

学 位 論 文 題 名

免疫系遺伝子の転写調節因子としての MSSP の解析

- Fas 誘導アポトーシス系における MSSP の機能を中心として -

学位論文内容の要旨

MSSP (c-myc gene single strand binding proteins) は、ヒトc-myc遺伝子第1エキソンの約2 kb上流に存在するDNA複製開始部位／転写エンハンサー (myc(H-P)21配列) に直接結合する転写因子として本研究室で単離・同定された。またc-Mycと複合体を形成することから、MSSPはc-Mycと協調的な機能がこれまで多く報告されている。MSSPは現在5つのスプライシングバリエントが報告されており、そのすべてにおいてRNA結合モチーフ (RNA binding motif) を2ヶ所有し、RNA結合モチーフがDNAとの結合、転写、DNA複製、アポトーシスに必須であることが明らかとなっている。またMSSPはc-mycの転写エンハンサーに結合し、転写制御を行うほか、甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR)、 α -smooth muscle actin, MHC class I, MHC class IIなどの遺伝子も転写制御することが報告されている。

さらなるMSSPの機能や個体レベルでの表現型を解析するため、本研究室でMSSP(-/-)マウスを作製した。その結果、MSSP(-/-)マウス新生児には一部胎生致死傾向が見られるほか、プロゲステロン量低下などのホルモン異常、E2.5・8細胞期における初期発生段階での細胞死が認められた。MSSPがアポトーシスを誘導することは既に細胞レベルで明らかとなっており、MSSP(-/-)マウスの表現型からもMSSPが生死を司る分子であることが明らかとなっている。このことから本研究では、MSSPによるアポトーシス誘導機構を個体レベルおよび分子レベルで解析した。

はじめにc-Mycが制御する遺伝子の発現がMSSP(+/+)マウスとMSSP(-/-)マウス組織で変化するか解析を行った。この結果、デスレセプターであるFas (CD95) はMSSP(-/-)マウスのほぼすべての組織で減少が認められた。一方、c-Mycが直接転写制御するFas Ligandでは変化が認められなかった。さらに生後1日以内のマウスより調製した初代培養線維芽細胞でのFasの発現もMSSP欠損細胞では減少していた。MSSP欠損によりFasの遺伝子発現が低下するため、MSSP(-/-)マウスはアポトーシス不全であり、自己免疫疾患様の病態にあると考えられた。そこではじめに初代培養胸腺細胞をMSSP(+/+)マウスとMSSP(-/-)マウスから調製し、抗Fas抗体処置によりアポトーシス誘導を行った。この結果、MSSP欠損の胸腺細胞では細胞死が減少し、細胞レベルでのアポトーシス抵抗性が明らかとなった。一方、個体レベルでの致死性、アポトーシス、組織の損傷を解析するため、抗Fas抗体を尾静脈より投与し、肝臓組織標本を用いたTUNEL assayを行った。この結果、MSSP(+/+)マウスでは抗Fas

抗体投与で死亡例が1例出たほか、ほぼすべてのマウスで肝臓組織における出血が確認された。また、TUNEL assayの結果、MSSP(-/-)マウスはMSSP(+/+)マウスに比べアポトーシス陽性細胞がほぼ半減したことから、MSSP欠損により個体レベルでもアポトーシス抵抗性を示すことが明らかとなった。

MSSPが転写因子であることから、直接Fasの遺伝子発現を転写レベルで制御している可能性が示唆された。そこでFas遺伝子プロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子に連結したベクターとともにMSSP発現ベクターをMSSP(-/-)線維芽細胞に共導入しルシフェラーゼアッセイを行った結果、MSSP依存的なプロモーター活性の上昇が認められた。そこでさらにMSSP依存的にFas遺伝子のプロモーター活性を上昇させる領域をルシフェラーゼアッセイおよびChIP assayを行い解析した結果、-1035から-635の領域が得られた。この領域を検索した結果、MSSPコンセンサス配列 (A/T C T A/T A/T T) である'TCTAAT'の存在を確認した。そこで'TCTAAT'を含むFas遺伝子プロモーター領域をプローブとしたゲルシフトアッセイを行った結果、コンセンサス配列特異的なシフトバンドが検出された。さらに抗MSSP抗体を用いたスーパーシフトアッセイを行ったところ抗MSSP抗体特異的なシフトバンドが検出されたことから、MSSPはFas遺伝子プロモーター領域の-1035から-635の領域に存在する'TCTAAT'配列に結合することが明らかとなった。

またMSSPのスプライシングバリエーションであることが既に明らかとなっているYC1はIL-2受容体 α 鎖 (CD25) のrepressorタンパク質としてGenBankに登録されている。MSSP(-/-)マウスではMSSP欠損によりIL-2受容体 α 鎖の発現抑制が解除されることで発現が増加している可能性が示唆された。そこでMSSP(+/+)マウスとMSSP(-/-)マウスからIL-2受容体の発現が高いリンパ系組織である脾臓を用いRT-PCRを行った結果、MSSP(-/-)マウスでIL-2受容体 α 鎖の発現の増加が認められた。マウスIL-2受容体 α 鎖プロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子に連結したベクターとMSSP発現ベクターをMSSP(-/-)線維芽細胞に共導入しルシフェラーゼアッセイを行った結果、MSSP依存的なプロモーター活性の減少が確認された。マウスIL-2受容体 α 鎖プロモーター領域にMSSPコンセンサス配列が存在するか検索を行ったところ、7ヶ所存在することを確認した。MSSPはこのコンセンサス配列に結合しIL-2受容体 α 鎖の発現を制御する可能性が示唆される。

IL-2受容体 α 鎖はマウスにおいては機能的IL-2受容体形成に必須であり、MSSP(-/-)マウスではIL-2シグナル伝達過剰により生体に異常が生じている可能性が示唆される。一方、IL-2受容体 α 鎖は自己反応性T細胞の抑制を行う「制御性T細胞」のマーカー (CD4⁺CD25⁺) として報告されている。このことからMSSP(-/-)マウスはFasの減少によりアポトーシス不全となり自己免疫疾患様の病態にある可能性が示唆されたが、制御性T細胞の増加により自己免疫疾患様の病態は抑制されている可能性も示唆される。以上よりMSSPは広く免疫系分子の発現制御を行い、また免疫寛容、免疫バランスに関与する分子である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 寛 芳

副 査 教 授 横 沢 英 良

副 査 助 教 授 松 本 健 一

副 査 助 教 授 川 原 裕 之

学 位 論 文 題 名

免疫系遺伝子の転写調節因子としての MSSP の解析

－ Fas 誘導アポトーシス系における MSSP の機能を中心として－

本研究室においてヒト *c-myc* 遺伝子の第1エキソンの約2 kb 上流に DNA 複製開始／転写エン
ンサー領域 (*myc*(H-P)21) が存在することを明らかにした。この配列特異的に結合するタンパク
群として MSSP(*c-myc* single strand binding proteins)が同定された。MSSP の機能解明のため、本
研究室で *Mssp* 欠損(-/-)マウスを作製した。今回 *Mssp*(-/-)マウスの主要な組織においてアポトーシ
スに關与する Death Receptor, Fas(CD95)の発現レベルが顕著に低下していることを明らかにした
細胞及び個体レベルでもアポトーシス刺激に対し、*Mssp*(-/-)の感受性は低下していた。さら
MSSP が転写レベルで Fas 遺伝子発現の調節を行っていることを明らかにした。同様に MSSP
IL-2 受容体 α 鎖(CD25)の遺伝子発現も調節したことから、広く免疫系遺伝子の調節因子として
MSSP の可能性が示唆された。

1. *Mssp*(-/-)マウスにおける Fas(CD95)の発現レベル

Mssp(-/-)マウス、野生型マウスの主要組織における Fas タンパク質量を比較しところ、
Mssp(-/-)マウスの組織において顕著な Fas タンパク質の低下を確認した。さらに *Mssp*(-/-)マウ
ス組織で見られる Fas 遺伝子発現の低下は細胞レベルでも同様であり、MSSP(-/-)線維芽細胞で
Fas 遺伝子発現が低下していた。

2. 抗 Fas 抗体によるアポトーシス感受性の変化

5-7週齢の雄性マウス(野生型マウス、*Mssp*(-/-)マウス)に抗 Fas 抗体 0.5 mg/kg 静脈内投与 TUN
assay を行った。*Mssp*(-/-)マウスでは野生型マウスのアポトーシス陽性細胞数に比べほぼ半減し
おり、個体レベルでもアポトーシス感受性が低下していることが明らかとなった。同様に *Mssp*(-/-)
初代培養胸腺細胞に Fas 依存アポトーシスが誘導は半減していた。

3. 転写因子 MSSP の Fas 遺伝子発現への関与

MSSP 発現ベクターと Fas 遺伝子上流をルシフェラーゼに連結したベクターを Mssp(-/-)線維芽細胞に共導入しルシフェラーゼアッセイを行った。この結果、MSSP 用量依存的な活性が現れた事、MSSP が転写因子として Fas の遺伝子発現を制御している可能性が示唆された

4. MSSP による Fas 遺伝子の転写調節領域の同定

MSSP 導入によりプロモーター活性が変化する領域を決定するため、Fas 遺伝子上流とその欠変異体をルシフェラーゼ遺伝子ベクターに連結させ、HeLa 細胞に導入しルシフェラーゼアッセイを行ったところ、-1035 から-635 間の領域において MSSP 導入によるプロモーター活性の変化が認められた。さらに MSSP の Fas 遺伝子プロモーター領域への結合を抗 MSSP 抗体を用いたクロチン免疫沈降法で確認を行った。

この結果、MSSP が Fas 遺伝子プロモーター上の-1035 から-635 間の領域に結合し Fas 遺伝子転写活性化を行うことが明らかとなった。さらにこの領域に MSSP のコンセンサス配列(A/TCTA/TA/TT)が存在するか否かの検討を行ったところ、TCTAAT 配列の存在を確認した。

5. MSSP による Fas 遺伝子発現制御

MSSP が Fas プロモーター領域に存在するコンセンサス配列特異的に結合し、Fas 遺伝子発現に関与するか MSSP コンセンサス配列を含む Fas プロモーター領域をプローブにしたゲルシフトアッセイ、さらに抗 MSSP 抗体を用いたスーパーシフトアッセイ、そして MSSP コンセンサス配列を除いた Fas 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼに連結したベクターを用いたルシフェラーゼアッセイにより検討した。Fas 遺伝子プロモーター領域に存在する TCTAAT を含む列に MSSP が結合することがゲルシフトアッセイ及び抗 MSSP 抗体を用いたスーパーシフトアッセイにより明らかとなった。さらに MSSP 結合配列と考えられる TCTAAT を除いたベクターを用いたルシフェラーゼアッセイでは、プロモーター活性が減少した。この結果、MSSP は Fas promoter 領域に存在するコンセンサス配列に結合し Fas 遺伝子発現を制御することが明らかとなった。

6. Mssp(-/-)マウス脾臓における IL-2 受容体 α 鎖(CD25)の発現

本研究室でクローニングした MSSP と他グループよりクローニングされたヒト YC1(GenBank L11289)はスプライシングの違いにより生ずることが明らかとなっている。ヒト YC1 は IL-2 受容体 α 鎖の repressor タンパク質として登録されている。Mssp(-/-)マウス、野生型マウスの脾臓を用いて RT-PCR 法を行ったところ、Mssp(-/-)マウス脾臓で IL-2 受容体 α 鎖が増加していた。IL-2 Receptor α 鎖は、 β 鎖そして γ 鎖と結合し IL2 高親和性レセプターを形成することから、MSSP(-/-)マウス脾臓では IL-2 シグナルの異常が予想される。また IL-2 受容体 α 鎖が自己反応性 T 細胞の抑制に関与するという「制御性 T 細胞」の特異的マーカーとしても報告されており、MSSP は自己の免疫バランスにも関与する可能性も示唆された。

このように、野村 淳は精力的に MSSP の機能解析を行ない、多くの成果をあげた。これらの業績は野村 淳に博士(薬学)の学位授与に十分値し、推薦するものである。