

氏名(国籍)	楊 景 堯 (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2397号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	転写因子 MafK 過剰発現の T 細胞分化に対する影響
主査	筑波大学教授 医学博士 林 英 生
副査	筑波大学教授 獣医学博士 八 神 健 一
副査	筑波大学教授 医学博士 住 田 孝 之
副査	筑波大学助教授 医学博士 洪 谷 彰

## 論文の内容の要旨

### (目的)

転写因子である Maf 群タンパク質は大 Maf 群タンパク質と小 Maf 群タンパク質に分類され、bZIP 構造をもつファミリーを構成している。Maf 群タンパク質はレトロウイルスの細胞性原癌遺伝子として同定されたもので、二量体を形成し、Maf recognition element (MARE) に結合する。大 Maf 群タンパク質はホモ二量体または他の bZip タンパク質とヘテロ二量体を形成し、MARE に結合し転写を促進する。一方、小 Maf 群タンパク質は bZip 領域で他の転写因子とヘテロダイマーを形成し転写促進に働くが、ホモダイマーを形成しているときは転写を抑制する。Maf 群タンパク質は赤血球系、巨核球系や免疫系、特に T 細胞に対しての機能が報告されているが、小 Maf 群タンパク質の機能ははまだ不明である。

本研究は、小 Maf 群タンパク質のトランスジェニックマウスを作製し、小 Maf 群タンパク質 MafK を過剰に発現させ、そのホモダイマーの形成を利用し、T 細胞における小 Maf 群タンパク質の機能と免疫系における転写因子ネットワーク間での転写制御機能を解明する。

### (材料および方法)

human CD2 のプロモーター領域と CD2 ローカスコントロール領域を持つ VA vector にマウス *mafKcDNA* を挿入しトランスジェニックマウスを作製した。polymerase chain reaction (PCR) 法と Southern blotting 法を用いて導入遺伝子の導入を確認し、タンパク質発現の確認には免疫ブロット法を用いた。胸腺サイトカンの発現は reverse transcription PCR (RT-PCR) 法にて施行した。また fluorescence activated cell sorter (FACS) 解析を用いて胸腺と脾臓のリンパ球分画の解析を行った。血清免疫グロブリンは enzyme-linked immunosorbent assay 法 (ELISA 法) にて測定した。

### (結果)

合計 904 個の受精卵に VA-*mafK* 遺伝子を注入し、94 匹の F0 世代を得たがそのうち 10 匹に遺伝子導入を認めた。C57BL/6 と掛け合わせた F1 は 143 匹であり、そのうち 7 ライン 36 匹のみが標的遺伝子陽性であり、安定したラインとしてライン 194 とライン 792 の VA-*mafK* トランスジェニックマウスの作製に成功した。トランスジェニック

マウスの表現型では生存率に有意差が認められた。同腹の導入遺伝陰性（以下野生型）のマウスは60週まで生存率は100%であるのに対し、ライン194では23%に低下し、ライン792は40週の時点で50%までに低下していた。トランスジェニックマウスはいずれも重篤な肺炎に罹患し、起炎微生物は*Pneumocystis carinii*と同定された。トランスジェニックマウスの胸腺総細胞数は $1.2 \times 10^8 \pm 3.9 \times 10^7$ であり、野生型 $2.3 \times 10^8 \pm 5.2 \times 10^7$ に比べて有意に減少していた。また、胸腺のCD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞数、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>細胞数とCD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>細胞数も有意に減少していた。トランスジェニックマウス胸腺のIL-2発現量は野生型に比べて有意に低下していた。血清免疫グロブリンIgGは野生型の $4343.0 \pm 2127.8\text{mg/dl}$ に対し、トランスジェニックマウスは $2086.7 \pm 1127.4\text{mg/dl}$ と低下していた。

#### (考察)

作製したトランスジェニックマウスは加齢に伴い生存率が低下していた。これは、胸腺細胞数及びCD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>細胞、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞とCD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の減少などT細胞の分化に影響が生じた他、IL-2の発現量低下、IgG減少など免疫低下によるものと考えられた。免疫低下の原因として、過剰発現したMafKが他のbZip型転写因子と競合して免疫関連遺伝子の転写を抑制したと考えられた。中でもIL-2は転写制御領域にMafKが結合しうるAP-1結合配列を有し、これにMafKが結合し、その結果IL-2の転写が抑制されたと推測される。本研究ではMafKの免疫系における転写因子ネットワークの関わりを解析したとともに、トランスジェニックマウスを用いてドミナントネガティブ的手法によるシスエレメントターゲティングに成功した。

#### (結論)

1) *mafK* トランスジェニックマウスは生存率が加齢に伴い低下した。2) *mafK* トランスジェニックマウスは総胸腺細胞数の減少をはじめ、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>細胞、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞とCD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の減少が見られ、T細胞の分化に影響が認められた。3) *mafK* トランスジェニックマウスではIL-2の発現が低下していた。これは、過剰発現したMafKがIL-2のAP-1結合サイトに結合し転写を抑制したと推測される。4) トランスジェニックマウスを用いたMafK過剰発現は、免疫系における転写因子ネットワークの解明だけでなく、ドミナントネガティブ的手法によるシスエレメントターゲティングの解析にも有効な手法であると考えられた。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

生物の個体発生の過程が分子レベルで明らかになるにつれて、転写因子の機能解析とそのネットワークの解明がますます重要な課題となっている。本研究は血球細胞の分化に関与する転写因子Maf群のうち、小Maf群タンパク質の機能を明らかにするために、その遺伝子群のうち、*mafK*遺伝子のトランスジェニックマウスを作製している。作製したマウスは加齢に伴い易感染感受性となり生存率が低下し、T細胞分化に影響が見られ、IL-2の産生が低下しているという観察結果を得ている。マウスの性状のさらに詳細な解析が望まれるが、このモデルマウスを用いて、転写因子を中心とした細胞分化ネットワークに新しい知見が得られると期待され、個体発生・分化の機構の解明に貢献するものと思われる。貴重な研究成果であり今後の研究進展に多に期待できるものがある。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。