

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590436
 研究課題名（和文）GANP のハイパーミューテーション機能

研究課題名（英文）Role of GANP-mediated hypermutation

研究代表者
 前田 和彦（MAEDA KAZUHIKO）
 熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
 研究者番号：20332869

研究成果の概要（和文）：活性化型脱アミノ化酵素（AID）による抗体遺伝子への体細胞変異導入は成熟 B 細胞における抗体の多様性獲得には必須である。AID が細胞質から核に移行して標的となる免疫グロブリン（Ig）遺伝子座へ導かれていく分子機構については明らかではない。本研究では、胚中心 B 細胞で高発現する GANP と AID が複合体を形成し、IgV 領域遺伝子座にリクルートしていることを明らかとした。また、GANP が転写制御していることを証明した。以上の成果より、GANP が IgV 遺伝子座選択的アクセスと AID の標的 DNA アクセスを制御することを解明した。

研究成果の概要（英文）：Activation-induced cytidine deaminase (AID) is essential to the generation for somatic hypermutation at immunoglobulin gene locus. However, it is unclear how cytoplasmic AID shepherds from cytoplasm to nucleus toward the IgV locus. We studied the role of GANP-mediated somatic hypermutation in B cells. We showed that GANP forms a complex with AID in the cytoplasm and relocated into the nucleus. We found that GANP regulates the recruitment of AID to the immunoglobulin variable regions by modulating transcription and nucleosome occupancy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：免疫学・ゲノム・遺伝子

1. 研究開始当初の背景

（1）抗原刺激を受けた B 細胞は、末梢リンパ組織の胚中心（GC）において免疫グロブリン

ン（Ig）のクラスを IgM から IgG へとクラススイッチ組換え（class switch recombination; CSR）し、さらに Ig 遺伝子

の V 領域 (IgV) には体細胞突然変異 (somatic hypermutation; SHM) を誘導する。また、ある種属ではジーンコンバージョン (gene conversion; GCV) が機能している。活性型脱アミノ化酵素 (AID) は、SHM/CSR/GCV における必須分子であることがこれまでの研究によって示されている。AID に関連する研究は、発見以来 10 年間に 700 報以上の報告があることから非常に重要と認識されている。AID は核移行シグナル (NLS) と核外移行シグナル (NES) を使って核膜孔を移動できるが、細胞質に優位に局在している。AID の異所性発現マウスでは発癌を誘発するため、B 細胞には AID を Ig 遺伝子座に適切に誘導する分子機構と未同定分子の存在が強く示唆されている。RNA 代謝、DNA 複製に関与する分子とタンパク質結合が認められるが、機能的な結論には至っていない。

(2) AID の作用機序として、プロテインキナーゼ A による 38 番目のセリンがリン酸化されると、活性化 AID が一本鎖 DNA を基質として、標的配列 WRC (W=A/T, R=A/G) (hotspot) のシトシン (dC) をウリジン (dU) に変換、dU が uracil-DNA glycosylase (UNG) による作用で脱塩基状態が形成され、様々な DNA 修復関連分子が誘導される、という DNA 脱アミノ化モデルが支持されている。しかし、Ig 遺伝子座周辺配列の解析や AID 自身の詳細な分子構造解析にも関わらず、どのようにして AID が Ig 遺伝子座にアクセスしているのかという重要な課題が現在まで取り残されている (Delker et al., Nat. Immunol., 2009)。

(3) GC 領域で高発現する 210kDa の核内タンパク質 GANP (germinal center associated protein) には、RNA プライマーゼ (PD)、酵母 Sac3 相同性 (SHD)、複製ライセンス因子 MCM3 結合ドメイン (MCM3BD)、ヒストンアセチル化 (HAT) 活性領域がある。B 細胞特異的ノックアウト (B-ganp KO) マウスと B 細胞特異的トランスジェニック (GanpTg) マウスを用いた解析から、高親和性抗体産生に関連していることが明らかになっている。さらに ganp 遺伝子の発現量変動が発がんに関連する。しかしながら、さまざまな機能ドメインやモチーフを有する GANP が、どのような分子機構によって SHM を誘導し高親和性抗体産生に関与しているのか、分子発見以来依然明らかではない。

2. 研究の目的

(1) 成熟 B 細胞における抗体の多様性獲得には活性化 B 細胞で特異的発現する AID による DNA 変異導入の分子経路が必須である。し

かしながら、細胞質に優位に存在する AID 分子が核移行して、どのようにして Ig 遺伝子座へと正確に誘導されていくのかについては明らかではない。本研究では、同じく GC-B 細胞で高発現する GANP が、AID の標的 DNA にアクセスする分子経路に位置することを証明し、これまで分子レベルで未解決とされている抗体遺伝子の多様性・親和性獲得における分子機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) GANP が AID と複合体を形成しているかどうかを分子生物学的手法によって解析する。

(2) さまざまな変異体を作製し、GANP による核内輸送経路に変化があるかどうかについてタイムラプス蛍光顕微鏡を用いた生細胞観察による経時的追跡によって解析を行なう。

(3) GANP が AID の Ig 遺伝子座へのリクルートに関与しているかどうかをクロマチン免疫沈降法と定量 PCR 法によって調べる。

(4) ヒト Ramos B 細胞株から核タンパク質分画を精製し GANP 結合分子をプロテオミクス法によって同定し、検定する

4. 研究成果

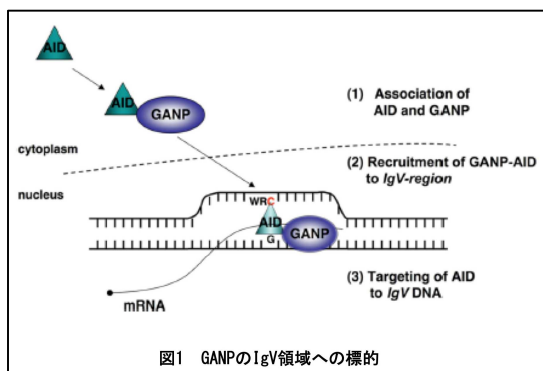
(1) 無細胞系及びヒト B 細胞株抽出系による免疫沈降法によって、GANP と AID が核酸を介さずに直接結合することを明らかとした。この結合は細胞質分画で複合体を形成し、核分画へと移動することを観察し、細胞分画を用いたウエスタンブロット法によって確認した。

(2) GANP 結合領域を同定するため、さまざまな AID 変異体を作製した。免疫沈降法によってスクリーニングしたところ、D143A 変異体 AID が GANP との結合能を消失することを明らかとした。この D143A 変異体 AID は脱アミノ化酵素活性を保つことから、構造変化は認められない。さらに赤色蛍光タンパク質と融合した D143A 変異体 AID を作製し、緑色蛍光タンパク質融合 GANP を使い、両分子の核内輸送についてタイムラプス蛍光顕微鏡を用いた経時的生細胞観察では、核内輸送に障害があることが認められた。

(3) GANP が AID の Ig 遺伝子座へのリクルートを制御していることをクロマチン免疫沈降法と IgV 領域に対する定量 PCR 法による検出系を確立させ、証明した (図 1)。この研究成果は、国内外の関連分野において 26 回の原著論文・総説で引用され国内外で高く評価・注目されている。

(4) GANP 複合体を調べるため、ヒト Ramos B 細胞株から抽出した核タンパク質と抗 GANP 抗体を用いてプロテオミクスを行なった。その結果、ヒストン蛋白及び種々の RNA 輸送・

代謝関連分子群の同定に成功した。個別分子の検証を進める過程で、GANP のヒストンアセチル化ドメイン HAT に着目した。GANP 自身の HAT ドメインがヌクレオソームの配置と安定性維持に関連することを ChIP 法及びヌクレ



オソーム占有アッセイによって検証を行なった。GANP がクロマチン分画に安定的に存在すること、GANP の HAT ドメインがヌクレオソームの配置と安定性維持に関連することについて生化学的手法を用いて明らかとした。GANP 複合体による Ig 遺伝子座選択的アクセスが、AID の標的 DNA アクセスに関連することが示唆された。

(5) ヒトB細胞株のRamos 細胞で内在性GANP をノックダウンする方法を確立した。GANP抑制状態では、ヒストンH1/H3のアセチル化の低下、活性化RNAポリメラーゼIIのアクセスが著しくて低下、stall factorのアクセスが変動することを証明した。さらに、GANP強制発現 Ramos細胞では、IgV領域に存在する2つのヌクレオソームのポケット領域に、AIDによって変異誘導されるhotspot C→T変異が高頻度に蓄積していることが判明した。これらの結果より、GANPのハイパーメチレーション機能は、GANP自身によるIgV遺伝子座選択的アクセスによって、リクルートしてきたAIDを標的DNAに制御することによることを解明した。以上の研究成果は、総合科学雑誌のNature Communications誌 (オンライン版) に受理された。オンライン発表後、2,000回を超えるアクセス (7位) があり、速報値として国内外に高いインパクトを与えた。

今後の展望として、GANPを介した新たなSHM誘導経路の同定が、抗体産生細胞の成熟過程や長期生存システムのさらなる解明へと繋がるものと期待される。

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4件)

(1) Shailendra Kumar Singh, Kazuhiko Maeda

(co-first author), Mohammed Mansour Abbas Eid, Sarah Ameen Almofty, Masaya Ono, Phuong Pham, Myron F. Goodman, and Nobuo Sakaguchi. 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

(2) Teppei Toda, Kazuhiko Kuwahara, Naoyuki Kondo, Zene Matsuda, Yosuke Maeda, Kazuhiko Maeda, and Nobuo Sakaguchi. 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

(3) Nobuo Sakaguchi, Kazuhiko Maeda, and Kazuhiko Kuwahara. 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

(4) Kazuhiko Maeda, Shailendra Kumar Singh, Kazufumi Eda, Masahiro Kitabatake, Phuong Pham, Myron F. Goodman, and Nobuo Sakaguchi. GANP-mediated recruitment of activation-induced cytidine deaminase to cell nuclei and to immunoglobulin variable region DNA. J. Biol. Chem.、査読有、2010、285:23945-23953

DOI: 10.1074/jbc.M110.131441

[学会発表] (計24件)

(1) Maeda, K., Singh, S., Almofty, S., Eid, M., Shimoda, M. and 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)

(2) Singh, S., Maeda, K., Eid, M., Almofty, S., Shimoda, M. and Sakaguchi, N., GANP regulates APOBEC3G targeting for reduction of HIV-1 infectivity, 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)

(3) Eid, M., Maeda, K., Singh, S., Almofty, S., Shimoda, M. and 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)

(4) Almofly, S., Maeda, K., Singh, S., Eid, M., Shimoda, M. and Sakaguchi, N., Escorting APOBEC3G toward the full length HIV-1 mRNA at the cytoplasmic P bodies. 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) 前田和彦、サーラルモフティ、シェイレンドラシン、モハメドエイド、下田真唯子、池田輝政、小糸厚、阪口薫雄、GANP を介した APOBEC3G の抗 HIV 感染阻止機構の解析、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、2012. 11. 25、慶応義塾大学、日吉キャンパス (神奈川)

(6) Maeda, K., SA, A., Singh, S., Eid, M., Shimoda, M., Ikeda, T., Shida, H., Koito, A., Pham, P., Goodman, M. and Sakaguchi, N. Mammalian TREX-2 component GANP is involved in HIV-1 mRNA export、第 13 回熊本エイズセミナー-GCOE ジョイント国際シンポジウム、2012. 10. 26、ホテル日航熊本、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル (熊本)

(7) Maeda, K., Singh, S., SA, A., Eid, M., Ono, M. and Sakaguchi, N., Targeting the rearranged immunoglobulin V-region locus in B-cells by the histone acetyltransferase activity of GANP、第 6 回日本エピ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)

(8) Maeda, K., Singh, S., SA, A., Eid, M., Ikeda, T., Koito, A., Pham, P., Goodman, M. and Sakaguchi, N., GANP associated with HIV-1 RNA export is encapsidated with APOBEC3G into virion core、Keystone Symposia Mutations, Malignancy and Memory-Antibodies and Immunity、2012. 3. 21、Boston, Boston Park Plaza & Towers (アメリカ)

(9) Sakaguchi, N., Singh, S., SA, A., Eid, M., Ono, M. and 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 (アメリカ)

(10) 前田和彦、シェイレンドラシン、サーラルモフティ、モハメドエイド、池田輝政、小糸厚、阪口薫雄、APOBEC3G の HIV-1 粒子内

への取り込みを制御する宿主因子 GANP、第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、2011. 12. 1、ハイアットリージェンシー東京 (東京)

(11) Maeda, K., Singh, S., Almofly, S., Eid, M. and 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)

(12) Singh, S., Maeda, K., Almofly, S., Eid, M. and 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)

(13) Eid, M., Maeda, K., Singh, S., Almofly, S. and 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)

(14) Maeda, K., Singh, S., SA, A., Eid, M., Ikeda, T., Koito, A., Pham, P., Goodman, M. and Sakaguchi, N., GANP promotes APOBEC3G encapsidation in virions to reduce viral infectivity、第 12 回熊本エイズセミナー-GCOE ジョイント国際シンポジウム、2011. 10. 21、ホテル日航熊本、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル (熊本)

(15) Maeda, K., Singh, S., SA, A., Eid, M., Ikeda, T., Koito, A., Pham, P., Goodman, M. and Sakaguchi, N., GANP associated with HIV-1 RNA export is encapsidated with Apobec3G into virion cores、The 2011 Meeting on Retroviruses at Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor、2011. 5. 25、New York, Cold Spring Harbor Laboratory (アメリカ)

(16) Maeda, K., Singh, S., SA, A., Eid, M. and Sakaguchi, N., Transcriptional targeting at immunoglobulin V-region locus by an RNA-export molecule GANP、第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会、2011. 5. 20、KKR ホテル熊本 (熊本)

(17) Sakaguchi, N., Maeda, K. and Kuwahara, K., Regulation of immune function by controlling RNA metabolism、The 2nd Workshop of Synthetic Immunology、2010. 12. 17、Kyoto University Shiran Kaikan, Inamori Hall (京都)

(18) 阪口薫雄、池田輝政、小糸厚、前田和彦、Apobec3G の HIV-1 粒子内への取り込みを制御する宿主因子の同定、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、2010. 11. 24、グランドプリ

ンスホテル高輪／ザ・プリンスさくらタワー
東京（東京）

(19) Sakaguchi, N., Maeda, K., Singh, S., Sarah, A., Eid, M., Ikeda, T. and Koito, A., GANP is a host factor that regulates Apobec3G encapsidation to HIV-1 viruses, Asian-African Research Forum 2010、2010.11.11、Hanoi, Melia Hotel (ベトナム)

(20) Maeda, K., Singh, S., Pham, P., Goodman, M. and Sakaguchi, N., GANP-mediated recruitment of AID to the nuclei and to IGV-region DNA, The 5th International Conference on Gene Regulation in Lymphocyte Development、2010.10.9、Aegean Conferences, Chania, Crete, Minoa Palace Conference Center (ギリシャ)

(21) Maeda, K., Singh, S., Sarah, A., Eid, M., Ikeda, T., Pham, P., Goodman, M., Koito, A. and Sakaguchi, N., GANP regulates the incorporation of Apobec3G into HIV-1 virions, 第11回熊本エイズセミナー-GCOE ジョイント国際シンポジウム、2010.10.6、ホテル日航熊本、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル（熊本）

(22) Maeda, K., Singh, S. and Sakaguchi, N., GANP controls AID recruitment to immunoglobulin variable region DNA, The 14th International Congress of Immunology、2010.8.22、The Kobe Convention Center Complex (兵庫)

(23) Singh, S., Maeda, K. and Sakaguchi, N., A role of chromatin modification at immunoglobulin locus by GANP, The 14th International Congress of Immunology、2010.8.22、The Kobe Convention Center Complex (兵庫)

(24) 阪口薫雄、前田和彦、シャイレンドラシン、北畠正大、戸田哲平、桑原一彦、Molecular Mechanism of Immunoglobulin V-region Diversification and its Application in Medical Sciences、日本ヒトプロテオーム機構第8回大会(日本プロテオーム学会2010年会)・第6回日本臨床プロテオーム研究会・連合大会、2010.7.26、東京ベイホテル東急(千葉)

[図書] (計5件)

(1) 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

(2) 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

(3) 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

(4) 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

(5) 前田和彦、阪口薫雄、臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、抗体の抗原親和性成熟とGANPの役割、2010、54(1)、pp19-25

[その他]

新聞報道

2013年5月15日、熊本日々新聞、「遺伝子変異させ強力な抗体」

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 和彦 (MAEDA KAZUHIKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：20332869