

細胞融合部門

坂 野 仁

当研究室では高次生体系における多重遺伝子の発現制御について研究を進めてきた。免疫系は、せいぜい数百の抗原受容体遺伝子を用いて、その数をはるかに越える種類の抗原を認識している。この多重遺伝子系は、遺伝子の発現制御に遺伝子の再構成や遺伝子変換等を巧みに駆使して、多様なリガンドの識別を可能にしている。当グループで研究している V(D) J 組み換えは、部位特異的に起こり、これには組み換えの為のシグナル配列 (recombination signal sequences: RSS) と、組み換え活性化遺伝子 (recombination activating genes: RAG) とが重要な役割を果たしている。

当グループでは、上に述べた V(D) J 組み換えの分子機構とその調節の解明を目指して研究を行っている。免疫系における抗原受容体遺伝子の再構成機構については、内外の研究チームがそれぞれ独自の立場から活発に研究を進めており、組み換え酵素の実体や、反応の素過程等、近年急速な展開を見せている。この V(D) J 組み換えは、T 細胞の T 細胞受容体及び B 細胞の抗体遺伝子に共通して見られるが、リンパ細胞が分化する過程で、組織特異的及び分化段階特異的に厳密に制御されている。例えば、機能的な抗体遺伝子の再構成は T 細胞では起こらず B 細胞でのみ生じ、同じ抗体遺伝子でも重鎖は proB 段階で、軽鎖は preB 段階で特異的に再構成される。我々は、V(D) J 組み換えの制御を研究するため、様々な組み換え基質をトランスジェニックマウスに導入し、組み換えの組織特異性を検討した。まず、抗体遺伝子の組み換えを負に制御する DNA エレメントが、 κ 遺伝子の 3' エンハンサー (E3') 領域に含まれる事が示唆され、一昨年にはこの調節エレメントが E3' 内にある 128bp の領域にしばり込まれた。続いて、この領域内に存在する PU.1 結合モチーフ (GAGGAA) を変異させるだけで、 $V\kappa - J\kappa$ 結合の B/T 特異性が失われることが見出され、制御エレメントの実体が明らかになった (Cell 83, 113-1123, 1995)。

組み換えの分化段階特異性についても、ごく最近になって、E3' 内にある PU.1 結合モチーフが proB/preB の特異性を制御している事が示された。当グループでは以前から、 κ 遺伝子の E3' 領域内に分化段階特異性を支配する制御エレメントがあるとの予備結果を得ていたが、新たに作成したトランスジェニックマウスの解析によって、そのエレメントが B/T 特異性の制御の場合と同様、PU.1 結合配列 (GAGGAA) そのものであるとの結論に達した (投稿準備中)。即ち、この配列を変異させた抗体 κ 遺伝子は、通常軽鎖遺伝子が再構成される preB の段階のみならず、重鎖遺伝子が再構成される proB の段階においても組み換えを起こす事が判明した。結論として、PU.1 結合配列は抗体遺伝子の再構成に関して、組織 (B/T) 特異性のみならず、分化段階 (proB/preB) 特異性についても負の制御エレメントとして機能している事が明らかになったのである。

この PU.1 配列は転写の制御に正の調節因子として働くことが知られているが、組み換えにおいては転写の場合とは逆に、レプレッサー分子との結合を介して制御的に働く事が示唆された。このレプレッサー分子は、PU.1 タンパクがT細胞に存在しないことから、PU.1 そのものではないと思われるが、PU.1 同様同じ ETS ファミリーに属する核タンパク質であると考えられており、現在このレプレッサー分子の単離を急いでいる。もしこのようなレプレッサーの遺伝子が同定され、そのノックアウトマウスが作成できれば、上に述べたトランスジェニックマウスを用いた実験結果が、内在性遺伝子の系を用いて確認出来ることになる。PU.1 結合配列は、転写を正に制御する場合、それに隣接する NFEM5 結合配列 (GAAAAC) と協調する形で調節を行うことが知られている。興味深いことに今回解析した組み換え制御の場合、PU.1 モチーフは NFEM5 モチーフを介さず単独で働く事が判明した。即ち、NFEM5 配列を変異させたトランスジェニック基質では、抗体遺伝子の再構成は組織特異性、分化段階特異性共に影響を受けなかった。我々は、ここに述べた負に働く組み換え制御が、いわゆる対立形質排除 (allelic exclusion) の key メカニズムになっているのではないかと考え、現在その可能性について検討している。

当グループでは、細胞表面に発現する受容体の遺伝子が多重遺伝子系を構成し、多種類のリガンドの識別にあたるもう一つの例として、嗅覚系における匂い分子受容体にも注目している。哺乳類では少なくとも数十万種の匂いの識別能力を備えているが、それには数百の嗅覚受容体遺伝子が対応している。嗅上皮上の嗅細胞では、多数の嗅覚受容体遺伝子の中から一つが選ばれて発現しており、抗原受容体遺伝子の場合と同様二つある allele のうち、一方のみが発現していると考えられている。また、嗅細胞は嗅球の表面に約一千対存在している糸球の中から、通常一つを選んでその軸索を投射している。即ち、個々の嗅細胞はそれぞれに異なった嗅覚受容体遺伝子を選択的に発現し、その受容体の種類に応じて対応する糸球に軸索を投射している。当グループでは、個々の嗅細胞において、ただ一種類の受容体遺伝子が発現させるメカニズムは何か、また、嗅覚受容体の発現と、軸索投射という二つの特異性が、どの様に連携しているのかという点に的をしぼって研究を進めている。

発表論文

1. Hiramatsu, R., Akagi, K., Matsuoka, M., Sakumi, K., Nakamura, H., Kingsbury, L., David, C., Hardy, R., Yamamura, K., and Sakano, H. (1995). The 3' enhancer region determines the B/T specificity and pro-B/pre-B specificity of immunoglobulin V κ -J κ joining. *Cell* 83, 1113-1123.
2. Akamatsu, Y., Tsurushita, N., Narawa, F., Matsuoka, M., Okazaki, K., Imai, M., and Sakano, H. (1994). Essential residues in recombination signal sequences for V(D) J joining. *J. Immunol.* 153, 4520-4529.
3. Huppi, K., Siwarski, D., Shaughnessy Jr., J., Maki, R., Shirakata, M., and Sakano, H. (1993). Genes associated with immunoglobulin V(D) J recombination from a complex locus on mouse chromosome 2 and human chromosome 11. *Immunogenetics* 37, 288-291.
4. Usuda, S., Takemori, T., Matsuoka, M., Shirasawa, T., Yoshida, K., Mori, A., Ishizaka, K., and Saka-

- no, H. (1992). Immunoglobulin V gene replacement is caused by the intramolecular DNA deletion mechanism. *EMBO J.* 11, 611-618.
5. Shirakata, M., Huppi, K., Usuda, S., Okazaki, K., Yoshida, K., and Sakano, H. (1991). HMG1 related DNA-binding protein isolated with V(D) J recombination signal probes. *Mol. Cell. Boil.* 11, 4528-4536.
6. Matsuoka, M., Nagawa, F., Okazaki, K., Kingsbury, L., Yoshida, K., Muller, U., Larue, D. T., Winer J. A., and Sakano, H. (1991). Detection of somatic DNA recombination in the central nervous system using lacZ transgenic mice. *Science* 254, 81-86.
7. Davis, D., Yoshida, K., Kingsbury, L., and Sakano, H. (1991). Circular DNA resulting from recombination between V(D) J joining signals and switch repetitive sequences in mouse thymocytes. *J. Exp. Med.* 173, 743-746.
8. Yoshida, K., Matsuoka, M., Usuda, S., Mori, A., Ishizaka, K., and Sakano, H. (1990). Immunoglobulin switch circular DNA in the mouse infected with *Nippostrongylus brasiliensis*: Evidence for successive class switching from μ to ϵ via γ_1 . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7829-7833.
9. Matsuoka, M., Yoshida, K., Maeda, T., Usuda, S., and Sakano, H. (1990). Switch circular DNA formed in cytokine-treated mouse splenocytes: Evidence for intramolecular DNA deletion in immunoglobulin class switching. *Cell* 62, 135-142.
10. Okazaki, K., and Sakano, H. (1988). Thymocyte circular DNA excised from T cell receptor alphadelta gene complex. *EMBO J.* 7, 1669-1674.
11. Aguilera, R. J., Akira, S., Okazaki, K., and Sakano, H. (1987). A pre-B nuclear protein which specifically interacts with immunoglobulin V-J recombination sequences. *Cell* 51, 909-917.
12. Akira, S., Okazaki, K., and Sakano, H. (1987). Two pairs of recombination signals are sufficient to cause immunoglobulin V-(D)-J joining. *Science* 238, 1134-1138.
13. Okazaki, K., Davis, D. D., and Sakano, H. (1987). Identification of T cell receptor β gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: Direct for intramolecular DNA deletion in V-D-J joining. *Cell* 49, 477-485.