

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390122

研究課題名(和文)抗体V領域遺伝子選択的AIDターゲティング機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of the selective AID targeting at the IgV-region

研究代表者

阪口 薫雄 (SAKAGUCHI, NOBUO)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：70192086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：GANPタンパクによる抗体親和性亢進誘導の分子機構を明らかにするため、B細胞核内タンパク中のGANP結合分子群を解析した。GANPはヒストンと相互作用し、GANPのヒストンアセチル化領域を介してヒストン修飾を誘導することを見いだした。GANPはIgV領域の遺伝子再構成付近へ選択的にアクセスし、IgV領域に対して転写を遅延化させ、R-ループ形成を促しAIDの繫留によって遺伝子変異を蓄積する。また、GANPのAIDによるIgV領域へのDNA損傷に対して制御することを明らかにした。GANPはIgVの変異誘導において、不必要なDNA損傷を極力抑制し、ゲノムの正統性を担保する為の必須分子である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanism of GANP interacted with AID in generation of antibody affinity maturation in B cells, GANP interacting proteins was identified in the nuclear extract from human B cell line Ramos cells. GANP interacts with histones and induces chromatin modification with the acetylation through the GANP HAT domain. GANP binds to the rearranged IgV region. This position is relaxed during IgV transcription. Transcription complex similarly retains during the IgV transcription, which presumably maintains the DNA configuration for continuation and providing the opportunity of AID accession. GANP recruits AID towards the selective site of the rearranged IgV region to augment mutation frequency. We further clarified the role of GANP in the choice of DNA repair pathways after the DNA injury caused by AID at the IgV region gene. GANP is essentially involved in maintenance of DNA and the genome integrity for efficient DNA mutations during antibody affinity maturation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫学 ゲノム 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物における抗体の特異性は、骨髄内の B 細胞初期分化過程における Ig 遺伝子の再構成によって獲得する。さらに抗体の親和性亢進は胚中心 B 細胞での V 領域 SHM 誘導による。このように B 細胞は RAG による二本鎖 DNA 切断 (DNA double strand break: DSB) と、成熟 B 細胞における AID 誘導性の IgV 領域 SHM と S 領域クラススイッチ組換え (Class Switch Recombination: CSR) の 3 種類の遺伝子変化を経る。末梢リンパ組織における成熟 B 細胞の抗体刺激依存性の抗体親和性亢進の分子機構に関しては未解明である。Neuberger らによる解析から、シチジン脱アミノ化酵素 AID によって C to U の転換が誘導される。その U を認識したウラシル N グリコシダーゼ (UNG) がヌクレオチドの存在しない無塩基状態を形成する。さらに AP エンドヌクレアーゼによる S 領域の切断を生み出す。このとき生じる S $\mu$  断端と 3' 側の S 領域が遺伝子再結合することによって、新たなクラスを発現する抗体へと変化する CSR を起こすというモデルが提唱された。一方、AID によって誘導される IgV 領域遺伝子の SHM については、その解析は明解なモデルを描くところまでには至っておらず、DSB を必要とするのかについても確定されていない。V 領域の CDR (相補性決定領域) 選択的に遺伝子変異を誘導する機構、そして、その後の遺伝子傷害の修復機構についても明らかにされていない。V 領域多様性誘導を誤りがち (エラーブローン) DNA ポリメラーゼ制御の分子メカニズムについても明らかになっていない。その解決の糸口として AID の IgV 領域 SHM 誘導に必要な N 末端にある核移行シグナル (NLS) と CSR に必要な C 末端の核外輸送シグナル (NES) は異なり、おそらくこれらに介在する分子群、そのシチジン脱アミノ化制御、DNA 修復プロセスなどが大きく異なるものと考えられる。現時点で明らかになっていることとして、胚中心 B 細胞に発現する AID が V 領域 SHM 誘導の起点になること。SHM は V 領域から JH4 のイントロン領域に見られること。ホットスポット配列 WRC (W=A/T, R=A/G) に変異頻度が著しく高いということ。AID は一本鎖 DNA のシチジンの脱アミノ化を誘導すること。抗体遺伝子は、転写の活発な V 領域プロモーターからイントロンエンハンサーに及ぶ領域において最も SHM の標的となりやすいということ等である。これらを総合するとその領域において染色体内のヒストンアセチル化 (HAT) 活性が上昇して転写 bubble (R-loop) を形成している。この領域は相補的な二本鎖 DNA と配列を同じくする一本鎖の RNA がともに存在し、AID が一本鎖 DNA に対してアクセスしやすい状態になっていると考えられる。その結果一本鎖 DNA 中の C を U に変換する頻度が著しく高まるものと想定される。これらは R-loop モデルとして理解されている。

## 2. 研究の目的

生体は、抗原に対して特異的かつ高親和性の抗体を産生することによって病原体を排除する。免疫グロブリン (Ig) の V 領域への体細胞突然変異 (Somatic Hyper Mutation: SHM) 導入は活性型脱アミノ化酵素 AID によって誘導されるが、シチジンの脱アミノ化が、どのようにして V 領域特異的に起こるのかについては明らかになっていない。最近、我々は V 領域 SHM 誘導の際に胚中心 B 細胞の抗体親和性亢進に働く GANP が AID の V 領域選択的標的化に関与することを明らかにした (Maeda et al., JBC 2010)。本研究において GANP/AID 複合体の IgV 領域遺伝子に特異的な標的化に関する制御メカニズムを明らかにし、高親和性抗体産生 B 細胞の分子機構を解明する。

## 3. 研究の方法

GANP をバックボーンとした AID 及び RNA との結合様式を検証する、そして IgV 領域への AID 複合体動員の分子機構を明らかにする。GANP 結合分子の同定を行なうことによって、GANP によるクロマチンアクセシビリティの制御機構を解明する。そのために GANP の機能ドメインを欠いた遺伝子欠失変異コンストラクトを作製し、IgV 領域遺伝子への特異性を生み出すのはどの領域の機能によるのかを明らかにする。

## 4. 研究成果

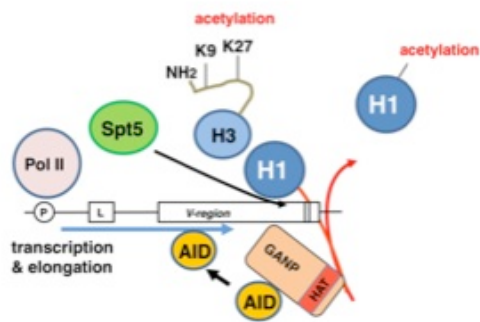
GANP の機能を RNA 複合体制御、クロマチンアクセシビリティ、そして DNA 修復の観点から解析した。

(1) GANP の RNA 認識モチーフ (RRM) による RNA 認識と結合性を調べた。Rev 依存性 HIV-1 mRNA 輸送測定システムを用いて mRNA 核外輸送機能について解析し、GANP は Crm1/RanGTP 依存性の RNA 輸送に機能することを示した。さらに RRM の認識する RNA の標的として、GANP 結合 RNA をヒト胚中心 B 細胞モデルの Ramos 細胞から回収し、非翻訳性の RNA 群に焦点をあてて定量 PCR 法で検定した。そして長鎖非翻訳 RNA の特定の RNA 分子に選択的に結合することを見いだした。この結果は GANP の新しい機能局面を提示したものであり、細胞生物学的に広範な役割を担うことを示唆しているが、今後広範囲に多様な RNA 種の同定とその生理学的意義の解明が必要であることを示した。

(2) GANP の IgV 領域 DNA への標的化に関して顕著な成果が得られた。遺伝子再構成した IgV 領域の C 末部分に選択的に GANP が結合すること、その結合には GANP の C 末端側に存在するヒストンアセチル化 (HAT) 活性領域が必要であることが明らかになった。HAT 活性によって IgV 領域のヌクレオソームにヒストンのアセチル化修飾を誘導した。このことか

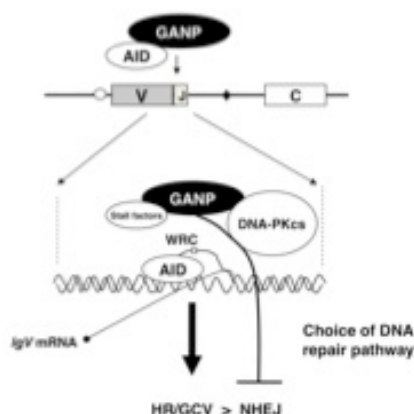
ら AID/RNA ポリメラーゼ II 複合体を GANP が動員している可能性が示唆された。Ramos 細胞から核内の DNA に結合するクロマチンを生成し、GANP と結合する機能分子をプロテオミクス解析によって詳細に明らかにした。クロマチンを構成するヒストン、とりわけリンカーヒストン H1 とコアヒストン複合体と結合し、IgV 領域の特定部位 (VDJ 再構成して形成された結合箇所) のヌクレオソームへの特異的結合を促し、その部位選択的ヒストンアセチル化によってヒストン H1 の解錠を行うことを明らかにした。そして IgV 領域の mRNA 転写を促進させ、同時にその転写進行を遅延化させることによって、一本鎖 DNA が露出する傾向にあり、R-ループ形成を促すことが明らかになった。その結果 GANP によって AID の繫留を促し、IgV 領域選択的に遺伝子変異が蓄積されることが示された。GANP が IgV 領域選択的な AID のヌクレオソーム配置に関する分子基盤を構成していることを示した。

GANP の HAT 領域が IgV 領域特異的な転写亢進を誘導していることから、Ig 遺伝子のクロマチン修飾の変化をヒストンアセチル化残基を標的にした ChIP on ChIP によって明らかにした。そして GANP ノックダウン法によって IgV 領域遺伝子での transcription-couple の SHM の誘導モデルの検証を行った。その分子機構の中心的役割を GANP が果たしている可能性についての実験的データを取得し解析した。成果は Nature Communications 誌に発表した。



(3) GANP の post-AID の DNA 修復に関与することの解析にニトリ DT40 B 細胞を用いた。この細胞においても GANP は AID による IgV 領域の SHM 誘導とニトリ B 細胞特有のジーンコンバージョン (遺伝子転換) による多様性獲得の増強を促すことを明らかにした。GANP は常態では DNA 修復分子 DNA-PKcs と直接結合しているが、AID による IgV DNA の DSB によって GANP から DNA-PKcs が遊離されること、そしてその後の DNA 修復に非相同断端接合ではなく、より安全な遺伝子配列の正統性を保つことの出来る相同組み替えによって遺伝子修復されるように制御していることを明らかにした。この成果は、GANP がゲノムの保護と維持において重要な機能を

果たしていることを示している。



## 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 15 件)

(1) Eid MMA, Maeda K (co-first author), Almofty SA, Singh SK, Shimoda M, Sakaguchi N. GANP regulates the choice of DNA repair pathway by DNA-PKcs interaction in AID-dependent IgV region diversification. J. Immunol., 査読有、2014、192: in press  
DOI: 10.4049/jimmunol.1400021

(2) Ye B, Dai Z, Liu B, Wang R, Li C, Huang G, Wang S, Xia P, Yang X, Kuwahara K, Sakaguchi N, Fan Z. Pcid2 inactivates developmental genes in human and mouse embryonic stem cells to sustain their pluripotency by modulation of EID1 stability. Stem Cells, 査読有、2014、32: 623-635  
DOI: 10.1002/stem.1580

(3) Takamura S, Kajiwara E, Tsuji-Kawahara S, Masumoto T, Fujisawa M, Kato M, Chikaishi T, Kawasaki Y, Kinoshita S, Itoi M, Sakaguchi N, Miyazawa M. Infection of adult thymus with murine retrovirus induces virus-specific central tolerance that prevents functional memory CD8+ T cell differentiation. PLoS Pathog., 査読有、2014、10: e1003937  
DOI: 10.1371/journal.ppat.1003937

(4) Ogiwara H, Yasui F, Munekata K, Takagi-Kamiya A, Munakata T, Nomura N, Shibasaki F, Kuwahara K, Sakaguchi N, Sakoda Y, Kida H, Kohara M. Histopathological evaluation of the diversity of cells susceptible to H5N1 virulent avian influenza virus. Am. J. Pathol., 査読有、2013、184: 171-183  
DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.10.004

(5) Silsirivanit A, Araki N, Wongkham C, Vaeteewottacharn K, Pairojkul C, Kuwahara K, Narimatsu Y, Sawaki H,

Narimatsu H, Okada S, Sakaguchi N, Wongkham S. CA-S27: a novel Lewis a associated carbohydrate epitope is diagnostic and prognostic for cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.*、査読有、2013、104: 1278-1284

DOI: 10.1111/cas.12222

(6) Sakurai A, Takayama K, Nomura N, Munakata T, Yamamoto N, Tamura T, Yamada J, Hashimoto M, Kuwahara K, Sakoda Y, Suda Y, Kobayashi Y, Sakaguchi N, Kida H, Kohara M, Shibasaki F. Broad-spectrum detection of h5 subtype influenza A viruses with a new fluorescent immunochromatography system. *PLoS One*、査読有、2013、8: e76753

DOI: 10.1371/journal.pone.0076753

(7) Rezano A, Kuwahara K, Yamamoto-Ibusuki M, Kitabatake M, Moolthiya P, Phimsen S, Suda T, Tone S, Yamamoto Y, Iwase H, Sakaguchi N. Breast cancers with high DSS1 expression that potentially maintains BRCA2 stability have poor prognosis in the relapse-free survival. *BMC Cancer*、査読有、2013、13: 562

DOI: 10.1186/1471-2407-13-562

(8) Maeda K, Almofty SA (co-first author), Singh SK, Eid MMA, Shimoda M, Ikeda T, Koito A, Pham P, Goodman MF, Sakaguchi N. GANP interacts with APOBEC3G and facilitates its encapsidation into the virions to reduce HIV-1 infectivity. *J. Immunol.*、査読有、2013、191: 6030-6039

DOI: 10.4049/jimmunol.1302057

(9) Singh SK, Maeda K (co-first author), Eid MMA, Almofty SA, Ono M, Pham P, Goodman MF, Sakaguchi N. GANP regulates recruitment of AID to immunoglobulin variable regions by modulating transcription and nucleosome occupancy. *Nat. Commun.*、査読有、2013、4:1830

DOI: 10.1038/ncomms2823

(10) Kuwahara K, Nakaya T, Phimsen S, Toda T, Kitabatake M, Kaji T, Takemori T, Watanabe T, Sakaguchi N. Lyn signaling to upregulate GANP is critical for the survival of high-affinity B cells in germinal centers of lymphoid organs. *J. Immunol.*、査読有、2012、189: 3472-3479

DOI: 10.4049/jimmunol.1200649

(11) Kitabatake M, Toda T, Kuwahara K, Igarashi H, Ohtsuji M, Tsurui H, Hirose S, Sakaguchi N. Transgenic overexpression of G5PR that is normally augmented in centrocytes impairs the enrichment of high-affinity antigen-specific B cells, increases peritoneal B-1a cells, and induces autoimmunity in aged female mice. *J. Immunol.*、査読有、2012、189: 1193-1201

DOI: 10.4049/jimmunol.1102774

(12) Toda T, Kuwahara K, Kondo N, Matsuda

Z, Maeda Y, Maeda K, Sakaguchi N. Dynamic appearance of antigenic epitopes effective for viral neutralization during membrane fusion initiated by interactions between HIV-1 envelope proteins and CD4/CXCR4. *Immunobiology*、査読有、2012、217:864-872

DOI: 10.1016/j.imbio.2011.12.007

(13) Silsirivanit A, Araki N, Wongkham C, Pairojkul C, Narimatsu Y, Kuwahara K, Narimatsu H, Wongkham S, Sakaguchi N. A novel serum carbohydrate marker on mucin 5AC: values for diagnostic and prognostic indicators for cholangiocarcinoma. *Cancer*、査読有、2011、117: 3393-403

DOI: 10.1002/cncr.25912

(14) Phimsen S, Kuwahara K, Nakaya T, Ohta K, Suda T, Rezano A, Kitabatake M, Vaeteewoottacharn K, Okada S, Tone S, Sakaguchi N. Selective cell death of p53-insufficient cancer cells is induced by knockdown of the mRNA export molecule GANP. *Apoptosis*、査読有、2011、17:679-690

DOI: 10.1007/s10495-012-0711-8

(15) Sakaguchi N, Maeda K, Kuwahara K. Molecular mechanism of immunoglobulin V-region diversification regulated by transcription and RNA metabolism in antigen-driven B cells. *Scand. J. Immunol.*、査読有、2011、73:520-526

DOI: 10.1111/j.1365-3083.2011.02557.x

[学会発表] (計45件)

(1) Sakaguchi N, Eid MMA, Singh SK, Almofty SA, Shimoda M, Maeda K. GANP plays a regulatory role in the choice of DNA repair pathway by dissociating DNA-PKcs in AID-induced immunoglobulin V-region diversification. *Keystone Symposia Conference Biology of B Cell Responses*、2014.2.13、Keystone Conference Center (コロラド、アメリカ)

(2) Maeda K, Singh SK, Eid MMA, Almofty SA, Shimoda M, Kawabata T, Sakaguchi N. GANP regulates transcription and nucleosome occupancy at the immunoglobulin variable region for AID-accession. *第42回日本免疫学会学術集会*、2013.12.13、幕張メッセ(千葉)

(3) Eid MMA, Maeda K, Almofty SA, Singh SK, Shimoda M, Sakaguchi N. B cell-associated regulation of DNA repair pathway through interaction with DNA-PKcs in IgV-region diversification. *第42回日本免疫学会学術集会*、2013.12.13、幕張メッセ(千葉)

(4) Maeda K, Singh SK, Almofty SA, Eid MMA, Shimoda M, Sakaguchi N. GANP regulates transcription and nucleosome occupancy at the immunoglobulin variable region for AID-accession. *第41回日本免疫学会学術集会*、

2012. 12. 5、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸ポートピアホテル（兵庫）

(5) Eid MMA, Maeda K, Singh SK, Almofty SA, Shimoda M, Sakaguchi N, Regulation of immunoglobulin variable region

diversification through GANP-mediated regulation of DNA double-strand break repair machinery、第41回日本免疫学会学術集会、2012. 12. 5、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸ポートピアホテル（兵庫）

(6) Maeda K, Singh SK, Almofty SA, Eid MMA, Ono M, Sakaguchi N、Targeting the rearranged immunoglobulin V-region locus in B-cells by the histone acetyl transcriptase activity of GANP、第6回日本エビジェネティクス研究会年会、2012. 5. 14、学術総合センター（東京）

(7) Sakaguchi N, Singh SK, Almofty SA, Eid MMA, Ono M, Maeda K、Role of GANP in transcriptional regulation of immunoglobulin gene locus、Keystone Symposia Mutations, Malignancy and Memory-Antibodies and Immunity、2012. 3. 21、Boston, Boston Park Plaza & Towers（ボストン、アメリカ）

(8) Maeda K, Singh SK, Almofty SA, Eid MMA, Sakaguchi N、Analysis of GANP-associated complex in B-cell nuclei、第40回日本免疫学会学術集会、2011. 11. 28、幕張メッセ（千葉）

(9) Singh SK, Maeda K, Almofty SA, Eid MMA, Sakaguchi N、Involvement of GANP in transcriptional regulation of immunoglobulin gene locus、第40回日本免疫学会学術集会、2011. 11. 28、幕張メッセ（千葉）

(10) Eid MMA, Maeda K, Singh SK, Almofty SA, Sakaguchi N、GANP augments the immunoglobulin V region gene conversion via Ku70 dependent mechanism、第40回日本免疫学会学術集会、2011. 11. 28、幕張メッセ（千葉）

(11) Maeda K, Singh SK, Almofty SA, Eid MAA, Sakaguchi N、Transcriptional targeting at immunoglobulin V-region locus by an RNA-export molecule GANP、第5回日本エビジェネティクス研究会年会、2011. 5. 20、KKRホテル熊本（熊本）

〔図書〕（計10件）

(1) 下田真唯子、前田和彦、阪口薫雄、臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、免疫グロブリンの体細胞高頻度突然変異誘導と GANP、2014、61(5)、pp472-479

(2) 前田和彦、阪口薫雄、臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、胚中心 B 細胞の高親和

性成熟における GANP の役割、2013、60(2)、pp115-121

(3) 前田和彦、阪口薫雄、臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、B 細胞の生存維持と miRNA、2012、58(3)、pp251-258

(4) 阪口薫雄、前田和彦、免疫学コア講義改訂3版、南山堂、編集2012、第6章、第9章、付表1

(5) 前田和彦、阪口薫雄、臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、プロテインホスファターゼ 2A の調節と自己免疫、2012、57(2)、pp119-124

(6) 前田和彦、阪口薫雄、免疫記憶の制御と疾患/B細胞免疫記憶：免疫記憶研究のフロンティア、実験医学、羊土社、高親和性抗体産生のメカニズム、2011、29(17)、pp106-111

(7) 前田和彦、阪口薫雄、臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、胚中心 B 細胞の分化・増殖と GANP、2011、56(2)、pp109-115

〔その他〕

新聞報道

2013年5月15日、熊本日日新聞、「遺伝子変異させ強力な抗体」

ホームページ等

<http://www.k-immu.jp/ja/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪口 薫雄 (SAKAGUCHI NOBUO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：70192086