

機関番号 : 13701

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20590277

研究課題名 (和文) 抗体遺伝子のクラススイッチ組換え及び体細胞突然変異制御の分子機構

研究課題名 (英文)

Molecular mechanisms for class switch recombination and somatic hypermutation of immunoglobulin genes

研究代表者

長岡 仁 (NAGAOKA HITOSHI)

岐阜大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 20270647

研究成果の概要 (和文) :

AID は抗体遺伝子の改変や細胞の腫瘍化に係るタンパク質で、その発現制御と作用機構を分子レベルで解析した。AID の遺伝子 *Aicda* の制御にエンハンサーとサイレンサーとして機能するエレメントを *in vitro* 及び *in vivo* で明らかにし、そこに結合する因子を同定した。また、AID 分子にヒストンシャペロン Spt6 が結合する事また、AID の C 末端ドメインは抗体遺伝子のクラススイッチ組み換えで DNA 修復の過程に関与する事を明らかにした。これらの知見は AID の機能やその破綻による細胞がん化過程の理解に重要な情報を提供する。

研究成果の概要 (英文) :

AID is the molecule central for Immunoglobulin gene alteration; its activity is believed to be involved in tumorigenesis in various types of cells. We have analyzed the regulatory elements in/around *Aicda*, the gene for AID and have determined essential DNA regions for enhancer and silencer. Some factors that bind to these elements were confirmed by chromatin immunoprecipitation. We also found that Spt6, a histone chaperon, associates with AID and it is involved in class switch recombination of immunoglobulin gene. A C-terminus of AID required for the repairing step of the recombination. These findings provide an important insight for understanding the molecular mechanisms of AID in normal and abnormal situation that are essential for antibody diversity and tumorigenesis, respectively.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 基礎医学・医化学一般

キーワード : 遺伝子 核酸 ゲノム 免疫学 抗体遺伝子

1. 研究開始当初の背景

B リンパ球は、抗原と出会った後、胚中心を形成し、そこで抗体遺伝子を DNA レベルで改編する。その第一は、体細胞突然変異

(SHM)である。これは主に点変異を抗体可変部遺伝子に高頻度で蓄積するもので、その中から抗原親和性の高い変異クローンが選択されることが、抗体の親和性成熟の分子基盤

である。第二は、抗体定常部遺伝子(C)のクラススイッチ組換え(CSR)で、C- μ 遺伝子の5'側にあるスイッチ領域(S- μ)と、他の定常部遺伝子の5'側に各々存在するスイッチ領域(S)間で組換えが起りその間のDNAが欠失する事で下流の定常部遺伝子が可変部遺伝子のすぐ下流に位置する様になるものである。AIDタンパク質はDNAの変異を誘導する事でCSRとSHMを引き起こす。また、その異所性な発現により細胞の腫瘍化に関与する事が示唆されていた。AIDの発現制御機構とDNA改変への作用機序は十分にわかっていない。

2. 研究の目的

(1) AIDの遺伝子(Aicda)の発現制御機構を解明する。

(2) AIDのDNA改変作用の分子機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Aicda遺伝子及び周辺領域の良く保存された部分のエンハンサー・サイレンサー活性をレポーターアッセイでin vitroで解析する。

(2) クロマチン免疫沈降法で制御タンパク質の結合を検討する。

(3) 制御領域のin vitroでの機能をトランスジェニック動物を作り確認する。

(4) AIDの結合タンパク質を免疫沈降で解析する。

(5) CSRとSHMに関わりあると思われるタンパク質をノックダウンしてその機能を解析する。

4. 研究成果

(1) Aicda遺伝子上流領域と第一イントロン内にエンハンサーおよびサイレンサー活性があるエレメントを同定し、それに関する転写因子群を同定した。(図1)

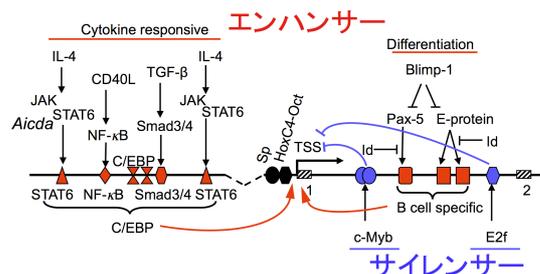


図1 Aicda遺伝子の発現制御エレメント

(2) AIDにSpt6が結合しそれがCSRに関与するがSHMへの関与は殆どないことを明らかにした。

(3) AIDのC末端側のドメインにCSR時のDNA再結合に重要な役割がある事を明らかにした。

(4) AIDによるCSR誘導にTopoisomerase Iの抑制が重要である事を明らかにした。

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12件)

- Honjo, T., Kobayashi, M., Begum, N., Kotani, A., Sabouri, S., and Nagaoka, H. (2012). The AID Dilemma: Infection, or Cancer? *Adv Cancer Res* 113, 1-44. 査読無し
- Kawamata, T., Lu, J., Sato, T., Tanaka, M., Nagaoka, H., Agata, Y., Toyoshima, T., Yokoyama, K., Oyaizu, N., Nakamura, N., Ando, K., Tojo, A., and Kotani, A. (2012). Imatinib mesylate directly impairs class switch recombination through downregulation of AID: its potential efficacy as an AID suppressor. *Blood* 査読有り
- Qin, H., Suzuki, K., Nakata, M., Chikuma, S., Izumi, N., Thi Huong, L., Maruya, M., Fagarasan, S., Busslinger, M., Honjo, T., and Nagaoka, H. (2011). Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression in CD4 T Cells is Associated with a Unique IL-10-Producing Subset that Increases with Age. *PLoS One* 6, e29141. 査読有り
- Okazaki, I. M., Okawa, K., Kobayashi, M., Yoshikawa, K., Kawamoto, S., Nagaoka, H., Shinkura, R., Kitawaki, Y., Taniguchi, H., Natsume, T., Iemura, S., and Honjo, T. (2011). Histone chaperone Spt6 is required for class switch recombination but not somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 7920-7925.

- 査読有り
5. 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. (2010). AID-induced T-lymphoma or B-leukemia/lymphoma in a mouse BMT model. *Leukemia* 24, 1018-1024. 査読有り
 6. Nagaoka, H., Tran, T. H., Kobayashi, M., Aida, M., and Honjo, T. (2010). Preventing AID, a physiological mutator, from deleterious activation: regulation of the genomic instability that is associated with antibody diversity. *Int Immunol* 22, 227-235. 査読無し
 7. Tran, T. H., Nakata, M., Suzuki, K., Begum, N. A., Shinkura, R., Fagarasan, S., Honjo, T., and Nagaoka, H. (2010). B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress Aicda by overcoming the effects of silencers. *Nat Immunol* 11, 148-154. 査読有り
 8. Begum, N. A., Stanlie, A., Doi, T., Sasaki, Y., Jin, H. W., Kim, Y. S., Nagaoka, H., and Honjo, T. (2009). Further evidence for involvement of a noncanonical function of uracil DNA glycosylase in class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2752-2757. 査読有り
 9. Doi, T., Kato, L., Ito, S., Shinkura, R., Wei, M., Nagaoka, H., Wang, J., and Honjo, T. (2009). The C-terminal region of activation-induced cytidine deaminase is responsible for a recombination function other than DNA cleavage in class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2758-2763. 査読有り
 10. Kobayashi, M., Aida, M., Nagaoka, H., Begum, N. A., Kitawaki, Y., Nakata, M., Stanlie, A., Doi, T., Kato, L., Okazaki, I. M., Shinkura, R., Muramatsu, M., Kinoshita, K., and Honjo, T. (2009). AID-induced decrease in topoisomerase 1 induces DNA structural alteration and DNA cleavage for class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 22375-22380. 査読有り
 11. Sabouri, Z., Okazaki, I. M., Shinkura, R., Begum, N., Nagaoka, H., Tsuchimoto, D., Nakabeppu, Y., and Honjo, T. (2009). Apex2 is required for efficient somatic hypermutation but not for class switch recombination of immunoglobulin genes. *Int Immunol* 21, 947-955. 査読有り
 12. Shivarov, V., Shinkura, R., Doi, T., Begum, N. A., Nagaoka, H., Okazaki, I. M., Ito, S., Nonaka, T., Kinoshita, K., and Honjo, T. (2009). Molecular mechanism for generation of antibody memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 569-575. 査読有り
- [学会発表] (計 6 件)
1. 長岡 仁 他 AID 遺伝子が発現する T 細胞サブセットは IL-10 を発現し加齢とともに蓄積するユニークなサブセッ

- トである 第84回日本生化学会大会
2011年9月24日 京都市
2. 吉岡 孝 他 RNF8によるPlk1タンパク質の減少とがん細胞における異常 第84回日本生化学会大会 2011年9月22日 京都市
 3. 長岡 仁 他 Transcriptional regulation of Aicda, encoding activation-induced cytidine deaminase 第14回国際免疫学会議 2010年8月26日 神戸市
 4. Tran TH 他 AID遺伝子 (Aicda) の発現は、刺激反応性及びBリンパ球特異的な2つのエンハンサー領域とそれに拮抗するサイレンサーにより制御される 第82回日本生化学会大会 2009年10月23日 神戸市
 5. 小林 牧 他 免疫グロブリン遺伝子座のクラススイッチ組換えにおけるTopoisomerase Iの関与 第82回日本生化学会大会 2009年10月23日 神戸市
 6. Tran TH 他 Identification of functionally important elements regulating activation-induced cytidine deaminase gene expression 第38回日本免疫学会総会・学術集会 2008年12月1日 京都市

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.gifu-u.ac.jp/labo/laboj/molpathobiochem.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長岡 仁 (NAGAOKA HITOSHI)

岐阜大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20270647