

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：34204

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670150

研究課題名(和文)抗体遺伝子可変領域に選択的に体細胞突然変異が導入される機序の解明

研究課題名(英文) Identification of co-factors specific for somatic hypermutation of immunoglobulin genes

研究代表者

新藏 礼子(Reiko, Shinkura)

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗体遺伝子の可変領域(V領域)に起こる体細胞突然変異は高親和性の抗体を得るのに必須の現象である。ゲノム中のV領域になぜ高率に突然変異が挿入されるかその機序は不明である。AID(activation-induced cytidine deaminase)は体細胞突然変異とクラススイッチの両方に必須の分子であるが、AIDのN末が体細胞突然変異特異的なドメインであることが過去の研究で明らかである。G23S変異体の脱アミノ化酵素活性は保持されているので、AIDのN末と相互作用する補因子が重要と考える。野生型AIDとG23S変異体に結合する蛋白質の比較から体細胞突然変異特異的補因子の候補分子を得た。

研究成果の概要(英文)：Antigen stimulation induces antibody diversification through somatic hypermutation (SHM) and class switch recombination (CSR). SHM introduces point mutations at high frequency in the variable (V) region gene, whereas CSR is a region-specific recombination that replaces the heavy chain constant region (CH) gene from C $\mu$  to other downstream CH gene, diversifying antibody effector function without changing their antigen specificity. Activation-induced cytidine deaminase (AID) is essential for both SHM and CSR. However, it is unknown how AID regulates two genetic events, SHM and CSR. Previous studies showed that N-terminal mutant AIDs caused selective deficiency in SHM but retained CSR, suggesting the possibility that SHM activity of AID may require the SHM-specific cofactors interacting with N-terminal region of AID. In this study, we found several candidate molecules, which were co-immunoprecipitated with AID, but not G23S (a N-terminal mutant of AID), as SHM-specific cofactors.

研究分野：分子生物学、免疫学

キーワード：抗体 遺伝子組み換え 体細胞突然変異

## 1. 研究開始当初の背景

体細胞突然変異によって獲得する抗原に対する結合力の増強はクラススイッチによって産生される IgA や IgG の抗原への攻撃力とともに感染防御に重要である。体細胞突然変異だけが障害されたマウスやヒトの症例は報告がなかったが、研究代表者が作製した AID 変異体のノックインマウス (G23S マウス) はクラススイッチは起こるのに体細胞突然変異だけが障害される初めてのモデル動物である<sup>1,2</sup>。クラススイッチと体細胞突然変異は異なる遺伝子変異により起こるが、両者とも同じ酵素 activation-induced cytidine deaminase (AID) (198 アミノ酸で構成) が必須である<sup>3</sup>。

AID という酵素は体細胞突然変異 (somatic hypermutation: SHM) (抗体遺伝子 V 領域への点突然変異挿入) とクラススイッチ (抗体遺伝子 C 領域内の 2 箇所) の 2 本鎖切断と断端の結合による DNA 組み換え反応) というまったく異なる二つの DNA 変異を引き起こすために必須の initiator であることは誰もが認めている。しかし二つの反応を AID という単一の酵素がどのように区別しているかについてはまだ明らかではない。研究代表者は多くの AID 変異体を自ら作製し、200 個以上の各変異体の体細胞突然変異とクラススイッチ活性、細胞内における局におよび脱アミノ化酵素活性について膨大なデータを蓄積してきた。

N 末の G23S 変異体と G23S ノックインマウスはクラススイッチではなく、SHM における AID の機能解明のために格好の材料である。逆に、AID の C 末 (183-198 アミノ酸) に変異を持つ患者では体細胞突然変異はほぼ正常に起こるが、クラススイッチが障害されていた<sup>4</sup>。また研究代表者の未発表データから C 末変異体のひとつである F198S 変異体は野生型 AID より体細胞突然変異の導入効率が 3 倍以上高いこともわかっている。AID のこれらの N 末変異体、C 末変異体ともに *in vitro* 脱アミノ化活性 (酵素活性: アミノ酸 55-94) は保持されていることから、AID の N 末や C 末に特異的に結合する補因子により、AID がクラススイッチと体細胞突然変異を区別し突然変異の効率も制御されていると考えられる。補因子 (抑制性あるいは促進性) を同定することは、いまだよく解明されていない '体細胞突然変異が抗体遺伝子の V 領域に選択的

に導入される機序' を解く鍵となる。実際 AID が属する APOBEC family 各分子の酵素活性部位は良く保存されているが、N 末と C 末の構造がそれぞれ異なっており、各酵素のターゲットを決めていると考えられている<sup>5</sup>。

G23S 変異が存在する AID の N 末には putative nuclear localization signal があり、N 末変異体の体細胞突然変異効率が低いのは AID の核移行が障害されているからである、と多くの研究者が考えている。研究代表者はそれに反して、自分自身の変異体の解析結果と G23S ノックインマウスの結果から、核局在と関係なく AID の N 末構造自体が体細胞突然変異の効率に重大な効果を及ぼすという結論に達し、今回の研究提案に至った。SHM 誘導の際におそらく AID は核内で機能すると予想しており、AID と同様に核移行する G23S 変異体は、免疫沈降法により SHM 特異的補因子を捕まえる実験の有望な bait になる。

さらに SHM の研究においてチャレンジングな点は、個体で実際に SHM が起こる細胞は胚中心 B 細胞という非常に限られた少数の細胞群であることである。ちなみに野生型マウス小腸パイエル板の胚中心 B 細胞は一匹からせいぜい一万個程度しか分取出来ない。免疫沈降法は大量の細胞からタンパク質を得る事が絶対条件である。そこで研究代表者は SHM 補因子候補の捕捉実験を可能にする SHM の人工基質を用いた系を立ち上げた。

AID が SHM に必須の分子であること、また error-prone polymerase を含むいくつかの DNA 修復酵素が SHM のパターンを変化させることは、今まで報告がある。しかし、なぜ他の遺伝子よりも抗体遺伝子 V 領域に高頻度に突然変異が修復されずに許容されるのか、という答えは得られていない。このように体細胞突然変異は 30 年以上前から現象は確認されていても機序の解明が遅々として進んでいない。AID の N 末や C 末構造が体細胞突然変異にとっても重要であることが分かった今、体細胞突然変異効率を制御する補因子同定に成功すれば、体細胞突然変異の分子機構の解明が大いに進むと考えられる。抗体遺伝子 V 領域特異的に培養細胞中で体細胞突然変異を誘導することが可能になれば、抗体エンジニアリングの新たな技術開発につながり、動物を免疫

する必要のない抗体医薬の開発が可能になる。

## 2. 研究の目的

### 体細胞突然変異特異的補因子の同定

野生型 AID と G23S 変異体に結合する蛋白質の比較から体細胞突然変異特異的補因子を同定し、抗体遺伝子の V 領域 SHM が選択的に導入される制御機構を明らかにし、新たな抗体エンジニアリングの技術開発につなげる。

## 3. 研究の方法

### (1) 体細胞突然変異の *in vitro* 実験系の構築

以前から線維芽細胞に人工基質（ストップコドンが挿入された GFP 遺伝子）を発現させて体細胞突然変異の頻度を測定する系を使用してきた<sup>1</sup>。この実験系でスクリーニングした結果、得られた G23S 変異体は B 細胞ラインに過剰発現させたときに起こる SHM、あるいは G23S ノックインマウスの *in vivo* での SHM の頻度ともよく相関することが明らかになった<sup>1,2</sup>。つまり、SHM は本来胚中心 B 細胞で起こる反応であるが、initiator である AID があれば B 細胞以外の細胞でも起こり、かつ G23S や F198S 変異体による体細胞突然変異の効率も再現可能であることが証明された。

以前から用いている繊維芽細胞系の欠点は、増殖が遅く免疫沈降に必要な大量のタンパク質を得るのに不都合なことである。そこで、細胞増殖が盛んで遺伝子導入効率が高い細胞（293T 細胞）であらたに SHM の測定系（かつ材料調製用）を構築した。SHM 検出のための人工基質はストップコドンが挿入された GFP 遺伝子(GFP<sup>mut</sup>)でありこれを 293T 細胞に導入した。Tet 制御により GFP<sup>mut</sup> の発現を誘導できる系を構築した。AID の過剰発現により SHM が起こると GFP reversion が起こり、SHM の効率が目で確認できる系である。

繊維芽細胞系よりも短期間でかつ容易に SHM を誘導することが可能になった。

### (2)免疫沈降法による SHM 特異的補因子の探索

今回あらたに構築した 293T(GFP<sup>mut</sup>)を使った SHM の実験系はタンパク質の過剰発現系としても最善の細胞である。Myc-tag と Flag-tag を付加した AID および G23S 変異体をそれぞれ過剰発現した大量の 293T(GFP<sup>mut</sup>)細胞 (1 X 10<sup>8</sup> 個) からタンパク質を抽出して、AID または G23S 変異体と免疫沈降するタンパク質を得た。これを 2 次元電気泳動で展開することで AID と G23S 変異体と相互作用するタンパク質を比較した。

## 4. 研究成果

### (1)293T(GFP<sup>mut</sup>)を用いた SHM アッセイ

293T GFP<sup>mut</sup> に AID、G23S を発現させ、SHM が生じて GFP の蛍光を発するようになったか、フローサイトメーターにより解析した。AID を導入した細胞では 0.59%の細胞が GFP を発していた。それに対し、G23S を導入した細胞では GFP を発する細胞は確認されなかった。また、AID 発現細胞より GFP の蛍光を示す細胞を分離し、GFP 遺伝子をクローニングして sequence 解析を行った。その結果、63 クローン中 16 クローンで遺伝子変異が確認され、変異頻度は 6.6 × 10<sup>-4</sup>/bp であった。よって、AID を過剰発現させることで B 細胞ではない 293T 細胞でも SHM が誘導されることを確認できた。

### (2)SHM 特異的補因子を含む免疫沈降産物取得のための最適条件の検討

AID により SHM が生じるためには、DNA に対して傷を生じさせること、その傷に対して間違った修復をさせることの 2 つの機構が必要であると考えている。そのため、AID と相互作用する因子の中には AID を切断する nuclease や間違った修復を行う error-prone polymerase が存在し、complex を形成して働いていると考えられる。また、complex の中核として Proliferation Cell Nuclear Antigen (PCNA) が存在していると考えている。PCNA はリング状のタンパク質であり、polymelase のように DNA に対して作用する分子は PCNA を介して DNA に結合している。そのため、AID による

SHM においても PCNA が中心となり、AID や nuclease、error-prone polymerase が機能的 complex を形成していると予想した。同様に Flap structure specific endonuclease 1 (Fen1) と呼ばれる酵素が SHM に関与していると予想している。Fen1 は Flap 鎖を切断する 5' -フラップエンドヌクレアーゼ (FEN)活性、5' -エキソヌクレアーゼ (EXO) 活性とギャップエンドヌクレアーゼ (GEN) 活性を持つ DNA 複製と修復に関わる酵素である。さらに、これまでのマイクロアレイ解析データ結果から胚中心 B 細胞 (germinal center : GC) で強く発現していることが他者により確認されている (ウェブ公開データ)。

野生型マウス及び G23S マウスのパイエル板から GC B 細胞と non-GC B 細胞をセルソーターにより分離した。得られた細胞数は野生型マウス由来の GC B 細胞が  $4.5 \times 10^5$  cells、non-GC B 細胞が  $8.1 \times 10^6$  cells、G23S マウス由来では GC B 細胞が  $3.5 \times 10^5$  cells、non-GC B 細胞が  $3.3 \times 10^6$  cells であった。分離した細胞から total RNA を抽出し、cDNA を合成して Fen1 の定量的 PCR による遺伝子発現解析を行った。野生型マウスと G23S マウス間で比較した場合、GC、non-GC 共に有意な差は見られなかった。しかし、GC と non-GC を比較したとき、野生型マウスと G23S マウスの両方で Fen1 の発現量におよそ 4 倍の差が確認された (Figure 1)。Fen1 は GC において強く発現していることが確認され、AID による SHM への関与が予想された。

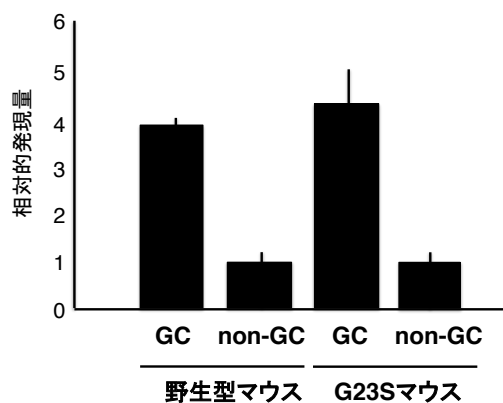


Figure 1 GC B 細胞および non-GC B 細胞における Fen1 の発現解析

縦軸は相対的発現量を示している。データは  $\beta$ -actin 発現量による補正を行っている。  
\* $p < 0.05$ , mean  $\pm$  SD

### (3)免疫沈降による SHM 機能的 complex の捕捉

前項で述べたように、SHM 関連因子の補足には SHM 機能的 complex を回収することが重要である。現在、complex を形成している分子の候補として考えている AID、PCNA、Fen1 を指標とし、これら 3 種類のタンパク質が通常の免疫沈降により回収されているか、Western blotting により確認した。その結果、AID/G23S、PCNA は免疫沈降産物として回収されたことが確認されたが、Fen1 は確認できなかった。分子間の相互作用が弱いことも考えられたので formaldehyde による固定を行った後、免疫沈降を試みた。その結果、PCNA、AID/G23S、Fen1 の 3 種類すべての回収が確認され、共沈させることができ (Figure 2)、SHM 機能的 complex が捕捉されたと考えられる。

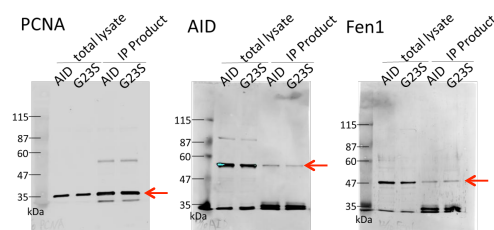


Figure 2 Formaldehyde による固定を行った細胞での免疫沈降の回収タンパク質の確認

左から順に PCNA、AID、Fen1 に対する抗体による Western blotting の結果を示した。矢印はそれぞれのタンパク質の予想されるバンドを示している。

AID:AID 発現 293T(GFP<sup>mut</sup>)細胞由来、  
G23S:G23S 発現 293T(GFP<sup>mut</sup>)細胞由来

### (4) 2次元電気泳動による SHM 特異的補因子候補の探索

AID、PCNA、Fen1 の 3 種類すべてが免疫沈降産物として回収できたことが確認できたサンプルを用いて 2次元電気泳動を行い、AID 発現 293T(GFP<sup>mut</sup>)細胞由来の免疫沈降産物と G23S 発現 293T(GFP<sup>mut</sup>)細胞由

来の免疫沈降産物で比較し、片方でのみ共沈されている、または明らかに共沈された量に差があるタンパク質の探索を行った。その結果、AID 発現 293T(GFP<sup>mut</sup>)細胞由来のみで共沈が確認されたスポットが見られた (Figure 3)。SHM 特異的補因子候補と成り得る分子が確認できた。

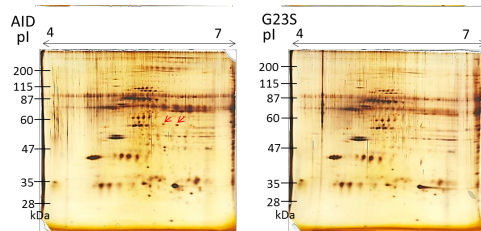


Figure 3 2次元電気泳動による SHM 特異的補因子候補の探索

矢印は AID 発現 293T(GFP<sup>mut</sup>)細胞由来のみ見られるスポットを示している。

AID: AID 発現 293T(GFP<sup>mut</sup>)細胞由来

G23S: G23S 発現 293T(GFP<sup>mut</sup>)細胞由来

今回の研究で SHM 機能的 complex が回収される免疫沈降の条件を見つけた。2次元電気泳動により SHM 特異的補因子の候補と成り得るスポットを確認することができた。しかし、まだそのスポットの同定には至っていない。今後はスポットがどんなタンパク質であるのか同定し、さらにそれが AID による SHM に関与しているか解析したいと考えている。

#### <引用文献>

- ① Shinkura et al. Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 5:707, 2004
- ② Wei et al. Mice carrying a knock-in mutation of Aicda resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. *Nat. Immunol.* 12:264, 2011
- ③ Muramatsu et al. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102:553, 2000
- ④ Ta et al. AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat. Immunol.* 4:843, 2003

⑤ Muramatsu et al. Discovery of activation-induced cytidine deaminase, the engraver of antibody memory. *Adv. Immunol.* 94:1, 2007

#### 5. 主な発表論文等

[図書](計1件)

① 新藏 礼子、腸管免疫の恒常性における免疫グロブリン遺伝子の体細胞突然変異の重要性.

臨床免疫・アレルギー科 5:361, 2012

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

新藏 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

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

山田 啓祐 (YAMADA Keisuke)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス

研究科・前期博士課程学生