

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：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590445

研究課題名（和文） 胚中心B細胞におけるA:T変異導入機構の解明

研究課題名（英文） Mechanisms of the induction of A:T mutations in the germinal center B cells

研究代表者

王 継揚 (WANG JIYANG)

独立行政法人理化学研究所・免疫多様性研究チーム・チームリーダー

研究者番号：80231041

研究成果の概要（和文）：

AID (activation-induced cytidine deaminase) はシトシン (C) をウラシル (U) に変換することにより、DNA 上に U:G 損傷を誘導する。通常なら、損傷を受けた C:G 塩基対にのみ変異が誘発される。しかし、胚中心 B 細胞では、約半数の変異が損傷のない A:T 塩基に生じる。本研究の結果、A:T 変異の誘発は胚中心 B 細胞に特異的な現象で、ターゲット遺伝子の局在部位に依存せず、胚中心 B 細胞の環境及び急速な細胞分裂に依存することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The activation-induced cytidine deaminase converts cytosine to uracil and generates a U:G lesion on DNA, which obviously can cause mutations at the C:G pair. However, half of the mutations in the germinal center B cells occur at the non-damaged A:T pair. In the present study, we found that the induction of A:T mutations is an intrinsic property of the germinal center B cells and is independent of target gene location but requires rapid cell division.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
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：胚中心B細胞，抗体遺伝子，体細胞変異，ミスマッチ修復，細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

胚中心B細胞の抗体遺伝子の体細胞変異(SHM)はAIDにより誘導され、高親和性抗体の産生に必須である。AIDはシトシン(C)を脱アミノ化し、ウラシル(U)に変換し、その結果誘導されるU:Gミスマッチや脱塩基部位を複製する過程で、C:G塩基対に変異が導入されると考えられている。

事実、AIDを強制発現したNIH3T3細胞では、AIDの酵素活性と一致して、ほぼ100%の変異がC:G塩基対に誘導される。一方、胚中心B細胞の抗体遺伝子変異はC:G塩基対に加え、半数の変異がA:T塩基対に生じるが、C:G塩基対に誘導されたU:Gミスマッチが、どのようにA:T塩基対にまで変異を誘発するか不明である。

A:T 変異誘導には、エラーを起こしやすい DNA ポリメラーゼ・イータ (POLH) が必要であることが示されている。しかし、NIH3T3 で POLH を過剰発現させても誘導される変異は C:G 変異のみで、これに対し胚中心 B 由来の細胞株 Ramos では C:G 及び A:T 変異が誘導される。即ち、通常の細胞では、POLH が発現していても動員されないのに対し、胚中心 B 細胞では POLH が動員され、その結果 A:T 変異が誘導されることが示唆された。

一方、*lacZ* トランスジェニックマウスの各組織でのゲノム変異を解析すると、胚中心 B 細胞においてのみ高い割合の A:T 変異が認められた。*lacZ* での A:T 変異は、抗体遺伝子の SHM と比べて低頻度で、AID 非依存性 A:T 変異であるにもかかわらず、POLH が必須であることが示された。以上の事実から、胚中心 B 細胞では、本来使われない POLH を DNA 修復に動員する分子機構が存在し、抗体遺伝子のみならず、*lacZ* 遺伝子においても高い割合の A:T 変異が導入されたのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

現在、SHMに関わる因子のうち、AIDが唯一、胚中心B細胞特異的であると認められている。しかし、胚中心B細胞で誘導されるA:T変異については、AIDを含めこれまで明らかにされている因子だけでは十分ではない。この点に関し、我々は、胚中心B細胞に特異的に作用する未知の因子が、A:T変異導入に必要である可能性を提示した。本研究では、A:T塩基への変異導入機構の解明を目的とし、胚中心B細胞由来の細胞株であるRamosを用いて、A:T変異の誘発に必要な因子及び条件を探る。

3. 研究の方法

胚中心B細胞由来の細胞株である Ramos に AID を発現するレトロウイルスを導入して、様々な細胞培養条件や AID 発現レベルにおける A:T 変異誘発について詳細に調べた。また、A:T 変異の誘発に関わる因子のノックアウトマウスを掛け合わせて、異なる因子間の相互作用についても解析を行った。

4. 研究成果

本研究では、以下の研究成果が得られた。1、速い細胞増殖速度が胚中心B細胞における抗体遺伝子の A:T 変異の誘発に重要であることを示した。DNA 複製は、単に C:G 塩基対の変異を誘発するのみならず、A:T 塩基対の変異誘発にも重要であることが示唆された。2、抗体遺伝子の体細胞変異の一端を担う POLQ の機能ドメインについて詳細な解析を行った。その結果、POLQ の N 末端のヘリカーゼドメインと C 末端のポリメラーゼドメインが、放射線照射

などにより誘導される DNA 二重鎖切断の修復にそれぞれ重要な働きをしていることが明らかになった。一方、POLQ は DNA 二重鎖切断の修復を伴う抗体遺伝子のクラス変換には必要ないことを示した。3、REV1 の酵素活性を特異的に失活させたマウス (REV1AA) と POLH 欠損マウスの掛け合わせマウスにおける抗体遺伝子の体細胞変異について調べた。その結果、ダブルノックアウトマウスでは、それぞれの単独ノックアウトマウスに比べ、変異頻度がさらに低下し、しかも C から G および G から C の変異もほぼ消失した。この結果から、複数のポリメラーゼが相互作用しながら、さまざまな点変異を誘発することが示された。4、UNG と POLH の二重欠損マウスにおける体細胞変異について解析した結果、UNG と POLH が異なる U:G 損傷をターゲットとすることを明らかにした。5、A:T 変異に見られる strand-bias は AID の発現量が高い時にのみ誘発されることを示した。これらの研究成果は、A:T 変異の誘発機構の更なる解明に重要な知見を提供した。

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 16 件) 全て査読あり

1. Ouchida, R., Mori, H., Ohno, H. and Wang, J.-Y. FcμR (Toso/Faim3) is not an inhibitor of Fas-mediated cell death in mouse T and B cells. *Blood* 121: 2368-2370 (2013). doi:10.1182/blood-2012-12-470906
2. Kano, C. and Wang, J.-Y. High levels of AID cause strand bias of mutations at A versus T in Burkitt's lymphoma cells. *Mol. Immunol.* 54: 397-402 (2013). doi: 10.1016/j.molimm.2013.01.005.
3. Tsuruoka, N., Arima, M., Yoshida, N., Okada, S., Sakamoto, A., Hatano, M., Satake, H., Arguni, E., Wang, J.-Y., Yang, J.-H., Nishikura, K., Sekiya, S., Shozu, M. and Tokuhisa, T. ADAR1 induces adenosine-targeted DNA mutations in senescent Bcl6-deficient cells. *J. Biol. Chem.* 288: 826-836 (2013). doi: 10.1074/jbc.M112.365718.
4. Li, S., Zhao, Y. and Wang, J.-Y. Analysis of Ig gene hypermutation in *Ung*^{-/-}*Polh*^{-/-} mice suggests that UNG and A:T mutagenesis pathway target different U:G lesions. *Mol. Immunol.* 53: 214-217 (2013). doi: 10.1016/j.molimm.2012.08.009.
5. Ouchida, R., Mori, H., Hase, K., Takatsu, H., Kurosaki, T., Tokuhisa, T., Ohno, H. and Wang, J.-Y. Critical role of the IgM Fc receptor in IgM homeostasis, B cell survival and humoral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: E2699-2706 (2012). doi:

- 10.1073/pnas.1210706109.
6. Kawano, Y., Ouchida, R., Wang, J.-Y., Yoshikawa, S., Yamamoto, M., Kitamura, D. and Karasuyama, H. A novel mechanism for the autonomous termination of pre-B cell receptor expression via induction of lysosomal-associated protein transmembrane 5. *Mol. Cell. Biol.* 32: 4462-4471 (2012). doi: 10.1128/MCB.00531-12.
 7. Glowacka, W.K., Alberts, P., Ouchida, R., Wang, J.-Y. and Rotin, D. LAPT5 is a positive regulator of pro-inflammatory signaling pathways in macrophages. *J. Biol. Chem.* 287: 27691-27702 (2012). doi: 10.1074/jbc.M112.355917.
 8. Li, Y., Li, S., Hoshino, M., Ishikawa, R., Kajiwara, C., Gao, X., Zhao, Y., Ishido, S., Udono, H. and Wang, J.-Y. HSP90 α deficiency does not affect Ig gene hypermutation and class switch but causes enhanced MHC class II antigen presentation. *Int. Immunol.* 24: 751-758 (2012). doi: 10.1093/intimm/dxs076.
 9. Shigeta, A., Tada, Y., Wang, J.-Y., Ishizaki, S., Tuyusaki, J., Yamauchi, K., Kasahara, Y., Iesato, K., Tanabe, N., Takiguchi, Y., Sakamoto, A., Tokuhisa, T., Shibuya, K., Hiroshima, K., West, J. and Tatsumi, K. CD40 amplifies Fas-mediated apoptosis: a mechanism contributing to emphysema. *American Journal of Physiology* 303: L141-151 (2012). doi: 10.1152/ajplung.00337.2011.
 10. Kano, C., Hanaoka, F. and Wang, J.-Y. Analysis of mice deficient in both REVI catalytic activity and POLH reveals an unexpected role for POLH in the generation of C to G and G to C transversions during Ig gene hypermutation. *Int. Immunol.* 24: 169-174 (2012). doi: 10.1093/intimm/dxr109.
 11. Imai, T., Kato, Y., Kajiwara, C., Mizukami, S., Ishige, I., Ichiyangi, T., Hikida, M., Wang, J.-Y. and Udono, H. Hsp90 contributes to cytosolic translocation of extracellular antigen for cross-presentation by dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 16363-16368 (2011). doi: 10.1073/pnas.1108372108.
 12. Li, Y., Gao, X. and Wang, J.-Y. Comparison of two POLQ mutants reveals that a polymerase-inactive POLQ retains significant function in tolerance to etoposide and γ -irradiation in mouse B cells. *Genes Cells* 16: 973-983 (2011). doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01550.x.
 13. Kano, C., Ouchida, R., Kokubo, T. and Wang, J.-Y. Rapid cell division contributes to efficient induction of A/T mutations during Ig gene hypermutation. *Mol. Immunol.* 15-16: 1993-1999 (2011). doi: 10.1016/j.molimm.2011.06.218.
 14. Masuda, K., Mori, H., Ohara, O., Nakayama, M., Wang, J.-Y. and Burrows, P. Defining the immunological phenotype of Fc receptor-like B (FCRLB) deficient mice: confounding role of the inhibitory Fc γ RIIb. *Cell. Immunol.* 266: 24-31 (2010). doi: 10.1016/j.cellimm.2010.08.007.
 15. Ouchida, R., Kurosaki, T. and Wang, J.-Y. A role for lysosomal-associated protein transmembrane 5 in the negative regulation of surface BCR levels and B cell activation. *J. Immunol.* 185: 294-301 (2010). (Featured in "In This Issue") doi: 10.4049/jimmunol.1000371.
 16. Shima, H., Takatsu, H., Fukuda, S., Ohmae, M., Hase, K., Kubagawa, H., Wang, J.-Y., and Ohno, H. Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM. *Int. Immunol.* 22: 149-156 (2010). doi: 10.1093/intimm/dxp121.
- [学会発表] (計 13 件)
1. Wang, J.-Y. Critical role of the IgM Fc receptor in IgM homeostasis, B cell survival and humoral immune responses International Symposium of the Japanese Society of Immunology, Kobe, Japan (2012年12月6日)
 2. Wang, J.-Y. The IgM Fc receptor positively regulates B cell survival and antibody production. Innovation Summit Tokyo 2012 - Chronic Inflammation and Autoimmune Diseases, Tokyo, (2012年4月17日)
 3. Ouchida, R., Mori H, Hase K, Kurosaki T, Ohno H, Wang, J.-Y. The Fc receptor for IgM (Fc μ R) positively regulates primary and memory B cell responses. Keystone Symposium on Regulation of Lymphocyte Signaling. Keystone, USA (2012年3月13日)
 4. Wang, J.-Y. The Fc receptor for IgM (Fc μ R) positively regulates B cell survival and activation. International Symposium of the Japanese Society of Immunology, Chiba, Japan (2011年11月27日)
 5. Kawano Y, Ouchida, R., Wang, J., Yoshikawa S, Yamamoto M, Kitamura D, Karasuyama H. The autonomous termination of pre-BCR expression through BLNK-mediated induction of LAPT5. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan (2010年8月24日)
 6. Kubagawa H, Oka S, Kubagawa Y, Torii I, Takayama E, Kang D, Gartland GL, Bertoli L, Mori H, Takatsu H, Kitamura T, Ohno H, Wang, J.-Y. Identification and characterization of the elusive IgM Fc receptor (Fc μ R). 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan (2010年8月25日)
 7. Shima H, Takatsu H, Fukuda S, Ohmae M, Hase K, Kubagawa H, Wang, J., Ohno H. Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan (2010年8月25日)

8. Ouchida R, Mori H, Wang J-Y. The lysosomal protein LAPT5 negatively regulates B cell activation and antibody production by downmodulating cell surface BCR expression. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan (2010年8月23日)
9. Li Y, Ouchida R, Wang J-Y. A transcription factor regulates apoptosis of germinal center B cells and the production of high-affinity antibodies. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan (2010年8月24日)
10. Masuda K, Li Y, Ouchida R, Mori H, Wang J-Y. A critical role for REV1 in induction of C:G transitions and A:T mutations during immunoglobulin gene hypermutation. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan (2010年8月26日)
11. Kano C, Ouchida R, Moritan T, Wang J-Y. Induction of A:T mutations is dependent on cellular environment but independent of mutation frequency and target gene location. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan (2010年8月26日)
12. Ouchida R, Wang J-Y. LAPT5 controls B cell antigen receptor levels and negatively regulates B cell activation. Keystone Symposium on Lymphocyte Activation and Gene Expression, Breckenridge, USA (2010年3月1日)
13. Wang J, Kano C. Induction of A:T mutations is dependent on cellular environment but independent of target gene location. Experimental Biology, Anaheim, USA (2010年4月28日)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王 継揚 (WANG JIYANG)

独立行政法人理化学研究所・免疫多様性研究
チーム・チームリーダー

研究者番号：80231041

(2) 研究分担者

大内田 理佳 (OUCHIDA RIKA)

独立行政法人理化学研究所・免疫多様性研究
チーム・研究員

研究者番号：80391887

(3) 連携研究者

なし