとんどわかっていなかった。今回我々は V γ 2 遺伝子再構成を直接制御する転写因子をはじめて同定した。更に RSS 下流領域が再構成制御に重要と考えられた。

論文審査の結果の要旨

E2A の胸腺における主要アイソフォームである E47 の遺伝子欠損マウスを用いて、V γ 2 遺伝子再構成の制御機構について解析が行なわれた。E2A 欠損マウスでは V γ 2 遺伝子再構成が障害されており、E2A の量依存的に V γ 2 遺伝子の accessibility が低下した。さらに E2A は in vivo、in vitro において V γ 2 遺伝子領域ならびに HsA, E γ 1 に結合しており、V γ 2 遺伝子領域内では V γ 2 遺伝子の組み換えシグナル配列下流に存在する 2 つの E-box に結合し、転写を活性化させた。以上より、E2A は V γ 2 遺伝子に直接結合し、accessibility を上昇させることにより再構成を正に制御すると考えられた。今回の研究で V γ 2 遺伝子再構成を直接制御する転写因子をはじめて同定し、組み換えシグナル配列下流が再構成制御に重要であることが証明され、V γ 2 遺伝子再構成の分子機構について明らかとなった。よって、博士 (医学) の学位授与に値する。