

**平成27年度科学研究費助成事業（特別推進研究）自己評価書**  
**〔追跡評価用〕**

平成27年 4 月 24 日現在

<b>研究代表者 氏 名</b>	本庶 佑	<b>所属研究機関・ 部局・職 (研究期間終了時)</b>	京都大学・医学研究科・客員教授
<b>研究課題名</b>	A I Dによる抗原刺激依存性抗体遺伝子改編機構の研究		
<b>課題番号</b>	17002015		
<b>研究組織 (研究期間終了時)</b>	研究代表者 本庶 佑（京都大学・医学研究科・客員教授）		

**【補助金交付額】**

年度	直接経費
平成17年度	118,700 千円
平成18年度	119,200 千円
平成19年度	146,300 千円
平成20年度	113,076 千円
平成21年度	104,900 千円
総 計	602,176 千円

## 1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか

特別推進研究によってなされた研究が、どのように発展しているか、次の(1)~(4)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

## (1) 研究の概要

(研究期間終了後における研究の実施状況及び研究の発展過程がわかるような具体的内容を記述してください。)

本研究の終了に引き続き、2010年から2014年5年間特別推進研究「AIDによるtopoisomerase 1を介したゲノム不安定性誘導のメカニズム」の課題で5年間3億9千万円の支援を受け、研究を続行した。さらに、京都大学医学研究科免疫ゲノム医学寄附講座において民間から総額3億円の寄附を受け、研究を続けた。その内容は一貫してAIDの分子メカニズムの解明であるが、その項目毎にまとめる。

(a) AIDの発現制御機構の解明。AIDの発現はゲノム不安定性を引き起こすことから、極めて厳格な制御機構があることが予想されたが、その詳細については全く不明であったので、ルシフェラーゼ発現系を用いた*in vitro*におけるエンハンサーの解析からB細胞特異的な発現誘導エレメントとサイトカイン等による活性化刺激に依存した正の制御機構、またB細胞以外で発現しないように制御する負の制御エレメントからなることを明らかにした(2010年)。2013年にはこれらのエレメントをBacトランスジーンを用いて*in vivo*においても結論が正しいことを明らかにした。

(b) AIDの分子構造と機能の相関の解明。AIDのN末端とC末端が違う機能を持つことを証明した。AIDのN末端に対する点突然変異G23Sのノックインマウスを作成し、これが体細胞突然変異を著しく低下させるが、クラススイッチ(CSR)の低下は比較的少ないことを明らかにした(2011)。一方、C末端の変異においては体細胞突然変異はほとんど低下せず、逆にCSRにおける切断端結合が阻害されることを明らかにし(2014)、AIDにDNA切断と組換えの2つの機能があり、それぞれN端をC端の分子の構造により制御されることを明らかにした。

(c) AIDによるTopoisomerase1 (Top1)が制御される様式の解明。Top1の一方のアレルをノックアウトしたところ、予想されたように体細胞突然変異の頻度が著しく向上した(2011)。また、CSRも亢進をした(未発表)。さらにTop1がAIDによって低下するという2009年の報告を発展させる研究を続行し、Top1の3' UTRにmiRNAが結合することを明らかにし、miRNAを運ぶAgo2タンパク質とTop1 3' UTRの結合部位を明らかにした(未発表)。

(d) AIDのターゲット特異性決定機構の解析。AIDのターゲット特異性を決める要因としてDNA塩基配列の特有な反復配列WRGYモチーフなどに代表される回文構造を持つ反復塩基配列の存在が重要であることをAIDによる切断端DNAのゲノムワイド解析によって明らかにした(2012年)。さらにクロマチン上におけるヒストンのエピジェネティックな修飾やそれに関わる特異的なタンパク因子の集積が必要であることを明らかにした(2010、2012年)。具体的にはH3K4me3の修飾とFACT複合体の集積が免疫グロブリン遺伝子座ならびにゲノムワイドに同定されたAID新規ターゲット領域において集積することを明らかにし、特異性を決める要因がDNA構造とクロマチン構造の両者の組合せによることを初めて示した。

(e) UNGとAPE1の機能解明。2004年に報告したUNGのCSRへの関与は酵素活性によるのではなく、足場タンパクとしての関与であることをさらに明らかにした。すなわち、UNGは体細胞突然変異を抑制するが、これはUNGの足場タンパクとしての機能により塩基除去修復(BER)酵素群がDNA切断部位に動員されることにより正しい修復が増強され、体細胞突然変異による誤った修復を押さえるためと考えられる。UNGの様々な変異体を調べるとCSRの活性化に必要な部位と体細胞突然変異の抑制に必要な部位とが全く違うものであり、酵素活性との相関が見られないことを明らかにした。さらに、UNGは切断後にクロマチン部位に集積してくるヒストンアセチル酵素認識タンパク質であるBRD4とコンプレックスを作ることも証明した(2014年)。さらにDNA脱アミノ学説で必須なDNA切断酵素と考えられているAPE1の完全ノックアウトCH12細胞を使い、DNA切断が全く低下しておらず、体細胞突然変異の低下が見られないことからAPE1は従来の仮説と異なり、DNA切断後の修復過程に働くことを証明した。

以上のように2010年に終了した特別推進研究後も一貫してこの研究を発展させ、RNA編集説のより強固な証拠を得ている。後述するように昨年にはRNA編集説を支持する決定的な証拠としてRNA結合タンパクhnRNP KとhnRNP LがAIDの共役因子であることを証明した。

## 1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

(2) 論文発表、国際会議等への招待講演における発表など（研究の発展過程でなされた研究成果の発表状況を記述してください。）

## &lt;論文発表&gt;

1. B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress *Aicda* by overcoming the effects of silencers. Tran, T. H. et al. *Nat. Immunol.* 11 148-155 (2010)
2. Histone3 lysine4 trimethylation regulated by the facilitates chromatin transcription complex is critical for DNA cleavage in class switch recombination. Stanlie, A. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 22190-22195 (2010)
3. Mice carrying a knock-in mutation of *Aicda* resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. Wei, M. et al. *Nat. Immunol.* 12 264-270 (2011)
4. Decrease in topoisomerase I is responsible for activation-induced cytidine deaminase (AID)-dependent somatic hypermutation. Kobayashi, M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 19305-19310 (2011)
5. Nonimmunoglobulin target loci of activation-induced cytidine deaminase (AID) share unique features with immunoglobulin genes. Kato, L. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109 2479-2484 (2012)
6. *In vivo* analysis of *Aicda* gene regulation: a critical balance between upstream enhancers and intronic silencers governs appropriate expression. Huong, L. et al. *PLoS One* 8 e61433 (2013)
7. Differential regulation of S-region hypermutation and class-switch recombination by noncanonical functions of uracil DNA glycosylase. Yousif, A. S. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111 E1016-E1024 (2014)
8. Chromatin Reader Brd4 Functions in Ig Class Switching as a Repair Complex Adaptor of Nonhomologous End-Joining, Stanlie, A. et al. *Mol. Cell* 55, 97-110 (2014)
9. APE1 is dispensable for S-region cleavage but required for its repair in class switch recombination. Xu, J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111 17242-17247 (2014)

## &lt;招待講演&gt;

- 2010 The 18th Symposium on Recent Advances in Cellular and Molecular Biology (*Keynote speaker*) "AID-mediated antibody memory generation and genomic instability" Taipei, Taiwan  
The 3rd International Symposium: Regulators and Adaptive Immunity (*Symposium speaker*) "Role of AID in vaccination" Erlangen, Germany
- 2011 The 2011 Gordon Research Conference on RNA Editing (*Symposium speaker*) "RNA editing hypothesis for antibody memory generation" Texas, USA  
Bob Smith Lecture at MD Anderson Cancer Center (*Lecture*) "Dilemma of AID: infection or cancer" Texas, USA  
The 2011 Spring Conference of the Korean Association of Immunologists (*Plenary speaker*) "Dilemma of AID: infection or cancer" Seoul, Korea
- 2012 Keystone Symposia: Mutation, Malignancy and Memory-Antibodies and Immunity (*Symposium speaker*) "An evolutionary view of the mechanism for immune and genome diversity" Boston, USA  
The 2012 Gordon Research Conference on DNA Damage, Mutation and Cancer (*Symposium speaker*) "Common mechanisms for immune diversity and genome instability" California, USA  
Robert Koch Lecture (*Awardee lecturer*) "Acquired immunity, genome instability, cancer" Berlin, Germany
- 2013 Keystone Symposia: B Cell Development and Function (*Symposium speaker*) "Acquired immunity, genome instability, and cancer" Colorado, USA  
Charles A. Janeway Jr. Memorial Symposium (*Symposium speaker*) "Non canonical function of UNG regulates AID-dependent antibody memory" New Haven, USA  
15th ICI Milan 2013 (*Luncheon seminar speaker*) "Molecular mechanism for antibody memory generation" Milan, Italy
- 2014 "Frontiers in immunology - from molecules to disease" at Nobel Forum (*Symposium speaker*) "AID's function in DNA cleavage and recombination of the immunoglobulin gene" Stockholm, Sweden
- 2015 Keystone Symposia on HIV Vaccines/The Golden Anniversary of B Cells "Antibody Maturation and Class Switch" session (*Chair person /Symposium speaker*) "Antibody Maturation and Class Switch" Banff, Canada

**1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）****(3) 研究費の取得状況（研究代表者として取得したもののみ）**

科学研究費補助金 特別推進研究「AIDによる topoisomerase1 を介したゲノム不安定性誘導のメカニズム」  
研究代表者 平成 22 年度～26 年度 直接経費総額 430,400,000 円

**(4) 特別推進研究の研究成果を背景に生み出された新たな発見・知見**

すでに（1）において詳述したが、その中でも重要な発見は以下の通り。

a) Top1 mRNA と miRNA-RISC 複合体の詳細な結合部位の同定を行い、Top1 mRNA の 3' UTR に AID 発現時にのみ結合する配列があることを示した。さらにこの Top1 mRNA 3' UTR の miRNA 結合部位が CSR 制御に重要であることを CH12 細胞を用いた CRISPR/CAS9 ノックアウト法によって明らかにした。すなわち、Top1 mRNA 3' UTR 中の miRNA の結合部位を欠失した Top1 遺伝子を持った細胞では CSR が著しく低下した。従って AID による Top1 mRNA 3' UTR への miRNA 結合が CSR に不可欠である。

b) AID の共役因子として RNA 結合タンパク質の同定。RNA 編集説の根幹である RNA を認識する共役因子の同定に成功した。RNA 編集因子として機能が確定している APOBEC1 は、ACF という RNA 結合分子を必要とする。ACF は hnRNP (heterogeneous nuclear RNA 結合タンパク質) のファミリーに属することから既知 hnRNP ファミリーメンバーを網羅的に siRNA 法で低下させ、CSR への影響を指標にスクリーニングしたところ、hnRNP K と hnRNP L が同定された。また、この分子の RNA 結合部位の欠失を行なうと、CSR や体細胞突然変異の活性が阻害されたことから RNA 認識が重要であると考えられる。この発見は AID の作用に RNA が不可欠であることを示し、RNA 編集説の確証となった。

c) AID のターゲット特異性決定機構。AID による特異性決定に関わるものとして DNA の一次構造に由来する Non-B 構造に加えて、H3K4me3、FACT、さらにヒストンモディファイアータンパクである Smarca 4 が不可欠であることを明らかにした。

d) DNA 脱アミノ学説の中心的な DNA 切断分子である UNG および APE1 が両者とも DNA 切断ではなく、DNA 切断後の修復過程に必要であることを明らかにした。

## 2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況

特別推進研究の研究成果が他の研究者に活用された状況について、次の(1)、(2)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

### (1) 学界への貢献の状況（学術研究へのインパクト及び関連領域のその後の動向、関連領域への関わり等）

a) Top1 の異常によってゲノム不安定性が引き起こされる事、しかもこれが複製の過程ではなく、転写依存的に起こることが我々の研究の後、遺伝的神経変性疾患のいくつかの病気で明らかになった。いずれも Top1 が DNA に不可逆的に結合した DNA-Top1 複合体を速やかに除去し、修復する過程の酵素の異常であることが明らかになり、Top1 を介したゲノム不安定機構は免疫細胞でだけではなく、神経細胞においても重要な役割を担うことが明らかとなり、他の分野への大きなインパクトが示された (ref1)。

b) AID の異常により腸管免疫における IgA 産生が著しく阻害される。腸管における IgA 産生は腸管内のバクテリア叢の制御に極めて重要なことが近年報告され、逆にまたバクテリア叢の異常によって生体の代謝、免疫、神経機能等に大きな影響が出ることが証明された。この腸内バクテリア叢と生体応答のつながりは今日神経科学、代謝病学、免疫学を巻き込んだ大きなテーマとして世界中で研究されている。その根源的な制御を行なう AID の異常とヒトの様々な疾患との関連について多くの人が注目しており、新しい分野の構築に重要な手掛かりを与えた (ref2)。

3) 慢性リンパ性白血病においては AID の発現をするものとししないものとの間で悪性度に差があるという報告がある。AID の発現により癌細胞における遺伝子変異が連続的に進行するのではないかという考えがあり、AID の異常発現が発癌そのものからその後の悪性化のステップに関わることが示唆され、今日多くの研究が進んでいる (ref3)。

ref1 Kobayashi, M. et al. PNAS. 2009  
 Kobayashi, M. et al. PNAS. 2011  
 El-Khaisy, M et al., DNA Repair, 2009  
 Hubert, L. et al., MCB, 2011  
 Reynolds, A. et al., Nucl.Acids Res. 2012  
 Alagoz, M. et al., Plos ONE., 2013  
 Katyal, S. et al. Nat. Neuroscience, 2014

ref2 Wei, M. et al. Nat. Immunol. 2011  
 Fagarasan, S. et al. Science. 2012  
 Mathias, A. et al. Gut Microbes. 2014  
 Palm, NW. et al. Cell. 2014  
 Yano, JM. et al. Cell. 2015

ref3 Okazaki, T. et al. Adv. Immunol. 2007  
 Pasqualucci, L. et al. Nat. Genet. 2008  
 Qian, J et al. Cell. 2014  
 Huemer, M. et al. Eur. J. Immunol. 2014

## 2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況（続き）

(2) 論文引用状況（上位10報程度を記述してください。）

## 【研究期間中に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	<i>Helicobacter pylori</i> infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. (2007)	<i>Helicobacter pylori</i> の病原性に関わる遺伝子部分の発現により細胞内にAIDが発現誘導されることを明らかにした。	211
2	AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. (2008)	マウス発癌モデルである c-myc BCL6 myc BCL オンコジーン発現マウスと AID 欠損マウスの交配により、リンフォーマの発現を調べ、BCL6 依存性の胚中心由来リンフォーマは AID に依存することが明らかになった。	160
3	AID to overcome the limitations of genomic information. (2005)	AID がどのような分子機構で抗体遺伝子に変異を導入するのかについて、この時点で発表されていた文献を網羅的に調べ、様々な観点から DNA 脱アミノ学説の矛盾を明らかにした。	75
4	Role of AID in tumorigenesis. (2007)	AID による発癌についての多くの報告を统一的に整理し、AID が腫瘍化に関わる現象について総括的なまとめをした。	69
5	Discovery of activation-induced cytidine deaminase, the engraver of antibody memory. (2007)	分子メカニズムに関して、RNA 編集説と DNA 脱アミノ説との長い論争について、その相互のエビデンスを比較検討し、RNA 編集説が正しいと思われる論拠を整理した。	65
6	Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation and the development of colitis-associated colorectal cancers. (2008)	炎症性の反応により大腸由来の細胞において AID が遠所性に発現される。それによって TP53 のような癌抑制遺伝子に遺伝的変異が挿入されることを明らかにした。	64
7	Negative regulation of activation-induced cytidine deaminase in B cells. (2006)	B 細胞のみで AID を発現させるマウスを用い、さらに B 細胞での腫瘍化を検索したが、AID タンパクが大量に発現されたにも関わらず、発癌は見られず、CSR やミューテーションの過剰も見られないので、B 細胞においては AID に対して抑制的制御が働く可能性を示唆した。	52
8	A target selection of somatic hypermutations is regulated similarly between T and B cells upon activation-induced cytidine deaminase expression. (2005)	AID の過剰発現による T 細胞におけるミューテーションと B 細胞におけるミューテーションのターゲット特異性が極めて一致していることを明らかにした。	49
9	Evolution of class switch recombination function in fish activation-induced cytidine deaminase, AID. (2006)	セブラフィッシュとなまずの AID を用いてこれらがマウス細胞において体細胞突然変異と共に CSR を引き起こすことを明らかにした。	46
10	Organ-specific profiles of genetic changes in cancers caused by activation-induced cytidine deaminase expression. (2008)	AID の発現によって引き起こされる腫瘍においても臓器特異性があることを見出した。	42

## 【研究期間終了後に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	Mice carrying a knock-in mutation of <i>Aicda</i> resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. (2011)	AID の N 末端に点突然変異を導入したマウスでは、体細胞突然変異が著しく低下し、IgA の腸管内細菌叢の恒常性に関わることを報告した。	62
2	Histone3 lysine4 trimethylation regulated by the facilitates chromatin transcription complex is critical for DNA cleavage in class switch recombination. (2010)	AID による DNA 切断のターゲット特異性の指標として、H3L4me3 が重要であることを明らかにした。	37
3	Nonimmunoglobulin target loci of activation-induced cytidine deaminase (AID) share unique features with immunoglobulin genes. (2012)	AID によって切断された細胞断端をラベルし、全ゲノムシーケンスを行い、免疫グロブリン以外での AID ターゲットを網羅的に調べ、その遺伝子の近傍に反復配列が集中していることを明らかにした。	24
4	Preventing AID, a physiological mutator, from deleterious activation: regulation of the genomic instability that is associated with antibody diversity. (2010)	AID の発現制御に関するエンハンサー解析から AID の発現が B 細胞特異的また様々な外部刺激に应答して正と負の制約を受けていることを示す実験データを総括した。	16
5	X4 and R5 HIV-1 have distinct post-entry requirements for uracil DNA glycosylase during infection of primary cells. (2010)	HIV のレプリケーションに際して、UNG が virus ゲノムのインテグレーションに必要であることを明らかにした。	16
6	Activation-induced cytidine deaminase expression in CD4 <sup>+</sup> T cells is associated with a unique IL-10-producing subset that increases with age. (2011)	T 細胞の一部に AID が発現し、加齢によって増加し、IL-10 を産生することを報告した。	15
7	An evolutionary view of the mechanism for immune and genome diversity. (2012)	AID の祖先型が八つ目ウナギに見出されたことから、AID の進化とメカニズムの共通性を論じた。	13
8	The histone chaperone SPT6 is required for Activation-induced Cytidine Deaminase target determination through H3K4me3 regulation. (2012)	SPT6 のノックダウンにより AID の発現制御が行なわれ、尚かつ免疫グロブリン遺伝子座のヒストン修飾に影響が起り、CSR が著しく阻害される。	13
9	RNA editing of hepatitis B virus transcripts by activation-induced cytidine deaminase. (2013)	B 型肝炎ウイルスは複製に際して、RNA 型のゲノムを一時的に作る。この際に AID が大量に発現されていると、RNA にデアミネーションが起こる事を見出した。	13
10	The DSIF subunits Spt4 and Spt5 have distinct roles at various phases of immunoglobulin class switch recombination. (2012)	Spt5 は Spt4 と FACT 複合体を形成すると同時に H3K4me3 修飾を制御するが、Spt4 はそのような効果がない。両者が AID のターゲット特異性に関して、異なる機能を示すことを明らかにした。	12

### 3. その他、効果・効用等の評価に関する情報

次の(1)、(2)の項目ごとに、該当する内容について具体的かつ明確に記述してください。

#### (1) 研究成果の社会への還元状況（社会への還元の程度、内容、実用化の有無は問いません。）

我々の研究はAIDを通じた獲得免疫の根源的な分子機構を解明する基礎研究である。このような研究が5年間で社会へ還元されるような明確な産物を生み出すことは極めて稀である。たとえば、我々が1992年に発見し、解析を進めたPD-1は、22年の歳月を経て初めて臨床的な抗癌剤としての役割が明らかになり、明確な社会還元が行なわれた。2000年に我々が見つけたAIDの研究は、その極めて高度の機能解析はまだ完了していない段階であり、この研究の完成の過程で現在未だ具体的な社会的還元には至っていない。しかし、想定されるいくつかの社会還元としては、すでに2.(1)に述べたようなTop1関連酵素の異常による神経遺伝病、IgAの異常による腸管バクテリア叢の変化、AIDの発現異常による白血病やゲノム不安定などの様々な病気との関連から将来的に大きな社会的還元が期待される場所である。



## 3. その他、効果・効用等の評価に関する情報（続き）

(2) 研究計画に関与した若手研究者の成長の状況（助教やポスドク等の研究終了後の動向を記述してください。）

名前	当時	現在
新藏 礼子	准教授	長浜バイオ大学バイオサイエンス学科 教授
長岡 仁	准教授	岐阜大学医学部 教授
岩井 佳子	助手	東京医科歯科大学准教授を経て、産業医科大学医学部 教授
村松 正道	助手	金沢大学医薬保健学類医学系 教授
岡崎 拓	助手	徳島大学疾患ゲノムセンター 教授
山本 典夫	助手	京都大学大学院医学研究科耳鼻科 助教
辻 正幸	ポスドク	理化学研究所横浜研究所 研究員を経て、サントリー 研究員
岡崎 一美	ポスドク	徳島大学疾患ゲノム研究センター 助教
土井 知光	ポスドク	東京大学医科学研究所 助教
寺脇 正剛	ポスドク	仏留学後、東京都医学総合研究所 研究員
伊藤 聡美	ポスドク	仏留学後、科学技術大学院大学 研究員
鈴木 敬一郎	大学院生	理化学研究所横浜研究所 研究員を経て、京都大学医学研究科 AK 研究員
吉田 卓	大学院生	エーザイ株式会社 創薬第二研究所 研究員を経て、Harvard Medical School へ留学
福田 仁	大学院生	姫路医療センター医員
野中 太郎	大学院生	彦根市立病院 医員を経て、Univ. of California へ留学
Tran Huy Thinh	大学院生	理化学研究所横浜研究所 研究員を経て、本国ベトナムに帰国
Lucia M. Kato	大学院生	理化学研究所横浜研究所 研究員
河本 新平	大学院生	理化学研究所横浜研究所 研究員
梁 国新	大学院生	金沢大学研究員を経て、Stanford Univ. に留学
Andre Atanlie	大学院生	京都大学医学研究科 研究員を経て、米国 NIH へ留学
Le Thi Huong	大学院生	Thai Nguyen Medical Univ. 講師
Rui Yuxiang	大学院生	大阪大学免疫学フロンティア研究センター 研究員