

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590311

研究課題名（和文） DNA 修復における微小相同組換えの制御機構の研究

研究課題名（英文） Molecular analysis of microhomology-mediated end-joining in DNA repair

研究代表者

桑原 一彦（KUWAHARA KAZUHIKO）

熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号：10263469

研究成果の概要：GANP 分子の DNA 組換え制御機構に関して、βガラクトシダーゼ遺伝子を用いた組換え検出系により GANP の相同組換え抑制に関しては中央部分の Sac3 相同領域が重要であること、またこの組換え抑制は二重鎖切断後に起こることが明らかとなった。さらに GANP 欠損 B 細胞を用いてクラススイッチの解析を行うと IL-4 と抗 CD40 抗体の共刺激による誘導で微小相同組換えによる修復が増加していた。以上の結果より GANP は DNA 修復において相同組換え、微小相同組換えを制御する役割を持つことが示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：DNA 損傷、相同組換え、非相同末端接合、クラススイッチ

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA 損傷は二種類の過程によって修復されるが、一つは細胞周期 G1/S で起こる非相同末端接合（NHEJ）、もう一つは S/G2 で機能する相同組換え（HR）である。HR は DNA 修復の最も確実で安全な過程できるとされている。

(2) HR による遺伝子修復にはこれまでに明らかにされている過程以外に多岐にわたる機構が存在することが明らかになりつつある。免疫グロブリン遺伝子の修復には V 領域、C 領域ともに NHEJ が関与することが知られて

いる。しかし、クラススイッチでは、断端に 2～7 塩基対の相同部位が存在する遺伝子接合が存在し、microhomology-mediated end-joining (MMEJ) として注目されている。

(3) 免疫グロブリン遺伝子の修復に関わる分子として GANP を同定したが、この分子は MMEJ に関与する結果を得ており、DNA 修復における MMEJ の分子機構を明らかにする糸口になることが考えられた。

2. 研究の目的

(1) 研究遂行にあたり、(a) GANP は HR を抑

制する機能を有する、(b)B 細胞特異的 GANP 欠損マウスにおいてはクラススイッチが亢進する、という予備データを有していた。

(2) (a)に関して、 β ガラクトシダーゼ遺伝子を用いた組換え検出系で GANP が HR を起こす二重鎖切断の結合過程(接合前、接合、接合後)のどこに関与するか、また NHEJ が障害されている Scid マウス由来の線維芽細胞株を用いて *in vitro* の解析を行う。これにより GANP 分子が DNA 切断後の修復で HR、NHEJ、MMEJ のどのプロセスに有効かを明らかにする。

(3) (b)に関して、生体内における DNA 組換えの場としては免疫グロブリン遺伝子のクラススイッチが最も良い解析のモデルである。GANP 欠損 B 細胞を用いて様々な刺激系でクラススイッチを誘導し、S 領域の junction 部分がどのように修復されているかを解析する。

3. 研究の方法

(1) HR を誘導する二重鎖切断接合過程のどの過程(接合前、接合、接合後)に GANP が関与するかを調べる。

組換え検出系のレポーターベクターと GANP 発現ベクターをマウス線維芽細胞株 NIH-3T3 に共遺伝子導入し、転写への影響を解析する。もし抑制がかかっている場合は接合前で GANP が関与して HR を抑制している可能性がある。

レポーターベクターに酵母のエンドヌクレアーゼである I-sceI 認識配列を挿入し、I-sceI 発現ベクターと GANP 発現ベクターを共遺伝子導入する。I-sceI で二重鎖切断をおこした後 GANP が HR を抑制している場合は接合もしくは接合後に関与する可能性が高い。

GANP のどの領域が HR 抑制効果に重要であるのかを明らかにするために、GANP の種々の変異体を作成して、それぞれをレポーターベクターと共遺伝子導入して HR に対する効果を検討する。

(2) GANP が NHEJ に対しても影響を与えるかを調べるために Scid マウスより樹立した胎仔線維芽細胞株を用いて野生型マウス胎仔線維芽細胞株との組換え効率の比較を行う。もし両方で組換え効率に差がない場合は GANP は NHEJ の抑制には関与していないと考えられる。

(3) GANP が HR 関連分子と相互作用するかを解析する。哺乳動物の HR には Rad51、Mre11/Rad50/NBS1 複合体、Rad54 などに関与していることが示されている。DNA 損傷を与えると S 期で Rad51 のフォーカス形成が見られるので、この部分に GANP が共局在するか、あるいは GANP 欠損 B 細胞での二重鎖切断誘導で Rad51 のフォーカスが形成されるかを検討する。

(4) 免疫グロブリン遺伝子 V 領域及び C 領域の DNA 組換えにおける GANP の機能を解析する。

RAG 依存的におこる V(D)J 組換えを *in vitro* で解析するシステムのプラスミド等の供与を M. Lieber 博士、D. Schatz 博士より受けているので、GANP と共発現させた時に V(D)J 組換え効率などがどのように変化するかを解析する。

B 細胞特異的 GANP 欠損マウスにおける血清 IgG1 と IgE の上昇、GANP 欠損 B 細胞を用いた *in vitro* クラススイッチにおける switched transcript の早期の上昇から、IL-4 と抗 CD40 抗体の刺激による過剰なクラススイッチが考えられる。S 領域の junction の配列を解析して、MMEJ の増加の有無を検討する。MMEJ の増加が見られた場合は、この増加が刺激特異的なのか、それともサブクラス特異的なのか、を IL-4/抗 CD40 抗体以外の組み合わせ(LPS、LPS/IL-4 など)で刺激する。

4. 研究成果

(1) 2つの β -ガラクトシダーゼ遺伝子をタンデムにつないだ組換え検出ベクターを構築し、これを用いて GANP が HR を抑制することをすでに確認しているため、共発現させる GANP の種々の変異体を作成して GANP のどの領域が組換え抑制に関与するのかを検討した。中央部分 Sac3 相同領域が核内で働くことが重要であることが判明した。

(2) 新たに前方の β -ガラクトシダーゼ遺伝子に I-sceI 認識配列を挿入したベクターを作成し、I-sceI 発現ベクターとともに GANP 発現ベクターを共発現させた。I-sceI 切断による組換えを GANP は著明に減少させることがわかり、GANP による組換え抑制は二重鎖切断後(接合後)に起こることが示された。

(3) GANP が NHEJ にも影響を与える可能性を考え、NHEJ が機能しない Scid マウスから胎仔線維芽細胞を樹立し、組換えベクターを導入したが予想外に遺伝子導入効率が悪く、現時点では答えが出ていない。

(4) GANP 欠損 B 細胞に電離放射線をあて、二重鎖切断を誘導した後の Rad51 のフォーカス形成を調べた。しかし、コントロール B 細胞と比較して Rad51 のフォーカスに大きな差は見られなかった。また GANP と Rad51、Rad54 などとの会合も検討したが、これらの分子と GANP とは会合していなかった。従って、GANP の HR に対する抑制効果はこれまでに明らかにされている HR の機構とは異なるユニークなものである可能性が強く示唆された。酵母では GANP 相同分子 Sac3 が transcription-coupled recombination に関わることが報告されており、GANP が哺乳動物で同様な機能を有するのかを検討する必要がある。

(5) GANP が NHEJ に対しても影響を与えるか

を明らかにするために、RAG 依存的に起こる V(D)J 組換えに対してどのように影響するかを *in vitro* の V(D)J 再構成システムに GANP 発現ベクターを共遺伝子導入して解析した。その結果、GANP とそのカルボキシル末端側のみをもつ MCM3AP の両者とも RAG 依存的組換えには何の効果も及ぼさなかった。少なくとも V 領域遺伝子組換えの NHEJ には GANP は影響を与えないことが考えられた。

(6) GANP 欠損 B 細胞を IL-4/抗 CD40 抗体刺激でクラススイッチを誘導すると、mRNA 発現量、細胞表面のタンパク発現量、さらに培養上清中の抗体価が正常よりも増加していた。そこでこの過剰なクラススイッチが MMEJ によっておこっている可能性を考え、S μ /S γ 1 の junction 配列を解析した。その結果、GANP 欠損 B 細胞ではコントロール B 細胞に比べて 2~5 塩基の microhomology で修復されている割合が有意に多くなっていた。GANP 欠損 B 細胞を IL-4/抗 CD40 抗体以外の組み合わせ(LPS 単独または LPS/IL-4) で刺激し、S μ /S γ 3 のスイッチ junction 及び S μ /S γ 1 のスイッチ junction における microhomology の出現頻度をシーケンス解析した。これらのスイッチ junction ではコントロール B 細胞と比較して MMEJ による修復の増加は認めなかった。GANP は IL-4/抗 CD40 で誘導される IgG1 と IgE へのクラススイッチに関与することが示唆され、GANP 欠損 B 細胞におけるクラススイッチの障害は microhomology を介する MMEJ により修復される可能性が考えられた。

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 3 件)

Hideya Igarashi, Kazuhiko Kuwahara, Mikoto Yoshida, Yan Xing, Kazuhiko Maeda, Koichi Nakajima & Nobuo Sakaguchi. GANP suppresses the arginine methyltransferase PRMT5 regulating IL-4-mediated STAT6-signaling to IgE production in B cells. *Mol. Immunol.* 46:1031-1041 (2009). 査読有り

Satoru Fujimura, Takeshi Matsui, Kazuhiko Kuwahara, Kazuhiko Maeda & Nobuo Sakaguchi. Germinal center B-cell-associated DNA hypomethylation at transcriptional regions of the AID gene. *Mol. Immunol.* 45:1712-1719 (2008). 査読有り

Mikoto Yoshida, Kazuhiko Kuwahara, Tatsuya Shimasaki, Naomi Nakagata, Masao Matsuoka & Nobuo Sakaguchi. GANP suppresses DNA recombination, measured by direct-repeat β -galactosidase gene

construct, but does not suppress the type of recombination applying to immunoglobulin genes in mammalian cells. *Genes Cells* 12:1205-1213 (2007). 査読有り

〔学会発表〕(計 9 件)

Kazuhiko Kuwahara, Functional differences between GANP and THP1 molecules in B cell activation and development, 第 37 回日本免疫学会学術集会、2008 年 12 月 1 日、国立京都国際会館

Kazuhiko Kuwahara, Occurrence of sporadic breast cancer is associated with decrease of GANP causing abnormal sister chromatid cohesion, 第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日、名古屋国際会議場

桑原一彦、GANP 分子発現低下による姉妹染色分体接着異常とその発癌における役割、第 12 回基盤的癌免疫研究会、2008 年 7 月 2 日、大宮ソニックシティ

桑原一彦、GANP 分子発現低下による姉妹染色分体接着異常とその発癌における役割、第 12 回がん分子標的治療研究会、2008 年 6 月 26 日、総合学術センター

Kazuhiko Kuwahara, Occurrence of sporadic breast cancer is significantly associated with the decreased expression of GANP, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Sac3, The Asia-Africa International Network Symposium of JSPS Asia and Africa Science Platform Program and The Fourth LiverCare Center Symposium, 2008 年 2 月 19 日、Chroen Thani Princess Hotel (Khon Kaen, Thailand)

Kazuhiko Kuwahara, Lack of THP1 protein associated with GANP impairs B cell maintenance, 第 37 回日本免疫学会学術集会、2007 年 11 月 20 日、グランドプリンスホテル新高輪

Kazuhiko Kuwahara, Characterization of ganp gene abnormality in human breast cancer, 第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月 3 日、パシフィコ横浜

桑原一彦、非遺伝性散発性乳癌における胚中心関連 GANP 分子の発現異常、第 11 回基盤的癌免疫研究会、2007 年 7 月 11 日、東京大学鉄門記念講堂

桑原一彦、非遺伝性散発性乳癌における GANP の発現異常、第 11 回がん分子標的治療研究会、2007 年 7 月 6 日、大阪国際交流センター

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称:胆管がん特異的糖鎖エピトープを認識

するモノクローナル抗体

発明者：阪口薫雄、桑原一彦、荒木令江、坂本珠美

権利者：財団法人くまもとテクノ産業財団

種類：特願

番号：2009-025607

出願年月日：2009年2月2日

国内外の別：国内

〔その他〕

日本語総説

桑原一彦、吉田尊、阪口薫雄

胚中心 B 細胞に発現する GANP の遺伝子修復活性、臨床免疫・アレルギー科、51(2):119-124 (2009)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 一彦 (KUWAHARA KAZUHIKO)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号：10263469