

氏名	むとうたろう 武藤太郎
学位の種類	博士 (生命科学)
学位記番号	生博第12号
学位授与の日付	平成16年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	生命科学研究所 高次生命科学専攻
学位論文題目	ヒトAID遺伝子の単離、発現領域、染色体位置の同定

論文調査委員 (主査) 教授 湊 長博 教授 清水 章 教授 眞貝 洋一

### 論文内容の要旨

「抗体遺伝子クラススイッチ組み換え (以下, CSR)」は, 抗体遺伝子の重鎖定常領域を他のアイソタイプに組み換え, 外部からの侵入物に対して様々な方法でそれを除去することを可能にしている免疫システムである。CH12F3-2細胞株は, ある種のサイトカイン刺激後にIgMからIgAに特異的にCSRを起こすマウスB細胞リンパ腫細胞株であり, マウス Activation-induced Cytidine Deaminase (AID) 遺伝子は, そのCSRに伴って発現増強される遺伝子として単離されたが, 機能は不明であった。

申請者ヒトAID遺伝子を単離同定することを目的として, ヒト由来のゲノムDNAライブラリーからマウスAIDホモログ遺伝子をクローニングし, RACE法によりそのcDNA配列を得た。ここで得られた遺伝子は, ヒトゲノムDNAの中でマウスAID cDNA断片とクロスハイブリダイズする唯一の配列である事, マウスAID配列との同義置換率の値が, この遺伝子とマウスAIDとのオーソロジーを支持する事, この遺伝子から推測されるアミノ酸配列がマウスゲノムの中でAIDと最も相同性を有している事, という3つの特徴を有するため, これをヒトAIDであると結論した。ヒトAID遺伝子は, 全長約11kbで5つのexonから成り, そのcDNA配列は, 内部にcytidine deaminase (CDD) motifを含むタンパクをコードしていた。AIDのCDD motifのアミノ酸配列はマウスとヒトで100%保存されていたため, この部位がAIDの機能にとって重要な役割を果たしている事が示唆された。AIDの発現を調べた結果, リンパ節と扁桃腺に, また, centroblast B細胞株に発現を認めた。この結果は, AIDがCSRに関連するという仮説と合致する。さらにFISH法による解析の結果, ヒトAID遺伝子が染色体12p13上に位置することが判明した。

他方, 外国のグループによって, ヒト免疫不全症の一つであるHyper IgM syndrome 2 (HIGM2) においては, 患者のB細胞において抗体遺伝子座のCSRおよび高頻度体細胞突然変異 (SHM) を引き起こせないことが知られていた。この疾患は常染色体劣性遺伝性疾患であり, 原因遺伝子は不明であるものの, 染色体12p13上に位置する事が強く示唆されていた。またHIGM2患者におけるCSRの欠質はB細胞に特異的な異常に由来する事が推測されていた。これらの特徴はAID遺伝子の特徴と合致したため, HIGM2の患者におけるAIDの遺伝子配列を決定した。その結果, 18人のHIGM2患者のAID遺伝子に, アミノ酸配列の変化を伴う変異の存在が明らかとなった。さらに, AID欠損マウスにおいても, HIGM2様の表現型が発現することが明らかとなり, AIDはHIGM2の原因遺伝子でありCSRとSHMに必須の遺伝子であると結論づけた。

様々なB細胞腫瘍においては, 異常な染色体転座とCSRやSHMの関連が示されており, また, APOBEC-1を肝臓において強制発現させた動物では腫瘍が生成する事が知られている。そこで申請者は, CSRおよびSHMに必須のAID遺伝子のB細胞腫瘍生成における影響を評価するために, B細胞特異的に恒常的にAIDを発現するトラスジェニックマウスの解析を行った。その結果, 平常状態のマウス体内においては, AIDの発現がB細胞発生, 血中抗体濃度, CSRの頻度, SHMの頻度に影響を与えない事が判明した。この事は, B細胞においてはAIDの異常な影響を相殺する機構, 例えばAIDと協調して働く分子が存在しない, DNA基質がCSRやSHMを受けないように修飾されている, 異常なAIDの働きを受けたB細胞

が除去される、などの存在を示唆するものであり、AIDのB細胞腫瘍発生における役割についてはさらなる解析が必要と考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

「抗体遺伝子クラススイッチ組み換え（以下、CSR）」は、抗体遺伝子の重鎖定常領域の遺伝子組み換えによって、抗原特異性を保持したまま生物学的活性の異なる多様な抗体分子を精製する機構であり、免疫応答と多様性の形成にきわめて重要なメカニズムである。すでにマウスB細胞リンパ腫細胞株から、CSRに関連すると考えられるマウス Activation-induced Cytidine Deaminase (AID) 遺伝子が単離されていたが、その機能は不明であった。他方、ヒトにおいてはCSRの異常を有するいくつかの遺伝性免疫不全症の存在が知られている。申請者はヒトAID遺伝子を単離同定することによって、逆遺伝学的手法によりAID遺伝子のCSRへの機能的関与を明らかにすることを試みた。

申請者は、ヒト由来のゲノムDNAライブラリーからマウスAIDホモログ遺伝子をクローニングし、RACE法によりそのcDNA配列を得た。ここで得られた遺伝子は、ヒトゲノムDNAの中でマウスAID cDNA断片とクロスハイブリダイズする唯一の配列である事、マウスAID配列との同義置換率の値が、この遺伝子とマウスAIDとのオーソロジーを支持する事、この遺伝子から推測されるアミノ酸配列がマウスゲノムの中でAIDと最も相同性を有している事、という3つの特徴を有するため、これをヒトAIDであると結論した。ヒトAID遺伝子は、全長約11kbで5つのexonから成り、そのcDNA配列は、内部にcytidine deaminase (CDD) motifを含むタンパクをコードしていた。AIDのCDD motifのアミノ酸配列はマウスとヒトで100%保存されていたため、この部位がAIDの機能にとって重要な役割を果たしている事が示唆された。AIDは、リンパ節と扁桃腺に、また、centroblast B細胞株に発現を認めた。この結果は、AIDがCSRに関連するという仮説と合致する。さらにFISH法による解析の結果、ヒトAID遺伝子が染色体12p13上に位置することが判明した。

他方、外国のグループによって、ヒト常染色体劣性免疫不全症の一つであるHyper IgM syndrome 2 (HIGM2)においては、患者のB細胞において抗体遺伝子座のCSRおよび高頻度体細胞突然変異 (SHM) を引き起こせないことが報告されており、その原因遺伝子は染色体12p13上に位置する事が強く示唆されていた。そこで申請者はHIGM2の患者におけるAIDの遺伝子配列を決定し、18人のHIGM2患者のAID遺伝子に、アミノ酸配列の変化を伴う変異の存在することを明らかにした。さらに、AID欠損マウスにおいても、HIGM2様の表現型が発現することが明らかとなり、AIDはHIGM2の原因遺伝子でありCSRとSHMに必須の遺伝子であると結論づけられた。

さらに申請者は、AID遺伝子のB細胞腫瘍生成における影響を評価する目的で、B細胞特異的にAIDを発現するトランスジェニックマウスの解析を行い、平常状態においてはAIDの過剰発現がB細胞発生、血中抗体濃度、CSRの頻度、SHMの頻度に影響を与えない事、従って正常細胞においてはAIDの異常な影響を相殺する機構が存在すること、を示唆した。

以上の結果は免疫応答の多様性形成の遺伝学的機構の理解とその異常による病態発生の解明に大きな貢献をなすものであり、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。また申請者は、平成16年1月27日、論文内容とそれに関連した口頭試問を受け調査委員全員一致で合格と認められたものである。