

機関番号：14301

研究種目：特別推進研究

研究期間：2005 ～ 2009

課題番号：17002015

研究課題名（和文） A I Dによる抗原刺激依存性抗体遺伝子改編機構の研究

研究課題名（英文） AID-dependent genetic alteration mechanism to generate antigen-specific antibodies

研究代表者

本庶 佑 (HONJO TASUKU)

京都大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：80090504

研究成果の概要（和文）：AIDはTopoisomerase(Top1)の翻訳を低下させ、Top1を減少させることにより転写されているS領域のDNA構造に変化を起こしてTop1による不可逆的切断を導入することを明らかにした。AIDはmicroRNAの編集によりこの翻訳抑制を行なうという仮説を提示した。また、AIDはリンフォーマのみならず感染症に伴う発癌に付随して発現することが示されたので、AIDプロモータの解析を行いその結果、正と負の制御があり環境因子による正の制御が強いことを示した。また、以下のようなDNA脱アミノ仮説の反証を示した。1) 脱アミノ活性欠質AID変異体にもクラススイッチ(CSR)活性があること、2) UNGの酵素活性がありながらタンパク結合ドメインの変異により、CSR活性が失われること、3) APE1および2欠損でもCSRが不変である。

研究成果の概要（英文）： We found that AID down-modulates translation of topoisomerase (Top1). The reduction of Top1 induces aberrant DNA structure in transcribed S regions, resulting in irreversible cleavage by Top1. We propose that AID edits microRNA and edited microRNA down-modulates translation of Top1 mRNA. AID was shown to be expressed not only in lymphoma but also pathogen-induced tumors. We investigated the AID promoter and identified positive and negative regulatory elements, which may explain such AID induction. We examined DNA deamination hypothesis and obtained the following evidence against this hypothesis. 1) AID mutant without DNA deamination activity is proficient for CSR. 2) UNG mutants of the protein interaction domain with normal U removal activity lost CSR activity. 3) APE1 and APE2 deficiency did not reduce CSR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	118,700,000	35,610,000	154,310,000
2006年度	119,200,000	35,760,000	154,960,000
2007年度	146,300,000	43,890,000	190,190,000
2008年度	113,076,000	33,922,800	146,998,800
2009年度	104,900,000	31,470,000	136,370,000
総計	602,176,000	180,652,800	782,828,800

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：クラススイッチ・体細胞突然変異・RNA編集・ウラシルDNAグリコシラーゼ・免疫沈降法・マイクロアレイ法

## 1. 研究開始当初の背景

SHM および CSR は B リンパ球が抗原によって活性化されることにより、引き起こされる。SHM は、抗体 V 領域エクソンとその周辺への点突然変異の集積であり、通常の突然変異の百万倍の頻度で起こる。CSR は、認識した抗原をどのように処理するか、あるいは体中のどの部位で抗原を捕捉するかを決定する抗体 H 鎖 C 領域 (定常部) の入れ換えを行う DNA 組換え反応である。本研究の焦点は B リンパ球が抗原に遭遇したあと、どのようなしくみで可変部の多様化と定常部の入れ換えを行うのかという分子機構の解明である。

CSR は、Nossal ら (1964 年) および Cooper ら (1970 年) によって現象の発見が報告された。すなわち、一個の B リンパ球が最初に IgM を発現し、抗原刺激によって様々な抗体クラス (IgG, IgM, IgA, IgE) を産生するようになるという現象である。一方、SHM は古くから仮説として存在したが分子レベルでその現象が間違いないことを実証したのは Weigert と Cohn ら (1970 年) による  $\lambda$  鎖 V 領域のアミノ酸配列の決定である。しかしながら、DNA レベルでの変異導入の機構については、AID の発見まで全く手掛かりがなかった。

## 2. 研究の目的

「抗原刺激によって誘導される抗体分子の多様化機構」の解明を行なうことは免疫学に残された最大課題の一つである。抗原刺激によって発現誘導される activation induced cytidine deaminase (AID) がクラススイッチ組換え (CSR) と体細胞突然変異 (SHM) に必須であり、AID が発現されることによって CSR と SHM の両者が B リンパ球以外の細胞でも誘導されることが明らかになっている。また、AID が染色体転座やがん遺伝子の突然変異に関与することが明らかになっており、AID による DNA 切断様式の解明は未知の生命科学領域の開拓につながることを期待される。国際的には AID に対する関心はきわめて高く、2004 年前半だけで 40 報近い論文が発表されている。AID の作用機構については、ケンブリッジ大学の Neuberger 博士が提唱している DNA 脱アミノ仮説を信奉する研究者が圧倒的に多数である。申請者は AID 発見以来一貫して RNA 編集仮説を唱え、これに対する実験的根拠を与え、最近では DNA 脱アミノ仮説を否定する結果を示してきた。本研究では、AID がどのような仕組みで CSR と SHM の両者における DNA 切断を特異的に行うかという分子機構とその制御について解明する。

## 3. 研究の方法

クラススイッチ組換えの検証には、*in vitro* 細胞株で効率よく IgM から IgA にスイッチする CH12 細胞を用いた。また、AID 変異体の活性検証には AID 欠失 B 細胞にレトロウイルスで AID 変異株を導入することを行なった。また、DNA 脱アミノ仮説を検証するために UNG 欠失マウス、APEX2 欠失マウスを用いた。APEX1 にはノックダウン法を用いて、その CSR への関与を検証した。Top1 の関与については AID による翻訳制御をアミノ酸の取り込みによって検証した。さらに人工的に Top1 をノックダウンすることによって CSR が強く活性化されることを証明した。また、Top1 の特異的阻害剤カンプトテシンの添加によって CH12 細胞によるクラススイッチ活性が低下した。G23S AID 変異体のノックインマウスを用い、その *in vivo* における腸管免疫の変異を組織染色、FACS、バクテリアのコロニーカウント、コレラトキシン毒素への抵抗性により検証した。AID プロモーターは、*luciferase construct* を作成し、CH12 細胞に導入することにより AID 発現に関わる領域を同定した。

## 4. 研究成果

【DNA 脱アミノモデルの反証】 DNA 脱アミノ学説は、AID が直接 DNA 上の C を U に変換し、その結果起こるミスマッチ (U/G) を塩基除去修復過程で UNG や Apex1 酵素により DNA 鎖切断を行うというモデルである。我々は、このモデルに対する重要な反証を得た。(a) DNA 脱アミノ活性がない AID 変異体 N51A をリンパ球に発現させると CSR 活性が野性型の 50% 維持された。(b) UNG の突然変異株を用い、UNG の WXXF モチーフの変異体を作製したところ、U 除去活性が保存されているにも関わらず、CSR 活性が欠損することを見いだした。

【RNA 編集モデルの検証】 CSR がニッキング酵素によって開始されるという我々の知見に基づき、Top1 の特異的阻害剤カンプトテシンを与えると CSR が強く阻害されることを明らかにした。さらに、AID と Top1 の関係を調べると、AID の発現によって Top1 のタンパク量が低下することが明らかとなった。また、Top1 の低下によって Non-B 型 DNA 構造の変化が起こることも明らかにした。Non-B DNA フォームの形成により、Top1 の切断がその後の DNA の回転と再結合を阻害し、ニック切断に

至るのであろうという結論にいたった。一方、ほかのニック活性を持つ Apex1 と 2 のノックダウンまたはノックアウトで CSR に影響はまったく見られなかった。

【SHM と CSR の活性の区別】AID 変異体 G23S は SHM が著しく低下するが、CSR は比較的保たれていた。G23S は切断活性が相対的に低下しているために、V 領域の切断活性がほとんど検出限界に近いくらいに低下しているといういわゆるハイボモルフィック変異体であることが明らかとなった。G23S のノックインマウスを作製し、*in vivo* で腸管免疫の場でこのマウスは IgA を大量に産生するが、SHM は 1/5 以下でコレラ毒素の抵抗性が低下していた。これにより SHM の腸管免疫での重要性が示された。

【AID の発癌への関与】国内外での研究者との共同研究により、肝癌、胃癌等の患者組織において AID の発現がみられること、また *in vitro* の実験でヒト胃粘膜上皮に *H-Pylori* が感染すると AID 発現が誘導されること、また肝細胞への HCV の感染によっても AID の発現が誘導されることから、AID と発癌の連関がヒトにおいても高い可能性として指摘されるようになった。AID の異常発現を制御するために AID プロモーター解析を行い、AID の発現を負に制御する E2F と *c-myc* が極めて重要役割を持つことを明らかにした。

## 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 49 件)

1) Komeno, Y., Kitaura, J., Watanabe-Okochi, N., Kato, N., Oki, T., Nakahara, F., Harada, Y., Harada, H., Shinkura, R., Nagaoka, H., Hayashi, Y., Honjo, T. and Kitamura, T. AID-induced T-lymphoma or B-leukemia/lymphoma in a mouse BMT model. *Leukemia* 査読有 24 1018-1024 (2010)

2) Tran, T., Nakata, M., Suzuki, K., Begum, N. A., Shinkura, R., Fagarasan, S., Honjo, T. and Nagaoka, H. B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress the Aicda gene by overcoming the effects of silencers. *Nature Immunol.* 査読有 11 148-154 (2010)

3) Kobayashi, M., Aida, M., Nagaoka, H.,

Begum, N. A., Kitawaki, Y., Nakata, M., Stanlie, A., Doi, T., Kato, L., Okazaki, I., Shinkura R., Muramatsu, M., Kinoshita, K. and Honjo, T. AID-induced decrease in topoisomerase 1 induces DNA structural alteration and DNA cleavage for class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 査読有 106 22375-22380 (2009)

4) Sabouri, Z., Okazaki, I., Shinkura, R., Begum, N. A., Nagaoka, H., Tsuchimoto, D., Nakabeppu, Y. and Honjo, T. Apex2 is required for efficient somatic hypermutation but not for class switch recombination of immunoglobulin genes. *Int. Immunol.* 査読有 21 947-955 (2009)

5) Doi, T., Kato, L., Ito, S., Shinkura, R., Wei, M., Nagaoka, H., Wang, J. and Honjo, T. The C-terminal region of AID is responsible for a novel function other than DNA cleavage in class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 査読有 106 2758-2763 (2009)

6) Begum, N.A., Stanlie, A., Doi, T., Sasaki, Y., Jin, H. W., Kim, Y.S., Nagaoka, H. and Honjo, T. Further evidence for involvement of a non-canonical function of uracil DNA glycosylase in class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 査読有 106 2752-2757 (2009)

7) Nonaka, T., Doi, T., Toyoshima, T., Muramatsu, M., Honjo, T. and Kinoshita, K. Carboxy-terminal domain of AID required for its mRNA complex formation *in vivo*. *Natl. Acad. Sci. USA* 査読有 106 2747-2751 (2009)

8) Shivarov, V., Shinkura, R. and Honjo, T. Dissociation of *in vitro* DNA deamination activity and physiological functions of AID mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 査読有 105 15866-15871 (2008)

9) Honjo, T. *Nature Immunol.* A memoir of AID, which engraves antibody memory on DNA. *Nature Immunol.* 査読有 9 335-337 (2008)

10) Pasqualucci, L., Bhagat, G., Jankovic, M., Compagno, M., Smith, P., Muramatsu, M.,

Honjo, T., Morse, HC 3rd, Nussenzweig, MC and Dalla-Favera, R. AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. Nat. Genet. 査読有 40 108-112 (2008)

11) Okazaki, I., Kotani, A. and Honjo, T. Role of AID in tumorigenesis. Adv. Immunol. 査読有 94 245-273 (2007)

12) Muramatsu, M., Nagaoka, H., Shinkura, R., Begum, N. A. and Honjo, T. Discovery of activation-induced cytidine deaminase, the engraver of antibody memory. Adv. Immunol. 査読有 94 1-36 (2007)

13) Matsumoto, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Endo, Y., Kou, T., Morisawa, T., Azuma, T., Okazaki, I., Honjo, T. and Chiba, T. *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. Nature Medicine 査読有 13 470-476 (2007)

14) Begum, N. A., Izumi, N., Nishikori, M., Nagaoka, H., Shinkura, R. and Honjo, T., Requirement of non-canonical activity of uracil DNA glycosylase for class switch recombination. J. Biol. Chem. 査読有 282 731-742 (2007)

15) Honjo, T., Nagaoka, H., Shinkura, R. and Muramatsu, M., AID to overcome the limitations of genomic information. Nature Immunol. 査読有 6, 655-661 (2005)

[学会発表] (計 57 件)

1) 本庶 佑 Common properties between class switch and meiotic homologous recombination. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on "Gene Expression and Signaling in the Immune System" 2010. 4. 24 New York, USA

2) 本庶 佑 Molecular studies on generation of antibody memory. The International Symposium on Genomics and Medicine, The Fondation Jean Dausset-Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) 2009. 3. 23 Paris, France

3) 本庶 佑 Molecular mechanism for

generation of antibody memory. 2008 Leskowitz Memorial Lecture at Tufts University School of Medicine 2008. 9. 24 Boston, USA

4) 本庶 佑 Molecular mechanism for antibody memory. The Heidelberger-Kabat Lecture, the Dean's Lecture Series 2006-2007, Columbia University Medical Center 2007. 2. 15 New York, USA

5) 本庶 佑 AID for generation of antigen-induced immune diversity. Paul E. Lacy Lecturer at Washington University in St. Louis 2006. 5. 1 St. Louis, USA

6) 本庶 佑 AID, a central molecule of immune diversity. 日独免疫セミナー 2005. 9. 18. Potsdam, Germany

[図書] (計 3 件)

1) 本庶 佑, 岩波書店、いのちとはなにか -幸福・ゲノム・病、全 154 ページ、2009

2) Okazaki, I., Kotani, A. and Honjo, T., ELSEVIER, Adv. Immunol., Role of AID in tumorigenesis., Vol. 94, p245-273, 2007

3) Muramatsu, M., Nagaoka, H., Shinkura, R., Begum, N. A. and Honjo, T., ELSEVIER, Adv. Immunol. Discovery of activation-induced cytidine deaminase, the engraver of antibody memory. Vol. 94, p1-36, 2007

[その他]

ホームページ等

<http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/>

[http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad\\_school/introduction/1513/](http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1513/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本庶 佑 (HONJO TASUKU)

京都大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：80090504

(2)研究分担者

錦織 桃子 (NISHIKORI MOMOKO)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：60378635  
異動のため H17 年度のみ

(3)連携研究者

新藏 礼子 (SHINKURA REIKO)  
長浜バイオ大学・バイオサイエンス部・  
教授  
研究者番号：50362471  
H17 年度から H19 年度までは研究分担者

ベガム ナシム (BEGUM NASIM)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：80362507  
H17 年度から H19 年度までは研究分担者

長岡 仁 (NAGAOKA HITOSHI)  
岐阜大学・医学研究科・教授  
研究者番号：20270647

鄭 (岡崎) 一美 (CHON(OKAZAKI) IL-MI)  
徳島大学・疾患ゲノム研究センター・助教  
研究者番号：50452339

小林 牧 (KOBAYASHI MAKI)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：20400690

土井 知光 (DOI TOMOMITSU)  
慶應大学・医学研究科・助教  
研究者番号：70437218

