

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390138
 研究課題名（和文） 抗体遺伝子多様化を司る遺伝子 AID の活性制御因子の単離と機能解析

研究課題名（英文）
 Trial of isolation and functional analysis of AID-regulatory elements

研究代表者
 村松 正道（Muramatsu Masamichi）
 金沢大学・医学系・教授
 研究者番号：20359813

研究成果の概要（和文）：

抗体遺伝子座の多様性を作る遺伝子 AID の活性制御因子の単離を試みた。AID に物理的に結合するタンパク質の中にそのような制御因子があると仮定して、候補を探索し、AID との機能連関が示されるかを検証する手法を用いた。発現ライブラリーによるアプローチから 3 つの AID 結合タンパクを同定したが、RNA 干渉法での機能連関の証明には至らなかった。これら 3 つの候補については、AID の機能制御について更なる解析が望まれた。

研究成果の概要（英文）：

AID creates genetic diversity in immunoglobulin genes upon antigen stimulation. It is important to elucidate how AID activity is regulated because insufficient regulation of AID activity results in oncogenesis. This study tried to identify regulatory elements of AID by screening AID binding proteins. Library screening of candidates cDNA following confirmation of physical binding ability between candidates and AID, we found three possible candidates for an AID regulatory factor. Unfortunately, RNA interference approach of candidates did not prove evidences to support regulatory role of candidates. Farther study by different approach will be required to clarify role of those candidates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2008 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
総計	12,600,000	3,780,000	16,380,000

研究分野：免疫学、ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：クラススイッチ組換え、somatic hypermutation, 抗体遺伝子、免疫記憶、B リンパ球, 親和性成熟

1. 研究開始当初の背景

これまで我々のグループはAIDの機能解析を行い以下の知見を得てきた。

- 1, AIDはDNA/RNAの塩基修飾を行なう遺伝情報改変酵素である。
- 2, AIDは抗体遺伝子のsomatic hypermutationとクラススイッチ組換えを行なう酵素である。
- 3, AIDの発現制御不良はゲノム不安定性をおこしさらには発癌につながる。

また内外の研究も総合すればAIDの機能は次のように想定された。

抗原刺激を起点とした刺激がBリンパ球に入ると、Bリンパ球は活性化されAIDを発現誘導する。同時に抗体遺伝子座が構造的変化を起こしAIDがアクセスできるようになる。AIDは抗体遺伝子座DNAを触媒しC to Uの変換を行う。AID活性によって作られたUが、UNGにより認識され塩基除去修復系がDNA切断あるいは点突然変異をDNAに起こす。つまりAIDによって作られたUがsomatic hypermutationとクラススイッチ組換えの引き金となる。一方、AIDの活性異常がある時、特にAIDの異所性発現や過剰発現時はAIDがc-mycなどの抗体遺伝子座以外のDNAにUを導入する。この事がIgH/c-mycの染色体転座やBcl-6の高頻度変異を起こしリンパ腫の原因となる。次に浮かび上がった疑問はAIDの標的遺伝子座認識機構である。AIDは、198アミノ酸と比較的小さな酵素であり、また明らかなDNA結合ドメインを持たない。AIDの

発現がある時でも遺伝子改変が起こるのは抗体遺伝子座のみであり、抗体遺伝子座以外の多くの遺伝子座でおこる遺伝子改変はまれである。またAIDの人工基質を発現させれば、繊維芽細胞内でさえsomatic hypermutationやクラススイッチ組換えを起こせる。

したがってAIDの標的遺伝子座認識システムは、AID以外の共役因子が主に決めており、それはB細胞のみならず繊維芽細胞にも発現し、活性中心を持つAIDを標的遺伝子座にリクルートする能力が想定された。

2. 研究の目的

AIDの機能を調節するAID結合タンパクの単離。その事によるAID機能制御機構の解明。

3. 研究の方法

本研究では、まずAIDに物理的に結合するタンパクを単離する事を目指す。そしてその中からAIDの機能を補助する因子を見つける事でAID共役因子を同定したい。

本研究に先んじて行なった研究では、AIDをbaitに酵母ツーハイブリット系を用いてBリンパ球cDNAライブラリーをスクリーニングしたが、確かな候補遺伝子は得られなかった。またAIDにエピトープタグをつけホ乳類細胞で発現させタグに対する免疫沈降でAIDと共沈するタンパクを同定する手法でもAID共役因子は同定できなかった。これら先行するオ

一ソドックスな手法が成功裏には終わらなかった事から、本研究では大腸菌ツーハイブリットによる候補遺伝子のリストアップとその機能解析を進める。候補遺伝子が大腸菌ツーハイブリットの段階である程度絞り、次に AID との物理的結合を 293T 細胞共発現後の免疫沈降で確認し、物理的結合が確認された候補遺伝子を RNA 干渉法で発現抑制し AID の機能連関を見る。

一方、この研究が進行している中、研究代表者は研究拠点を京都大学から金沢大学に移した。それに伴い AID 共役因子の単離同定を全く別の手法で行なう機会を得た。AID の新たな機能評価方法として B 型肝炎ウイルスが有効である事を見いだした。予備的観察では AID は B 型肝炎ウイルスキャップシドに取り込まれる事が示唆されたため、HBV キャップシドを物理的に精製する事で AID 共役因子の単離同定するという挑戦である。

4. 研究成果

複数の細胞ソースの大腸菌ツーハイブリッドライブラリー約 1200 万クローンをマウス AID を bait にしてスクリーニングをかけた。次に大腸菌ツーハイブリットレベルで AID に結合するが GFP に結合しないクローンを絞り込んだ結果、27 候補が浮かび上がった。

その塩基配列を DNA シークエンシングで決定し、ORF の配列情報および B 細胞と繊維芽細胞の発現の有無から候補を絞り。可能性の高い遺伝子をクローニングし、ほ乳類の系で AID との物理的結合を確認した。293T 細胞に AID と候補遺伝子を発現させ免疫沈降により物理的結合を確認した。結果 3 つの候補 (14-3-3b, Importin4A, EF1a) の確認がとれた。これら 3 つの候補遺伝子産物に対する発現抑制を行い AID の機能に変化がでるか検討した。発現抑制実験は、siRNA オリゴの遺伝子導入を用いた。クラススイッチを短期間

に誘導できる 2 種類の細胞株すなわちマウス B 細胞株 CH12F3-2 およびマウス繊維芽細胞 NER7 細胞に siRNA を導入した。NER7 は、クラススイッチを起こす為の人工基質を染色体に持つ安定発現株でクラススイッチ評価に有用である事は以前報告している。siRNA 導入による発現抑制の評価は RT-qPCR で行なった。マウス AID に対する siRNA を手法の妥当性を示すコントロールとした。その結果マウス AID の siRNA 導入では、発現抑制は 9 割抑制し、クラススイッチも 8 割抑制した。一方、Importin4a や 1433b は 8 割の発現抑制が観察されたが、クラススイッチ能抑制は明らかではなかった。EF1a は発現抑制できなかった。microRNA の発現による発現抑制や dominant negative 体の強制発現も試みたが、AID の機能を制御している事を示す証拠とはならなかった。Importin4a や 1433b は、ほ乳類ではファミリーを形成しており各メンバーがそれぞれ重複しながら特定の生命現象には特定のファミリーメンバーがその生命現象を司る事が知られておる。またあるファミリーメンバーが欠損すると別のファミリーメンバーがその穴埋めをする事象も報告されている。従って Importin4a や 1433b の AID 制御因子の可能性はまだ残っているが RNA 干渉のアプローチで AID 制御因子としての役割を証明するのは難しい事が判明した。

H20 年度より、金沢大学に移動した事に伴い AID 制御因子発掘の別のアプローチを試みた。AID のファミリーメンバーである APOBEC3G が HIV ウイルスのキャップシドに取り込まれて HIV ウイルスゲノムに hypermutation を導入する事が報告された。キャップシド内は、ほ乳類細胞の中で DNaseI 抵抗性の閉鎖空間を形成し、キャップシドは生化学的に精製できる事が知られている。もし AID がキャップシド内に取り込まれてウイ

ルスゲノムに hypermutation を導入するならば、キャプシドを精製する事で hypermutation に関する AID 制御因子を単離できる可能性があると考えた。ウイルス系は通常の研究室で取り扱える B 型肝炎ウイルスの系を用いた。既に APOBEC3G が B 型肝炎ウイルスのキャプシド内に取り込まれて hypermutation を起こす事が報告されていたからである。AID を B 型肝炎ウイルス複製のあるヒト肝細胞培養株に強制発現させた。APOBEC3G をコントロールとして平行して実験した所、AID は APOBEC3G より強力にウイルス複製を抑制し、同程度に hypermutation を導入した。従って AID も少なくとも強制発現下では APOBEC3G と同様にキャプシド内に取り込まれる可能性が示唆された。従ってこの研究により AID 制御因子単離をキャプシドを用いて行なうという全く新しい方法論が可能となった。現在 AID の B 型肝炎ウイルスへの作用は論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1, AID-induced decrease in topoisomerase 1 induces DNA structural alteration and DNA cleavage for class switch recombination. 査読あり
Kobayashi M, Aida M, Nagaoka H, Begum NA, Kitawaki Y, Nakata M, Stanlie A, Doi T, Kato L, Okazaki IM, Shinkura R, Muramatsu M, Kinoshita K, Honjo T.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 29;106(52):22375-80.
- 2, Nonaka T, Doi T, Toyoshima T, Muramatsu M, Honjo T, Kinoshita K.

Carboxy-terminal domain of AID required for its mRNA complex formation in vivo. 査読あり

Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 ;106(8):2747-51.

- 3, Pasqualucci L, Bhagat G, Jankovic M, Compagno M, Smith P, Muramatsu M, Honjo T, Morse HC 3rd, Nussenzweig MC, Dalla-Favera R.

AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis 査読あり
Nat Genet. 2008 ;40(1):108-12.

- 4, Muramatsu M, Nagaoka H, Shinkura R, Begum NA, Honjo T. 査読なし

Discovery of activation-induced cytidine deaminase, the engraver of antibody memory.

Adv Immunol. 2007;94:1-36.

[学会発表] (計 10 件)

- 1, 喜多村 晃一 Effects of APOBEC3G and Base Excision Repair on Hepatitis B Viral Genome 第 39 回日本免疫学会学術集会 2009 年 12 月 3 日大阪国際会議場(大阪府)
- 2, 村松正道 アレルギー・免疫記憶の仕組み 第 59 回日本アレルギー学会秋期学術大会 2009 年 10 月 30 日 秋田ビューホテル(秋田県)
- 3, 喜多村 晃一 B 型肝炎ウイルスに対する APOBEC3G と塩基除去修復因子の作用第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 月 25 日 都市センターホテル(東京都)
- 4, 村松正道 デアミナーゼと高頻度突然変異 H21 年度十全同窓会総会 2009 年 7 月 4 日 金沢大学十全記念館 (石川県)
- 5, 村松正道 ウイルス感染とデアミナーゼ 第 36 回日本臨床免疫学会総会 2008 年 10 月

18日 京王プラザホテル (東京都)

6, 村松正道 抗体遺伝子座の多様性を作る
遺伝子 : AID 第 17 回アンチセンスシンポ
ジウム 金沢 2007 年 12 月 3 日

<その他>

<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~med06/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村松 正道 (Muramatsu Masamichi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号 : 20359813

(2) 連携研究者

喜多村 晃一 (Kitamura Koichi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号 : 70378892