

|         |                                                                                                                                      |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名     | 李 海 天 <sup>リ チョン</sup>                                                                                                               |
| 学位の種類   | 博士 (医学)                                                                                                                              |
| 学位記番号   | 医博第 2673 号                                                                                                                           |
| 学位授与の日付 | 平成 16 年 3 月 23 日                                                                                                                     |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当                                                                                                                     |
| 研究科・専攻  | 医学研究科病理系専攻                                                                                                                           |
| 学位論文題目  | Induction of Germline Transcription in the Human TCR $\gamma$ Locus by STAT5<br>(STAT5によるヒト TCR $\gamma$ 遺伝子の germline 転写誘導機構に関する研究) |
| 論文調査委員  | (主査) 教授 清水 章 教授 鍋島 陽一 教授 生田 宏一                                                                                                       |

### 論 文 内 容 の 要 旨

IL-7レセプターはリンパ球の初期生成に重要な働きをしている。IL-7レセプターはT細胞とB細胞の初期分化に重要であり、とくに $\gamma\delta$ T細胞の分化や増殖に必須である。IL-7レセプター欠損マウスでは免疫グロブリン重鎖遺伝子座やT細胞レセプター(TCR) $\gamma$  遺伝子のV(D)J組換えが障害されている。マウスTCR $\gamma$  遺伝子座については、IL-7レセプターにより活性化されたStat5が5'J $\gamma$ 領域のモチーフに結合し、germline転写を誘導することにより当該遺伝子座のaccessibilityを上昇させ、V-J組換えを誘導する。そこで、同様の機構がヒトにおいても働いているかを明らかにする目的で以下の解析を行った。

ヒト赤白血病細胞株TF-1において、サイトカイン刺激によりTCR $\gamma$  遺伝子のgermline転写とStat5のリン酸化が誘導されることがノザン法とウエスタン法で確認された。

ヒトのTCR $\gamma$  遺伝子座は6個のV $\gamma$ の下流にJ $\gamma$ 1.1-J $\gamma$ 1.21-J $\gamma$ 1.3-C $\gamma$ 1とJ $\gamma$ 2.1-J $\gamma$ 2.3-C $\gamma$ 2の2つセットが存在している。J $\gamma$ 1.1とJ $\gamma$ 2.1のそれぞれ300bpと590bp上流にStatモチーフ(TTCNNNGAA)が存在した。J $\gamma$ 2.1とモチーフの間にはAlu繰り返し配列が挿入されていた。このモチーフからJ $\gamma$ 1.1では約100bp下流から、J $\gamma$ 2.1では約80bpと約400bp下流からgermline転写が始まっていた。

次に、Stat5がJ $\gamma$ 1.1上流に存在しているStatモチーフと結合するかをゲルシフト法により解析した。その結果、J $\gamma$ 1.1上流にあるモチーフとStat5の結合が認められた。さらに、このモチーフと5bp下流に存在する非典型的なモチーフ(TTCNNNGAA)の両方にStat5が結合することが確認された。

さらに、5'J $\gamma$ 1.1プロモーター領域1kbをレポーター遺伝子につなげBa/F3細胞に導入すると、Stat5依存のおよびIL-3依存的に転写が活性化された。また、典型的なモチーフに突然変異を導入したDNAでは、Stat5依存的な転写活性が消失した。一方、5'J $\gamma$ 2.1プロモーター領域ではStat5依存的な顕著な転写の活性化は見られなかった。

最後に、ヒトとマウスのTCR $\gamma$  遺伝子座の調節領域のDNA配列を比較すると、J $\gamma$ プロモーター、3'エンハンサー、HsAのすべてにおいて高い相同性を示し、Stat結合配列はこれら調節領域において完全に保存されていた。

以上の結果から、ヒトにおいてもIL-7Rにより活性化されたStat5が5'J $\gamma$ 領域のモチーフに結合し、germline転写を誘導することによりTCR $\gamma$  遺伝子座のaccessibilityを調節している可能性が示された。マウスとヒトで同様の機構が保存されていることから、Stat5によるTCR遺伝子座のaccessibilityの調節が普遍的なものであることが推察される。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

IL-7レセプターはT細胞とB細胞の初期分化に重要であり、とくに $\gamma\delta$ T細胞の分化や増殖に必須である。IL-7レセプター欠損マウスでは、免疫グロブリン重鎖遺伝子座やT細胞レセプター(TCR) $\gamma$  遺伝子のV(D)J組換えが障害されている。マウスTCR $\gamma$  遺伝子座については、IL-7レセプターにより活性化されたSTAT5がJ $\gamma$ プロモーターのモチーフに結

合し、germline 転写を誘導することにより当該遺伝子座の accessibility を上昇させ、V-J 組換えを誘導することが知られている。そこで、同様の機構がヒトにおいても働いているかを明らかにする目的で以下の解析を行った。

ヒト赤白血病細胞株 TF-1 において、サイトカイン刺激により TCR $\gamma$  遺伝子の germline 転写と STAT5 のリン酸化が誘導されることをノザン法とウエスタン法で確認し、ヒトの TCR $\gamma$  遺伝子座は 6 個の V $\gamma$  遺伝子の下流に J $\gamma$ 1.1-J $\gamma$ 1.21-J $\gamma$ 1.3-C $\gamma$ 1 と J $\gamma$ 2.1-J $\gamma$ 2.3-C $\gamma$ 2 の 2 つのセットが存在している。J $\gamma$ 1.1 と J $\gamma$ 2.1 のそれぞれ 300bp と 590bp 上流に STAT モチーフ (TTCNNNGAA) が存在した。J $\gamma$ 2.1 とモチーフの間には Alu 繰り返し配列が挿入されていた。このモチーフから J $\gamma$ 1.1 では約 100bp 下流から、J $\gamma$ 2.1 では約 80bp と約 400bp 下流から germline 転写が始まっていた。

次に、5' J $\gamma$ 1.1 プロモーター領域 1kb をレポーター遺伝子につなげ Ba/F3 細胞に導入すると、STAT5 依存적および IL-3 依存的に転写が活性化された。また、典型的モチーフに変異を導入したプロモーターでは、STAT5 依存적転写活性が消失した。一方、5' J $\gamma$ 2.1 プロモーター領域では STAT5 依存적顕著な転写の活性化は見られなかった。さらに、STAT5 が J $\gamma$ 1.1 上流に存在している STAT モチーフと結合するかをゲルシフト法により解析した。その結果、J $\gamma$ 1.1 上流に存在する典型的モチーフと 5bp 下流に存在する非典型的モチーフ (TTCNNNGAA) の両方に STAT5 が結合することが確認された。

最後に、ヒトとマウスの TCR $\gamma$  遺伝子座の調節領域の DNA 配列を比較すると、J $\gamma$  プロモーター、3' エンハンサー、HsA のすべてにおいて高い相同性を示し、STAT 結合配列はこれら調節領域において完全に保存されていた。

以上の結果から、ヒトにおいても IL-7R により活性化された STAT5 が 5' J $\gamma$  領域のモチーフに結合し、germline 転写を誘導することにより TCR $\gamma$  遺伝子座の accessibility を調節している可能性が示された。マウスとヒトで同様の機構が保存されていることから、STAT5 による TCR 遺伝子座の accessibility の調節が普遍的なものであることが推察される。

以上の研究はリンパ球分化のメカニズムの解明に貢献し免疫学の理解と発展に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお本学位授与申請者は、平成 15 年 11 月 12 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。