

博士論文

論文題目 B 細胞分化に伴う細胞増殖制御における
BTB ZF タンパク質 ZNF131 の役割

氏 名 宮内 英満子

目次

1. 要旨	p.5
2. 序文	p.6
2-1. 免疫反応及び免疫細胞	
2-2. B 細胞の種類、発生及び分化	
2-3. B 細胞の抗原レセプターの形成と機能	
2-4. B 細胞の分化に関わる転写因子	
2-5. BTB ZF ファミリーと ZNF131	
2-6. IL-7	
2-7. mb1 と mb1-cre マウス	
2-8. T 細胞分化における ZNF131 の役割	
2-9. 本研究の目的	
3. 実験方法	p.21
3-1. 実験材料	
3-1-1. マウス	
3-1-2. マウスの飼育環境	
3-1-3. マウス genotyping	

- 3-1-4. マウス genotyping のプライマーの名称、使用量及び塩基配列
- 3-1-5. 試薬
- 3-1-6. 抗体
- 3-2. 脾臓における B 細胞の解析
 - 3-2-1. 脾臓細胞の単離
 - 3-2-2. 脾臓細胞の抗体染色反応
- 3-3. HSC から初期 B 前駆細胞の解析
 - 3-3-1. 骨髄細胞の回収
 - 3-3-2. 骨髄細胞の抗体染色反応
 - 3-3-3. ソーティングによる細胞の回収
 - 3-3-3-1. pre-pro-B、pro-B、pre-B の回収
 - 3-3-3-2. HSC、MPP+LMPP、CLP の回収
 - 3-3-4. BrdU (Bromodeoxyuridine) による B 細胞増殖の検討
 - 3-3-5. Annexin V による cell death の解析
- 3-4. PCR-サザンブロット法による遺伝子再構成の解析
 - 3-4-1. PCR-サザンブロット法
 - 3-4-2. PCR-サザンブロット解析により検出されるバンド

3-5. Real-Time PCR による遺伝子発現の解析	
3-5-1. cDNA の合成	
3-5-2. Real-Time PCR	
3-5-3. プライマーの名称、塩基数及び塩基配列	
3-6. ZNF131 KO の HSC から pre-B における ZNF131 欠失の確認	
3-7. B 細胞の初期分化過程における細胞周期の確認	
3-8. 細胞培養	
3-9. p21 ルシフェラーゼレポーターアッセイ	
4. 結果	p.37
4-1. HSC から初期分化 B 細胞の各分化段階における <i>Znf131</i> mRNA の発現	
4-2. ZNF131 KO における <i>Znf131</i> 遺伝子欠失効率	
4-3. 脾臓 B 細胞の解析	
4-4. B 細胞初期分化過程における解析	
4-5. B 細胞初期分化過程での細胞増殖	
4-6. B 細胞初期分化過程における細胞周期	
4-7. pro-B における cell death の解析	
4-8. pro-B における FSC の解析	

4-9.	IL-7 シグナルに関わる遺伝子の発現解析	
4-10.	B 細胞の分化に中心的な役割を担う遺伝子の発現解析	
4-11.	pro-B における Ig heavy chain の遺伝子再構成の検討	
4-12.	pro-B における、preBCR シグナル伝達に関わる遺伝子の発現及び、遺 伝子再構成に関わる遺伝子の発現解析	
4-13.	pro-B における細胞増殖に関わる遺伝子の発現解析	
4-14.	細胞培養系 (in vitro) における pro-B の解析	
4-15.	p21 プロモーターにおける ZNF131 の制御領域の同定	
5.	考察	p.49
6.	図	p.56
7.	謝辞	p.88
8.	引用文献	p.89

1. 要旨

BTB ZF ファミリーに属する転写因子の多くは、リンパ球の分化や機能に重要な役割を果たす。このファミリーに属する ZNF131 を、骨髄における初期分化 B 細胞で欠失させると pro-B 細胞段階で分化が停止し、細胞増殖も抑制された。一方、ZNF131 は Immunoglobulin の遺伝子再構成に必須ではないことが明らかになった。ZNF131 欠失 B 細胞では、cdk インヒビター p21 の発現亢進が見られ、細胞増殖抑制の一因となるメカニズムと考えられた。ZNF131 は p21 プロモーターに対して転写抑制因子として機能し、ZNF131 による制御領域は、転写活性化因子である p53 による制御領域を含んでいた。

2. 序文

2-1. 免疫反応及び免疫細胞

免疫反応は、自然免疫系の反応と獲得免疫系の反応に大別することができる。

生体内に異物の侵入や発生があると、ただちに自然免疫系が異物の排除を行う。

自然免疫系の重要な特徴は、異物を認識すると短時間で免疫反応を開始することである。自然免疫系の反応を担う細胞集団には、好中球、マクロファージ、樹状細胞等の食細胞に加え、NK (Natural Killer) 細胞を含む innate lymphoid cell と総称される抗原特異的受容体を持たないリンパ球集団等がある。自然免疫系は、異物を排除するように作動すると同時に、獲得免疫系の細胞にその情報を伝える抗原提示が行われ、抗原を特異的に認識する獲得免疫系が活性化する。

獲得免疫系は活性化後、増殖し機能分化することにより、抗原特異的反応により異物を排除する。この獲得免疫系の反応を担う細胞集団は、T 細胞及び B 細胞のリンパ球集団であり、抗原特異的受容体遺伝子を遺伝子再構成により形成する、生体内において二つしかない細胞集団である。成熟個体での免疫系細胞は、骨髄の造血幹細胞 (hematopoietic stem cell 以降 HSC) を起源とし全ての血球系への分化能を維持したまま自己複製能を失った多能性前駆細胞 (multipotent progenitor 以降 MPP) を経て分化する。T細胞系列の前駆細胞は胸腺へ移動し

Notch シグナルや Interleukin-7 (以降 IL-7) シグナルをはじめとし、様々なシグナル伝達系とそれに連動した転写因子ネットワークにより成熟した T 細胞へと分化する。一方、B 細胞系列の分化は前駆細胞が骨髄にとどまり、骨髄で分化及び成熟し、その後二次リンパ組織へ移動する。

2-2. B 細胞の種類、発生及び分化

成熟 B 細胞 (以降 mature B) は、一般的に B 細胞として知られている B2 細胞、腹腔や胸腔に存在する B1 細胞、脾臓の辺縁体に存在する辺縁体 B 細胞の 3 種類に大別される¹。B1 細胞は、主に胎生期に発生し成体ではほとんど出現しない。主に自己複製により増殖し、一般的な B 細胞とは発生場所も異なり胎生期に肝臓、大網等の通常とは異なった場所で発生する。また分化していく経路も異なると考えられている^{2,3}。辺縁体 B 細胞は脾臓の辺縁体に存在する B 細胞であり、前駆細胞が骨髄で分化した後、未成熟 B 細胞 (以降 immature B) が血流を介して骨髄外の末梢へ移動し、辺縁体 B 細胞として成熟する。また、一般的な B 細胞もこの immature B から発生することが知られている⁴。以降、本稿では B2 細胞を「B 細胞」と表記する。

マウスやヒトにおける B 細胞は、胎児期の半ばから後半では肝臓の造血多能

性幹細胞から発生する。生後においては HSC から pre-pro-B 細胞 (以降 pre-pro-B)、pro-B 細胞 (以降 pro-B)、pre-B 細胞 (以降 pre-B)、immature B へと分化し、immature B は血液を介して脾臓へ移動した後、mature B (辺縁体 B 細胞及び B 細胞) へと分化していく^{5,6}。HSC からの分化は、MPP に分化し、赤血球系や巨核球系への分化能の弱くなったリンパ球系前駆細胞 (lymphoid-primed multipotent progenitor 以降 LMPP)、赤血球系や巨核球系に分化するミエロ-エリスロイド系前駆細胞 (myelo-erythroid progenitor 以降 MEP)、ミエロ-リンフォイド系前駆細胞 (myelo-lymphoid progenitor 以降 MLP) へ分化する。LMPP からはリンパ球系へ分化する共通リンパ系前駆細胞 (common lymphoid progenitor 以降 CLP)、MLP からはミエロイド系へ分化するミエロイド系前駆細胞 (myeloid progenitor 以降 MP) になり、CLP から T 細胞や B 細胞へ分化していく。この段階から B 細胞への分化 (specification) が起こる (図 1)^{3,7,8}。この後、細胞表面分子である B220 を発現する pre-pro-B になると B 細胞への分化が決定づけられ (図 2)、T 細胞等其他の細胞系列への分化能は消失、即ち運命決定 (commitment) が起こる (図 1)。

分化に重要な細胞外因子としては、HSC からリンパ系列へ分化するためにサイトカインである c-kit リガンドや Flt3 リガンドが必要であり、さらに B 細胞へ分化するために IL-7 が必要である⁹。B 細胞系列への決定に必要な転写因子集団に

は、E2A、EBF1、Pax5、Ikaros、PU.1 等があり、最近では Runx1 も重要であることが示されている (図 3) ¹⁰。

2-3. B 細胞の抗原レセプターの形成と機能

B 細胞は分化段階初期に pre-B 細胞レセプター (pre-B cell receptor 以降 preBCR) を発現し、さらに分化に伴い B 細胞レセプター (B cell receptor 以降 BCR) を発現する。これは抗原レセプターであり、外部から病原体等の抗原が侵入しこのレセプターに結合することにより、B 細胞内にシグナルが送られ抗原レセプターが分泌されるようになったもの、即ち抗体を産生するようになる ⁷。pro-B 段階において、免疫グロブリン (Immunoglobulin 以降 Ig) heavy chain と surrogate light chain との複合体が形成される。これが preBCR であり、細胞表面に発現することにより pre-B に分化する。preBCR の発現には、シグナルを細胞内へ伝達する分子集団、mb1 (Ig α) 及び Ig β との細胞膜上での複合体形成が必要である。これらの分子は ITAM と呼ばれるシグナル伝達に必須のモチーフを持っており、ITAM のチロシンがリン酸化されチロシンキナーゼ SYK をリクルートし、その後のシグナル伝達経路が活性化する。ITAM のリン酸化は Lyn 等の SRC ファミリーチロシンキナーゼによる。preBCR からのシグナルが細胞内に伝達されると

pro-B から large pre-B に分化し細胞増殖が誘導される。補助レセプターである CD19 はこのシグナルを増強する。また IL-7 シグナルも細胞増殖を促進する。その後、まだ未知な部分も多いが preBCR シグナルによる IL-7 シグナルの抑制やその他の作用により、細胞増殖が停止し、small pre-B となり Ig light chain の遺伝子再構成が誘導される。その結果、Ig heavy chain と Ig light chain からなる BCR を発現する immature B へ分化し、骨髄から二次リンパ組織へ移動し mature B となる (図 4A、7)。

病気を引き起こす様々な他の生物、非生物由来の抗原は非常に多様であり、そのため BCR も多様な抗原特異性を持つ必要がある。また、一つの B 細胞は一種類の BCR を発現するように制御されていることから、生体が持つ通常の遺伝子の総数よりはるかに多い BCR 遺伝子を、その総数以上の B 細胞に発現させる必要がある。これは BCR をコードする遺伝子断片に対して、遺伝子再構成により BCR 遺伝子を形成するという手段により実現する。BCR の抗原特異性は遺伝子再構成より形成される可変領域 (V 領域 variable region) が担う。定常領域 (C 領域 constant region) は、抗体の種類 (アイソタイプ、クラスとも呼ばれる) を規定する。Ig heavy chain、Ig light chain の可変領域は異なった二つ以上からなる遺伝子の断片の組み合わせによってコードされている。light chain の場合には、

可変領域の大部分のアミノ酸をコードする V 遺伝子断片（可変部断片 variable segment）と、残りのアミノ酸をコードしている J 遺伝子断片（結合断片 joining segment）が組み合わさる。heavy chain の可変部領域は V 遺伝子断片、J 遺伝子断片の他に、V 遺伝子断片と J 遺伝子断片の間に D 遺伝子断片（多様性断片 diversity segment）が挿入される。さらに断片の結合部分にも配列の多様性が発生するメカニズムが動員される。Ig heavy chain の遺伝子再構成は、CLP において B 細胞への分化が誘導された細胞集団において、D 遺伝子断片と J 遺伝子断片とが組み合わさり、その後 pro-B において V 遺伝子断片と DJ 遺伝子断片が結合することにより完全な形の VDJ 遺伝子断片の融合が形成される（図 4B）¹¹。

さらに mature B では、はじめに IgM が発現しているがスプライシングにより IgD も発現し、その後クラススイッチという行程により、IgG（ヒトでは IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、マウスでは IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3）、IgA（ヒトでは IgA1、IgA2）、IgE という定常領域の異なった種類の抗体（アイソタイプ）遺伝子を形成する。クラススイッチにより、産生される抗体の抗原特異性は変化しないが heavy chain 定常領域の差異によりエフェクター機能が異なる。

2-4. B 細胞の分化に関わる転写因子

B 細胞の分化に重要である転写因子は c-myc、EBF1、Pax5、Miz1 (ZBTB17)、E2A、IRF4、Ikaros、Aiolos、LRF (ZBTB7a) 等多くのものがある。B 細胞系列への分化に重要な転写因子は、E2A、EBF1、Pax5、Ikaros であり、運命決定に重要な転写因子は、E2A、Pax5、LRF 等である。CLP 等早期の分化過程では、Ikaros、PU.1、E2A によりリンパ球への分化が誘導される^{5, 12}。Ikaros 及び E2A は HSC から CLP への分化及び B 細胞への分化に重要である。一方、PU.1 は EBF1 と IL-7 レセプター (IL-7 receptor 以降 IL-7R) の発現を抑制するため、以降の B 細胞の分化を阻害しミエロイド系列への分化を促進する。これに対して Ikaros が PU.1 を抑制し、リンパ球への分化の進行を維持する (図 3)。EBF1 は欠失させると pre-pro-B で分化が停止し、Ig 遺伝子再構成が誘導されない。EBF1 は surrogate light chain の発現や D-J 領域の遺伝子再構成に関与し、B 細胞分化の中心的転写因子である。Pax5 は pro-B から発現し、CD19 や mb1 等の発現誘導や Ig heavy chain の遺伝子再構成に関与する。Pax5 は EBF1 の発現も促進させ、EBF1 と Pax5 はポジティブフィードバック経路を形成する。前述したように Ikaros は PU.1 の抑制を介してミエロイド系列への分化抑制、Pax5 や LRF は Notch シグナルの抑制を介して T 細胞系列への分化抑制に関与し、B 細胞系列への運命決定に重要である。LRF は T 細胞系列への分化と B 細胞系列への分化のスイッチの役割を担

う転写因子である。また、E2A は B 細胞系列への分化に必要であり、この転写因子の機能は PU.1 により誘導される抑制因子である Id2 により遮断されることで、ミエロイド系列への分化が促進される (図 3) ¹³。

2-5. BTB ZF ファミリーと ZNF131

ZNF131 (ZBTB35) は、BTB (Broad-complex, Tramtrack and Bric-a-brac) ZF (Zinc Finger) ファミリーに属する転写因子であり、他の BTB ZF ファミリータンパク質と同様に核タンパク質である ¹⁴。BTB ZF ファミリータンパク質は、アミノ末端側に BTB ドメイン、カルボキシル末端側に ZF ドメインを 2 個から 14 個持ったものが一般的なものとして知られており (図 5A)、約 50 の転写因子から構成される。ZF ドメインは、アフリカツメガエルの転写因子、TFIIIA で見出された。このドメインは亜鉛イオンを含み、DNA に結合する活性を持つ。このドメインの共通配列 (二つのシステインと二つのヒスチジン : C2H2) は、最も一般的な DNA 結合モチーフとして全てのヒト遺伝子の約 3% に含まれる。BTB ドメインはキイロショウジョウバエの突然変異体の原因遺伝子である、broad-complex、tramtrack、bric a brac から見つかри、この遺伝子は C2H2 ジンクフィンガーも持っている。その後、哺乳類にも相同性のある ZBTB14 や ZBTB25

が見出され、真核生物に分布する遺伝子ファミリーであることが明らかになった。原核生物のゲノムの中では見つかっていない¹⁵。さらにポックスウイルスがコードする遺伝子とより長い相同領域が認められ、BTB POZ (poxvirus and zinc finger) ドメインという名称で呼ばれるようになった。BTB POZ ドメインは約120のアミノ酸から形成され、ZF ドメインに変えて Kelch ドメイン等他のドメインを持った遺伝子集団も見出された。BTB ZF ファミリーに属する転写因子集団は、血液系、特にリンパ球の分化や機能に重要なものが多く含まれ、Bcl6 (ZBTB27)、Th-POK (ZBTB7b)、LRF、Miz1 等がその例である (図 5B)。ZNF131 は、1994 年にヒトのジンクフィンガークリュッペルファミリーに属している 16 個の新しい遺伝子として染色体上にマッピングされたが、その機能はほぼ未知である¹⁶。ZNF131 は 6 個の ZF ドメインを持っており、6 個の ZF ドメインの内、ZF 3 から 5 が DNA との結合に重要であり、ZF 2 と 6 は DNA との結合には重要ではないことが報告されている (図 6)¹⁷。またスプライシングにより、BTB ドメイン側の ZF が 1 個失われた、ZF ドメインが 5 個の splice variant も報告されている (図 6)。エストロゲン受容体 ER α (Esr1) のコリプレッサーとしてエストロゲンを阻害する機能が報告されている¹⁸。また BTB ZF ファミリーに属し、DNA メチル化で誘導されるメチルシトシンに結合活性を持つ転写因子 Kaiso

(ZBTB33) の結合分子として同定され、Kaiso の転写活性を抑制することが報告されている¹⁷⁾。

また、ZNF131 完全ノックアウトマウスは、胎生約 9.5 日で embryonic lethal になる。

2-6. IL-7

IL-7 はマウス骨髄の長期リンパ球培養系で、刺激を受けて増殖した pre-B 由来のサイトカインとして特定された。初期の B 細胞の分化における IL-7 の重要性は、IL-7 ノックアウトマウスにより in vivo 及び in vitro の研究で明らかにされている⁹⁾。IL-7 は IL-7R を介してそのシグナルを細胞内に伝達する。IL-7R には、 α 鎖及び common γ (γ_c) 鎖がある (図 7)。IL-7 シグナルはこの二つの受容体を介して細胞内に伝達され、チロシンキナーゼである JAK1 及び JAK3 をリン酸化する。JAK キナーゼは STAT5 をチロシンリン酸化し、リン酸化 STAT5 は核内へ移行し転写因子として機能する。IL-7 は初期分化 B 細胞において、Cyclin D3 を活性化し細胞増殖を誘導する。またリン酸化 STAT5 は Ig light chain の遺伝子再構成を抑制する。STAT5 は IL-7 シグナルの標的遺伝子である *Socs1*、*Socs3* により負に制御されている。BTB ZF ファミリーに属する転写因子 Miz1 は、*Socs1*、

Socs3 の発現を抑制し IL-7 シグナルに促進的に作用する (図 7) ⁸。

また、IL-7 シグナルは JAK1 を介して PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) を活性化し、転写因子 Foxo1 をリン酸化することにより細胞質への移行を促進し、遺伝子再構成に必要な *Rag1/Rag2* の発現を低下させ、遺伝子再構成を阻害する。

IL-7 シグナルのこの作用により、増殖している large pre-B において、Ig light chain の遺伝子再構成が抑制される (図 7) ^{13,19}。

2-7. mb1 と mb1-cre マウス

mb1 は Ig α とも呼ばれ、Ig β と共に preBCR 及び BCR と複合体を形成し、ITAM モチーフを持つことから、preBCR シグナル及び BCR シグナルを細胞内へ伝達するために必須のシグナル伝達分子である。骨髄における CLP の後期から pre-pro-B にかけて発現が誘導され、プラズマ細胞を除く全ての分化過程で発現する (図 2)。mb1-cre マウスは *mb1* 遺伝子座への *cre* 遺伝子のノックインマウスであり、内在性の *mb1* と同様、*cre* を CLP 後期から pre-pro-B、さらに pro-B で発現する。mb1-cre マウスでは一つの *mb1* 遺伝子座に *cre* 遺伝子が組み込まれ、この遺伝子座からの *mb1* の発現は消失するが、mb1-cre ヘテロマウスでは B 細胞分化に関して、細胞集団の減少等の影響を及ぼさないことがわかっている。

類似の B 細胞分化過程で *cre* を発現する CD19-*cre* マウスと比較して、やや早期の B 細胞分化過程から *cre* が発現するだけでなく *cre* による欠失の誘導率が CD19-*cre* より高いことが報告されている²⁰。

2-8. T 細胞分化における ZNF131 の役割

T 細胞は胸腺において分化、成熟する。骨髄において HSC から分化した CLP は、一部は Ig heavy chain 遺伝子再構成を開始し B 細胞系列へ向かうが、一部は胸腺に移動し胸腺上皮にある Notch リガンドから Notch シグナルを受け取り、T 細胞系列への分化を開始する (図 8)。また IL-7 シグナルは、初期の T 細胞の増殖に重要である。胸腺における初期の分化過程は、分化マーカーとして利用される CD4 及び CD8 を共に発現していないため、ダブルネガティブ (Double Negative 以降 DN) と呼ばれる。DN において T 細胞レセプター (T cell receptor 以降 TCR) β 鎖あるいは TCR γ 鎖/TCR δ 鎖の遺伝子再構成が誘導される。遺伝子再構成が成功した細胞は、TCR γ 鎖/TCR δ 鎖の場合は $\gamma\delta$ T 細胞へ成熟し、TCR β 鎖の場合は surrogate α 鎖である pT α と複合体を形成し、pre-T 細胞レセプター (pre-T cell receptor 以降 preTCR) を発現する細胞集団になる。この細胞集団は増殖し、CD4 及び CD8 を共に発現するダブルポジティブ (Double Positive 以降 DP) に

分化する (図 8)。この過程で TCR α 鎖の遺伝子再構成が誘導され、TCR α 鎖/TCR β 鎖を持つ $\alpha\beta$ T 細胞となる。DP 分画では、自己反応性の TCR を発現する細胞の排除 (ネガティブセレクション) や外来抗原をよりよく認識する TCR を発現する細胞の維持 (ポジティブセレクション) による T 細胞の選択と CD4 シングルポジティブ (Single Positive 以降 SP) 及び CD8 SP T 細胞の分化、制御性 T 細胞や NKT 細胞等の T 細胞分化が進行する。TCR は自己の major histocompatibility complex (主要組織適合遺伝子複合体 MHC) 分子の上に乗った抗原のみを認識する MHC 拘束性を持つ。MHC class II 拘束性 TCR を発現する CD4 陽性ヘルパー T 細胞と MHC class I 拘束性 TCR を発現する CD8 陽性サイトトキシク (キラー) T 細胞に分化する。これらの成熟 T 細胞は、スフィンゴシン受容体を介するシグナルを利用して胸腺から末梢へ移動する。末梢での T 細胞の維持には TCR を介するシグナルや IL-7、IL-15 等のサイトカインシグナルが関与する。

先行研究により、*Znf131* 遺伝子欠失マウスの作成がなされ胸腺での T 細胞分化過程での役割や末梢 T 細胞の TCR シグナルに対する機能が明らかにされており²¹、ZNF131 を DN の過程で欠失させたマウスでは、DN から DP への分化とそれに伴う細胞増殖が阻害され、胸腺の T 細胞数は正常の 10 分の 1 以下になった。TCR β 鎖の遺伝子再構成には影響がなく、preTCR の発現は正常であったが、

preTCR シグナルにより誘導される細胞増殖と DP への分化が強く阻害された。

preTCR シグナルによる細胞増殖が DP への分化に必須という仮説が提示されており、この結果は細胞増殖と細胞分化が連動している可能性を支持する。ZNF131 の欠失は、この過程で重要な *c-myc* の発現には影響しなかったが、細胞増殖制御に関わる遺伝子の中で、cdk インヒビター p21 (以降 p21) の発現上昇が見られた。これが細胞増殖抑制の原因の一つと考えられた。また p21 プロモーターに対して、ZNF131 が転写抑制作用を持つことを示した²¹。ZNF131 を DP の過程で欠失させると、末梢の T 細胞維持が阻害された。これは TCR シグナルの異常であることが示唆されたが、この場合も p21 の発現上昇が関与していることを見出している。

2-9. 本研究の目的

以上のように BTB ZF ファミリーに属する転写因子の多くがリンパ球の分化過程や機能発現に重要であることが示されてきた。*Znf131* mRNA は様々な組織で発現しているが、ヒトの網羅的プロテオミクス解析により作成されたデータベース (human proteome map)²²によれば、T 細胞及び B 細胞で ZNF131 タンパク質の発現が高いことが示されている。先行研究により ZNF131 は T 細胞の分

化や活性化に重要であることが明らかになり、同様に発現の高い B 細胞における ZNF131 の機能解析を目的として研究を行った。このため、ZNF131 のコンディショナルノックアウトマウスを使用し、B 細胞の分化における ZNF131 の役割について解析した。なお、本研究の内容は、公益財団法人 東京都医学総合研究所における動物実験倫理委員会で承認されたものである（承認番号 15077）。

3. 実験方法

3-1. 実験材料

3-1-1. マウス

マウスは全て C57BL/6 系統を使用した。Znf131-floxed マウスは公益財団法人 東京都医学総合研究所 免疫遺伝子研究室 宮武昌一郎先生より (図 9)²¹、mb1-cre マウスは Max Planck Institute of Immunobiology Dr. Michael Reth よりご供与頂いた。コントロールとして用いた Znf131^{floxed/floxed} (以降 wild type) 及びコンディショナルノックアウトマウス Znf131^{floxed/floxed} mb1^{cre/+} (以降 ZNF131 KO) は、Znf131^{floxed/floxed} 及び mb1^{cre/+} の交配により作出した。

コンディショナルノックアウトマウスの遺伝子座は、mb1-cre が pre-pro-B で発現することにより、ZNF131 の BTB 領域の一部をコードするエキソン 4 が pre-pro-B から pro-B で欠失する。実験には、7 週齢から 13 週齢のマウスを使用した。

3-1-2. マウスの飼育環境

SPF (Specific Pathogen Free) 環境 (昼 12 時間 [8 時から 20 時]、夜 12 時間 [20 時から 8 時])、温度 : 23±1°C、湿度 : 50±10%、飼料 : 放射線照射飼料、飲水 : 限外濾過水の給水瓶方式で飼育した。

3-1-3. マウス genotyping

wild type 及び ZNF131 KO マウスの genotyping は tail DNA を PCR (Polymerase Chain Reaction) 後、電気泳動により行った。PCR 反応液は、ZNF131、mb1-cre 共に tail DNA 1 μ l に対して、EX Taq (TaKaRa) 0.1 μ l、2.5 mM dNTP ミクスチャー 0.8 μ l、10 \times EX Taq buffer 1 μ l、milliQ 6 μ l に 20 μ M のプライマー (名称、使用量及び塩基配列は後述) を加えた溶液で行った。PCR の反応条件を以下に示す。

ZNF131

Initial denaturation	94°C	3 min	1 cycle
Denaturation	94°C	30 sec	35 cycles
Annealing	57°C	30 sec	
Extension	72°C	1 min	
Final extension	72°C	5 min	1 cycle
Hold	4°C	∞	1 cycle

mb1-cre

Initial denaturation	94°C	1 min	1 cycle
Denaturation	94°C	30 sec	35 cycles
Annealing	62°C	30 sec	
Extension	72°C	1 min	
Final extension	72°C	2 min	1 cycle
Hold	4°C	∞	1 cycle

3-1-4. マウス genotyping のプライマーの名称、使用量及び塩基配列

	プライマー名称	使用量	塩基配列
ZNF131	ZNF131-F2	0.5 μ l	5' GAT ATT CTA GCT CCA GGA AGT TGG CAT ATA CAC 3'
	ZNF131-R2	0.3 μ l	5' GGA TGT CAC TAC TTA ATG ATT CGA CAC 3'
	ZNF131-R5	0.3 μ l	5' CCT ACA AAA CTG TGC TTG TTG GCA CTC 3'
mb1-cre	mb1-Fw	0.5 μ l	5' CCA GGC TCT GAC CCA TCT GTC TCC TCT CC 3'
	mb1-Rw	0.3 μ l	5' GAG CTA GCT CTG CTC CTA ATG TTT TGG AAG 3'
	hCre-R	0.3 μ l	5' GTC CTG GCA TCT GTC AGA G 3'

3-1-5. 試薬

RPMI-1640 with L-Glutamine and Phenol Red (和光純薬工業(株)、Cat. # 189-02025)

FETAL BOVINE SERUM (CCB、Cat. # 171012)

2-Mercaptoethanol (SIGMA-ALDRICH、Cat. # M7522)

Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100 \times) ,Liquid (GibcoTM、Cat. # 10378-016)

Sodium Pyruvate (100 mM) (GibcoTM、Cat. # 11360-070)

MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100 \times) (GibcoTM、Cat. # 11140-050)

Normal Rat Serum (Millipore、Cat. # 10710C)

Streptavidin MicroBeads (Miltenyi Biotec、Cat. # 130-048-101)

IC Fixation Buffer (eBioscience、Cat. # 00-8222-49)

10 \times Permeabilization Buffer (eBioscience、Cat. # 00-8333-56)

Annexin V Binding Buffer (Bio Vison、Cat. # 1035-100)

DNase I recombinant ,RNase-free (Roche、製品コード 04716728001)

RNAiso Plus (Total RNA 抽出試薬) (TaKaRa、製品コード 9109)

PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa、製品コード RR047A)

SYBR® Premix EX TaqII (TaKaRa、Cat. # RR820A)

Proteinase K (TaKaRa、製品コード 9034)

SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (CAMBREX、Cat. # 50513)

Ribonuclease, DNase free, Glycerol Solution (和光純薬工業(株)、Cat. # 312-01931)

Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega、Cat. # E1910)

3-1-6. 抗体

IgM-FITC Clone : RMM-1 (BioLegend、Cat. # 108105)

Sca-I-FITC Clone : D7 (BioLegend、Cat. # 108105)

BrdU-FITC Clone : 3D4 (BD Pharmingen™、Cat. # 556028)

κ Isotype Control-FITC Clone : MOPC-21 (BD Pharmingen™、Cat. # 556028)

Annexin V- FITC Apoptosis Kit (Bio Vison、Cat. # K101-25)

IgM-PE Clone : RMM-1 (BioLegend、Cat. # 406507)

CD127 (IL-7Rα) -PE Clone : A7R34 (eBioscience、Cat. # 12-1271-81)

CD19-PerCP/Cy5.5 Clone : 1D3 (TONBO biosciences、Cat. # 65-0193-U025)

CD43-APC Clone : 1B11 (BioLegend、Cat. # 121213)

CD135-APC Clone : A2F10 (BioLegend、Cat. # 135309)

CD117 (c-kit) -PE/Cy7 Clone : 2B8 (eBioscience、Cat. # 25-1171-81)

B220-V450 Clone : RA3-6B2 (TONBO biosciences、Cat. # 75-0452-U025)

Brilliant Violet 421 Streptavidin (BioLegend、Cat. # 405226)

Ghost Dye™ Violet 510 (TONBO biosciences、Cat. # 13-0870-T100)

NK1.1-biotin Clone : PK136 (BioLegend、Cat. # 108704)

Ter119-biotin Clone : TER-119 (TONBO biosciences、Cat. # 30-5921-U500)

B220-biotin Clone : RA3-6B2 (BioLegend、Cat. # 103204)

CD3ε-biotin Clone : 145-2C11 (BioLegend、Cat. # 1003)

CD11b-biotin Clone : M1/70 (BioLegend、Cat. # 101204)

CD19-biotin Clone : 6D5 (BioLegend、Cat. # 115504)

Gr-1-biotin Clone : RB6-8C5 (BioLegend、Cat. # 108404)

3-2. 脾臓における B 細胞の解析

3-2-1. 脾臓細胞の単離

マウスを二酸化炭素により安楽死させた後、脾臓を無菌的に採取し、ペトリ
ディッシュ (日本ベクトン・ディッキンソン) に入れた培養液 (RPMI-1640

medium [FETAL BOVINE SERUM (5%)、2-Mercaptoethanol (55 mM)、Penicillin-Streptomycin-Glutamine, Liquid (1%)、Sodium Pyruvate (100 mM)、MEM Non-Essential Amino Acids Solution (1%)] に入れ、滅菌済みスライドグラス (松浪硝子工業株式会社) で脾臓を擦り潰し回収した。回収後の脾臓細胞から赤血球を取り除くために、ヘモリシス溶液 (NH_4Cl [0.15 M]、 KHCO_3 [10 mM]、 Na_2EDTA [0.1 mM]) を 10 ml 加え溶血処理を行った。

3-2-2. 脾臓細胞の抗体染色反応

抗 B220 – V450 抗体 (1/400)、抗 CD19 – PerCP/Cy5.5 抗体 (1/400) 及び抗 IgM – FITC 抗体 (1/400) で染色した。染色後、FACS buffer (Bovine Serum Albumin [BSA : 0.1%]、Sodium Azide [NaN_3 : 0.05%]、 $1\times$ Phosphate Buffered Saline [PBS : (NaCl : 137 mM) (Na_2HPO_4 : 8.1 mM) (KCl : 2.68 mM) (KH_2PO_4 : 1.47 mM)]) で懸濁し FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) Canto™ II (BD Biosciences) により FACS 解析を行った。FACS 操作後の解析は、FACS 解析ソフト FLOWJO (FLOWJO, LLC DATA ANALYSIS SOFTWARE) により解析を行った。

3-3. HSC から初期 B 前駆細胞の解析^{23,24}

3-3-1. 骨髄細胞の回収

左右大腿骨及び左右頸骨を無菌的に採取し培養液に浸しておき、5 ml シリンジ（テルモ）に 25 ゲージの針（テルモ）を取り付け、培養液を吸い上げた針を差し込み、培養液をペトリディッシュにフラッシュさせ、内部の骨髄細胞を培養液により押し出して回収後、ヘモリシス溶液で溶血処理を行った。

3-3-2. 骨髄細胞の抗体染色反応

抗 IgM-PE 抗体（1/400）、抗 CD19-PerCP/Cy5.5 抗体（1/400）、抗 CD43-APC 抗体（1/400）、抗 B220-V450 抗体（1/400）で染色し、FACS buffer で懸濁後、FACS 解析を行った。

3-3-3. ソーティングによる細胞の回収

3-3-3-1. pre-pro-B、pro-B、pre-B の回収

マウスから骨髄を取り出し溶血処理後、Rat serum（Normal Rat Serum）によりブロッキング処理を行った。その後、Ter119-biotin（1/100）、CD3ε-biotin（1/200）、CD11b-biotin（1/200）、Gr-1-biotin（1/400）のビオチン標識抗体処理を行い、Streptavidin MicroBeads で反応させ、autoMACS Pro Separator（Miltenyi Biotec）により negative fraction を回収した。この細胞を抗 IgM-PE 抗体（1/400）、抗 CD19-PerCP/Cy5.5 抗体（1/400）、抗 CD43-APC 抗体（1/400）、抗 B220-V450 抗体（1/400）で染色し、FACSAria™ III Cell Sorter（BD Biosciences）を用いて、

pre-pro-B (Lineage⁻ IgM⁺ B220⁺ CD43⁺ CD19⁻)、pro-B (Lineage⁻ IgM⁺ B220⁺ CD43^{high} CD19⁺)、pre-B (Lineage⁻ IgM⁺ B220⁺ CD43^{low} CD19⁺) を回収した。

3-3-3-2. HSC、MPP+LMPP、CLP の回収

Rat serum でブロッキング後、NK1.1-biotin (1/100)、Ter119-biotin (1/100)、B220-biotin (1/200)、CD19-biotin (1/200)、CD3ε-biotin (1/200)、CD11b-biotin (1/200)、Gr-1-biotin (1/400) のビオチン標識抗体処理を行い、Streptavidin MicroBeads で反応させ、autoMACS Pro Separator により negative fraction を回収後、抗 streptavidin-BV421 抗体 (1/400)、抗 CD117-PE/Cy7 抗体 (1/400)、抗 CD135-APC 抗体 (1/400)、抗 CD127-PE 抗体 (1/400)、抗 Sca-I-FITC 抗体 (1/400) により染色後、ソーティングにより、HSC (Lineage⁻ CD127⁻ CD117⁺ Sca-I⁺ CD135⁻)、MPP+LMPP (Lineage⁻ CD127⁻ CD117⁺ Sca-I⁺ CD135⁺)、CLP (Lineage⁻ CD127⁺ CD117^{low} Sca-I^{low} CD135⁻) を回収した²⁴。

3-3-4. BrdU (Bromodeoxyuridine) による B 細胞増殖の検討

マウスに 1×PBS に懸濁された BrdU (10 mg/ml) を 1 匹につき 100 μl をマイJECTター27 ゲージ (テルモ) を用いて腹腔内投与し、さらに 2 時間後に再度、等量を腹腔内投与し、その 2 時間後、マウスを安楽死させ骨髄細胞を回収した。回収した骨髄細胞を抗 IgM-PE 抗体 (1/400)、抗 CD19-PerCP/Cy5.5 抗体

(1/400)、抗 CD43-APC 抗体 (1/400)、抗 B220-V450 抗体 (1/400) で染色を行い、IC Fixation buffer で細胞の固定処理を行った。1×Permeabilization buffer を加え懸濁し、遮光、室温で 20 分インキュベート後、DNase I recombinant により genomic DNA の断片化処理を行い、その後、抗 BrdU-FITC 抗体 10 μ l で染色後、FACS 解析を行った。

3-3-5. Annexin V による cell death の解析

マウスより骨髄細胞を単離後、死細胞検出のため Ghost Dye Violet 510 (100 μ l / 1×10^6 個) で反応させ、その後、抗 IgM-PE 抗体 (1/400)、抗 CD19-PerCP/Cy5.5 抗体 (1/400)、抗 CD43-APC 抗体 (1/400)、抗 B220-V450 抗体 (1/400) で染色を行い、1×Annexin V binding buffer に置き換え、抗 Annexin V-FITC 抗体 5 μ l で染色後、FACS 解析を行った。

3-4. PCR-サザンブロット法による遺伝子再構成の解析

3-4-1. PCR-サザンブロット法

ソーティングにより pro-B (wild type : 8×10^5 個、ZNF131 KO : 1.3×10^5 個) を回収した。回収した細胞に Lysis buffer (Tris-HCl [pH 8.0, 50 mM], NaCl [100 mM], EDTA [20 mM], SDS [1%]) 及び proteinase K (0.4 mg/ml) を加え、振盪インキ

ューベーターに入れ、55°C、6時間以上で細胞を溶解させた。その後フェノール・クロロホルム抽出及びクロロホルム抽出を行い、イソプロパノール沈殿後に、70%エタノールで wash 後、風乾させ、Tris-EDTA buffer (Tris-HCl[10 mM]、EDTA[pH 8.0、1 mM]) を加え、4°Cで24時間置くことにより DNA を完全に溶解させ、Nano Drop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) により DNA 濃度測定を行った。その後、以下の PCR コンディションにより DNA の増幅を行った。

Initial denaturation	98°C	1 min	1 cycle
Denaturation	98°C	10 sec	35 cycles
Annealing	60°C	90 sec	
Extension	68°C	90 sec	
Final extension	68°C	5 min	1 cycle
Hold	4°C	∞	1 cycle

DNA 増幅後、1% TAE アガロースゲルを用いて電気泳動を行った (75 V、2時間)。電気泳動後、アガロースゲルを 0.2 N の塩酸で 15 分処理し (DNA を変性)、0.5 M NaOH/1.5 M NaCl で 15 分 2 回の処理を行った。次にメンブレン (GE ヘルスケアバイオサイエンス: Hybond-N+) にバキューム装置を使用して転写を行った。転写後、メンブレンを風乾し、UV クロスリンカー CL-1000 (120 mJ/cm²) (UVP) を用いて DNA をメンブレンにクロスリンクした。次に、メンブレンを Pre-Hybr-solution (50%ホルムアミド、5×SSC、5×Denhardt、1%グリシン、0.5

mg/ml 4S DNA、50 mM リン酸バッファー) でブロッキングを行った (42°C、3 時間)。その後、Hybri-solution (50%ホルムアミド、5×SSC、1×Denhardt、0.1 mg/ml 4S DNA、10% dextran sulphate、20 mM リン酸バッファー) に γ -³²P でラベルした DNA プローブを 50,000 cpm 加えハイブリダイゼーションを行った (42°C、20 時間)。20 時間後、メンブレンを 0.1×SSC 溶液で洗浄しイメージプレートを用いて検出を行った。ハイブリダイゼーションの操作は、公益財団法人 東京都医学総合研究所 免疫遺伝子研究室 井口智弘先生に行って頂いた。

Heavy Chain のプライマーの名称及び塩基配列²⁵

	プライマー名称	塩基配列
Forward	VHJ558	5' CGA GCT CTC CAR CAC AGC CTW CAT GCA RCT CAR C 3'
	VH7183	5' CGG TAC CAA GAA SAM CCT GTW CCT GCA AAT GAS C 3'
Reverse	JH3(R)	5' GTC TAG ATT CTC ACA AGA GTC CGA TAG ACC CTG G 3'

Heavy Chain のプローブの名称及び塩基配列²⁵

	プローブ名称	塩基配列
IgH locus	upstream J _H 3	5' AGC CTT CAG GAC CAA GAT TCT CTG CAA ACG 3'

3-4-2. PCR-サザンブロット解析により検出されるバンド (図 10)

PCR-サザンブロット法により、異なった大きさのバンドが検出される理由は、J region の、J1 から J4 のどの J 遺伝子断片と D region の D 遺伝子断片が結合するかによる。J 遺伝子断片がプライマー設定部位より下流 (J4) にあればバンドは検出されない。プライマー設定部位より上流で最も近い J 遺伝子断片 (J3) と

結合すれば、最も短いバンドが検出され、プライマー設定部位から 2 番目に近い位置 (J2) であれば中間のバンドが検出され、プライマー設定部位から最も遠い位置 (J1) と結合すれば、最も長いバンドが検出される。V region は相同性が高く、プライマーが設定される部位が複数存在する。また、V 遺伝子断片と V 遺伝子断片の間隔が 5kbp から 90kbp と長いため、プライマーが設定された部位のみバンドが検出される。

3-5. Real-Time PCR による遺伝子発現の解析

ソーティングにより HSC、MPP+LMPP、CLP、pre-pro-B、pro-B、pre-B を回収した。回収後、RNAiso により、RNA を調製し、Nano Drop ND-1000 により RNA 濃度測定を行った。

3-5-1. cDNA の合成

cDNA の合成は PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) を用いて行った。RNA300 ng に対して、キットのプロトコールに従い、genomic DNA を消化後、cDNA 合成を行った。

3-5-2. Real-Time PCR

Real-Time PCR は、SYBR Premix EX TaqII を使用し、LightCycler® 480 リアル

タイム PCR システム (Roche) により行った。また、解析は全て、L32 (housekeeping gene) の値を元に比較を行った。

3-5-3. プライマーの名称、塩基数及び塩基配列^{10, 23, 24, 26-38}

プライマー名称	塩基数		塩基配列
L32 (Rp132)	63bp	F	5'-GAAACTGGCGGAAACCCA-3'
		R	5'-GGATCTGGCCCTTGAACCTT-3'
ZNF131	86bp	F	5'-GCAGCAGAGTTTCTACAAATGCTGG-3'
		R	5'-GTGTTTTCTCTAATGGAGCTGAG-3'
Runx1	115bp	F	5'-CTCGGCAGAAGCTGAGAAATG-3'
		R	5'-GACGGTGATGGTCAGAGTGA-3'
Miz1 (ZBTB7)	91bp	F	5'-CGTGGTGCACCTAGACATCA-3'
		R	5'-GTTCTCAGGGCTAAGGCTCA-3'
E2A (E47)	105bp	F	5'-CAGATGGTGGCCTGGATACT-3'
		R	5'-CATCCCTGCTGTAGCTGTCA-3'
Foxo1	96bp	F	5'-TGTCAGGCTAAGAGTTAGTGAGCA-3'
		R	5'-GGGTGAAGGGCATCTTTG-3'
EBF1	150bp	F	5'-CCATCCGAGTTCAGACACCTCCT-3'
		R	5'-ACCTCTGGAAGCCGTAGTCGATG-3'
Pax5	123bp	F	5'-GAGTCTGTGACAATGACACTGTGC-3'
		R	5'-AGCCTGTAGACACTATGCTGTGAC-3'
Puma (Bbc3)	104bp	F	5'-ATGGCGGACGACCTCAAC-3'
		R	5'-AGTCCCATGAAGAGATTGTACATGAC-3'
Bax	127bp	F	5'-TTTCATCCAGGATCGAGCAGGG-3'
		R	5'-GTCCAGTTCATCTCCAATTCGCC-3'
Bcl-2	128bp	F	5'-CCTGTGGATGACTGAGTACC-3'
		R	5'-GAGACAGCCAGGAGAAAT-3'
IRF4	90bp	F	5'-TCTTCAAGGCTTGGGCATTG-3'
		R	5'-CACATCGTAATCTTGTCTTCCAAGTAG-3'
IRF8	119bp	F	5'-TACAATCAGGAGGTGGATGC-3'
		R	5'-TTCAGAGCACAGCGTAACCT-3'
Ikzf1 (Ikaros)	109bp	F	5'-TCCCAAGTTTCAGGAAAGGA-3'
		R	5'-TCTGCTGTGCTCCAGAGGTA-3'
Ikzf3 (Aiolos)	100bp	F	5'-CCGAGATGGGAAGTGAGAGA-3'
		R	5'-CGCTTCTCACCGATGAATTT-3'
Igβ	152bp	F	5'-GTGCCCATCTTCCTGCTACTTGAC-3'
		R	5'-TGCTCTCCTACCGACCACTTTACC-3'

λ5	198bp	F	5'-GGGTCTAGTGGATGGTGTCC-3'
		R	5'-CAAACTGGGGCTTAGATGG-3'
VpreB	117bp	F	5'-ATGCTGCTGGCCTATCTCACAGG-3'
		R	5'-ATGGTCGTTGCTCAGGGTACAGG-3'
Rag1	121bp	F	5'-GTAAACAACCAAGCTGCAGACATT-3'
		R	5'-TCATCGGGTGCAGAACTGAAG-3'
c-myc	95bp	F	5'-GCCCCTAGTGCTGCATGAG-3'
		R	5'-CCACAGACACCACATCAATTTCTT-3'
Myb	142bp	F	5'-AACGAGCTGAAGGGACAGCA-3'
		R	5'-TGGCATGGTGTCTCCCAA-3'
p21 (Cdkn1a)	132bp	F	5'-TGTCTTGCCTCTGGTGTCTGAGC-3'
		R	5'-TCTTGCAGAAGACCAATCTGCG-3'
p27 (Cdkn1b)	130bp	F	5'-AGTGTCCAGGGATGAGGAAGCGAC-3'
		R	5'-TTCTTGGGCGTCTGCTCCACAGTG-3'
SOCS1	127bp	F	5'-GTGGTTGTGGAGGGTGAGA-3'
		R	5'-CCCAGACACAAGCTGCTACA-3'
SOCS3	114bp	F	5'-TGAGCGTCAAGACCCAGTCG-3'
		R	5'-CACAGTCGAAGCGGGAACT-3'
STAT5	121bp	F	5'-GCTGTATCCGGCACATTCTGT-3'
		R	5'-GTTTGGTTGATCTGAAGGTGCTT-3'
Cyclin D3 (Cend3)	103bp	F	5'-GATGGCCTCTGTGTAATCCGTACT-3'
		R	5'-GCTAAGCAGCAAGCAAAGCA-3'

3-6. ZNF131 KO の HSC から pre-B における ZNF131 欠失の確認

ソーティングにより HSC、MPP+LMPP、CLP、pre-pro-B、pro-B 及び pre-B を回収後、genomic DNA を調整した。genotyping と同様のプライマー及び PCR コンディションにより PCR 反応を行った。電気泳動後、SYBR Green (0.01%) で染色し、ImageQuant LAS-4000 (GE ヘルスケアバイオサイエンス) により画像を取り込んだ。

3-7. B 細胞の初期分化過程における細胞周期の確認

ソーティングにより pre-pro-B、pro-B、pre-B を回収後、メタノールにより 4°C、24 時間で細胞を固定、FACS buffer で wash 後、1 sample に付き、1 mg/ml Propidium Iodide (PI) 5 μ l、FACS buffer 200 μ l、10 mg/ml RNase (Ribonuclease, DNase free, Glycerol Solution) 2 μ l で懸濁し、室温、30 分で反応させた。30 分後、FACS 解析を行った。

3-8. 細胞培養

ソーティングにより回収した pro-B を 96 well plate (Greiner CELLSTAR®) に 1 well につき 5×10^4 個を加え、37°C、CO₂ 5% で一定時間培養した。培養液は、RPMI-1640 medium [FETAL BOVINE SERUM (10%)、2-Mercaptoethanol (55 mM)、Penicillin-Streptomycin-Glutamine, Liquid (1%)、Sodium Pyruvate (100 mM)、MEM Non-Essential Amino Acids Solution (1%)] を使用し、IL-7 は最終濃度 10 ng/ml になるように添加した。

3-9. p21 ルシフェラーゼレポーターアッセイ

先行研究により同定された、p21 プロモーターにおける ZNF131 の制御領域

である、翻訳開始点（ATG の A を+1 とする）より-794bp から-1491bp、さらにこの領域を細かく区切った、-1354bp から-1491bp、-1203bp から-1353bp、-1051bp から-1202bp、-903bp から-1050bp、-794bp から-902bp をそれぞれ内部欠失させた、6 種類のレポータープラスミドを作製した。これらのレポータープラスミドを NIH/3T3 の細胞に ZNF131 発現プラスミド、Renilla と共にトランスフェクションを行った。ルシフェラーゼ活性は、Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いて、トランスフェクションの 48 時間後に Lumat LB 9507（BERTHOLD TECHNOLOGIES）により測定した。

4. 結果

4-1. HSC から初期分化 B 細胞の各分化段階における *Znf131*mRNA の発現 (図 11、12)

先行研究では、T 細胞における ZNF131 の発現量を見ており、普遍的な発現が見られるが、DP で上昇が見られた²¹。B 細胞の各分化段階における *Znf131*mRNA の発現量を調べたところ、HSC、MPP+LMPP、CLP の各段階で発現が見られたが、B 細胞の初期分化過程である pre-pro-B、pro-B、pre-B でより強い発現が見られた (図 11)。

また、ZNF131 KO の pre-pro-B における *Znf131*mRNA の発現は、wild type と同程度の発現が見られたが、ZNF131 KO の pro-B では *Znf131*mRNA はほとんど発現が見られなかった (図 12)。ZNF131 KO では、pro-B 段階から *Znf131* 遺伝子の欠失が起こっていると示唆された。

4-2. ZNF131 KO における *Znf131* 遺伝子欠失効率 (図 13)

ZNF131 KO において、cre の発現が誘導される pre-pro-B では、wild type とほぼ同等の *Znf131*mRNA の発現が見られたが、pro-B では発現がほとんど見られなかった。どの分化過程から欠失が起こっているのか、genomic DNA に対する PCR

により検討した。

CLP では若干欠失が誘導され、pre-pro-B では明瞭に欠失が認められた。pro-B では完全に欠失していたが、mRNA の発現パターンから pre-pro-B ではある程度欠失が誘導されるが、発現にはほとんど影響がないと考えられた。

4-3. 脾臓 B 細胞の解析 (図 14、15、16)

B 細胞は生後、骨髄の HSC から pre-pro-B、pro-B、pre-B、immature B へと分化し、immature B は血液を介して二次リンパ組織へ移動した後、mature B へ分化する。脾臓における mature B を解析するため、脾臓重量を測定後、細胞を回収し、IgM、CD19、B220 の FACS 解析を行った。脾臓重量は、wild type と比較して ZNF131 KO ではほぼ 3 分の 1 であった (図 14)。ZNF131 KO では immature B 以降の B 細胞が全く見られず、B 細胞の分化が完全に抑制されていることが示唆された (図 15、16)。

4-4. B 細胞初期分化過程における解析 (図 17、18)

末梢において B 細胞が存在しないことが示されたので、次に B 細胞の初期分化過程への ZNF131 の影響を検討した。wild type 及び ZNF131 KO マウスから骨

髄を回収し、pre-pro-B 以降に発現する B220、HSC から pre-B まで発現する CD43、immature B 以降に発現する IgM の FACS 解析を行った。immature B 以降を排除した IgM⁺B220⁺の細胞集団を CD43 と CD19 を用いて、pre-pro-B、pro-B、pre-B に分画した（図 17）。pre-pro-B、pro-B、pre-B の分画には、pre-B が存在しない Rag2 KO マウスの解析をコントロールとして設定した。Rag2 KO マウスは、遺伝子再構成が起きないため、pro-B で分化が停止し、pre-B 以降の細胞が分化できない。ZNF131 KO には IgM⁺細胞が存在せず、immature B 以降は存在しない。図 17 の FACS 解析の結果からは、pro-B は ZNF131 KO と wild type でほぼ同様であったが、細胞数を比較すると、pre-pro-B では、ZNF131 KO の方が wild type よりやや細胞数が多く、pro-B はおよそ半数、pre-B ではさらに減少していた（図 18）。これは pro-B の段階で分化が抑制されていることを示す。

4-5. B 細胞初期分化過程での細胞増殖（図 19）

ZNF131 KO における pro-B で細胞数が減少していたことから、細胞増殖への影響について検討した。BrdU を短時間、マウスに投与し、DNA 合成を行っている細胞、組織に BrdU を取り込ませた後、骨髓細胞を分離し、BrdU に対する抗体を用いて、取り込まれた BrdU を細胞内染色した。wild type、ZNF131 KO は共

に pre-pro-B ではほとんど BrdU 抗体染色のシグナルが観察されなかった。wild type の pro-B は約 60%の細胞が BrdU を取り込んでおり、活発に増殖していることが予測された。また pre-B は preBCR シグナルにより増殖している large pre-B と、増殖を停止し Ig light chain の遺伝子再構成を行う small pre-B が含まれており、約 25%の細胞が DNA 合成を行っていた。ZNF131 KO の pro-B では、DNA 合成が非常に強く抑制され、細胞増殖の強い抑制が認められた。従って、ZNF131 は pro-B の細胞増殖と分化に必須であることが明らかとなった。

4-6. B 細胞初期分化過程における細胞周期 (図 20)

ZNF131 KO の pro-B において、細胞増殖が抑制されていることが示されたため、細胞周期の解析を行った。pre-pro-B、pro-B、pre-B を分取後、細胞を固定し、DNA を PI で染色後、DNA 量を FACS により解析した。wild type、ZNF131 KO 共に pre-pro-B は細胞増殖しておらず、ほぼ全ての細胞は G1 期であった。wild type の pro-B では激しく細胞増殖しており、S 期は 50%に達していた。ZNF131 欠失マウスの pro-B では、正常マウスの pro-B に比べると S 期は低下し G1 期の増大が認められたが、BrdU の取り込みが示す強い増殖抑制と考え合わせると、G1 期で細胞周期が停止する傾向が見られるものの、ZNF131 の欠失は細胞周期

を通して増殖の停止を誘導すると考えられた。pre-B では、BrdU の取り込みに見合った S 期の割合が認められた。

4-7. pro-B における cell death の解析 (図 21、22)

細胞数が減少している原因の一つに cell death も考えられるため、次に Annexin V により pro-B での cell death を解析した。cell death が起きている細胞を positive control としてゲートを設定し解析した。pro-B での cell death は、wild type と ZNF131 KO で、共にほとんど認められなかった (図 21)。pro-B では細胞増殖だけでなく、遺伝子再構成も活発に行われており、遺伝子再構成に失敗した細胞には cell death が誘導されるはずである。それを考えると、死細胞が即座にマクロファージ等に取り込まれ分解されてしまうため、検出できていない可能性も考えられる。次に cell death に関連する遺伝子の発現を Real-Time PCR により解析した (図 22)。ZNF131 KO の pro-B では cell death を促進する *Puma (Bbc3)* と *Bax*、cell death を抑制する *Bcl-2* の発現が共に亢進していた。*Bcl-2* は IL-7 の下流で誘導される遺伝子であり、ZNF131 KO の pro-B においても IL-7 シグナルが導入されていることが示唆される³⁹。cell death を誘導する遺伝子集団より cell death を抑制する遺伝子集団の作用の方が強いため、cell death が抑制されて

いた可能性もある。後述する pro-B の培養による解析では、ZNF131 欠失 pro-B は、IL-7 存在下であっても、細胞数は急速に減少し cell death が誘導されていることが示唆された。マウスから分離した pro-B で cell death は亢進していなかったことについて、生体内では、IL-7 以外に細胞の生存を維持する他のサイトカイン等のシグナルが存在する可能性も示唆された。

4-8. pro-B における FSC の解析 (図 23)

細胞の増殖状態、活性化の指標の一つとして、FSC (Forward Scatter) の解析を行った。ZNF131 KO における pro-B の FSC は、wild type の約半分ほどの範囲を示し、明らかに休止期ではなく、ある程度活性化していることが示唆された。pro-B では、IL-7 シグナルが、分化、細胞増殖、遺伝子再構成に重要であることが明らかになっており、IL-7 シグナルが導入されると休止期の細胞が活性化され代謝が促進し、その結果 FSC の増大が見られる。FSC の増大は、IL-7 の誘導等の結果と合わせて、ZNF131 が欠失した状態であっても、IL-7 等のシグナルが導入されていることを示す。しかし、ZNF131 の欠失は pro-B の増殖を強く抑制し、そのため FSC は正常マウスの pro-B のレベルには到達できないと考えられた。

4-9. IL-7 シグナルに関わる遺伝子の発現解析 (図 24)

さらに IL-7 シグナルの導入を調べるため、IL-7 シグナルによって誘導される遺伝子の発現を Real-Time PCR により解析した。*Socs1*、*Socs3*、*Cyclin D3* は pro-B において IL-7 シグナルにより誘導される遺伝子であり、正常マウス由来の pro-B での発現レベルは誘導された状態とみなされる。ZNF131 KO 由来の pro-B において変化は見られず、ZNF131 は IL-7 シグナルには関与していないということが *Bcl-2* の誘導や FSC の増大といった結果と合わせて支持された。

4-10. B 細胞の分化に中心的な役割を担う遺伝子の発現解析 (図 25)

ZNF131 KO の pro-B においても IL-7 シグナルには影響が見られないことが示唆されたので、次に B 細胞の分化に中心的な役割を持つ遺伝子集団の発現を Real-Time PCR により調べた。B 細胞の分化では、*Ebfl*、*Pax5*、*E2a* 等の B 細胞系列への決定に重要な遺伝子が多く存在するが (図 3)、これらの遺伝子の発現は、ZNF131 KO においてもほぼ wild type と同様であり、差は見られなかった。このことから、ZNF131 は B 細胞の分化に重要であるこれらの遺伝子の発現には関与しないと考えられた。

4-11. pro-B における Ig heavy chain の遺伝子再構成の検討 (図 26)

pro-B では細胞増殖が活発に行われているが、一方で Ig heavy chain の遺伝子再構成が進行する。DNA 合成と遺伝子再構成が同時に進行することは、ゲノムの不安定性を大きく高め、発癌リスクが極めて高くなることから、回避することが不可欠と考えられる。胸腺の DN や pre-B では、細胞増殖を行う分化過程(胸腺では DN2 及び DN4、B 細胞では large pre-B) と細胞増殖を停止し遺伝子再構成を進行させる分化過程(胸腺では DN3/4、B 細胞では small pre-B) が区分されている。pro-B は盛んに細胞増殖を行っている細胞が多く認められるが、上記細胞集団のように増殖している細胞集団と増殖を停止し遺伝子再構成を行う細胞集団に区分されるのか、あるいは細胞周期内で、S 期以外の過程で遺伝子再構成を行っているのか、解明されていない。T 細胞においては、ZNF131 の欠失は、細胞増殖を停止している DN3 で誘導される TCR β 鎖の遺伝子再構成には影響しなかった。ZNF131 が Ig heavy chain の遺伝子再構成にどのように影響するのか解析するため、骨髄からソーティングにより pro-B を分取し、genomic DNA の調整、PCR-サザンブロット解析を行った。その結果、ZNF131 KO においても Ig heavy chain の遺伝子再構成は誘導されていることが示された。ZNF131 は Ig heavy chain の遺伝子再構成に必須ではないことが示唆された。

4-12. pro-B における、preBCR シグナル伝達に関わる遺伝子の発現及び、遺伝子再構成に関わる遺伝子の発現解析 (図 27)

pre-B においては、preBCR シグナルが誘導されると転写因子 IRF4 が誘導される。IRF4 は転写因子 Ikaros 及び Aiolos を誘導し、Ikaros/Aiolos は細胞増殖に必要な c-myc を抑制するため細胞増殖が停止し、また、surrogate light chain である VpreB と $\lambda 5$ の発現を抑制するため、preBCR の発現自体が減少する。その結果、pre-B は増殖を停止、FSC の減少が誘導される。即ち large pre-B から small pre-B に移行する。small pre-B では、遺伝子再構成に重要である Rag1 も誘導され、Ig light chain の遺伝子再構成が起こることが明らかとなっている^{40,41}。これらの遺伝子発現を pro-B において Real-Time PCR により解析した。ZNF131 KO の pro-B では、pre-B において誘導される *Irf4* が低下し、また、その制御を受ける *Ikaros*、*Aiolos* も低下した。恐らくその結果として、*VpreB* と $\lambda 5$ の発現亢進、後述する *c-myc* の発現増大が認められた。遺伝子再構成に重要である *Rag1* の発現に影響は見られなかった。本来 large pre-B から small pre-B への移行過程で重要な IRF4 - Ikaros/Aiolos - c-myc - VpreB/ $\lambda 5$ という経路が pro-B 段階で既に準備がなされており、ZNF131 の欠失が IRF4 の発現抑制につながり、それが VpreB/ $\lambda 5$ や c-myc の発現増大をもたらすと考えられた。この経路の遺伝子集団の遺伝子欠失マウ

スの B 細胞分化に関する解析では、pro-B では影響が見られず、pro-B におけるこの経路の役割は不明である。*Irf4* や *Ikaros/Aiolos* を ZNF131 の標的遺伝子として解析を進めることが重要である。

4-13. pro-B における細胞増殖に関わる遺伝子の発現解析 (図 28)

先行研究では、T 細胞において ZNF131 を欠失させた場合、細胞増殖を抑制する遺伝子 p21 の発現亢進が見られたが、細胞増殖を促進する *c-myc* には影響が見られなかった²¹。ZNF131 の欠失により、pro-B の細胞増殖は強く抑制されたため、これらの遺伝子を含む細胞増殖制御に関わる遺伝子集団の発現を、Real-Time PCR により解析した。T 細胞の場合とは異なり、p21、*c-myc* が共に亢進していた。ZNF131 KO の pro-B では細胞増殖は停止していることから、p21 の細胞増殖抑制作用が *c-myc* の細胞増殖促進作用を凌駕していると考えられた。

4-14. 細胞培養系 (in vitro) における pro-B の解析 (図 29、30)

ZNF131 と IL-7 シグナルや細胞増殖、cell death の関係をさらに調べるため、ソーティングによりマウスから pro-B を分取後、IL-7 の添加、非添加において 48 時間培養し、FACS 解析を行った。wild type の pro-B では、IL-7 を添加した場

合、生存細胞が2倍に増大し細胞増殖が誘導された。また IL-7 を添加しない場合でも、pro-B はある程度生存できた。一方、ZNF131 KO の pro-B では IL-7 の有無に関係なく、生存細胞は急速に減少し、48 時間後においてはほぼ存在しなかった (図 29)。これは cell death が強く誘導されたと考えられた。

IL-7 シグナルが in vitro においても pro-B に導入されているかを確認するため、IL-7 シグナルにより誘導される *Socs3* の遺伝子発現を Real-Time PCR により解析した結果、IL-7 を添加した場合の wild type、ZNF131 KO の pro-B で共に *Socs3* の発現が亢進していた (図 30)。このことから、in vitro においても、また ZNF131 KO においても、IL-7 シグナルは導入されていることが示された。しかし、ZNF131 KO の pro-B では cell death が強く誘導されており、生体から分離後すぐに解析した場合 (図 21) とは異なった結果となったことから、生体内では B 前駆細胞が分化するニッチにおいて IL-7 の他に、c-kit リガンド、Flt3 リガンド等のサイトカインシグナルや接着分子を介するシグナル等、pro-B の生存に必要なシグナルが存在し、ZNF131 がそのような細胞生存シグナルに関与する可能性が示唆された。

4-15. p21 プロモーターにおける ZNF131 の制御領域の同定 (図 31)

p21 の発現亢進は、非常に多くの細胞系列において細胞増殖を強力に促進する c-myc の作用を抑制し、細胞増殖を停止させると考えられる。先行研究により、ZNF131 が p21 のプロモーター活性を抑制することが報告され、p21 遺伝子は ZNF131 の重要な標的遺伝子であることが示された²¹。そこで、先行研究において同定された p21 プロモーターにおける ZNF131 の制御領域をさらに限定するため、NIH/3T3 細胞でプロモーター活性を示し、ZNF131 による抑制活性も検出することができるプロモーター領域の異なった場所を内部欠失させたレポータープラスミドを 6 種類作製し、レポーターアッセイを行った。その結果、ZNF131 の制御領域が p21 プロモーターの癌抑制遺伝子 p53 結合領域を含む 138bp (-1354bp から-1491bp) の領域に限定された。p21 遺伝子を誘導することで細胞増殖を抑制することが重要な機能の一つである癌抑制遺伝子 p53 の制御領域と重なる可能性があり、さらに詳細な制御領域の解析が必要である。また ZNF131 と p53 の相互作用の有無も非常に重要な点であり、今後の解析が必要である。

5. 考察

B 細胞や T 細胞の分化は、抗原受容体遺伝子の遺伝子再構成や、自己を認識するクローンの排除等、他の細胞系列には見られないユニークな側面が特徴である。抗原受容体の遺伝子は、遺伝子再構成により、ゲノムが持つ全遺伝子数よりはるかに多くの抗原受容体遺伝子を出現させる。原則的に一つのリンパ球が二つの受容体分子からなる一種類の抗原受容体を発現するため、分化過程において、リンパ球は十分な細胞数を生み出す必要があり、盛んに増殖する。さらには、自己を認識してしまう抗原受容体を発現するリンパ球は排除される必要があり、胸腺では数パーセントの T 細胞しか残らないことが知られている。

この点からも、十分な数のリンパ球を末梢で確保するためには、やはり非常に多くの細胞を生み出す必要がある。一方、遺伝子再構成は DNA 切断を伴い、細胞にとって DNA 損傷の一種と考えられる。従って細胞増殖と同時に遺伝子再構成を進行させることは、ゲノム不安定性を亢進させ、細胞の癌化につながる。

そのため、リンパ球の分化過程は、細胞の増殖と停止、それに伴う遺伝子再構成の誘導と、細胞分化と細胞増殖が、かなり精密に連動して制御されている。

先行研究において、ZNF131 の欠失を誘導した T 細胞分化過程では TCR β 鎖の遺伝子再構成には影響しなかった。TCR β 鎖の遺伝子再構成後の preTCR の発現

に伴う細胞増殖と DN から DP への分化誘導は強く抑制された。ZNF131 の欠失が細胞増殖を抑制し、その結果 DP への分化も阻害されたと考えられる。

本研究による mb1-cre マウスによる B 細胞分化過程における ZNF131 の欠失は、mRNA や genomic DNA の解析から、pro-B を中心にほぼ完全に欠失されたと考えられる。pro-B は、BrdU の取り込み及び細胞周期の解析から激しく細胞増殖を行っていることが示された。同時に pro-B では Ig heavy chain の遺伝子再構成を進行させており、ゲノム不安定性に基づく細胞癌化を回避するメカニズムは不明な点が多い。ZNF131 の欠失は、pro-B においても強力に細胞増殖の抑制を誘導したが、遺伝子再構成は誘導されており影響はあったとしても小さいと考えられた。pro-B は細胞数が半減し、pre-B は非常に少なくなり、pro-B の段階で分化も抑制されたと考えられる。T 細胞の場合には、細胞増殖が停止している分化過程で ZNF131 の欠失が誘導されたが、pro-B では細胞増殖が進行している状態で ZNF131 が欠失したと考えられ、それでも細胞増殖の抑制が強く誘導された。細胞周期の解析から、S 期の減少と G1 期の増大は認められるものの、細胞周期の広範囲な過程で増殖抑制が誘導されたと考えられた。また、FSC のレベルも、正常 pro-B よりは低下するものの、明らかに代謝の亢進を示し、細胞が活性化していることを示している。

cell death について解析すると、ZNF131 欠失 pro-B では正常な pro-B と同様、ほとんど cell death は検出されなかった。しかし cell death の誘導に関与する複数の遺伝子 (*Puma*、*Bax*) の発現が ZNF131 欠失 pro-B で亢進していた。一方、cell death を抑制する遺伝子である *Bcl-2* の発現亢進も認められた。*Bcl-2* は IL-7 シグナルにより誘導される遺伝子であり、ZNF131 欠失 pro-B では、IL-7 シグナルが増強している可能性がある。cell death がほとんど検出されないことは、*Bcl-2* の作用が *Puma* や *Bax* の作用を凌駕しているということで説明される。しかし生体内では、特に血球系の死細胞はマクロファージ等の食細胞により、速やかに除去されるため、検出できなかつた可能性もある。pro-B を分離し、IL-7 のみの供給で培養した場合、正常な pro-B は細胞分裂が誘導され (未発表データ)、IL-7 を加えない場合でも、増殖は誘導されないが、ある程度生存することが確認された。ZNF131 欠失 pro-B を培養すると、IL-7 を加えても急速に細胞数の減少が認められ、cell death が誘導されたことが明らかである。in vivo の環境と比較して、ストローマ細胞や Flt3 リガンド、c-kit リガンド、SDF1 (CXCL12) といったサイトカイン等が欠如していることで cell death が強く誘導された可能性もある。今後これらの細胞やサイトカインを加えた培養系での解析を行う必要がある。ZNF131 が pro-B の生存に関与しており、細胞の生存を維持できる複数のシ

グナルが存在しない状況では、ZNF131 が必須となることが、*in vitro* の解析から示唆された。

ZNF131 欠失 *pro-B* では、種々の細胞系列の細胞増殖に重要であり、癌遺伝子としても重要な *c-myc* の発現が亢進していた。これは分化過程の T 細胞や成熟 T 細胞で ZNF131 を欠失した場合では見られなかった。*pre-B* では *preBCR* の発現により、リガンドが存在しない状況でも細胞増殖誘導シグナルが発生し、FSC が増大、*large pre-B* として増殖する。その後、メカニズムについては未知な点が多いが、細胞増殖が停止し、FSC が減少、*small pre-B* となる。*small pre-B* では、*large pre-B* において細胞増殖を誘導するシグナルを伝達していた *preBCR* が、逆に IL-7 シグナルの抑制を含め、細胞増殖を停止させ、遺伝子再構成を誘導するシグナルを伝達する。*small pre-B* において *c-myc* は抑制されるが、B 細胞分化の多くの過程で重要な転写因子 Ikaros/Aiolos の発現が増大することによる。さらに Ikaros/Aiolos は上位に位置する転写因子 IRF4 の増大により発現亢進する。IRF4、IRF8 を共に欠失させると *large pre-B* の段階で分化が固定され、細胞増殖が継続するため、細胞株として樹立可能となる。ZNF131 が欠失した *pro-B* では、このカスケードが逆方向のシグナルを伝達し、その結果、*c-myc* の発現亢進が誘導された可能性がある。即ち ZNF131 欠失 *pro-B* では、IRF4 の発現の減少及び

Ikaros/Aiolos の発現の減少が認められた。Ikaros/Aiolos の減少は c-myc の発現増大につながる。これらの転写因子の変異は、pro-B では影響が見られないことが報告されており、この経路は pro-B では重要ではないが、その後の分化過程で必要な経路が前もって準備されているという見方ができ、分化過程におけるシグナル伝達系の形成という観点から興味深い。

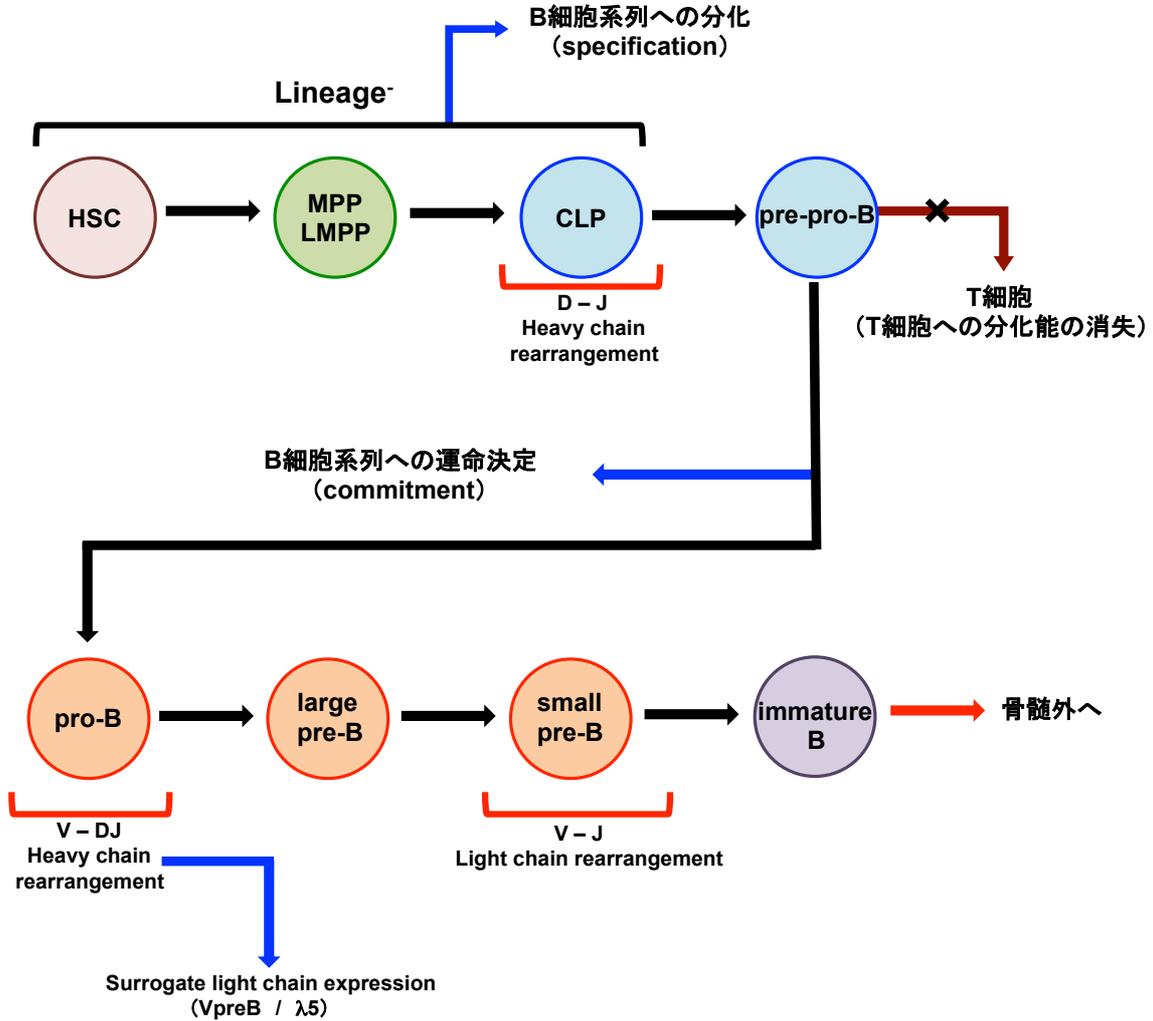
ZNF131 の欠失は、pro-B において c-myc の発現亢進をもたらし、FSC の増大等からも、細胞周期が動きはじめていることが示唆されたが、DNA 合成はほぼ完全に抑制された。細胞周期制御に関与する遺伝子集団の解析から、p21 の発現亢進が認められた。これは ZNF131 を T 細胞で欠失した場合にも認められた。

レポーターアッセイにより、ZNF131 は p21 プロモーターの転写活性を抑制する転写抑制因子であることが先行研究で示されている²¹。c-myc は BTB ZF ファミリーに属する Miz1 と複合体を形成し、p21 プロモーター転写開始点付近（イニシエーター）に結合し、p21 プロモーターの転写活性を抑制することが知られている。ZNF131 の欠失により、c-myc の p21 プロモーターに対する抑制作用も阻害されたと考えられる。種々の p21 プロモーターの内部欠失を作製し、レポーターアッセイを行った結果、p21 の翻訳開始点からの塩基数で-1354bp から-1491 bp の領域が ZNF131 が作用する領域とマップされた。非常に興味深い点は、こ

の領域に癌抑制遺伝子 p53 の結合領域が含まれていることである。p53 はヒトの癌の多くに変異が見出される。また先天的に p53 が変異している場合、Li-Fraumeni 症候群と呼ばれ、種々の癌を多発する遺伝疾患を招く。マウスにおいても p53 を欠失させると lymphoma を中心に種々の悪性腫瘍を多発する。p53 の発見から 35 年、その作用機序は多岐にわたることが明らかになっているが、はじめは DNA 損傷等の遺伝毒性ストレスにより活性化され、転写因子として p21 等の cdk インヒビターの誘導による細胞増殖停止と細胞老化の誘導、あるいは *Puma* や *Bax* といった cell death を誘導する遺伝子の発現誘導による cell death の誘導により、細胞癌化を阻止するという機能が明らかにされた。p21 プロモーターは p53 により活性化される⁴²。レポーターアッセイにおいて、p53 結合領域の欠失は、プロモーター活性の低下を示した。ZNF131 は p21 プロモーターを抑制し、p53 とは逆の作用である。現時点で、p53 と ZNF131 の関係について図 32 に示す仮説を考えている。まず、より詳細な制御領域のマッピングにより、p53 と ZNF131 の制御領域が分離できるのか重複しているのか解明する必要がある。制御領域が重複している場合に、p53 と ZNF131 が複合体を形成し、p53 の転写促進作用を ZNF131 が抑制する可能性がある。p53 と ZNF131 が DNA 上で置き換わる可能性もある。ZNF131 欠失 pro-B では、p53 の標的遺伝子で、cell death

を誘導する *Puma* や *Bax* の発現亢進も見られる。これらの遺伝子にも p53 の制御領域が存在する。ZNF131 がこれらの遺伝子も標的としているのか、その作用機序は p21 の場合と同様かということについても今後、解析する必要がある。さらに p53 の標的遺伝子はゲノムワイドで解析されており、膨大な、p53 により制御される遺伝子リストが存在する。ZNF131 についても、ゲノムワイドな遺伝子発現解析、結合領域解析等を行い、p53 との関係を明らかにしていくことが重要である。p53 との関係が深まれば、細胞癌化と ZNF131 の関係についての解析も進めることになる。

6. 図



- HSC : Hematopoietic stem cell (造血幹細胞)
- MPP : Multipotent progenitor (多能性前駆細胞)
- LMPP : Lymphoid-primed multipotent progenitor (リンパ球系前駆細胞)
- CLP : Common lymphoid progenitor (共通リンパ系前駆細胞)

図1. HSCからはじまるB細胞への分化過程
HSCからCLPへ分化し、T細胞への分化能の消失、B細胞系列への運命決定の樹立後、immature Bへと分化し、骨髓外へ移動する。さらに脾臓等のリンパ組織において成熟する。

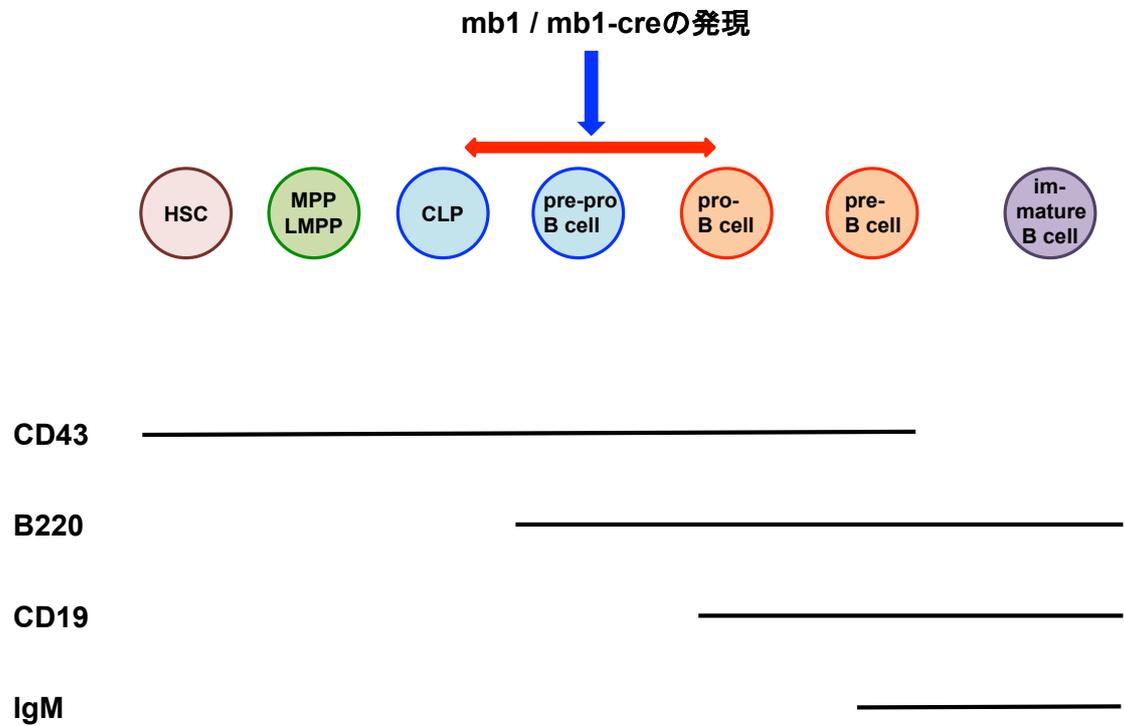


図2. B細胞の分化とマーカー分子の発現
HSCからB細胞系列への分化が決定し、immature Bへと分化していく過程において発現するマーカー。
CLPの後期からpre-pro-B、pro-B段階にかけてmb1-creが発現することにより、*Znf131* 遺伝子の欠失が誘導される。

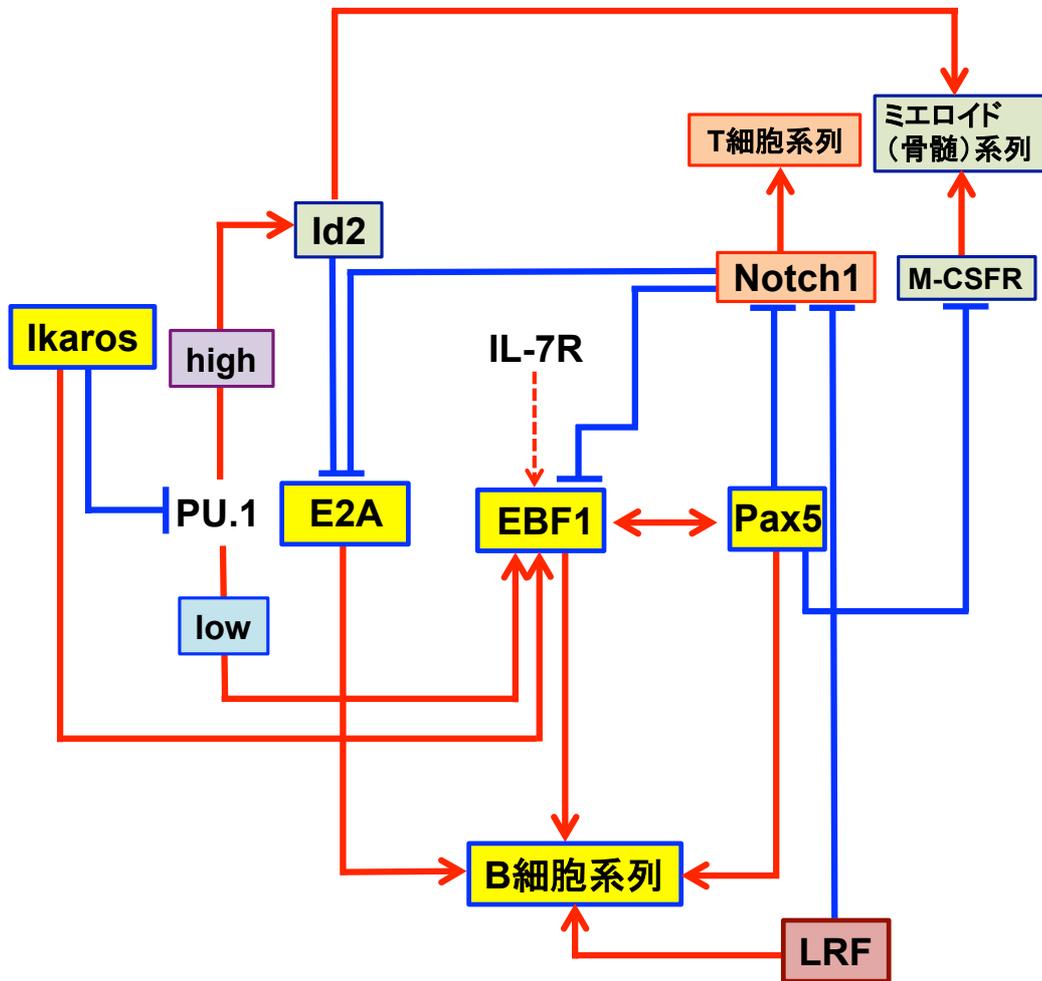


図3. B細胞系列への決定に必要な転写因子集団
 E2A、EBF1、Pax5はB細胞系列への分化を誘導する。EBF1とPax5は相互にポジティブフィードバックされる。IL-7Rを介するIL-7シグナルは、EBF1を活性化させE2Aと共にB細胞系列への分化を進行させる。
 Pax5、LRFはT細胞系列への分化に重要なNotchシグナルを遮断し、T細胞系列への分化を抑制する。IkarosはPU.1の抑制を介して、ミエロイド系列への分化を抑制する。

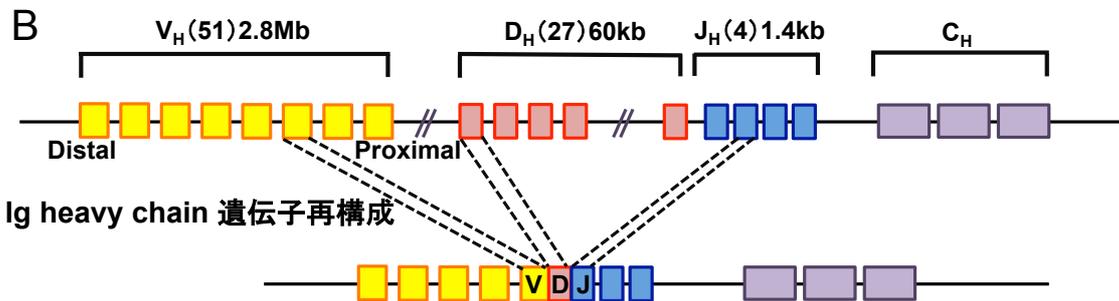
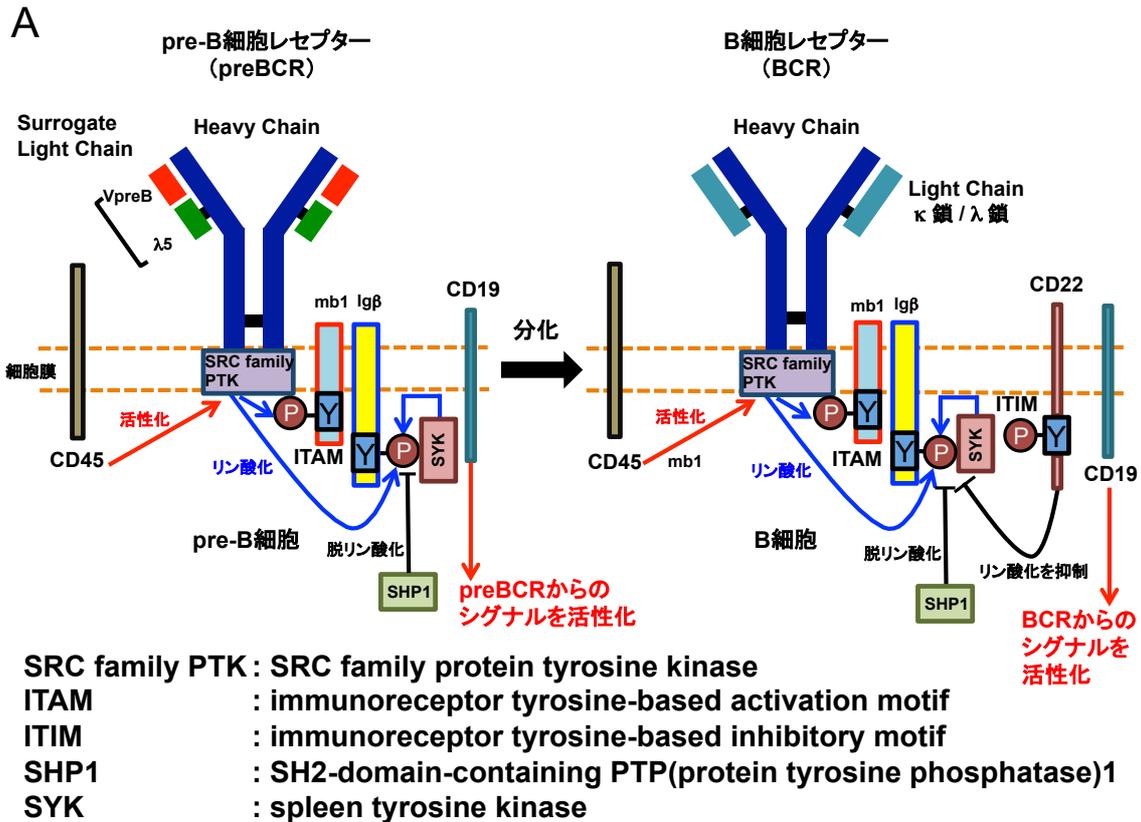


図4. preBCR、BCRの構造と遺伝子再構成

A. preBCR、BCRの構造

pre-B段階でpreBCRが発現し、その後にBCRが発現する。

preBCRはまずIg heavy chainの遺伝子再構成が誘導され、Ig light chainの代わりに surrogate light chainが発現することにより形成される。preBCRはmb1、Igβと複合体を形成し、細胞内にシグナルが導入されることにより分化、増殖が起こる。Ig light chainの遺伝子再構成が誘導され、surrogate light chainがlight chainと置き換わることによりpre-Bからimmature Bへ分化する。

B. Ig heavy chain遺伝子座における遺伝子再構成¹¹

再構成は、DJの再構成がCLPで誘導され、その後pro-B でV-DJの再構成が行われる。

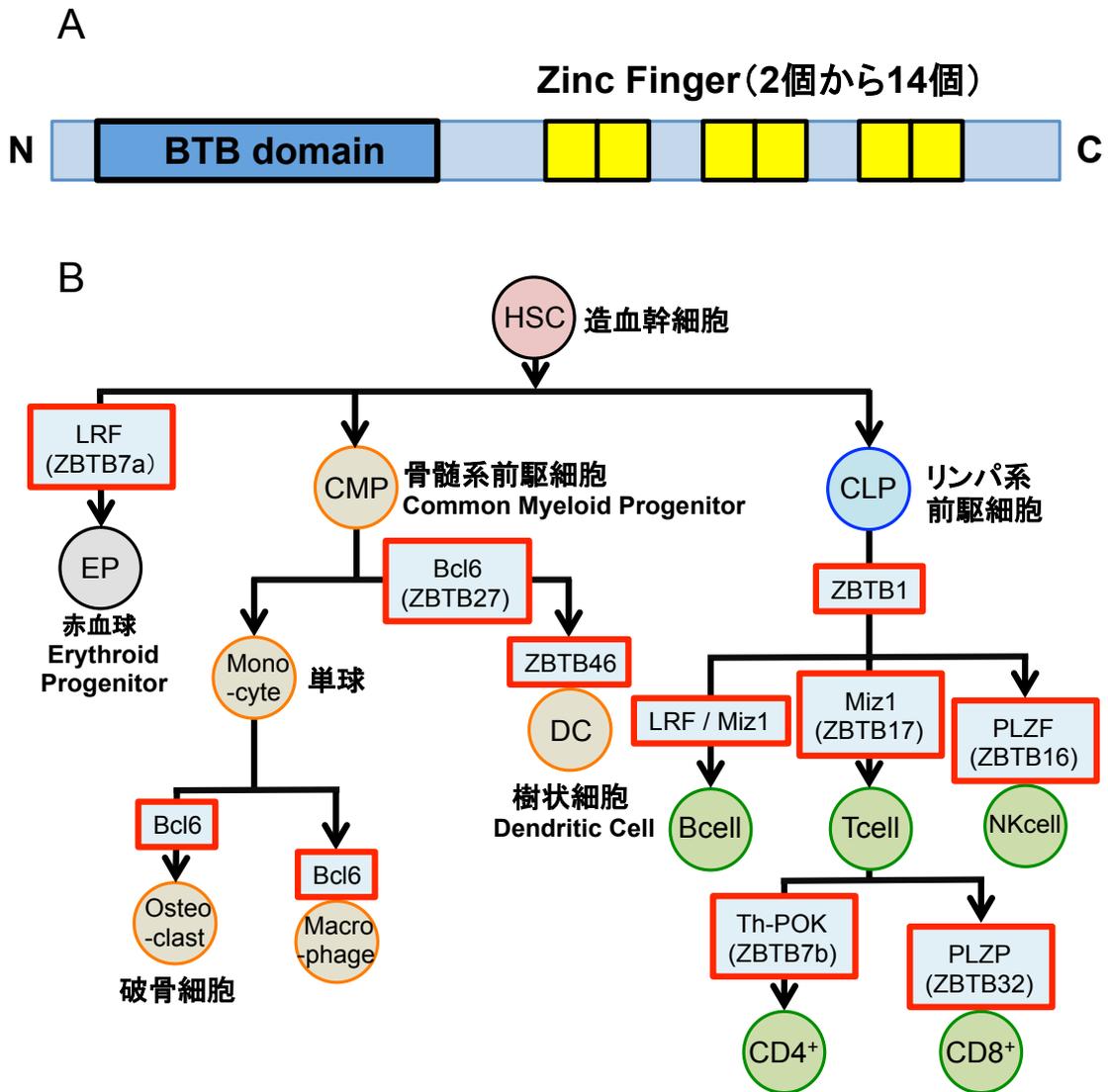


図5. BTB ZFファミリータンパク質の構造と造血系、免疫系での関与
A. BTB ZFファミリータンパク質の構造
 一般的な構造は、N末端側にBTBドメイン、C末端側に2個から14個のzinc fingerドメインを持つ。
B. 造血系、免疫系の分化に重要であるBTB ZFファミリータンパク質
 BTB ZFファミリーを構成する遺伝子の多くは、造血系、特に免疫系の分化に重要な役割を持つものが多い。

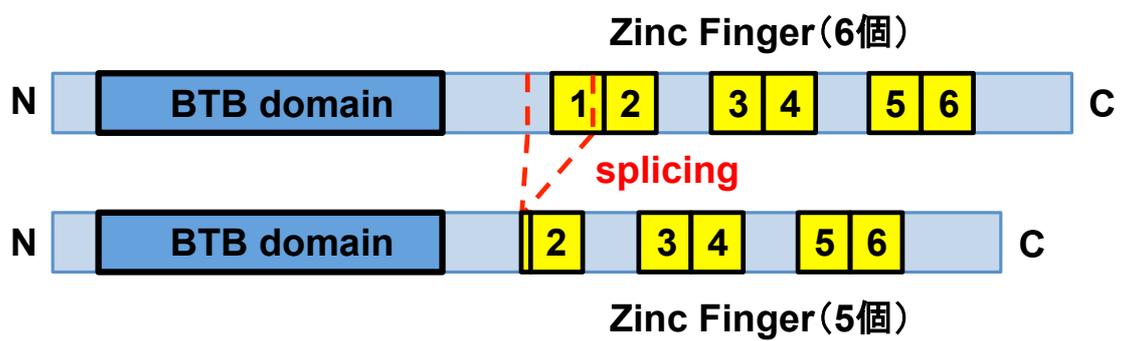


図6. ZNF131タンパク質の構造

ZNF131タンパク質は、N末端側にBTBドメイン、C末端側に6個のzinc fingerを持つものが一般的であるが、zinc fingerが5個のsplice variantも知られている。

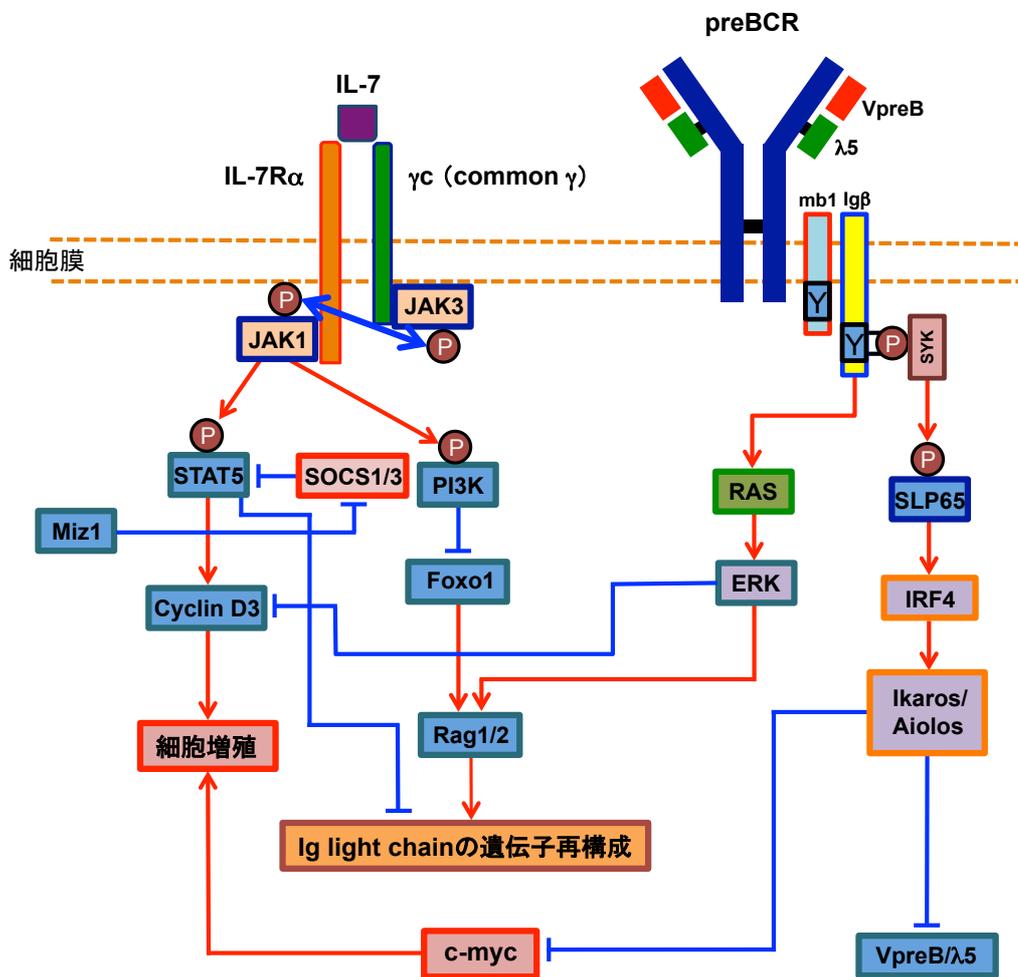


図7. pre-B段階におけるIL-7RとpreBCRによるシグナル伝達
 preBCRからのシグナルはSRCファミリーがmb1、IgβのITAMのチロシンをリン酸化しSYK（チロシンキナーゼ）がリクルートされることにより伝達される。IL-7RからのシグナルはJAK1（チロシンキナーゼ）が活性化することにより、STAT5がリン酸化され、リン酸化STAT5が核内に移動し転写因子として働き、細胞増殖等を誘導する。preBCRからmb1、Igβを介して伝達されたシグナルは、IRF4を活性化しIkaros/Aiolosを誘導させる。誘導されたIkaros/AiolosはVpreB/λ5を抑制することでpreBCRの発現を抑制し、またc-mycの発現を抑制することでpre-Bの増殖を停止させる。これによりIg light chainの遺伝子再構成が起こる。

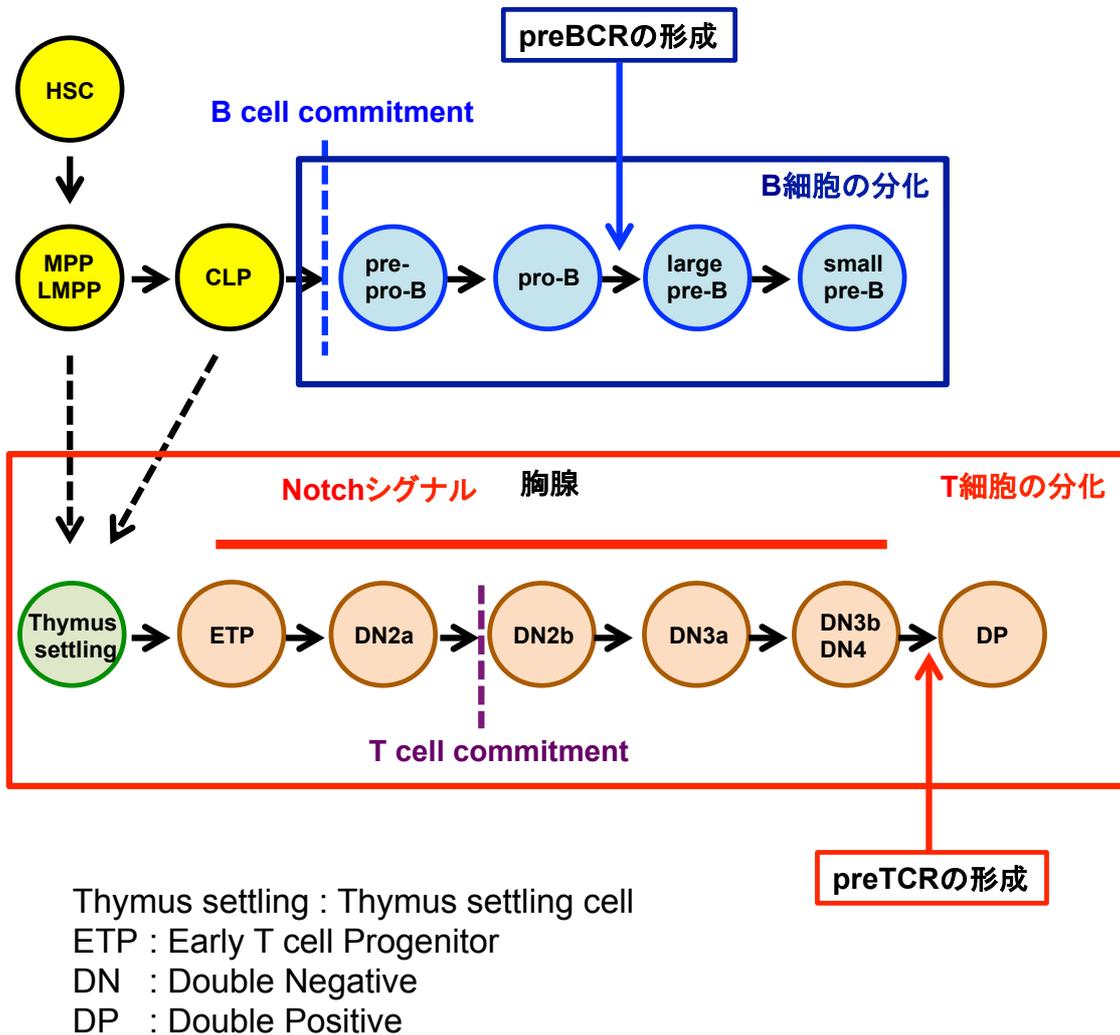


図8. B細胞とT細胞の分化過程の比較
 B細胞は骨髄に維持されるCLPから分化する。一方、T細胞はHSCからCLPへ分化し、胸腺へ移動した後、Notchシグナルが供給されることによりT細胞へ分化する。

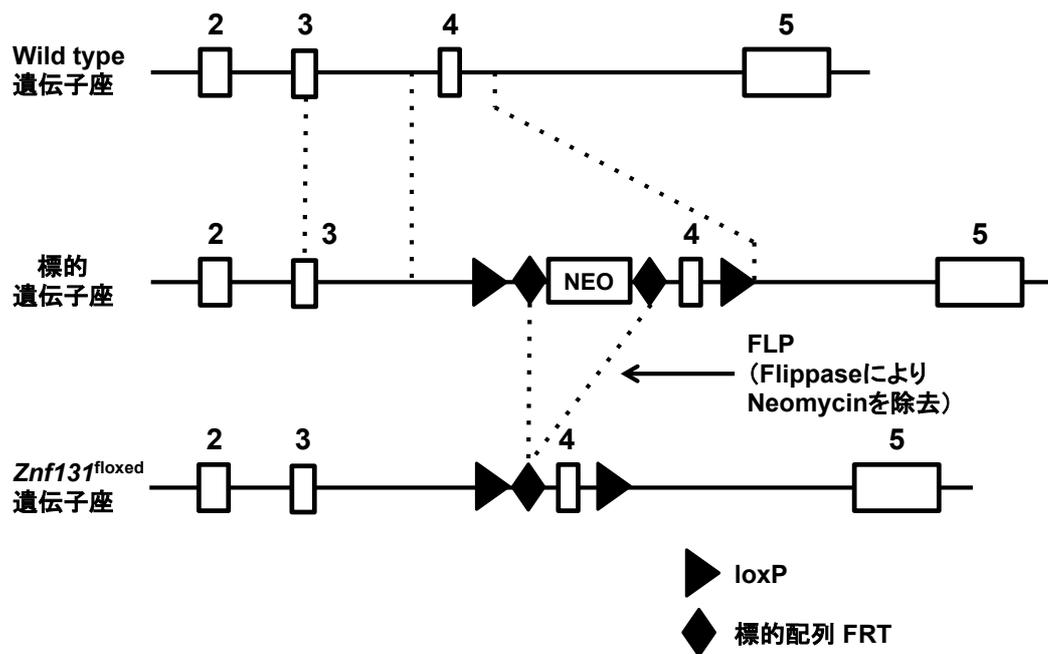


図9. loxPを挿入した*Znf131*遺伝子座
 ZNF131のZFの一部がコードされているエクソン4がloxPで挟まれておりcreにより欠失が誘導される²¹。

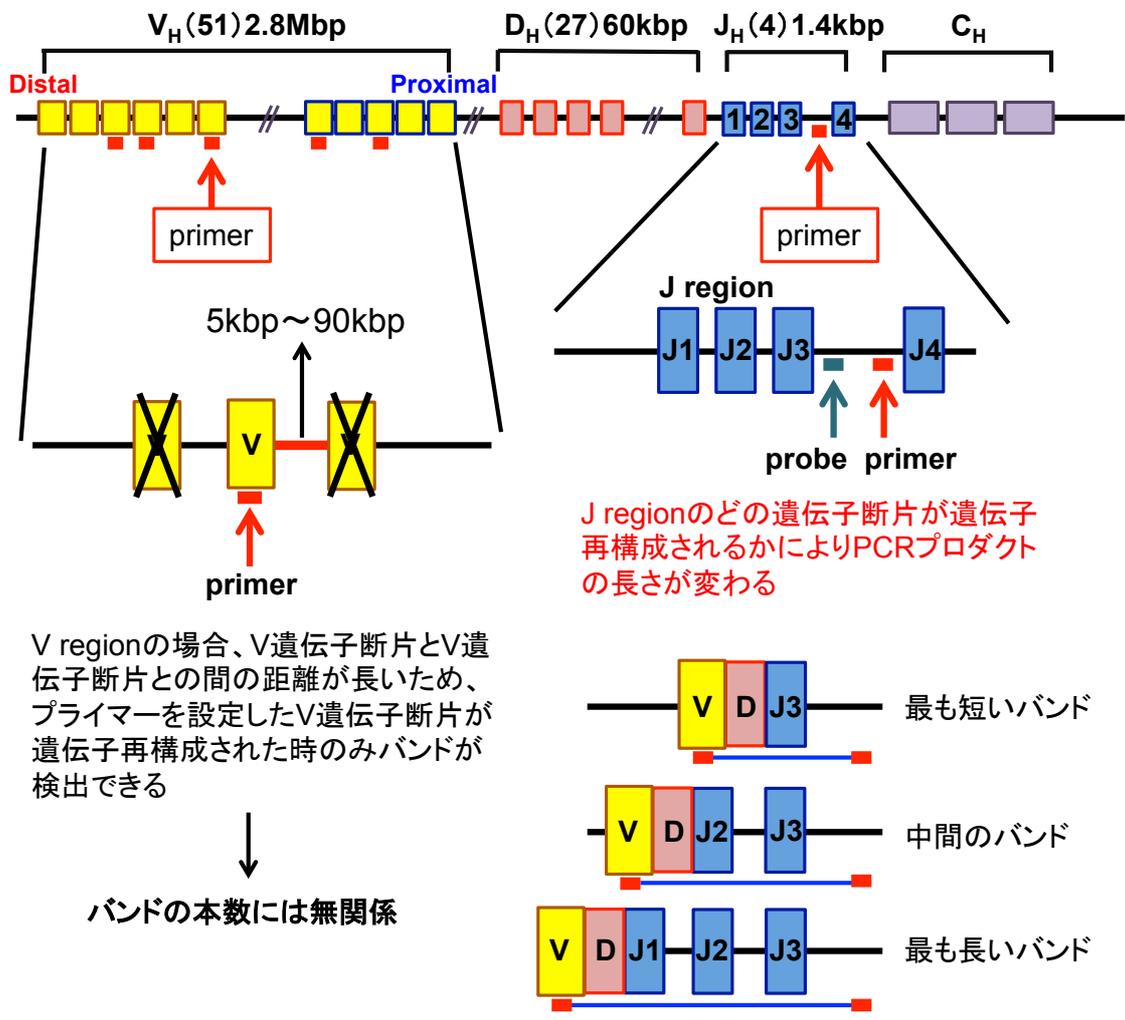


図10. PCR-サザンブロット解析により、遺伝子再構成が誘導される場合に異なる長さのPCRプロダクトが検出される理由

V regionの場合、V遺伝子断片間の長さが長いため、プライマーが設定されているV遺伝子断片がD遺伝子断片と結合した場合のみPCRで検出される。また、V regionは相同性が高いため、プライマーの結合部位が複数存在する。

一方、J regionに設定されたプライマーは、J遺伝子断片J1、J2、J3のどれがD遺伝子断片と結合するかにより、異なる長さの3本のバンドが検出される。

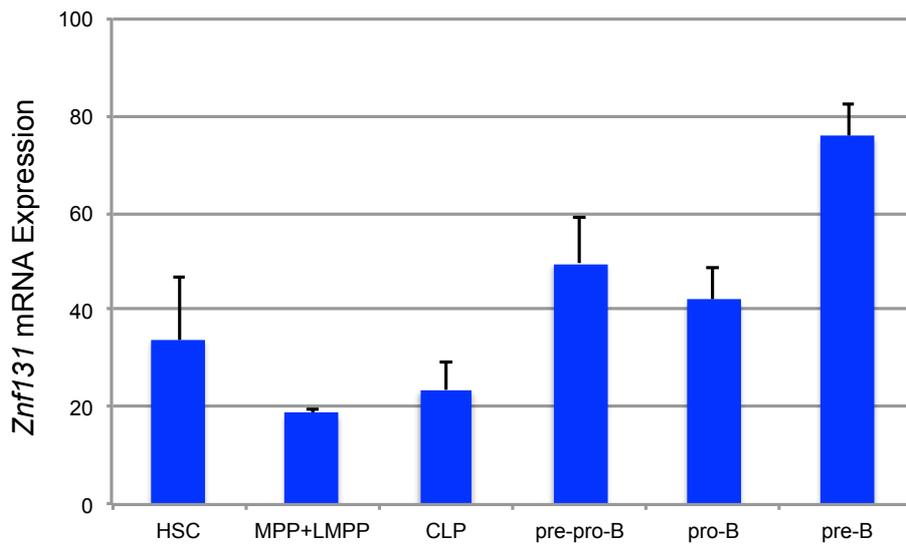


図11. *Znf131*mRNAの発現はB細胞の初期分化過程で亢進していたHSC、MPP+LMPP、CLPより、pre-pro-B以降の段階で発現の亢進が認められた。グラフは3回の独立実験 (N=3) を元に平均値+標準偏差を表す。

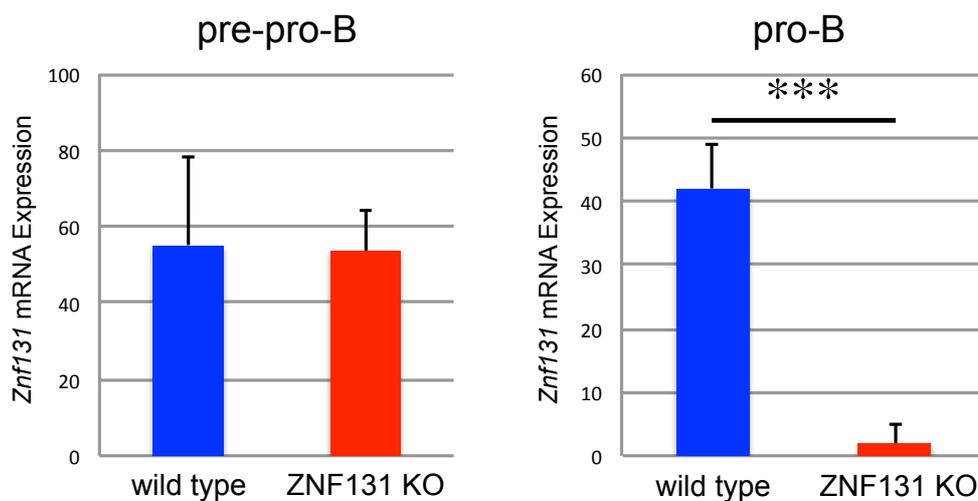
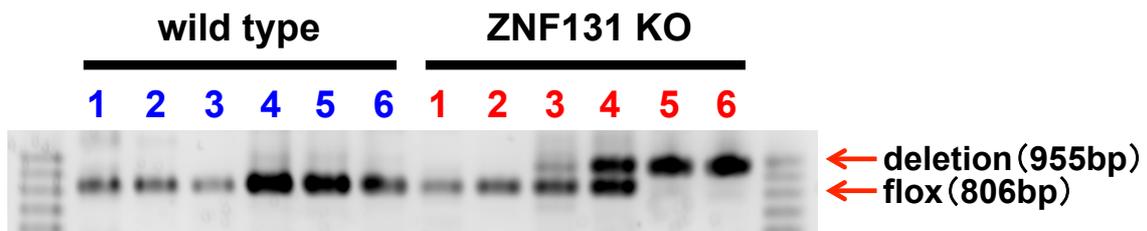


図12. ZNF131 KOにおける*Znf131*mRNAの発現の低下は、pro-B段階から起こった
 ZNF131 KOにおいてもpre-pro-Bでは*Znf131*mRNAの発現にはほぼ影響がなかったが、
 pro-Bではほとんど発現が見られなかった。
 グラフは3回の独立実験 (N=3) を元に平均値+標準偏差を表し、統計解析手法としてStudent's t-testを行った。
 P値 : ***p < 0.001



- 1 : HSC**
- 2 : MPP+LMPP**
- 3 : CLP**
- 4 : pre-pro-B**
- 5 : pro-B**
- 6 : pre-B**

図13. ZNF131 KOにおいてZNF131の欠失は、CLP段階から起こっていた genomic DNAのPCRによる解析から、CLPでは若干欠失が誘導され、pre-pro-Bにおいては明瞭に欠失が検出されたが、*Znf131*mRNAの発現解析の結果（図12）と合わせると、pre-pro-Bでの欠失率は低いと考えられる。pro-B以降は完全に欠失していた。図は1回の実験(N=1)を表す。

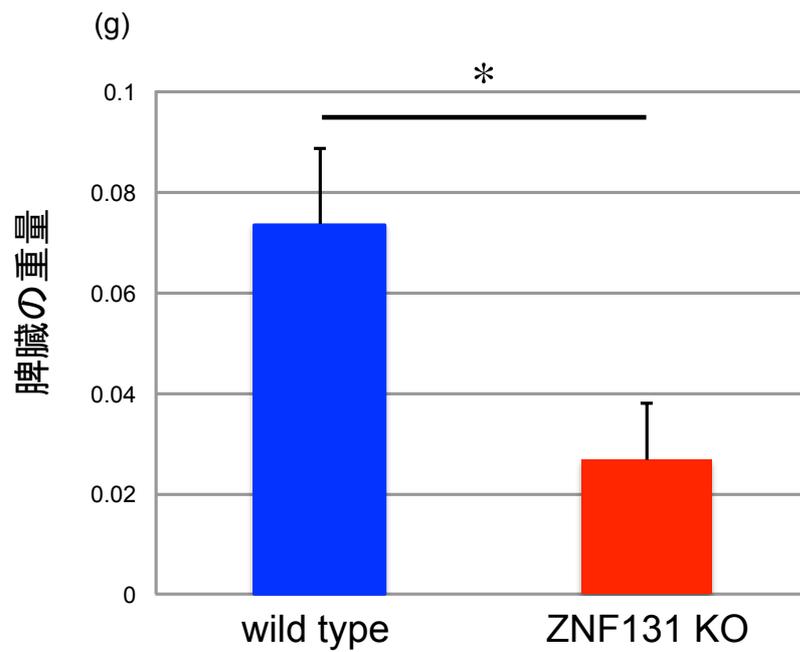


図14. ZNF131 KOにおける脾臓の重量はwild typeの約3分の1であった。ZNF131 KOでは、末梢においてB細胞が存在しないことが示唆された。グラフは3回の独立実験 (N=3) を元に平均値+標準偏差を表し、統計解析手法としてStudent's t-testを行った。 P値 : *p < 0.05

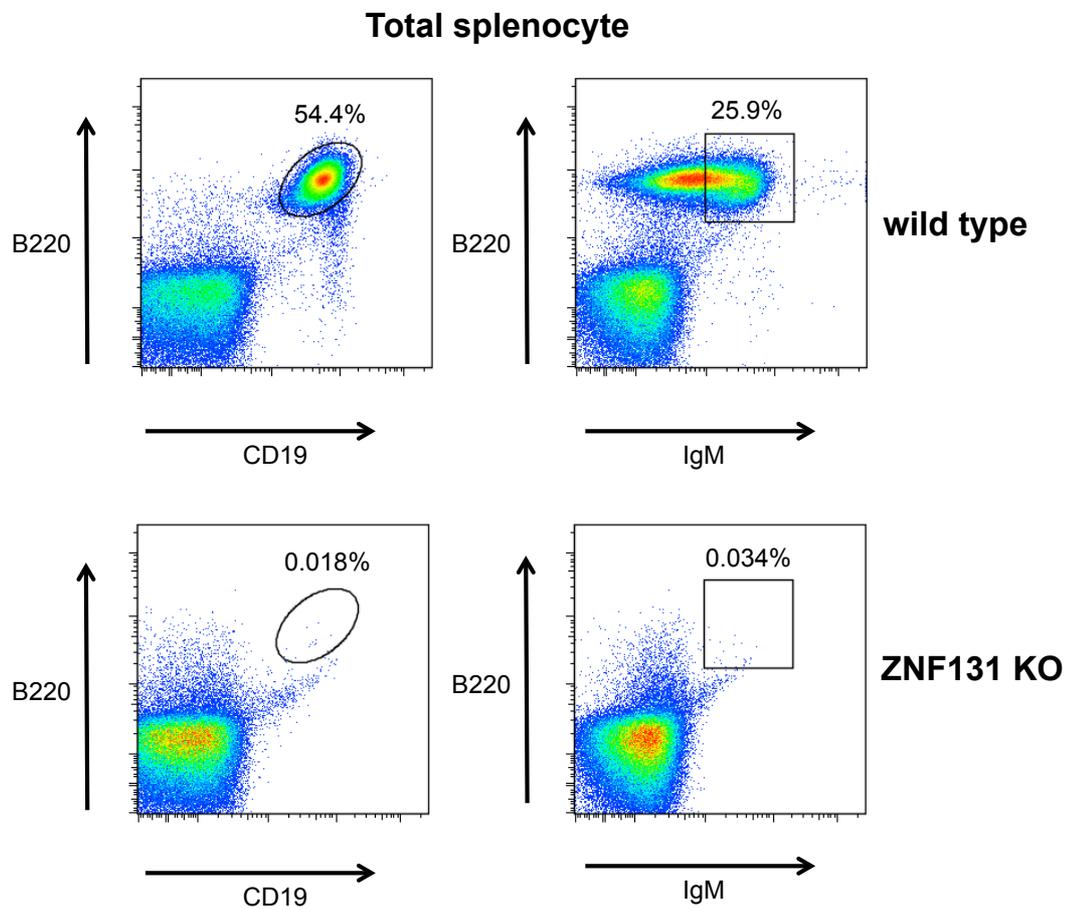


図15. ZNF131 KOの脾臓ではB細胞はほぼ存在しなかった
 脾臓細胞を抗B220抗体、抗CD19抗体、抗IgM抗体で染色し、FACS解析を行った。
 図は3回の独立実験 (N=3) の代表例を示す。

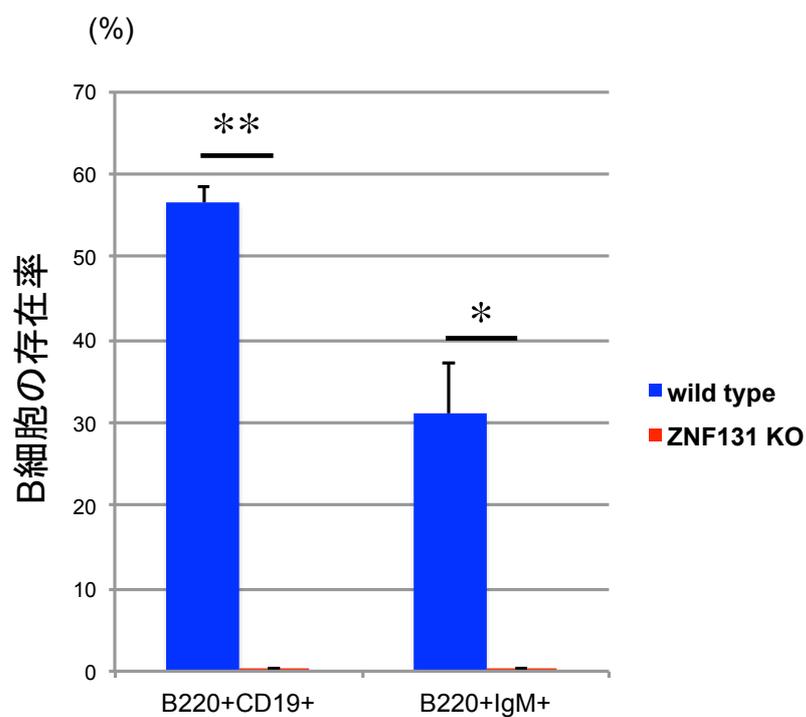


図16. ZNF131 KOの脾臓ではB細胞はほぼ存在しなかった
 図15から、B220+CD19+及びB220+IgM+の割合をグラフで示した。ZNF131 KOにおいてB細胞は激減していた。
 グラフは3回の独立実験 (N=3) を元に平均値+標準偏差を表し、統計解析手法としてStudent's t-testを行った。
 P値 : *p < 0.05 **p < 0.01

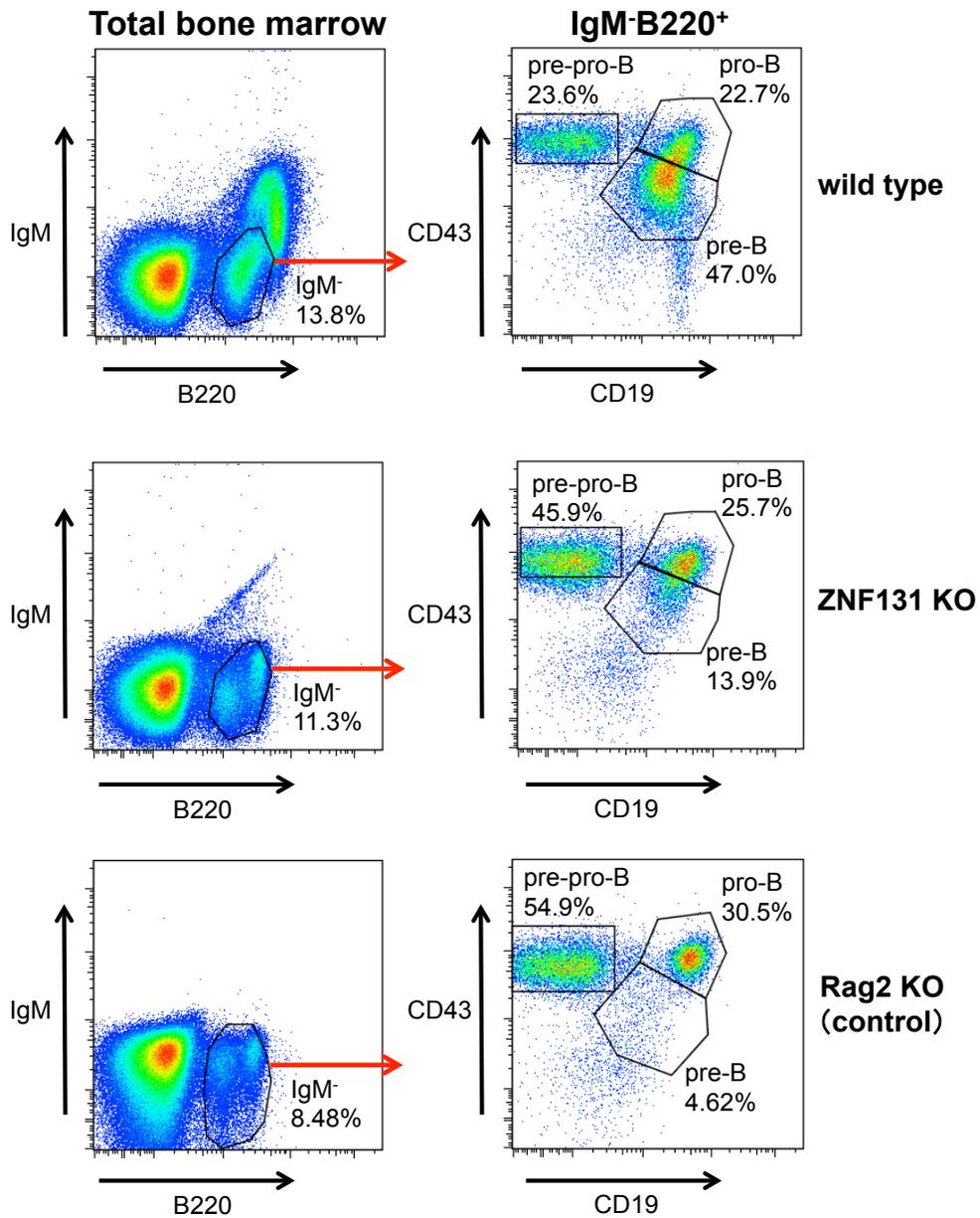


図17. 骨髄のB細胞の初期分化過程ではZNF131 KOのpre-Bの細胞の割合は減少した骨髄細胞を抗IgM抗体、抗B220抗体、抗CD43抗体、抗CD19抗体を用いて染色し、FACS解析を行った。ZNF131 KOではpre-pro-Bには影響がないがpro-Bは減少し、pre-Bはさらに減少していた。B細胞の初期分化過程の分画（ゲートの設定）にはpre-Bが存在しないRag2 KOを用いた。図は3回の独立実験（N=3）の代表例を示す。

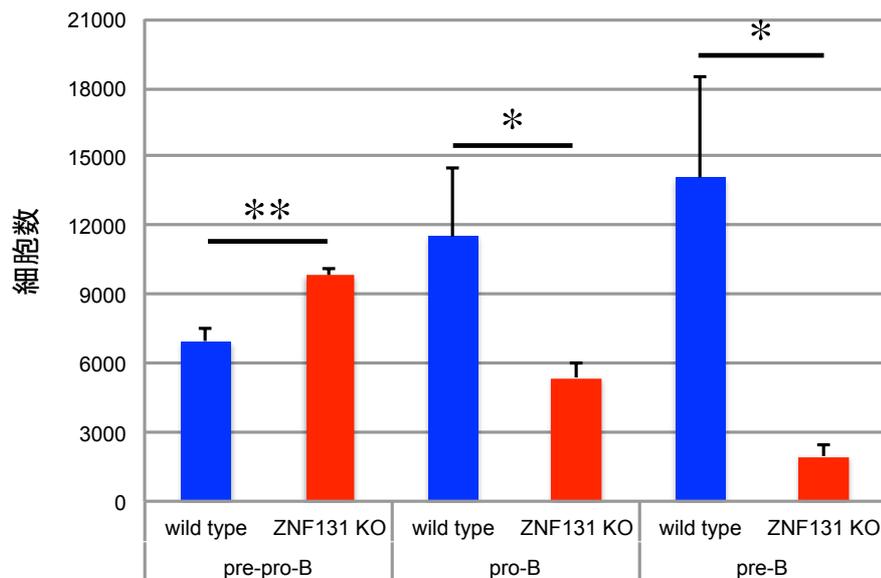


図18. ZNF131 KOではpro-B段階から細胞数が減少した
 wild type及びZNF131 KOマウスのpre-pro-B、pro-B、pre-Bの細胞数を比較した結果、
 pro-Bは半減し、pre-Bはさらに減少していた。
 グラフは3回の独立実験 (N=3) を元に平均値+標準偏差を表し、統計解析手法としてStudent's t-testを行った。
 P値 : *p < 0.05 **p < 0.01

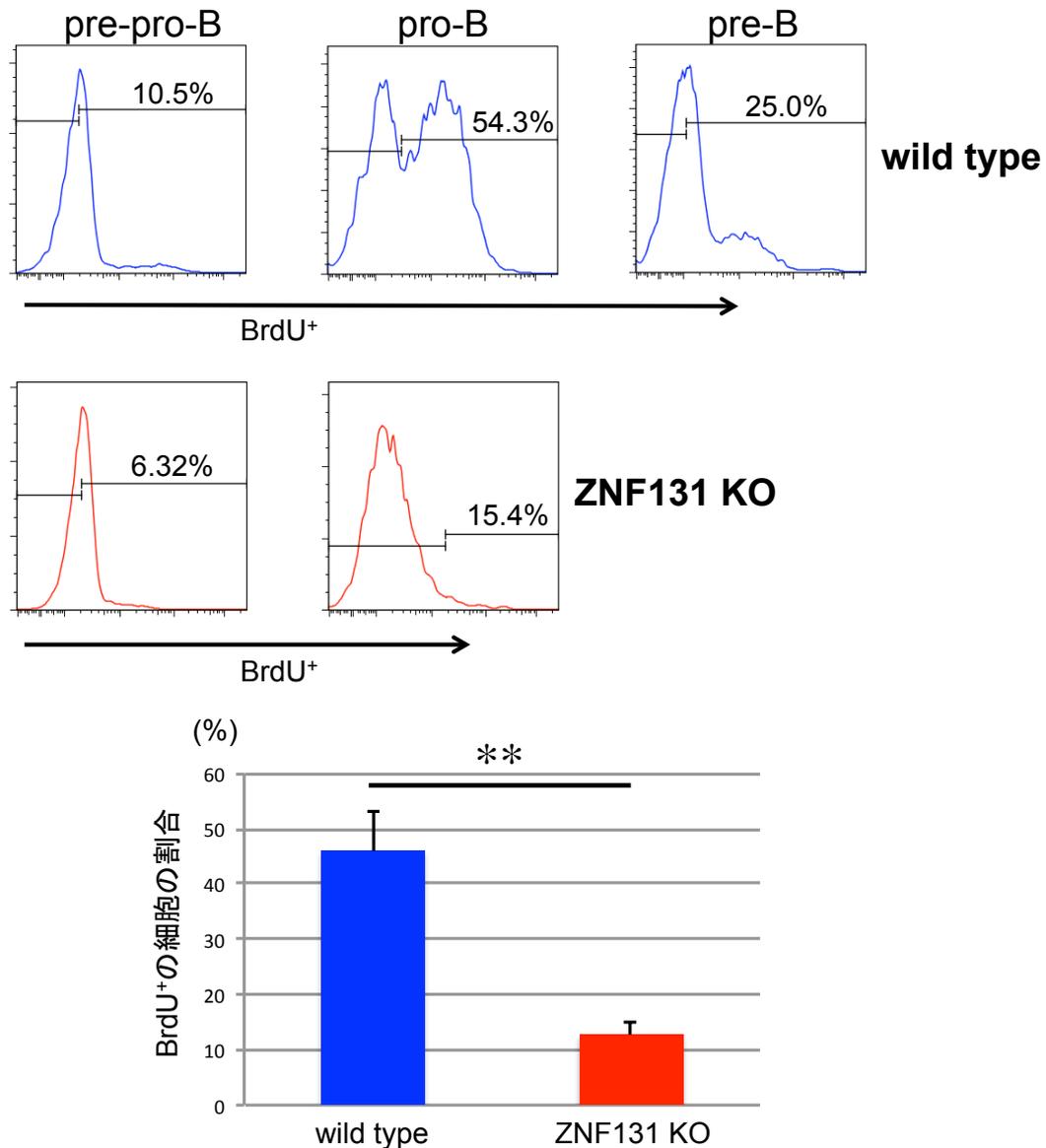


図19. wild typeのpro-Bでは細胞増殖が強く起こっており、ZNF131 KOのpro-Bでは細胞増殖が抑制された

BrdUの取り込みによるDNA合成の解析から、pre-pro-Bでは細胞増殖はほとんど起こっておらず、ZNF131 KOの影響も認められなかった。pro-BではZNF131の欠失により細胞増殖が強く抑制された。

ヒストグラムは3回の独立実験 (N=3) の代表例を、グラフは3回の独立実験 (N=3) を元に平均値+標準偏差を表し、統計解析手法としてStudent's t-testを行った。

P値 : **p < 0.01

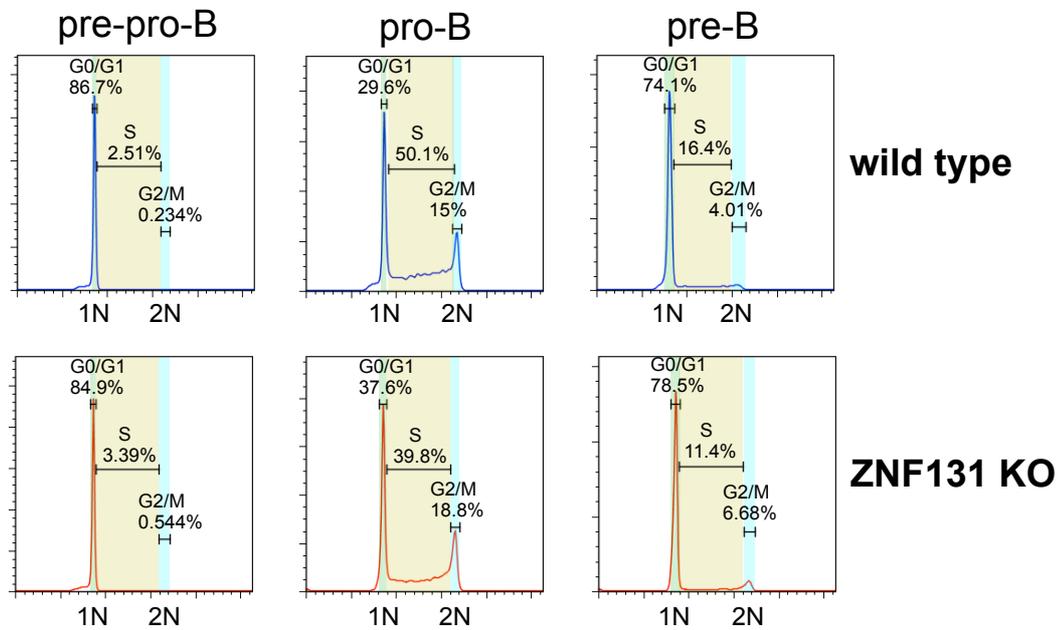


図20. ZNF131 KOのpro-B及びpre-Bでは、S期の減少とG1期の増大が認められた
 ZNF131 KOのpro-Bでは細胞増殖が強く抑制されているが（図19）、細胞周期における細胞増殖の停止時期は、G1期が多いものの、特定の段階に限定されていないと考えられた。
 ヒストグラムは1回の実験(N=1)を表す。

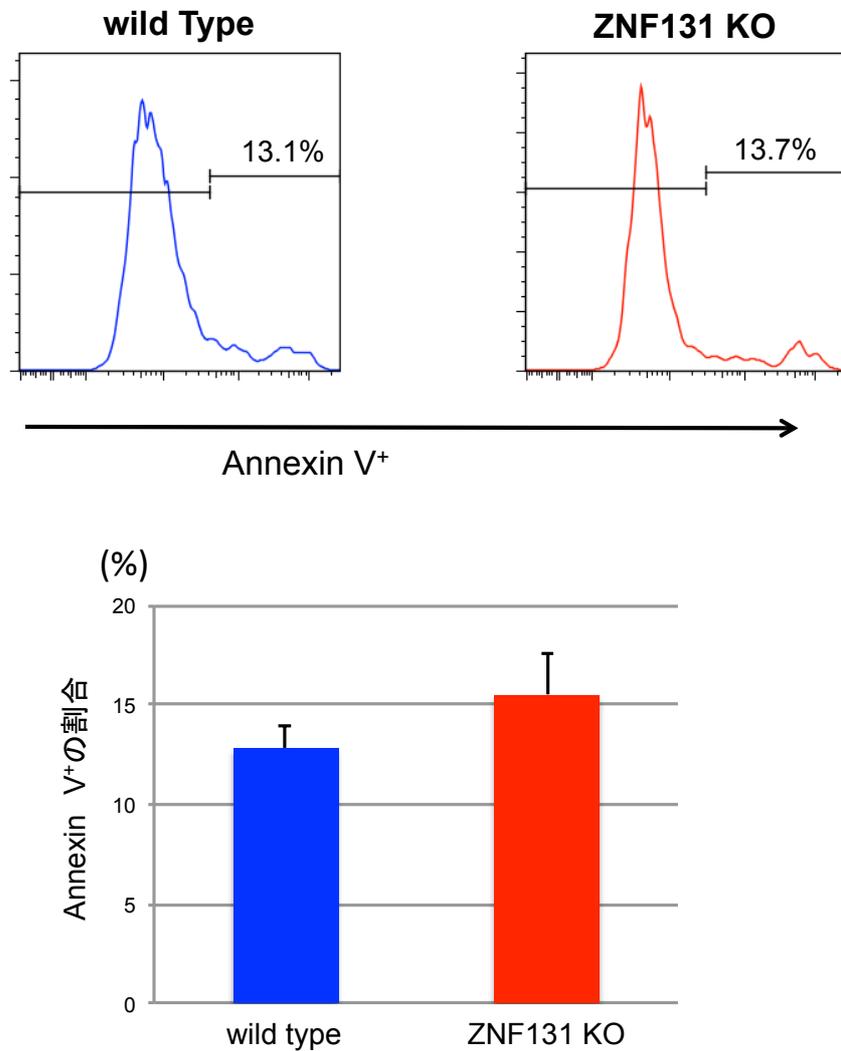


図21. ZNF131 KOのpro-Bにおいてcell deathの亢進は見られなかった
 cell deathが観察されるコントロールを基準にして解析した結果、ZNF131 KOにおいても、
 cell deathはほぼ認められなかった。
 ヒストグラムは3回の独立実験 (N=3) の代表例を、グラフは3回の独立実験 (N=3) を元に平
 均値+標準偏差を表し、統計解析手法としてStudent's t-testを行った。

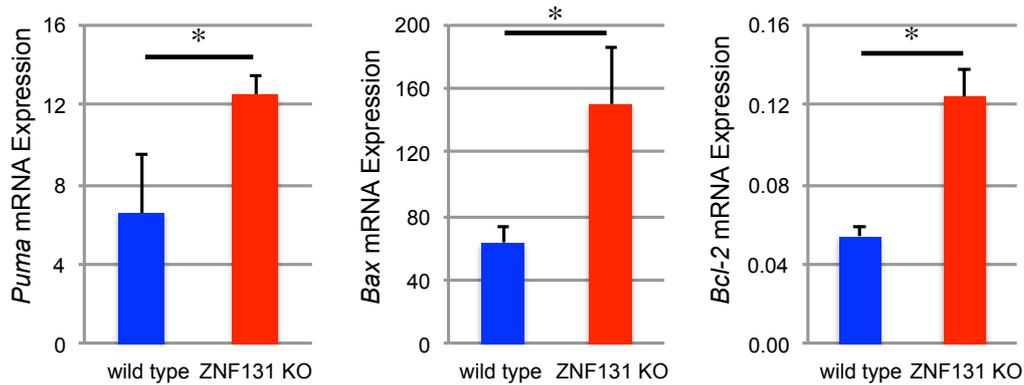


図22. ZNF131 KOにおけるpro-Bでは、cell deathを促進する遺伝子及び抑制する遺伝子の発現が共に認められた

cell deathを促進する遺伝子、*Puma* (*Bbc3*)、*Bax*の発現が亢進していた。また、IL-7で誘導され、cell deathを抑制する遺伝子*Bcl-2*の発現も亢進した。ZNF131 KOのpro-Bでは、cell deathを促進させる作用と、反対にcell deathを抑制しようとする作用が対立していることが示唆された。

グラフは3回の独立実験 (N=3) を元に平均値 + 標準偏差を表し、統計解析手法として

Student's t-testを行った。

P値 : *p < 0.05

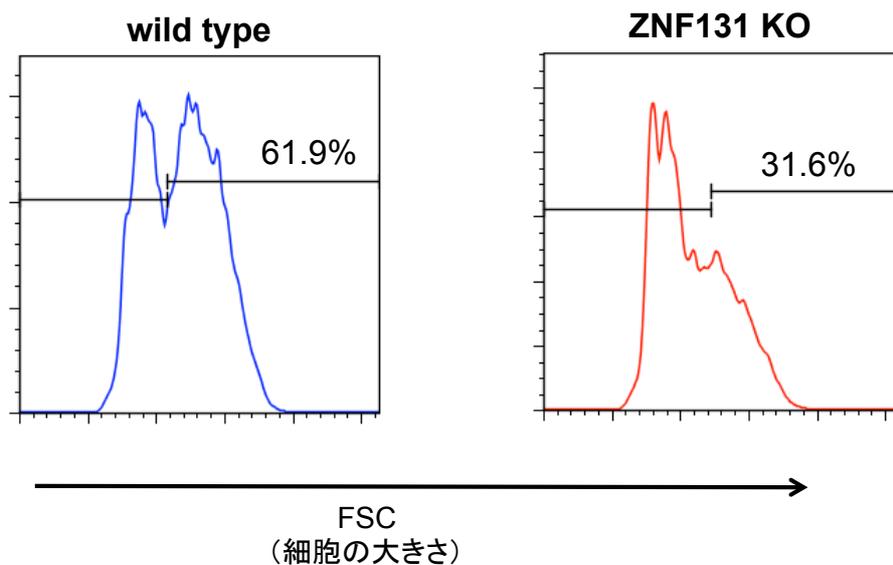


図23. ZNF131 KOにおいてもFSCはwild typeの約半分程度認められ休止期ではないことが示唆された

wild type及びZNF131 KOのpro-BにおけるFSCをヒストグラムにより比較した。pro-BではIL-7シグナルの導入により、休止期であった細胞が活性化されFSCの増大が見られる。ZNF131 KOにおいてはFSCはwild typeより減少するが、FSCの増大が認められたことから、IL-7シグナルが導入されていると考えられた。ヒストグラムは3回の独立実験 (N=3) の代表例を示す。

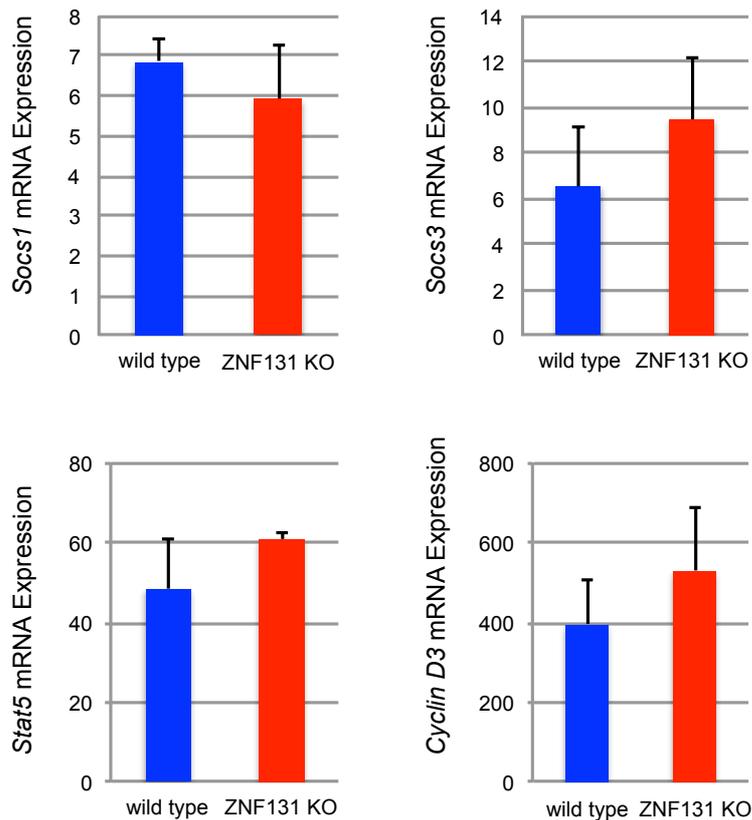


図24. IL-7により誘導される遺伝子の発現解析から、ZNF131 KOのpro-BにおいてもIL-7シグナルは導入されていることが示唆された

IL-7シグナルにより誘導される*Socs1*、*Socs3*、*Cyclin D3*の発現に影響は見られず、wild typeの細胞と同様にZNF131 KOの細胞でもIL-7シグナルが導入されていると考えられた。グラフは3回の独立実験 (N=3) を元に平均値+標準偏差を表し、統計解析手法としてStudent's t-testを行った。

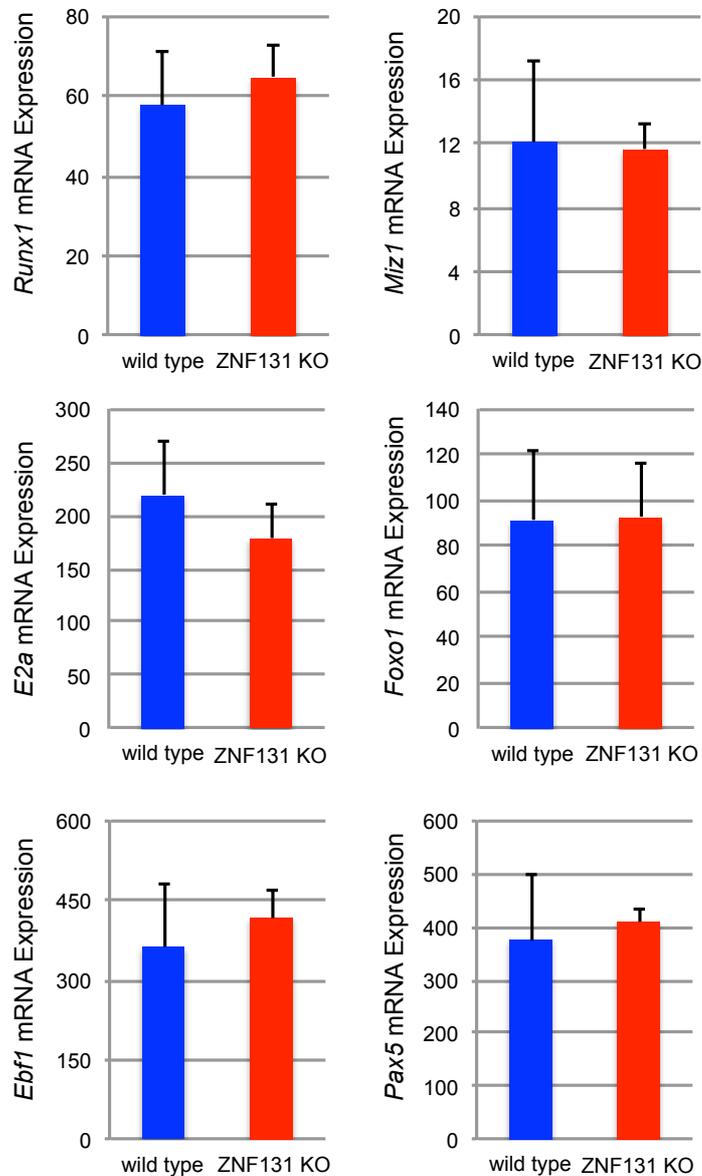


図25. ZNF131 KOのpro-Bにおいて、B細胞分化に中心的な役割を担う転写因子集団の発現には影響は見られなかった

B細胞の分化に重要な遺伝子の発現は、ZNF131 KOでもwild typeと差は見られなかった。グラフは3回の独立実験 (N=3) を元に平均値 + 標準偏差を表し、統計解析手法として Student's t-testを行った。

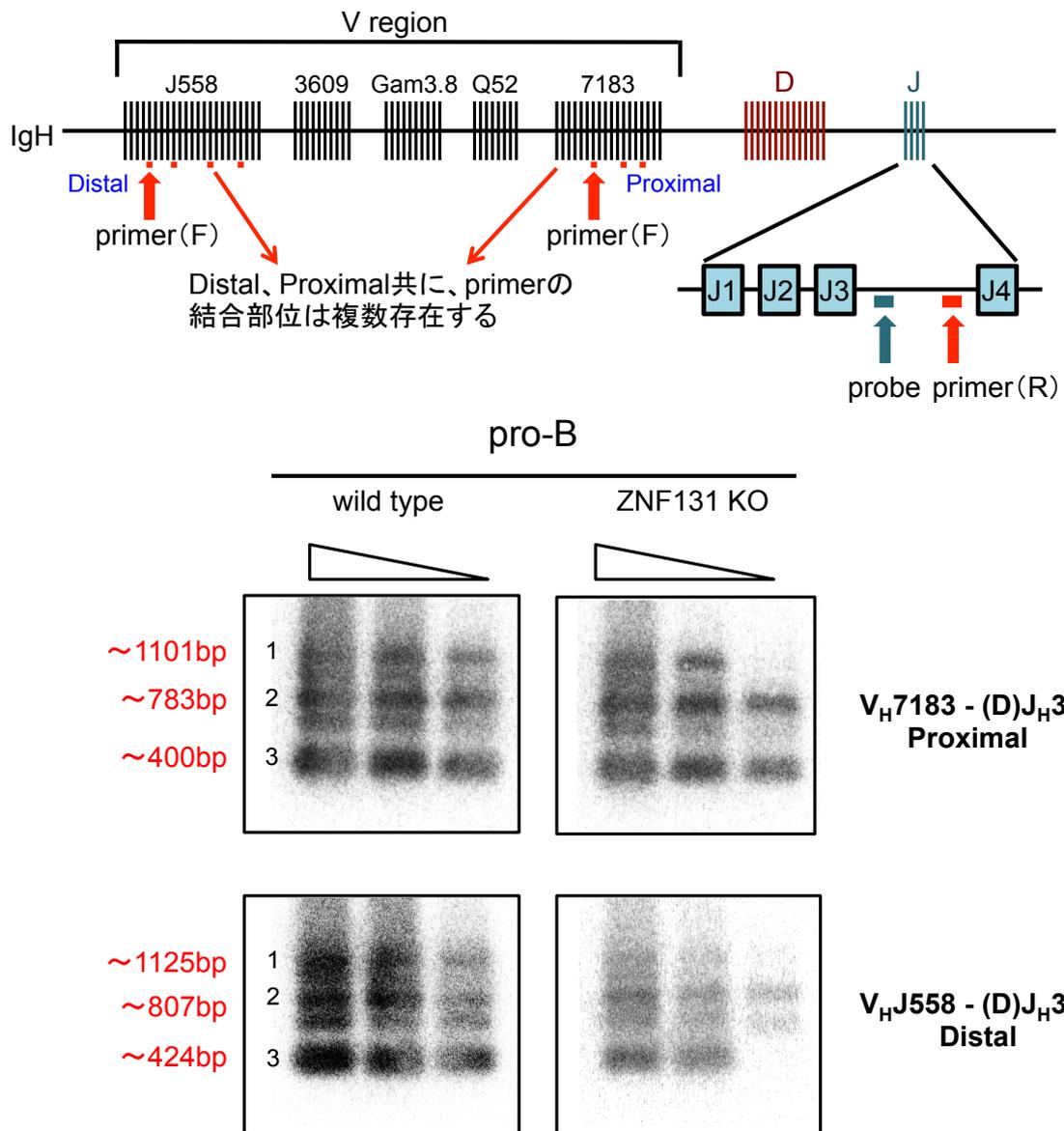


図26. ZNF131 KO のpro-Bにおいても、Ig heavy chainの遺伝子再構成は検出された上段は、Ig heavy chainの遺伝子座の構造を示す。T細胞でのT細胞受容体遺伝子の遺伝子再構成と同様に、ZNF131は抗体遺伝子の遺伝子再構成に必須ではないと考えられる。図は1回の実験(N=1)を表す。

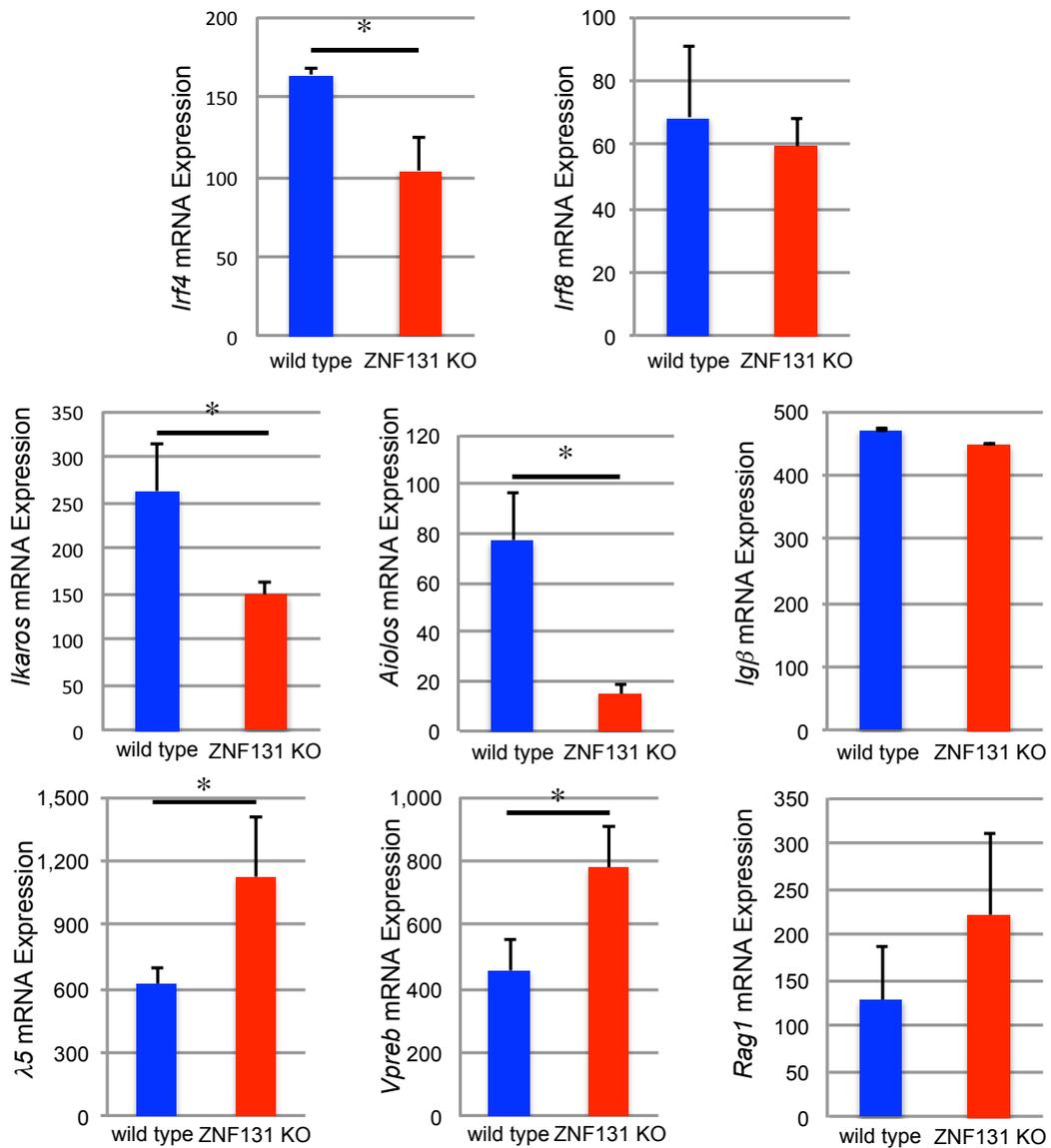


図27. pro-Bでは、preBCRシグナル伝達に重要な経路の一つが既に存在し、ZNF131を欠失した結果、preBCRシグナルによる活性化とは逆のシグナルが伝達された。そのため、surrogate light chainの発現亢進が認められた。グラフは3回の独立実験 (N=3) を元に平均値 + 標準偏差を表し、統計解析手法として Student's t-testを行った。 P値 : *p < 0.05

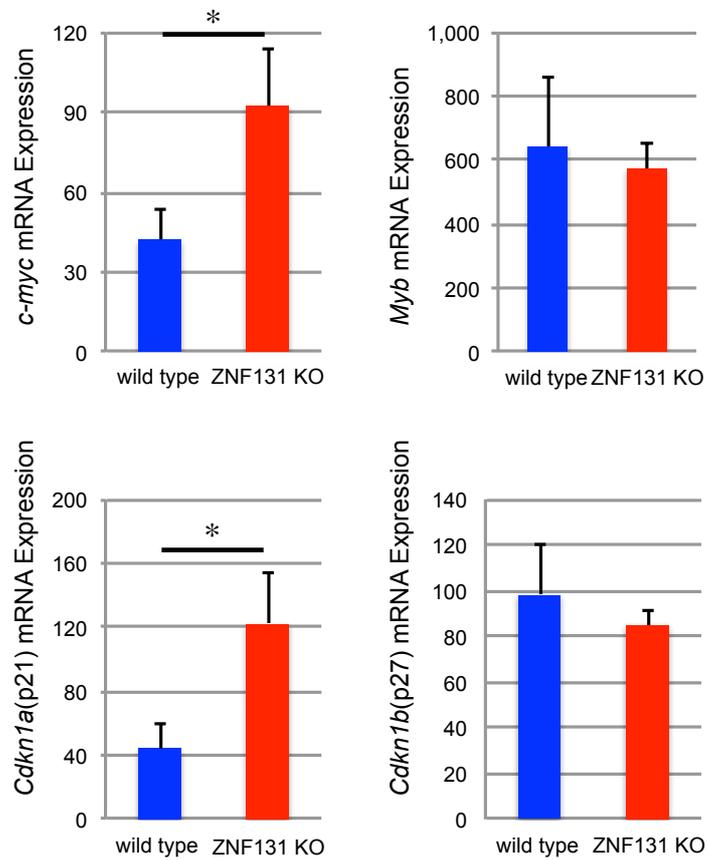


図28. ZNF131 KOのpro-Bでは、細胞増殖を促進する遺伝子及び抑制する遺伝子の発現が共に亢進していた

ZNF131 KOにおいて、細胞増殖を促進する*c-myc*及びcell cycleを抑制する*Cdkn1a*(p21)の発現の亢進が見られた。

グラフは3回の独立実験(N=3)を元に平均値+標準偏差を表し、統計解析手法として

Student's t-testを行った。

P値 : *p < 0.05

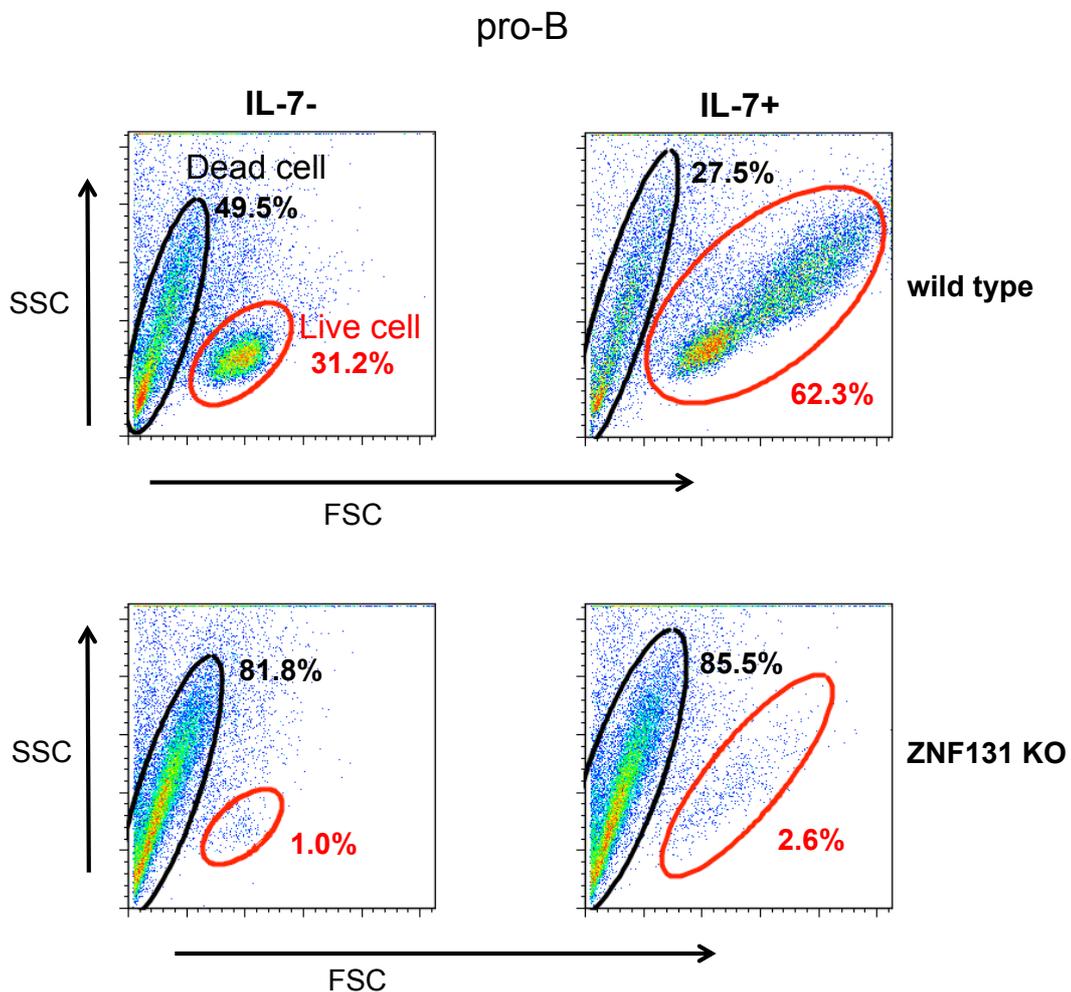


図29. pro-Bを細胞培養したところ、ZNF131を欠失させた場合、cell deathが亢進した *in vitro*において、IL-7添加と非添加で48時間培養したwild type及びZNF131 KOのpro-Bの生存細胞率を比較したところ、IL-7存在下であっても、ZNF131 KOにおいては生存細胞の割合が激減していた。

*in vitro*ではZNF131 KOにおいてcell deathが強く誘導されていることが示唆された。図は、wild type 2回 (N=2)、ZNF131 KO 1回 (N=1) の実験の代表例を表す。

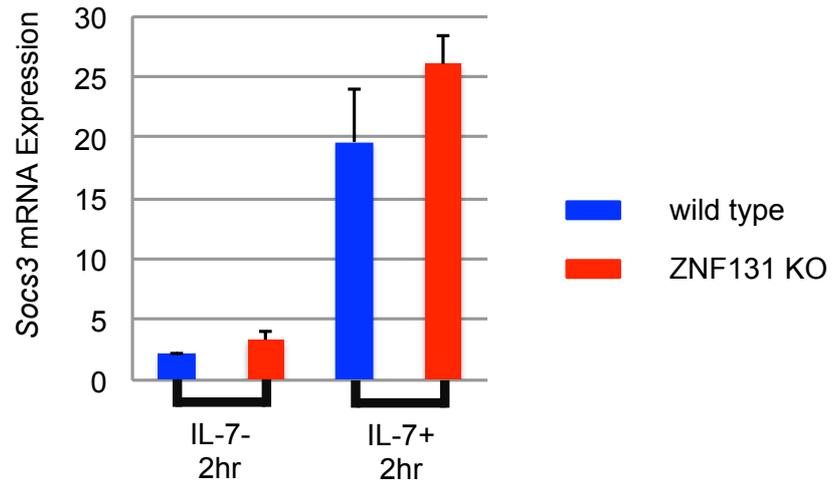
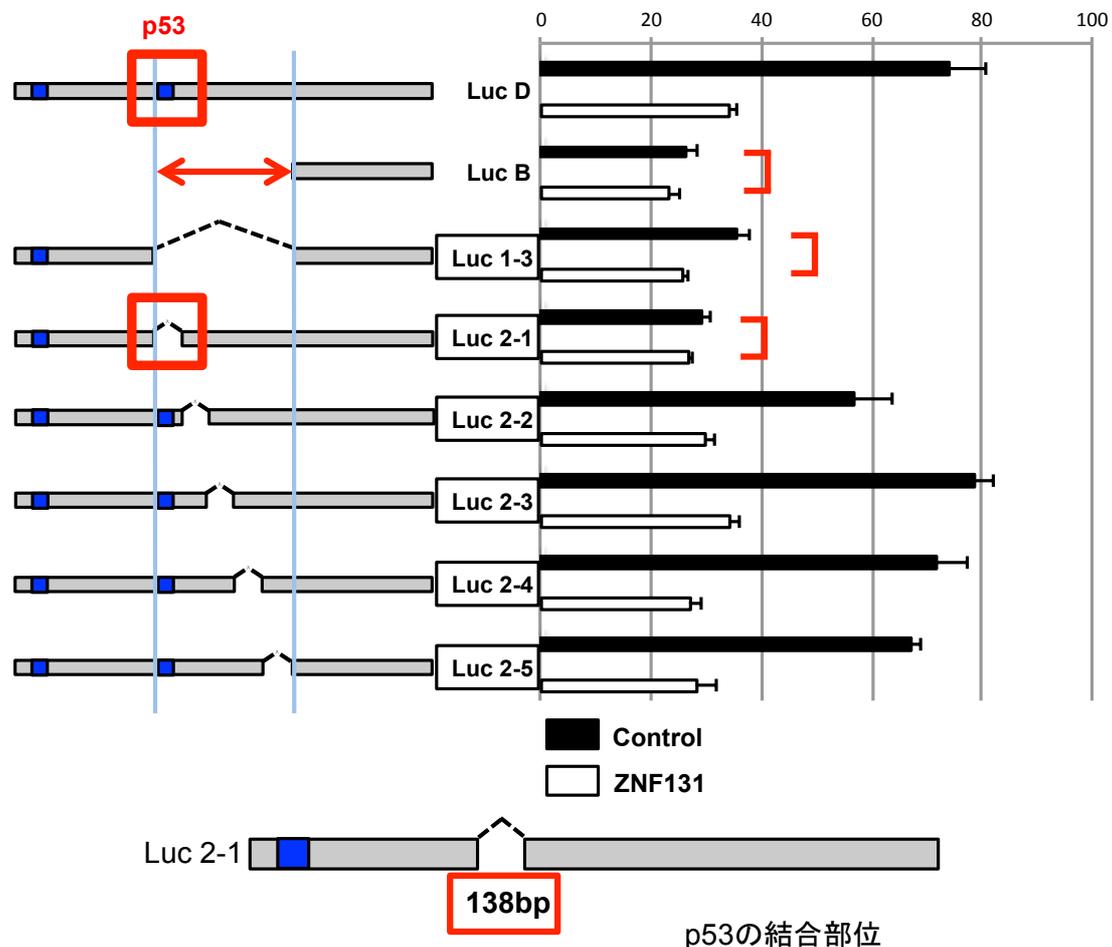


図30. ZNF131を欠失したpro-Bにおいて、in vitro系で、IL-7シグナルの導入により誘導される遺伝子の発現に影響は見られなかった
 ZNF131 KOにおいても、IL-7シグナルにより誘導されるSoccs3は強く誘導されており、IL-7シグナルが導入されていると考えられた。
 グラフは3回の独立実験 (N=3) を元に平均値 + 標準偏差を表し、統計解析手法として Student's t-testを行った。



5' – GAGGTCAGCTGCGTTAGAGGAAGAAGACTGGGCATGTCTGGGCAGAGATT
TCCAGACTCTGAGCAGCCTGAGATGTACAGTAATTGTAGCTGCTCCAAGCCTGGT
TTCTGTTTTTTAGTGGGATTTCTGTTTCAGATGAA – 3'

図31. レポーターアッセイにより、p21プロモーター領域におけるZNF131制御領域が138bpに限定され、この制御領域にはp53の結合領域が含まれていた
上段左は、レポーターアッセイに用いたプラスミドを示し、p21プロモーターに対するZNF131による転写抑制活性をNIH/3T3細胞を用いて解析した。p53結合領域を含む138bpの領域がZNF131が作用する配列を含む。p53はp21プロモーターに対して転写誘導活性を持つため、ZNF131による抑制活性が、p53を介するのか、そうでないのか明らかにする必要がある。上段右グラフは、3回の独立実験(N=3)を元に平均値+標準偏差を表す。
下段は、限定されたZNF131の制御領域及び塩基配列であり、p53の結合部位が含まれる。

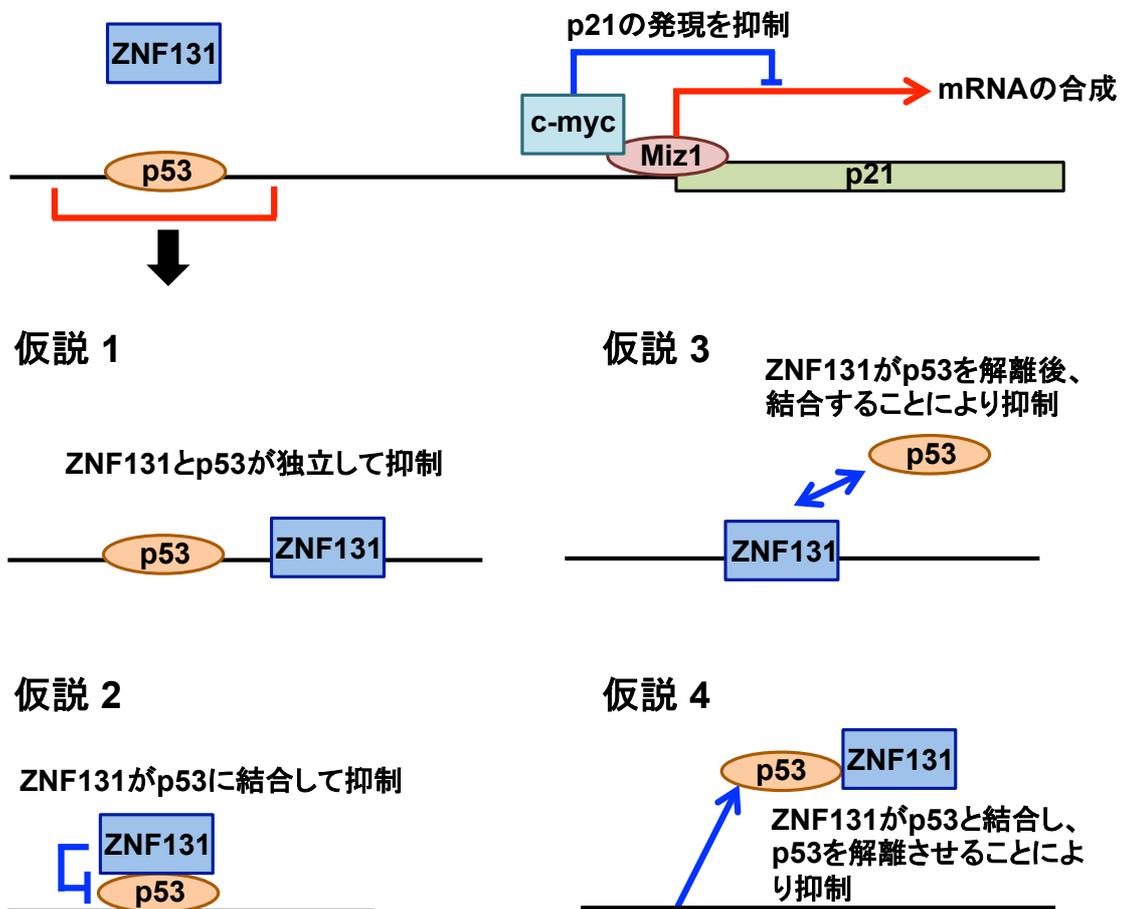


図32. ZNF131とp53の関係について、現時点で考えられる仮説
 p21のプロモーター活性はp53が正の制御を行っていることが知られている。
 レポーターアッセイの結果から、p21プロモーターにおけるZNF131の制御領域が限定され、p53の結合部位が含まれていたことから、ZNF131とp53の関係について仮説1から4が考えられた。

7. 謝辞

本研究において、指導教授であり、丁寧且つ熱心な研究指導を頂きました東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学 渡邊すみ子特任教授、また、懇切丁寧に熱心な研究指導を頂きました公益財団法人 東京都医学総合研究所 免疫遺伝子研究室 宮武昌一郎先生に心より深く感謝致します。また、本研究の細部に渡り、終始懇切丁寧にご指導、ご助言を頂きました公益財団法人 東京都医学総合研究所 免疫遺伝子研究室 井口智弘先生に心より深く感謝致します。そして本研究の全般に渡り多くの貴重なご助言、ご協力を頂きました公益財団法人 東京都医学総合研究所 免疫遺伝子研究室 青木和久先生、研究生活においてご協力、激励を頂きました公益財団法人 東京都医学総合研究所 ゲノム動態プロジェクト・免疫遺伝子研究室の皆様へ深く感謝致します。最後に、精神面においていつも励まし、支えて下さった家族に心から感謝致します。

8. 引用文献

1. Martin, F. & Kearney, J.F. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* **2**, 323-335 (2002).
2. Hardy, R.R. & Hayakawa, K. Perspectives on fetal derived CD5 B1 B cells. *Eur J Immunol* (2015).
3. Hardy, R.R. & Hayakawa, K. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* **19**, 595-621 (2001).
4. Bemark, M. Translating transitions - how to decipher peripheral human B cell development. *J Biomed Res* **29**, 264-284 (2015).
5. Ramirez, J., Lukin, K. & Hagman, J. From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. *Curr Opin Immunol* **22**, 177-184 (2010).
6. Rothenberg, E.V. Transcriptional control of early T and B cell developmental choices. *Annu Rev Immunol* **32**, 283-321 (2014).
7. Monroe, J.G. ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol* **6**, 283-294 (2006).
8. Kosan, C. *et al.* Transcription factor miz-1 is required to regulate interleukin-7 receptor signaling at early commitment stages of B cell differentiation. *Immunity* **33**, 917-928 (2010).
9. Wei, C., Zeff, R. & Goldschneider, I. Murine pro-B cells require IL-7 and its receptor complex to up-regulate IL-7R alpha, terminal deoxynucleotidyltransferase, and c mu expression. *J Immunol* **164**, 1961-1970 (2000).
10. Niebuhr, B. *et al.* Runx1 is essential at two stages of early murine B-cell development. *Blood* **122**, 413-423 (2013).
11. Schatz, D.G. & Ji, Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol* **11**, 251-263 (2011).
12. Mandel, E.M. & Grosschedl, R. Transcription control of early B cell differentiation. *Curr Opin Immunol* **22**, 161-167 (2010).
13. Clark, M.R., Mandal, M., Ochiai, K. & Singh, H. Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **14**, 69-80 (2014).
14. Oh, Y. & Chung, K.C. Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of

- zinc finger protein 131 potentiates its negative effect on estrogen signaling. *J Biol Chem* **287**, 17517-17529 (2012).
15. Siggs, O.M. & Beutler, B. The BTB-ZF transcription factors. *Cell Cycle* **11**, 3358-3369 (2012).
 16. Tommerup, N. & Vissing, H. Isolation and fine mapping of 16 novel human zinc finger-encoding cDNAs identify putative candidate genes for developmental and malignant disorders. *Genomics* **27**, 259-264 (1995).
 17. Donaldson, N.S. *et al.* Kaiso regulates Znf131-mediated transcriptional activation. *Exp Cell Res* **316**, 1692-1705 (2010).
 18. Oh, Y. & Chung, K.C. Zinc finger protein 131 inhibits estrogen signaling by suppressing estrogen receptor alpha homo-dimerization. *Biochem Biophys Res Commun* **430**, 400-405 (2013).
 19. Corfe, S.A. & Paige, C.J. The many roles of IL-7 in B cell development; mediator of survival, proliferation and differentiation. *Semin Immunol* **24**, 198-208 (2012).
 20. Hobeika, E. *et al.* Testing gene function early in the B cell lineage in mbl-cre mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13789-13794 (2006).
 21. Iguchi, T. *et al.* BTB-ZF Protein Znf131 Regulates Cell Growth of Developing and Mature T Cells. *J Immunol* **195**, 982-993 (2015).
 22. Kim, M.S. *et al.* A draft map of the human proteome. *Nature* **509**, 575-581 (2014).
 23. Venigalla, R.K. *et al.* PDK1 regulates VDJ recombination, cell-cycle exit and survival during B-cell development. *EMBO J* **32**, 1008-1022 (2013).
 24. Fahl, S.P., Crittenden, R.B., Allman, D. & Bender, T.P. c-Myb is required for pro-B cell differentiation. *J Immunol* **183**, 5582-5592 (2009).
 25. Fuxa, M. *et al.* Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev* **18**, 411-422 (2004).
 26. David-Fung, E.S. *et al.* Progression of regulatory gene expression states in fetal and adult pro-T-cell development. *Immunol Rev* **209**, 212-236 (2006).
 27. Hu, H. *et al.* Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development. *Nat Immunol* **7**, 819-826 (2006).
 28. Kimura, S. *et al.* Bcl-2 reduced and fas activated by the inhibition of stem cell factor/KIT signaling in murine melanocyte precursors. *J Invest Dermatol* **124**, 229-234 (2005).

29. Matsumoto, A. *et al.* p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **9**, 262-271 (2011).
30. Mucida, D. *et al.* Transcriptional reprogramming of mature CD4(+) helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Nat Immunol* **14**, 281-289 (2013).
31. Taghon, T., Yui, M.A., Pant, R., Diamond, R.A. & Rothenberg, E.V. Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity* **24**, 53-64 (2006).
32. Wormald, S. *et al.* The comparative roles of suppressor of cytokine signaling-1 and -3 in the inhibition and desensitization of cytokine signaling. *J Biol Chem* **281**, 11135-11143 (2006).
33. Berga-Bolanos, R., Alberdi, M., Buxade, M., Aramburu, J. & Lopez-Rodriguez, C. NFAT5 induction by the pre-T-cell receptor serves as a selective survival signal in T-lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 16091-16096 (2013).
34. David-Fung, E.S. *et al.* Transcription factor expression dynamics of early T-lymphocyte specification and commitment. *Dev Biol* **325**, 444-467 (2009).
35. Kang-Decker, N. *et al.* Loss of CBP causes T cell lymphomagenesis in synergy with p27Kip1 insufficiency. *Cancer Cell* **5**, 177-189 (2004).
36. Mochizuki, K. *et al.* Delta-like ligand 4 identifies a previously uncharacterized population of inflammatory dendritic cells that plays important roles in eliciting allogeneic T cell responses in mice. *J Immunol* **190**, 3772-3782 (2013).
37. Onoyama, I. *et al.* Conditional inactivation of Fbxw7 impairs cell-cycle exit during T cell differentiation and results in lymphomatogenesis. *J Exp Med* **204**, 2875-2888 (2007).
38. Zheng, Y. *et al.* Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* **458**, 351-356 (2009).
39. Lu, L., Chaudhury, P. & Osmond, D.G. Regulation of cell survival during B lymphopoiesis: apoptosis and Bcl-2/Bax content of precursor B cells in bone marrow of mice with altered expression of IL-7 and recombinase-activating gene-2. *J Immunol* **162**, 1931-1940 (1999).
40. Ma, S. *et al.* Ikaros and Aiolos inhibit pre-B-cell proliferation by directly suppressing c-Myc expression. *Mol Cell Biol* **30**, 4149-4158 (2010).

41. Ma, S., Pathak, S., Trinh, L. & Lu, R. Interferon regulatory factors 4 and 8 induce the expression of Ikaros and Aiolos to down-regulate pre-B-cell receptor and promote cell-cycle withdrawal in pre-B-cell development. *Blood* **111**, 1396-1403 (2008).
42. Bukholm, I.K. & Nesland, J.M. Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas. *Virchows Arch* **436**, 224-228 (2000).