

ポリコーム遺伝子群 *mel-18* による T 細胞受容体の遺伝子再構成の制御機構の解析

福 原 信 一

広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻探索医科学講座
免疫学研究室 (主任: 菅野雅元教授)

受付: 平成14年3月13日

受理: 平成14年9月4日

哺乳類ポリコーム遺伝子群産物は、クロマチンサイレンシングに関するタンパク質の複合体を形成し、「細胞の遺伝子発現メモリー機構」に重要であることが知られている。数百以上存在すると考えられる標的遺伝子の発現維持に関与していることが想定されており、代表例として形態形成に必要なホメオボックス遺伝子群、細胞周期関連の遺伝子としては、*p16^{INK4a}*, *p21^{Cip1/Waf1}*, *c-myc* などについては研究が進んでいる。*mel-18* は哺乳類ポリコーム遺伝子群として我々の研究グループが世界で最初に単離したものである。

mel-18 欠損マウスでは、胸腺の T 細胞の分化は $CD4^-CD8^-$ から $CD4^+CD8^+$ への過程で障害されていた。T 細胞分化に関与する重要な因子の一つに、遺伝子再構成を制御する Rag-1/2 タンパク質がある。Rag-2 タンパク質は細胞周期を制御する CDC2 や CDK2 によってリン酸化されることにより、不安定化され分解されることが知られている。*mel-18* 欠損マウスの胸腺における T 細胞の分化段階では、CDC2/CDK2 の活性が上昇していることと、Rag-2 タンパク質の減少が相関していた。さらに、T 細胞の遺伝子再構成は障害されていた。

一方、*mel-18* 過剰発現マウスでは、*rag-2*mRNA の発現は正常コントロール群と変わらないがタンパク質レベルは増加していた。また胸腺細胞の細胞周期の G0/G1 期は延長していた。S 期、G2/M 期で Rag-2 が増加すれば T 細胞の aberrant な遺伝子再構成が増加することが知られている。*mel-18* 過剰発現マウスでは、Rag-2 タンパク質の過剰発現が見られるが S 期、G2/M 期の比率の減少も起きていることから、aberrant な遺伝子再構成はほとんど検出できなかった。

以上のように、我々は *mel-18* 遺伝子の欠損、過剰発現と、Rag-2 タンパク質の安定性およびサイクリン依存性キナーゼ活性に相関があることを見出した。この結果から、ポリコーム遺伝子群は T 細胞受容体の遺伝子再構成を制御している可能性を示唆した。

Key words : 遺伝子再構成, ポリコーム遺伝子群, Rag-2, *mel-18*

リンパ細胞の表面に発現される抗原レセプターは、抗原を認識して不活性化するのみならず、抗原の存在を細胞内に伝達し、一連の抗原特異的な免疫応答を引き起こす上でも重要な役割を担う。B 細胞では免疫グロブリン、T 細胞では T 細胞レセプターが、抗原レセプターとして機能している。一つのリンパ細胞のクローンは、特定の 1 種類の抗原レセプターだけを発現し、特異的な認識を担う。脊椎動物の免疫系は、基本的には無限、少なくとも $10^8 \sim 10^{12}$ を超える種類に匹敵する多様性が求められることになる。この多数の抗原に対する特異性は、抗原レセプター分子の可変部にお

けるアミノ酸配列の多様性によってもたらされる。

抗原レセプターの遺伝子において、可変領域をコードする DNA は V, D, J と呼ばれるセグメントに分断化している。従って、この遺伝子系では抗原レセプターの発現に先行して、VDJ 組み換えと呼ばれる体細胞 DNA 組み換えが必要となっている。Rag-1 と Rag-2 はともに再構成反応を引き起こす酵素タンパク質としてこの過程で必須である。

T 細胞分化において胸腺内では CD4 と CD8 をともに発現していない (DN) 未熟な T 細胞が存在し、その分画は、さらに 4 段階に分けられる。最も初期の段

階では、遺伝子再構成はまだ始まっていない。この T 細胞は次の段階で CD25 を発現し、この時期に T 細胞受容体の β 鎖の遺伝子再構成が急速に進行する。 β 鎖の遺伝子再構成の進行とともに CD25 の発現が抑制され、CD4 と CD8 の両方の発現がみられる¹⁹⁾。

ポリコム遺伝子群はショウジョウバエのホメオボックス遺伝子群の負の制御因子として同定された^{20,26)}。その後 *mel-18* や *bmi-1* などの哺乳類のポリコム遺伝子群がショウジョウバエの *posterior sex comb* 遺伝子に対応していることが明らかとなった。

哺乳類のポリコム遺伝子群はリンパ球の成長及び分化を制御していることが報告されている。ポリコム遺伝子群の欠損により、リンパ球初期分化段階において細胞が IL-7 の刺激に対して十分に反応しないことによりリンパ球の分化・増殖障害を引き起こすことが知られている^{1,2,23,24)}。

C57BL/6 に10回以上の戻し交配を経た生後4週齢の *mel-18* 欠損マウスの胸腺では細胞数の減少と CD4⁻8⁻(DN) から CD4⁺8⁺(DP) への分化の障害が見られる²⁾。これまでの研究結果を踏まえると、*mel-18* は DN から DP への分化に関与していると考えた。そこで我々はこの分化過程で最も重要なイベントである遺伝子再構成反応に的を絞り、*mel-18* が遺伝子再構成を制御する Rag-1/2 とリンパ球の分化との関係を制御する役割について検討を行った。

今回の我々の研究によりポリコム遺伝子群の発現と Rag-2 タンパク質の安定性について示唆するデータが得られたので報告する。

材料と方法

1. マウス

mel-18 欠損マウスは 129/SV 由来の R1 胚性幹細胞を用い定法により gene targeting を行い、C57BL/6 マウスに交配し作成した^{1,21)}。*mel-18* 欠損マウス(-/-)は、10回以上 C57BL/6 マウスに戻し交配したヘテロ接合子同士の交配で得た。*mel-18* 過剰発現マウスは、プロモーターと *mel-18* 構造遺伝子をつなげたコンストラクトを C57BL/6 マウス受精卵に micro injection を行い作成した。これらのマウスは当教室の Kanno らが作成したものをを用いた。なお、全てのマウスは広島大学動物実験指針に基づき、広島大学医学部動物実験施設の specific pathogen free (SPF) の環境下で育成された。

2. 表面抗原の抗体

フローサイトメトリー解析のため、FITC 標識され

た抗 CD4 (RM4-5) モノクローナル抗体、phycoerythrin 標識された抗 CD8 (53-6.7) モノクローナル抗体 (PharMingen) を使用した。

3. 表面抗原の解析

$3-5 \times 10^5$ 個の胸腺細胞を FITC 標識一抗 CD4 抗体、phycoerythrin 標識一抗 CD8 抗体で染色した。FACS-Calibur (Becton Dickinson) を用いてフローサイトメトリーを行った。

4. キメラマウスの作成

4週齢の *mel-18* 欠損マウスから骨髓細胞を採取し、CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7), B220 (RA3-6B3), TER119 (TER-119), CD11b (M1/70), Ly-6G (RB6-8c5) (PharMingen) が陰性かつ、c-kit 及び Sca-1 が陽性の細胞 (*lin*⁻, c-kit⁺S, Sca-1⁺) を分画した。10Gy で致命的な放射線照射を行った *rag-1* 欠損マウスに *mel-18* 欠損マウス由来の (*lin*⁻, c-kit⁺S, Sca-1⁺) 細胞 500個を移植して、キメラマウスを作成した²⁵⁾。このキメラマウスを16週間 SPF の条件下で飼育し、実験に使用した。

5. 胸腺細胞における rag-1/2 の RT-PCR およびウェスタンブロット

TRIzol (GIBCO BRL) を用いて CD4/8 陰性の胸腺細胞から total RNA を抽出した。この total RNA とオリゴ dT プライマーを用いて逆転写反応を行い、1本鎖 cDNA を合成した後に SuperTaq (HT Biotechnology) を用いて PCR を行い、*rag-1*, *rag-2* mRNA の半定量を試みた。プライマーは以下のものをを用いた。*rag-1*: 5'-CCA AGC TGC AGA CAT TCT AGC ACT C-3', 5'-CAA CAT CTG CCT TCA CGT CGA TCC-3', *rag-2*: 5'-CAC ATC CAC AAG CAG GAA GTA CA-3', 5'-GGT TCA GGG ACA TCT CCT ACT AAG-3'¹⁵⁾。

細胞分解産物中のタンパク質の定量には Micro Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit (Pierce) を用いた。20 μ g の等量のタンパク質を SDS-PAGE ゲルで電気泳動した後、タンパク質をポリビニルジフルオリド膜にトランスファーした。メンブレンに Rag-1 または Rag-2 ポリクローナル抗体を反応させた後、ECL または ECL-PLUS (Amersham) を用いて Rag-1, Rag-2 各々のシグナルを検出した。Rag-1 (13781A) と Rag-2 (13791A) のポリクローナル抗体は PharMingen より購入したものをを使用した。なお、同様の実験を3回繰り返し、再現性を確認した。

6. キナーゼ活性の測定

酵素の抽出は Matsushima らの方法を用いた¹⁴⁾。Protein G セファロース・ビーズと抗 Rb 抗体 (PharMingen) を用いて免疫沈降したタンパク質を 1 ml の PBS 緩衝液で 4 回、1 mM の DTT を含んだ HEPES で 2 回洗浄した。ビーズを用いて免疫沈降したタンパク質に基質液 (0.2 μ g 可溶性グルタチオン S-transferase-pRb fusion protein または 1 μ g histone H1 (Boehringer Mannheim) と 2.5 mM EGTA, 10 mM β -glycerophosphate, 0.1 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF, 20 μ M ATP, 10 μ Ci of [γ -³²P] ATP (6000 Ci/mmol)(Amersham)) を加え、さらにキナーゼ緩衝液 (50 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) に懸濁した。30度, 30分で反応させた後, SDS-PAGE を行い, 基質蛋白質 (pRb) にリン酸化された量をオートラジオグラフィーで定量した。

7. シグナルジョイントのクローニング

mel-18 過剰発現マウスの脾臓 DNA を DNA zol (GIBCO BRL) を用いて抽出した。TCR β 遺伝子の遺伝子再構成の結果生じる V β 14-D β 1 のシグナルジョイントをクローニングするため, Lee らが報告したプライマーを用いて PCR を行った⁹⁾。なお, PCR の鋳型として, 抽出した脾臓 DNA 1 μ g を使用した。プライマーは 5'-ATGATGGAGATACTCCCAGA-3', 5'-TGTTGGTTACATCADGTCATTT-3' を使用した。PCR 反応は Gene Amp PCR system 9700 (PERKIN ELMER) で行った。PCR の条件は 94°C 4 分間の後, [94°C 1 分間, 56°C 1 分間, 72°C 1.5 分間] を 40 サイクル行い, 72°C 10 分間, 4°C で終了した。PCR 産物を 0.7% アガロースゲルで電気泳動した後, 目的のゲル部分を分離して QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) により PCR 由来の DNA を精製した。PCR 産物と pGEMT-easy ベクターをライゲーション反応した後, DH5 α コンピテントセル (TOYOBO) に transform して, シグナルジョイント DNA をクローニングした。LONG READIR 4200 DNA sequencer (LI-COR) により, クローニングしたシグナルジョイント DNA の塩基配列を解析した。

8. 細胞周期の解析

FITC で標識された抗 CD8 抗体と Phycoerythrin で標識された抗 CD4 抗体で胸腺細胞を染色した。細胞をパラホルムアルデヒドで固定した後, 5 μ g/ml の propidium iodide で染色し FACSCalibur で Mode-FitLite プログラムを用いて解析した⁵⁾。

9. *mel-18* 欠損マウスの胸腺細胞のサザンブローディング

mel-18 欠損マウスの胸腺, 肝臓よりゲノム DNA を抽出した後, 制限酵素 Hind III で断片化した。断片化した DNA を 0.7% アガロースゲルで電気泳動した後, ナイロンメンブレンにトランスファーした。メンブレンに ³²P ラベルした 86T5 \cdot TCR β プローブをハイブリダイゼーションした後, 洗浄してシグナルを検出した⁶⁾。プローブとして 86T5cDNA の C β 1 を用いた⁶⁾。

成 績

1. *mel-18* 欠損マウスの胸腺細胞の分化について

mel-18 欠損マウスでは以前より免疫に障害があることが報告されていた²⁾。生下時の胸腺細胞では表面抗原の CD4 と CD8 の発現に関して *mel-18* 欠損マウスは正常コントロールと差がない。しかし, 生後 4 週齢では *mel-18* 欠損マウスの CD4⁻8⁻ (DN) は増加し CD4⁺8⁺ (DP) は減少していた (Fig. 1)。

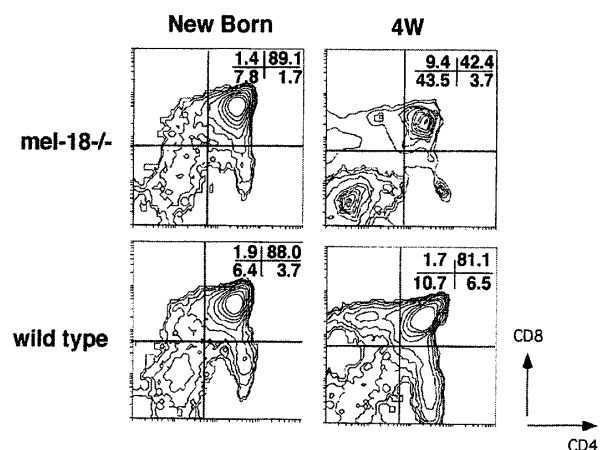


Fig. 1. Expression of CD4 and CD8 on thymocyte at birth and 4 weeks of age.

The upper panels show thymocytes from *mel-18*-deficient mice, the lower panels, wild-type mice.

$3\text{-}5 \times 10^5$ thymocytes were labeled with the FITC conjugated CD4 antibody and Phycoerythrin conjugated CD8 antibody, respectively. The X-axis displays CD4 and the Y-axis indicate CD8 staining. The percentage of CD4⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺ and CD4⁻CD8⁻ are indicated.

2. *mel-18* 欠損マウス由来の骨髄細胞の分化・増殖の検討

胸腺は少なくとも骨髄由来の胸腺細胞と胸腺ストローマ細胞という, 2 種類の細胞から構成される。どちらかに機能障害があれば胸腺の構造及び機能に障害

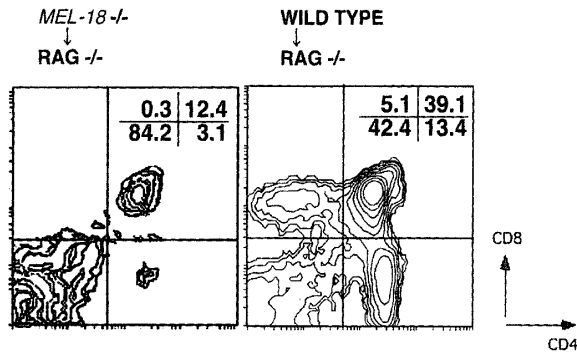


Fig. 2. Expression of CD4 and CD8 on the thymocytes of RAG-1-deficient mice is corrected by the engraftment with *mel-18*-deficient bone marrow (left), and of *mel-18*-deficient mice with RAG-1-deficient bone marrow (right).

The X-axis shows CD4 and Y-axis indicates CD8. The percentage of CD4⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺ and CD4⁻CD8⁻ are indicated.

を来たし得る。*mel-18* 欠損マウスの骨髄由来細胞の機能を分析するために致死的に放射線照射した *rag-1* 欠損マウスに *mel-18* 欠損マウス由来と正常マウス由来の骨髄細胞をそれぞれ移植する骨髄キメラ移植実験を行い、16週後に、胸腺のドナー骨髄由来細胞の解析を行った (Fig. 2)。正常マウス由来の骨髄細胞は胸腺で正常に分化していたが、*mel-18* 欠損マウスの骨髄由来細胞数は正常マウスの細胞数に比べて 1/10 であり、さらに CD4⁻CD8⁻ (DN) から CD4⁺CD8⁺ (DP) への分化が障害されていた。以上の実験結果を合わせて考えると生後 4 週齢の *mel-18* 欠損マウスにおいて DN から DP への分化が障害される原因は胸腺細胞の分化に影響を与える周囲環境であるストローマではなく、胸腺細胞そのものである可能性が考えられた。

3. *rag-1* と *rag-2* の mRNA の発現とタンパク質の安定性について

次に出生直後と生後 4 週齢での *mel-18* 欠損マウスと *mel-18* 過剰発現マウスと正常マウス由来の DN 胸腺細胞における *rag-1* と *rag-2* の mRNA とタンパク質量について検討した (Fig. 3A)。*rag-1* に関しては mRNA とタンパク質量は 3 群で差は無かった。しかし、Rag-2 のタンパク質量に関しては生後 4 週齢の *mel-18* 欠損マウスにおいて検出できなかった。mRNA の発現に関しては 3 群で差は無かった。以上の結果から 2 つの可能性が考えられる。1 つは翻訳レベルの制御であり、もう 1 つはタンパク質の安定性レベルでの調節である。Lee らの論文からも考えて、我々は後者の

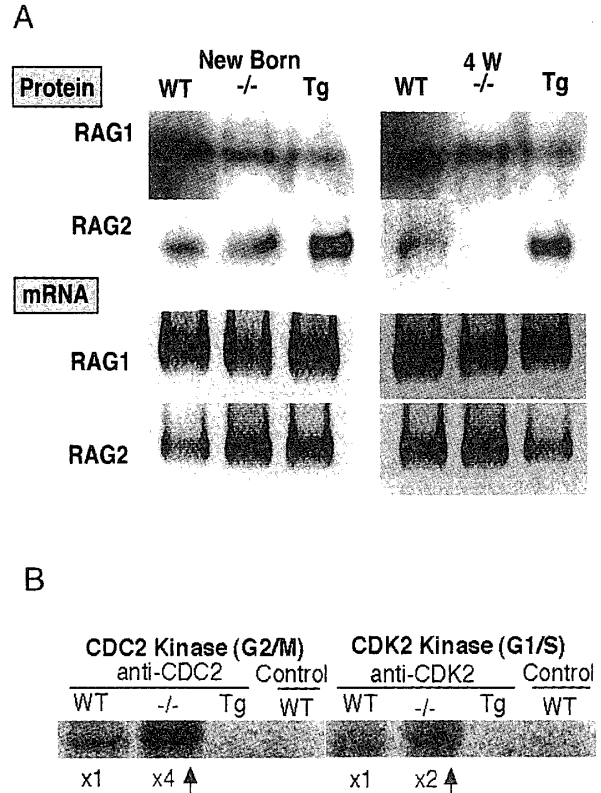


Fig. 3. Expression of RAG-1 and RAG-2 in *mel-18*-deficient and *mel-18*-transgenic mice and CDC2/CDK2 activity as determined by kinase assay (A): Rag-1 and Rag-2 protein and mRNA expression in CD4/CD8 double-negative thymocytes derived from wild-type, *mel-18*-deficient and *mel-18*-transgenic mice either at birth or at 4 weeks by Western blotting and RT-PCR, respectively.

(B): The activity of CDC2 and CDK2 kinases in CD4/8-DN thymocytes derived from control, *mel-18*-deficient and -transgenic mice. Histone H1 was used as a kinase substrate.

可能性が高いと考えて検討した。

Lee らは、Rag-2 のリン酸化により Rag-2 タンパク質の安定性が急激に失われること、さらにそのキナーゼは CDC2 キナーゼであることを報告している⁹⁾。*mel-18* 欠損マウスにおいて観察された Rag-2 タンパク質の不安定化に CDC2 や CDK2 キナーゼ活性が関与する可能性を検討するため、各マウスにおけるこれらキナーゼ活性を比較した。*mel-18* 欠損マウスの DN 胸腺細胞では CDC2 と CDK2 キナーゼ活性はともに上昇していた (Fig. 3B)。以上より *mel-18* 欠損マウスでは CDC2 と CDK2 キナーゼ活性の上昇と、Rag-2 の不安定化が同時に起きていることが観察出来たので、この両者を調節している可能性が考えられた。これに

より未熟な T 細胞の分化が損われ、T 細胞受容体の遺伝子再構成の異常を引き起こす可能性が考えられた。また、mel-18 過剰発現マウスの DN 胸腺細胞ではコントロールに比べて、Rag-2 タンパク質が増加していた (Fig. 3A)。このマウスでもやはり CDC2 と CDK2 キナーゼ活性の低下と Rag-2 タンパク質の安定性の増加が同時に起きていることが観察された。

4. mel-18 過剰発現マウスにおけるシグナルジョイントの塩基配列の解析

VDJ リコンビナーゼタンパクである Rag-2 が、細胞周期の G0/early G1 期に蓄積することが正常の VDJ 組み換えに必須であると報告されている⁹⁾。さらに Rag-2 タンパク質が細胞周期の他の期 (S, G2/M 期) で蓄積すると変異の多い組み換えが引き起こされることが知られている。上記の実験で mel-18 過剰発現マウスの DN 胸腺細胞で Rag-2 タンパク質が増加していることから考えると、このマウスの T リンパ球では、変異の多い組み換え (aberrant な VDJ 組み換え) が引き起こされると予想される。そこで mel-18 過剰発現マウスの末梢 T 細胞におけるシグナルジョイントの塩基配列の解析を行った。mel-18 過剰発現マウスの Vβ14 と Dβ1 の間のシグナルジョイントの塩基配列を調べてみると、予想に反し正常コントロールと同様に正確にヘプタマー・ノナマー結合を有しており、異常な組み換えは観察されなかった (Fig. 4A)。加えて、N-ヌクレオチドの挿入パターンも正常コントロール群と同様であった。挿入部の塩基配列の頻度も 2 群で差は無かった。

5. mel-18 過剰発現マウスにおける細胞周期の解析

mel-18 過剰発現マウスのリンパ球では、Rag-2 タンパク質が増加しているにもかかわらず予想に反してシグナルジョイントに変異の多い塩基配列が見られなかった原因を検討するために、胸腺細胞の細胞周期について実験を行った。mel-18 過剰発現マウスの DN 胸腺細胞の細胞周期についてフローサイトメトリーにより解析を行った。mel-18 過剰発現マウスの DN の胸腺細胞では細胞周期 G0/G1 期が延長しており、S 期と G2/M 期が減少していた。

正常コントロール群では G0/G1 期は 71.69% で S 期と G2/M 期はそれぞれ 6.16% と 22.15% であった。mel-18 過剰発現マウスでは G0/G1 期は 83.76% で S 期と G2/M 期はそれぞれ 0.16% と 16.08% であった (Fig. 4B)。S 期と G2/M 期に Rag-2 タンパク質の過剰発現することが変異型シグナルジョイントの形成を

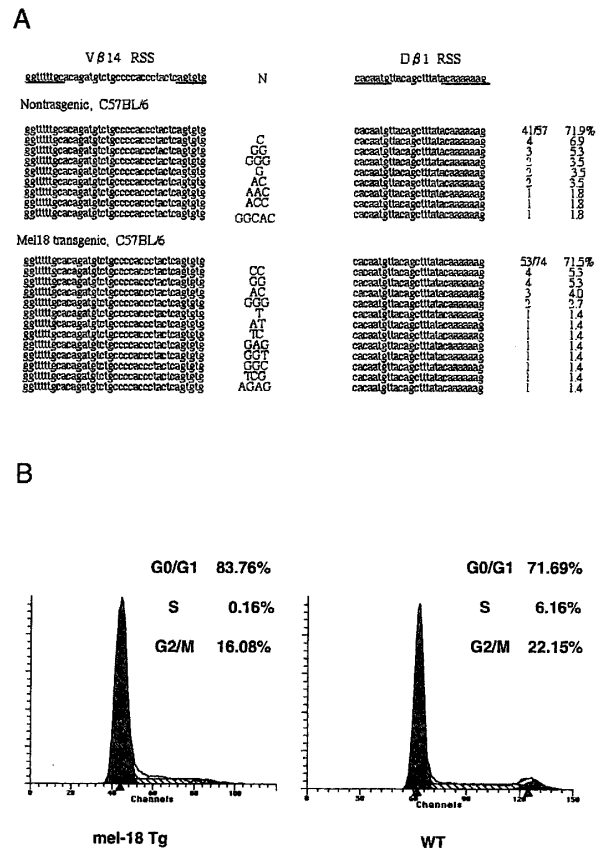


Fig. 4. (A): Vβ14-Dβ1 signal junctions isolated from splenic T cells of wild type mice (upper panel) or mice expressing the mel-18 transgene on a C57-BL/6 background (lower panel). The recombination signal sequences (RSS) of Vβ14 and Dβ1 are indicated by lowercase letters; N-nucleotide insertions are symbolized by underlined capital sequences. Heptamer and nonamer sequences are also underlined. The number of occurrences and percentages of a particular sequence are given at right.

(B): Cell cycle of DN thymocytes from mel-18-transgenic mice and wild type were analyzed after staining with propidium iodide. The horizontal axis expresses DNA content; the vertical axis expresses the number of cells. The percentage of cells in G1, S, and G2/M are shown.

誘導することが知られている。しかし、mel-18 過剰発現マウスでは S 期と G2/M 期が短縮 (特に S 期の短縮が著しい) するために、Rag-2 タンパク質が過剰発現していても T 細胞受容体の遺伝子再構成が比較的正常に行われると考えられた。

6. mel-18 欠損マウスにおける T 細胞受容体の遺伝子再構成の検討

mel-18 欠損マウスの DN の胸腺細胞では、Rag-2 タ

ンパク質の減少（不安定性）と細胞周期活性の上昇という2つの性格を同時に持つことから考えて、T細胞受容体の遺伝子再構成が障害されている可能性が考えられた。そこで我々は4週齢の *mel-18* 欠損マウスとコントロールの DN 胸腺細胞から DNA を抽出し TCR β の cDNA をプローブとしてサザンブロッティングを行った。

コントロールではスメアパターンであったが、*mel-18* 欠損マウスの T 細胞では遺伝子再構成が起きていないことを示すジャームラインバンドが検出された (Fig. 5)。この結果より *mel-18* 欠損マウスにおいて T 細胞受容体の遺伝子再構成が障害されていることが示唆された。

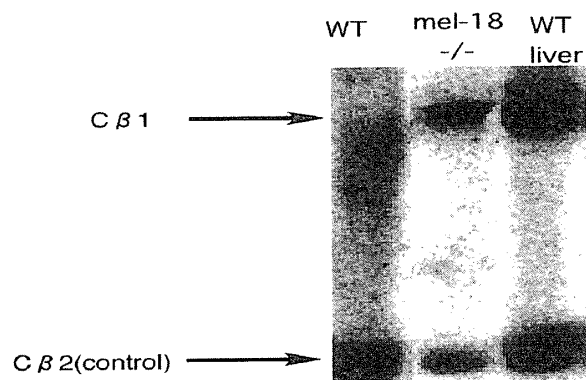


Fig. 5. Genomic Southern blotting analysis of TCR β rearrangement in thymocytes from *mel-18*-deficient and wild-type mice. We extracted genomic DNA from both mouse thymus and liver and performed a subsequent Southern hybridization using a 86T5·TCR β cDNA probe for the analysis of β -rearrangement. Extracts of wild-type liver are shown at right as a negative control.

考 察

この研究の観察結果から *mel-18* が Rag-2 タンパク質の安定性と細胞周期の制御に、ともに何らかの形で関与している可能性が考えられる。*mel-18* 欠損マウスの DN 胸腺細胞では、Rag-2 タンパク質の減少と、サイクリン依存性キナーゼである CDC2 と CDK2 の活性の上昇が同時に観察された。一方、*mel-18* 過剰発現マウスの DN 胸腺細胞では、Rag-2 タンパク質が蓄積していた。また、DN 胸腺細胞の細胞周期に関しては *mel-18* 過剰発現マウスでは *mel-18* 欠損マウスとくらべて G0/G1 期の比率が高くなることが分かった。

mel-18 欠損マウスと *mel-18* 過剰発現マウスにおける Rag-2 タンパク質と細胞周期に関する今回の我々の実験結果は Lee と Desiderio らの報告と合致した⁹⁾。

mel-18 過剰発現マウスにおいて Rag-2 タンパク質が蓄積していることは変異の多い VDJ 組み換えを生じる可能性が高くなることが考えられるが、変異の多い VDJ 組み換えは観察されず、ほぼ正常であった。この予想に反する結果は *mel-18* の過剰発現が Rag-2 タンパク質の安定性の上昇だけでなく CDC2/CDK2 活性の低下を同時に引き起こすため、G0/G1 期が増大し、結果として異常な VDJ 組み換えが生じ難くなっていると考えられた。実際、我々の実験で DN 胸腺細胞における細胞周期の G0/G1 期の比率が高くなっていた。一方、*mel-18* 欠損マウスでは Rag-2 タンパク質が減少し VDJ 組み換えは障害されていた。

mel-18 欠損マウスの免疫学的な欠損の一つは DN から DP への分化の障害による T 細胞の異常として報告されている²⁾。今回の我々の検討では Rag-2 タンパク質は出生直後ではコントロール群と変わりなく、CD4⁺CD8⁺ も対象と同じように存在したが、4週齢では Rag-2 のタンパク量が減少しており、このことにより遺伝子再構成が障害されリンパ球の分化が損なわれ CD4・CD8 の発現が低下していると考えられた。*mel-18* 欠損マウスの免疫学的な欠損は Rag-1/Rag-2 酵素タンパク質複合体が正常に作用できず、VDJ 組み換え障害を引き起こしているのかもしれない。抗原受容体遺伝子の VDJ 組み換えは遺伝子再構成反応を行う酵素である Rag-1 と Rag-2 により反応が進行し^{14,16,18)}、この後の遺伝子再構成の過程では、DNA 二重鎖切断を修復させるタンパク質である Ku70:Ku80, XRCC4, DNA 依存性 protein kinases が発現してくることが知られている¹¹⁾。遺伝子再構成をポリコーム遺伝子群が制御している可能性、という観点から今回は Rag-1, Rag-2 に焦点を絞って解析を行ったが、Ku70, XRCC4 などによる DNA 二重鎖切断の修復にも関与している可能性も考えられる。しかし、これらの DNA の遺伝子再構成に関するタンパク質とポリコーム遺伝子群との関係についてはまだ知られていない。今後、本当に Rag-2 タンパク質のリン酸化が上昇しているのか、更に検討を加える必要がある。

このように T 細胞分化にとって最も重要な VDJ 組み換えは、その重要な構成要素である Rag-2 タンパク質の細胞周期に伴う分解からも分かるように細胞周期と密接な関係を持つ^{10,12,13)}。Rag-2 タンパク質は細胞周期の G0/G1 期に蓄積し S 期に分解される¹³⁾。S 期、G2/M 期で Rag-2 タンパク質が増加すれば、T 細胞の遺伝子再構成による VDJ 組み換えには多くの変異が生ずる⁹⁾。

細胞周期とポリコーム遺伝子群との関係については

少なくとも以下の4つの報告が見られる。① *mel-18* は *c-myc/cdc25/cdk* の活性経路を制御することにより細胞周期を調節している²¹⁾, ② *Bmi-1* は *p16^{INK4a}* の制御を介して細胞増殖を調節している⁸⁾, ③転写因子である E2F ファミリーは Rb タンパクファミリーとともに細胞増殖と分化を調節している^{4,7)}, ④E2F ファミリーの一つである E2F6 とポリコム遺伝子群である RYBP, Ring1, MEL-18, mph1, *Bmi-1* 複合体は互いに結合している²²⁾。最近, Ogawa らの論文により, E2F6 とポリコムタンパク質複合体の結合から証明された。近年, Rb とポリコム経路の関連により細胞分裂の開始が制御されていることが報告された³⁾。これらの報告からポリコム遺伝子群はいくつかの経路を介して細胞周期を制御していると考えられる。

結論として, *mel-18* は「Rag-2 タンパク質の安定性」と「CDC2/CDK2 の活性制御を介した細胞周期の調節」という2つの因子を同時に調節することで, 結果として T 細胞受容体の遺伝子再構成 (T 細胞分化) を制御している可能性が示唆された。今後今回得られたこの可能性をさらに検討することにより, リンパ球の分化制御機構の一つが明らかにされると考えられる。

謝 辞

稿を終えるに際し, ご指導を賜りました菅野雅元教授, 救急医学教室大谷美奈子教授に謹んで感謝の意を表します。また本研究にご助力いただいた教室の皆様に対し, 心より御礼申し上げます。

参 考 文 献

1. Akasaka, T., Kanno, M., Baling, R., Mieza, M.A., Taniguchi, M. and Koseki, H. 1996. A role for *mel-18*, a Polycomb group-related vertebrate gene, during the anteroposterior specification of the axial skeleton. *Development* 122: 1513-1522.
2. Akasaka, T., Tsuji, K., Kawahira, H., Kanno, M., Harigaya, K., Hu, L., Ebihara, Y., Nakahata, T., Tetsu, O., Taniguchi, M. and Koseki, H. 1997. The role of *mel-18*, a mammalian Polycomb group gene, during IL-7-dependent proliferation of lymphocyte precursors. *Immunity* 7: 135-146.
3. Dahiya, A., Wong, S., Gonzalo, S., Gavin, M. and Dean, D.C. 2001. Linking the Rb and polycomb pathways. *Mol. Cell* 8: 557-569.
4. Dyson, N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12: 2245-2262.
5. Fox, M.H. 1980. A model for the computer analysis of synchronous DNA distributions obtained by flow cytometry. *Cytometry* 1: 71-77.
6. Hedrick, S.M., Nielsen, E.A., Kavaler, J., Cohen, D.I. and Davis, M.M. 1984. Sequence relationships between putative T-cell receptor polypeptides and immunoglobulins. *Nature* 308: 153-158.
7. Helin, K. 1998. Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 28-35.
8. Jacobs, J.J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R.A. and van Lohuizen, M. 1999. The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* 397: 164-168.
9. Lee, J. and Desiderio, S. 1999. Cyclin A/CDK2 regulates V(D)J recombination by coordinating RAG-2 accumulation and DNA repair. *Immunity* 11: 771-781.
10. Li, Z., Dordai, D.I., Lee, J. and Desiderio, S. 1996. A conserved degradation signal regulates RAG-2 accumulation during cell division and links V(D)J recombination to the cell cycle. *Immunity* 5: 575-589.
11. Lieber, M.R., Grawunder, U., Wu, X. and Yaneva, M. 1997. Tying loose ends: roles of Ku and DNA-dependent protein kinase in the repair of double-strand breaks. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 99-104.
12. Lin, W.C. and Desiderio, S. 1993. Regulation of V(D)J recombination activator protein RAG-2 by phosphorylation. *Science* 260: 953-959.
13. Lin, W.C. and Desiderio, S. 1994. Cell cycle regulation of V(D)J recombination-activating protein RAG-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91: 2733-2737.
14. Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J. and Kato, J.Y. 1994. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 14: 2066-2076.
15. Merkenschlager, M., Graf, D., Lovatt, M., Bommhardt, U., Zamoyska, R. and Fisher, A.G. 1997. How Many Thymocytes Audition for Selection?. *J. Exp. Med.* 186: 1149-1158.
16. Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C. and Baltimore, D. 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248: 1517-1523.
17. Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D.M. and Nakatani, Y. 2002. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* 296: 1132-1136.
18. Schatz, D.G., Oettinger, M.A. and

- Baltimore, D.** 1989. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59: 1035–1048.
19. **Shortman, K. and Wu, L.** 1996. Early T lymphocyte progenitors, p. 29-47. *In* W.E. Paul, C.G. Fathman and H. Metzger (eds.), Annual review of immunology, Vol. 14. Annual Reviews Inc., Palo Alto, CA.
20. **Simon, J.** 1995. Locking in stable states of gene expression: transcriptional control during *Drosophila* development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 376–385.
21. **Tetsu, O., Ishihara, H., Kanno, R., Kamiyasu, M., Inoue, H., Tokuhisa, T., Taniguchi, M. and Kanno, M.** 1998. *mel-18* negatively regulates cell cycle progression upon B cell antigen receptor stimulation through a cascade leading to *c-myc/cdc25*. *Immunity* 9: 439–448.
22. **Trimarchi, J.M., Fairchild, B., Wen, J. and Lees, J.A.** 2001. The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98: 1519–1524.
23. **van der Lugt, N.M., Domen, J., Linders, K., van Roon, M., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van der Valk, M., Deschamps, J., Sofroniew, M. and van Lohuizen, M.** 1994. Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the *bmi-1* proto-oncogene. *Genes Dev.* 8: 757–769.
24. **van der Lugt, N.M., Alkema, M., Berns, A. and Deschamps, J.** 1996. The Polycomb-group homolog Bmi-1 is a regulator of murine Hox gene expression. *Mech. Dev.* 8: 153–164.
25. **Zijlmans, J. M., Visser, J.W., Kleiverda, K., Kluin, P.M., Willem ze, R. and Fibbe, W.E.** 1995. Modification of rhodamine staining allows identification of hematopoietic stem cells with preferential short-term or long-term bone marrow-repopulating ability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92: 8901–8905.
26. **Zink, D. and Paro, R.** 1995. *Drosophila* Polycomb-group regulated chromatin inhibits the accessibility of a trans-activator to its target DNA. *EMBO J.* 14: 5660–5671.

mel-18 Control the T Cell Receptor Rearrangement via Rag-2 Protein Stability and CDC2/CDK2 Activity

Shin-ichi FUKUHARA

Department of Immunology and Parasitology, Hiroshima University School of Medicine
(Director: Prof. Masamoto KANNO)

Mammalian Polycomb group gene products are known to form a chromatin silencing complex to regulate cell cycle and cell death.

In *mel-18*-deficient mice, thymic T cell development is impaired on CD4⁻CD8⁻ to of CD4⁺CD8⁺ stage. In this immature thymic T cell stage, Rag-2 protein level was decreased despite its normal mRNA expression due to upregulation of CDC2/CDK2 activity. Therefore T cell receptor rearrangement was impaired.

In *mel-18*-transgenic mice, Rag-2 protein levels are increased with normal mRNA level. This phenotype occurs concomitantly with a prolongation of the cell cycle G0/G1 phase. As a result, TCR rearrangement occurred normally, despite the aberrant overexpression of Rag-2 protein.

Here, we demonstrate that *mel-18* regulates T cell receptor rearrangement by controlling both Rag-2 protein stability and cyclin dependent kinase activity.