

機関番号：34204

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590490

研究課題名 (和文) 抗体のクラススイッチ誘導に必須の遺伝子の同定

研究課題名 (英文) Identification of novel essential factors responsible for class switch recombination of immunoglobulin genes.

研究代表者

新蔵 礼子 (SHINKURA REIKO)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：50362471

研究成果の概要 (和文) : Activation-induced cytidine deaminase (AID)は抗体遺伝子のクラススイッチに必須の遺伝子であり抗体遺伝子に傷を入れることはわかっているが、AID の直接の標的は何か明らかではない。本研究ではAID がクラススイッチを誘導する詳細な機序を明らかにするため、AID 以外の cDNA (おそらく AID の標的 RNA 由来) で AID ノックアウト B 細胞のクラススイッチが回復されることを示し、AID の標的をクローニングすることを目的とした。スクリーニングの結果、AID の標的と思われる候補分子の情報を得たので、今後それらのクラススイッチへの寄与を検討する。

研究成果の概要 (英文) : Activation-induced cytidine deaminase (AID) is essential for class switch recombination of immunoglobulin genes. AID is required to introduce DNA lesions into switch region of immunoglobulin genes. However, an important question remains concerning how AID leads to double-strand DNA cleavage in switch region. Based on the hypothesis that a protein coded by the mRNA edited by AID generates DNA cleavage, I performed a rescue experiment for class switch recombination in AID-deficient B cells using retroviral cDNA library. Several candidate genes are now analyzed to confirm its role in class switch recombination.

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	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：抗体・クラススイッチ

1. 研究開始当初の背景

Activation-induced cytidine deaminase (AID)は抗体遺伝子のクラススイッチと体細胞突然変異(SHM)に必須の遺伝子である。その機序はDNA切断であることはわかっているが、AIDの標的がDNAであるか、RNAであるか、結論が得られていない。AIDの標的はDNA上のCであるとするDNA脱アミノ仮説は、ケンブリッジ大学のNeuberger博士が2002年に提唱して以来、多くの研究者が賛同している。この仮説ではAIDが一本鎖DNA上のdCを脱アミノ反応によってdUに変え、続いて生じたdU/dG mismatchesをUNGが認識し、dUをDNA上から除去し、その後、各種のDNA修復酵素の働きにより、DNA切断あるいは突然変異の挿入という結果になる、というものである。大腸菌などで合成したAIDが一本鎖DNA上のCをUに変えること、またUNGノックアウトマウスでクラススイッチが低下することなどがこの説を支持する証拠である。

これに対して、申請者は多くのAID変異体を作成し、それぞれについてクラススイッチ、体細胞突然変異および一本鎖DNAに対する脱アミノ活性をin vitroの実験系で対比、比較した。その結果、クラススイッチ活性とDNA脱アミノ活性の間に相関が見られないことがわかった。特にN51A変異体はDNAに対する脱アミノ活性を消失しているにもかかわらず、AIDノックアウトマウスのB細胞に発現させると、野生型AIDの40%ほどのクラススイッチを誘導できることがわかった。つまり、一本鎖DNAに対する脱アミノ活性はクラススイッチ誘導に必須ではないことが示唆され、AIDの標的はDNAではなくRNA上のCではないかという仮説が指示される結果を得た。

2. 研究の目的

上記の仮説を証明するためにはAIDが編集する標的RNAをクローニングしなければならない。そのためにAIDノックアウトB細胞に、cDNAライブラリーを導入してAID以外の分子の発現でクラススイッチが回復することを示す。cDNAライブラリーは刺激したマウ

スB細胞から調整し、レトロウイルスベクターを使ってAIDノックアウトB細胞に導入する。これによりAIDの下流で働く遺伝子、言い換えるとAIDによって編集されたmRNAをクローニングし、AIDがRNA編集酵素であることを証明する。

3. 研究の方法

(1) AIDノックアウトB細胞ラインの樹立

上記のレスキュー実験を成功させるためには実験に用いる細胞が重要である。つまり、クラススイッチが効率良く誘導できること、クラススイッチが誘導されたことを検出することが容易なこと、およびサブクローニングの途中で細胞が死んでしまっただけでなく、クラススイッチを起こした細胞を失わないこと、などの条件を満たさなければならない。世界で使われているB細胞ラインのうち、もっとも効率良くクラススイッチを誘導できるのはCH12である。In vitroでサイトカイン刺激を行うと48時間以内に約50%の細胞がIgAへとスイッチすることが知られている。この細胞を用いてAIDのクローニングも成功した。よってCH12を使ってAIDノックアウトB細胞の樹立を試みた。

(2) cDNA libraryの準備

レスキュー実験に使うcDNAライブラリーのソースとしてin vitroで刺激した後の正常マウスB細胞からRNAを抽出する。この中にはAIDのmRNAが含まれているので、AID mRNAに対するアンチセンスオリゴを用いてAID mRNAを排除したのち、残りのmRNAを用いてレトロウイルスベクターにcDNAライブラリーを構築した。仮説に従えば、この中にAIDによって編集されたmRNAが含まれているはずである。

(3) AIDノックアウトB細胞のクラススイッチレスキュー実験

cDNAライブラリーをパッケージング細胞である293T細胞に導入し、レトロウイルスを調製した。サイトカイン刺激したAIDノックアウトB細胞にこのレトロウイルスを感染させた。3日間培養後に、クラススイッチし

て IgG3 を発現した細胞をセルソーターで分離した。分離した細胞より DNA を抽出し、レトロウイルスベクターのインサートを PCR で増幅後、クローニングして塩基配列を解析した。

4. 研究成果

(1) CH12 を使って AID ノックアウト B 細胞の樹立を試みたが、ノックアウトの効率が低く、目的の細胞を得ることができなかった。そのためレスキュー実験は AID ノックアウトマウスの B 細胞を用いることに予定を変更した。当初、クラススイッチが回復した CH12 細胞を限界希釈してクローニングする予定であったが、AID ノックアウトマウス B 細胞は長期の培養に耐えないため、かわりにセルソーターによりクラススイッチが回復した AID ノックアウト B 細胞を分離することにした。この変更によって、予定通りレスキュー実験を行うことに成功した。

(2) レスキュー実験の結果、クラススイッチが回復した AID ノックアウトマウスの B 細胞から DNA を抽出し、細胞に導入されたレトロウイルスベクターのインサート cDNA の塩基配列を決定した。現在、AID 以外のクラススイッチ誘導に重要と考えられる候補遺伝子をいくつか得ている。今後、これらの候補分子について、AID の下流の反応に関わっているのかどうか、を詳細に検討していく予定である。

クラススイッチは抗体遺伝子の定常領域の DNA 配列を標的として、DNA2 本鎖切断とその断端の結合による反応であり、AID は DNA2 本鎖切断に必須といわれている。AID 以外の遺伝子の導入で AID ノックアウト細胞のクラススイッチを誘導できることを示すことは RNA 編集仮説の直接の証明となり、今後の研究の方向を大きく変えることになるかと期待される。また、AID が染色体転座や癌遺伝子の変異導入に関与することも報告されており、AID のゲノム改編機構を分子レベルで解明することは免疫学だけでなくがん征圧にも重要である。

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 9 件)

- ① Wei M, Shinkura R, Doi Y, Maruya M, Fagarasan S, Honjo T. Mice carrying a knock-in mutation of Aicda resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. *Nature Immunology* 12:264-270, 2011. 査読有
- ② 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, Kitamura T. AID-induced T-lymphoma or B-leukemia/lymphoma in a mouse BMT model. *Leukemia* 24:1018-1024. 2010. 査読有
- ③ 新蔵 礼子、免疫グロブリンの体細胞突然変異・クラススイッチと AID およびその関連分子、臨床免疫・アレルギー科、54:72-79, 2010. 査読無
- ④ Sabouri Z, Okazaki IM, Shinkura R, Begum N, Nagaoka H, Tsuchimoto D, Nakabeppu Y, Honjo T. Apex2 is required for efficient somatic hypermutation but not for class switch recombination of immunoglobulin genes. *International Immunology* 21:947-955, 2009. 査読有
- ⑤ Tran TH, Nakata N, Begum N, A Shinkura R Honjo T, Nagaoka H. B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress the Aicda gene by overcoming the effects of silencers. *Nature Immunology* 11:148-154, 2009. 査読有
- ⑥ 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. AID-induced decrease in topoisomerase 1 induces DNA structural alteration and DNA cleavage for class switch recombination. *PNAS* 106:22375-22380, 2009. 査読有
- ⑦ Doi T, Kato L, Ito S, Shinkura R, Wei M, Nagaoka Hm Wang J, Honjo T. The C-terminal region of activation-induced cytidine deaminase is responsible for a recombination function other than DNA cleavage in class switch recombination. *PNAS* 106:2758-2763, 2009. 査読有
- ⑧ Shivarov V Shinkura R, Doi T, Begum NA,

Nagaoka H, Okazaki IM, Ito S, Nonaka T, Kinoshita K, Honjo T. Molecular mechanism for generation of antibody memory. *Philos Trans R Soc Lond B Bio Sci* 364:569-575,2009.査読無

- ⑨ Shivarov V, Shinkura R, Honjo T. Dissociation of in vitro DNA deamination activity and physiological functions of AID mutants. *PNAS* 105:15866-15871, 2008.査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Shinkura R, Wei M, Honjo T. Knock-in mice carrying a somatic hypermutation-defective AICDA mutation have compromised mucosal defense and impaired gut homeostasis. 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan. 2010.8.26
- ② Shinkura R, Shivarov V and Honjo T. Dissociation of in vitro DNA deamination activity and physiological functions of AID mutants. 第 3 1 回日本分子生物学会年会、第 8 1 回日本生化学学会大会合同大会、神戸、2008.12.11.

[その他]

ホームページ等

http://www.nagahama-i-bio.ac.jp/news/news/2011/01/post_107.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新蔵 礼子 (SHINKURA REIKO)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・
教授

研究者番号：50362471