

Title	De novo protein synthesis is required for the activation-induced function in class-switch recombination.
Sub Title	クラススイッチ組換えにおけるAIDの機能発現には新たなタンパク質合成が必要である
Author	土井, 知光
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.2 (2004. 6) ,p.26-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040602-0026">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040602-0026</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# De novo protein synthesis is required for the activation-induced cytidine deaminase function in class-switch recombination.

(クラススイッチ組換えにおけるAIDの機能発現には新たなタンパク質合成が必要である)

土 井 知 光

## 内容の要旨

B細胞の抗体遺伝子はクラススイッチ組み換え (CSR) と呼ばれるDNA組み換えにより異なる機能を持つサブクラスを発現することが出来る。近年activation induced cytidine deaminase (AID) がCSRに必須の遺伝子として発見され、高IgM血症2型の原因遺伝子であることが報告された。更にAIDは非B細胞で人工基質上にCSRを起こすのに十分であることから、唯一の活性化B細胞特異因子であると示唆されている。

AIDはmRNA編集酵素ApoBc-1に相同性を持っていることから、AIDもmRNA編集酵素として組み換え酵素を合成しているという仮説がある (mRNA編集仮説)。一方、AIDが唯一の特異因子であることや、AIDにDNA上のシトシンを脱アミノ化する活性があることから、AIDが直接DNAに作用しているという仮説もある (DNA編集仮説)。2つの仮説の相違点はAIDの下流にタンパク質合成が必要であるか無いかである。これらの仮説を検証するために、タンパク質合成阻害剤によりAID下流の反応が抑制されるか調べることにした。しかし、タンパク質合成阻害剤はAIDがCSRを起こす前に加えなければならないが、AIDの発現前に加えるとAIDの合成そのものを抑えてしまうため、AIDを不活化状態で発現させタンパク質レベルで活性を回復させる必要があった。そこでAIDとエストロゲンレセプター (ER) のホルモン結合領域との融合タンパク質を作成した。この融合タンパク質AID-ERは、AIDを不活化状態で発現させタモキシフェン (OHT) を加えることで迅速に活性化させることが出来る。AID-ERを導入したAID欠損B細胞において、CSRが抑制されるか検討した。CSRはOHT添加後1時間で検出され始め徐々に蓄積していったが、CSRはタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド (CHX) をOHT添加1時間前から加えておくことで強く抑制された。この抑制はCHXを加えるタイミングをOHTの1時間後にすることで解除された。もしタンパク質合成がDNAの修復段階に必要であるならば、1時間後にCHXを加えた場合でも抑制されると考えられる。また、CSRにCHXによって消失してしまうような非常に代謝回転の早いタンパク質が関与している場合や、CHXがCSRを抑制するような因子を誘導している場合も同様であると考えられる。したがって、AIDは新規のタンパク質合成を介して、修復段階よりも前、おそらくDNA切断の段階に関与しているのではないかと考えられる。この結果はAIDの下流に組み換え酵素の合成があり、組み換え酵素の合成後は阻害剤に影響されないというmRNA編集仮説を指示するものであり、すでに存在するAIDが直接DNAを攻撃する説では説明しにくいものである。

## 論文審査の要旨

抗体遺伝子のクラススイッチならびに変換領域の体細胞変異は免疫反応において重要である。AID (activation-induced cytidine deaminase) はクラススイッチと体細胞変異の両方に必須の遺伝子であることが示されたものの、その作用機序についてはRNAエディティングを介するか、DNAの直接の脱アミノ化によるものであるかは不明であった。本研究は、この点を明らかにする目的で、AID遺伝子とエストロゲン受容体の融合タンパク質 (AID-ER) を利用した。AID-ERはそのままでは活性を持たず、エストロゲンが結合すると速やかに構造変化を起こし、活性を持つようになる。AID-ERをAID欠損B細胞に導入し、クラススイッチ刺激前後でタンパク質合成を阻害してクラススイッチの誘導の有無を検討した。その結果、クラススイッチ組換えが誘導されるためにはAIDの活性化のみならず、新たなタンパク質合成が必要であることが示された。AIDが直接DNAを修飾するのであれば新たなタンパク質合成は必要がなく、AIDがエディティング酵素として別のmRNAの塩基変換を誘導して組換え酵素を生み出す可能性が強く支持された。

審査においては、まず第2著者との同等な貢献について事実関係が質問された。これに対し、申請者は当初tatペプチドを結合したAIDタンパク質を細胞外から導入するというアイデアによって新たなタンパク質合成の必要の有無を検討する計画を立てたが、tat-AIDがうまく機能せず、同時期に第2著者がAID-ERを作製したために利用したこと、それ以外のアイデアやデータは全て申請者のものであることが説明された。次に、異なるタンパク質阻害剤 (シクロヘキシミドとビューロマイシン) で結果に若干の違いがある理由について質問され、薬剤の強さに差があるためであり、これはAID-ER自身の発現レベルに若干差が出ることと矛盾しないと回答された。また、AIDがクラススイッチと体細胞変異の両方に機能するのであれば、体細胞変異における新たなタンパク質合成の必要性はどうであるかとの質問がなされたが、これは体細胞変異を検出する感度の問題で難しいことが説明された。さらに、AIDが核において機能するのかが質問され、AIDが核に移行することは確認されており、恐らく核で機能すると思われること、核移行が出来ないAID-ERの変異体を作製するなどで解答が得られるはずであるが、証明はまだであると回答された。その他、本研究のバックグラウンドならびに周辺領域に関する質問がいくつかなされ、それぞれに回答がなされた。

審査員の協議により、本研究はクラススイッチの分子機構の一端を明らかにした価値ある研究であると評価され、同時に申請者は研究の内容のみならず周辺領域に関する十分な知識を持ち、学位を与えるにふさわしいと認められた。

論文審査担当者 主査 微生物学・免疫学 小安 重夫  
微生物学・免疫学 石川 博通 先端医科学 河上 裕  
発生・分化生物学 須田 年生

学力確認担当者:

審査委員長: 石川 博通

試問日: 平成16年2月12日