

科学研究費補助金（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成17年度採択分

平成20年 3月31日現在

研究課題名（和文）

AIDによる抗原刺激依存性抗体遺伝子改編機構の研究

研究課題名（英文）

AID-dependent genetic alteration mechanism to generate antigen-specific antibodies

研究代表者

氏名 本庶 佑 (Honjo Tasuku)

所属研究機関・部局・職 京都大学・医学研究科・客員教授



研究の概要：脊椎動物は、一度侵入した病原体に対して免疫記憶を保つ。このため、二度目に感染したときには、病原体を効率よく排除するクラスの抗体を迅速に作り、その抗体は初回の感染時のものに比べて効率よく抗原に結合する。この抗体分子に現れる免疫記憶の分子基盤は抗原刺激を受けたBリンパ球中で誘導される抗体遺伝子の再編、すなわち体細胞突然変異(SHM)ならびにクラススイッチ組換え(CSR)である。1999年、SHMとCSRの両方に必須の酵素 activation induced cytidine diaminase (AID)を我々は発見し、これがDNAの切断に関与することを示した。すなわち、AIDはワクチンによる抗体記憶をゲノムに刻む役割を担う分子である。本研究では、AIDがどのような仕組みでSHMとCSRという異なるタイプの遺伝子改編を制御するのかを明らかにする。また、どのようにして抗体遺伝子の切断をAIDが行なうのか、その分子機構を明らかにする。さらに我々はAIDが抗体遺伝子以外の遺伝子の切断を行うことにより発癌を誘導することも明らかとしたのでAIDの遺伝子ターゲットの制御機構の研究も行う。この研究の成果により、免疫学の根本課題である抗体の免疫記憶の仕組みが明らかになるとともにウイルス感染等によって発癌が引き起こされるゲノム不安定化の分子機構の解明が可能となり、新たな医学分野の展開が期待される。

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：クラススイッチ・体細胞突然変異・RNA編集・ウラシルDNAグリコシラーゼ・免疫沈降法・マイクロアレイ法

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物は、一度侵入した病原体に対して免疫記憶を保つ。このため、二度目に感染したときには、病原体を効率よく排除するクラスの抗体を迅速に作り（クラススイッチ）、その抗体は初回の感染時のものに比べて効率よく抗原に結合する（可変部変異）。抗体分子に現れるこの2種類の免疫記憶の分子基盤は抗原刺激を受けたBリンパ球中で誘導される抗体遺伝子の再編、それぞれクラススイッチ組換え(CSR)ならびに体細胞突然変異(SHM)である。1999年、我々はCSRとSHMの両方に必須の酵素 activation induced cytidine diaminase (AID)を発見し、これがCSRとSHMを引き起こすDNAの切断に関与することを示した。すなわち、AIDはワクチンによる抗体記憶をゲノムに刻む役割を担う分子である。

2. 研究の目的

本研究では、AIDがどのような仕組みで

SHMとCSRという異なるタイプの遺伝子改編を制御するのかを明らかにする。また、どのようにして抗体遺伝子の切断をAIDが行なうのか、その分子機構を明らかにする。さらに我々はAIDが抗体遺伝子以外の遺伝子の切断を行うことにより発癌を誘導することも明らかとしたのでAIDの遺伝子ターゲットの制御機構の研究も行う。

3. 研究の方法

AIDと会合するRNAやタンパク質を免疫沈降法と質量分析やマイクロアレイ、大規模塩基配列決定法を駆使して行なう。得られた分子の機能をRNAi、ノックアウトマウス、遺伝子導入法などで確認する。AIDによる抗体遺伝子以外の変異導入遺伝子のゲノムワイド同定のため、*in vitro*切断点標識法とタイリングアレイ法を用いる。AIDタンパク質の大量生産のため、小麦胚芽抽出液による無細胞系を用いる。

4. これまでの成果

(1) AIDによるDNA切断のメカニズムの解明
DNA 脱アミノモデルの反証として、AID の変異体で脱アミノ活性を完全に失ったが、CSR 活性があるものを同定した。また、UNG は U 除去のために必要なのではなく、切断後の修復のために必要であることを示した。RNA 編集モデルを支持するデータとして①タンパク質合成と核・細胞質移行が CSR に必須なこと②AID と RNA が細胞内で結合することを示した。AID による RNA 編集産物の同定のため、TDG ビーズ法を開発した。

(2) SHM と CSR を分別活性化するメカニズムの解明

AID の変異体には CSR または SHM のいずれかを失うものがあり、AID と会合する異なる分子が異なる RNA を編集すると考え、AID と会合する 2 種類の分子を同定した。

(3) AID による発癌のメカニズム

AID の異常発現により、各種臓器に発癌が引き起こされること並びに多数の癌遺伝子に変異が導入されることを明らかにした。さらにヒトのウイルス等の感染により、非リンパ組織に AID が発現誘導されることを示した。また、ヒト癌組織での AID 発現も認めた。

5. 今後の計画

AID の DNA 切断メカニズムの詳細を明らかにするため、AID が認識し編集する RNA 分子の同定を行なう。また、DNA 修復における UNG の役割を明らかにする。AID と会合する分子をさらに検索すると同時に得られた分子の機能をノックアウト法により調べる。AID の発癌の仕組みを調べるため、全ゲノム上のターゲット遺伝子を網羅的に同定する。AID 発現のマーキングのために AID-Cre×RFP^{f/f} マウスを用いて全身での感染や化学物質刺激による微量の AID の発現を検出し、AID の癌化における役割を明らかにする。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

- 1) **Honjo, T.** A memoir on AID, which engraves antibody memory on DNA. *Nature Immunol.* **9** 4 335-337 (2008) 査読なし
- 2) Pasqualucci, L., **Honjo, T.**, 他 9 名 AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat. Genet.* **40** 108-112 (2008) 査読あり
- 3) Kovalchuk, A. L., **Honjo, T.**, 他 12 名 AID-deficient Bcl-xL transgenic mice develop delayed atypical plasma cell tumors with unusual Ig/Myc chromosomal rearrangements. *J. Exp. Med.* **204** 2989-3001 (2007) 査読あり
- 4) Okazaki, I., Kotani, I. and **Honjo, T.** Role of AID in tumorigenesis. *Advances in Immunology*(Edited by F. Alt and **T. Honjo**) **94** 245-273 (2007)査読なし
- 5) Muramatsu, M., Nagaoka, H., **Shinkura, R.**,

Begum, N. A. and **Honjo, T.** Discovery of activation-induced cytidine deaminase, the engraver of antibody memory. *Advances in Immunology*(Edited by F. Alt and **T. Honjo**) **94** 1-36 (2007)査読なし

6) Endo, Y., **Honjo, T.**, 他 9 名 Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF- κ B signaling. *Oncogene* **26** 5587-5595 (2007)査読あり

7) Matsumoto, Y., **Honjo, T.**, 他 8 名 *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nature Medicine* **13** 470-476 (2007)査読あり

8) **Shinkura, R.**, **Begum, N. A.** and **Honjo, T.**, 他 2 名 Regulation of AID function *in vivo*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **596** 71-81 (2007)査読なし

9) Kumazaki, K., **Honjo, T.**, 他 4 名 AID^{-/-} μ s^{-/-} mice are agammaglobulinemic and fail to maintain B220-CD138⁺ plasma cells. *J. Immunol.* **178** 2192-2203 (2007)査読あり

10) Kotani, A., and **Honjo, T.**, 他 7 名 AID promotes B-cell lymphomagenesis in Emu-cmyc transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104** 1616-1620 (2007)査読あり

11) **Begum, A. N.**, **Shinkura, R.** and **Honjo, T.**, 他 3 名 Requirement of non-canonical activity of uracil DNA glycosylase for class switch recombination. *J. Biol. Chem.* **282** 731-742 (2007)査読あり

12) **Honjo, T.** and **Shinkura, R.**, 他 3 名 AID to overcome the limitations of genomic information by introducing somatic DNA alterations. *Proc. Japan. Acad. Ser. B* **82** 104-120 (2006)査読あり

13) Muto, T., and **Honjo, T.**, 他 6 名 Negative regulation of activation-induced cytidine deaminase in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103** 2752-2757 (2006)査読あり

14) Wakae, K., **Honjo, T.**, 他 6 名 Evolution of class switch recombination function in fish activation-induced cytidine deaminase, AID. *Int. Immunol.* **18** 41-47 (2005)査読あり

15) **Honjo, T.**, **Shinkura, R.**, 他 2 名 AID to overcome the limitation of genomic information. *Nat. Immunol.* **6** 655-661 (2005)査読あり

16) Kotani, A., **Begum, N. A.**, and **Honjo, T.**, 他 5 名 A target selection of somatic hypermutations is regulated similarly between T and B cells upon activation-induced cytidine deaminase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102** 4506-4511 (2005) 査読あり

17) Suzuki, K., Meek, B., Doi, Y., **Honjo, T.** and Fagarasan, S. Two distinctive pathways for recruitment of naïve and primed IgM⁺ B cells to the gut lamina propria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102** 2482-2486 (2005)査読あり

18) Nagaoka, H., and **Honjo, T.**, 他 3 名 DNA cleavage in immunoglobulin somatic hypermutation depends on *de novo* protein synthesis but not on uracil DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102** 2022-2027 (2005) 査読あり

日本学士院会員(H17)

ホームページ等

<http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/index.html>