

京都大学	博士（医学）	氏名	Le Thi Huong
論文題目	<b><i>In vivo</i> analysis of <i>Aicda</i> gene regulation: a critical balance between upstream enhancers and intronic silencers governs appropriate expression.</b>		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p><b>背景</b></p> <p>Activation-induced cytidine deaminase(AID)は、抗体遺伝子のクラススイッチ組換えや体細胞突然変異を引き起こす分子であり、Bリンパ球活性化に伴い強く発現されるが、他にも未熟Bリンパ球やTリンパ球、刺激を受けた胃上皮細胞や肝細胞で発現する。その様な活性化Bリンパ球以外での発現も、細胞がん化や自己反応性の未熟Bリンパ球の排除など何らかの役割を持つと考えられている。生体内の種々の細胞でAIDが状況に応じて発現する仕組みは明らかではない。これまでにAIDの遺伝子<i>Aicda</i>の制御に関わる3つのシス調節領域(region 1, 2, 4)が培養細胞の系で示されていた。本研究では、<i>Aicda</i>全体を含むバクテリア人工染色体(BAC)で遺伝子導入マウス(Tg)を作製・解析し、これらシス調節領域の生体内での役割を明らかにした。</p> <p><b>方法</b></p> <p><i>Aicda</i>の調節領域には、プロモーター領域(region 1)に加え、E2F, c-Myb結合配列を含む第一イントロン領域(region2)、NF-kB, STAT6, Smad, C/EBP結合配列が集簇する転写開始点の上流8-kbの領域(region4)がある。まず<i>Aicda</i>全体を含む全長190-kbのBACを相同組替えで改変し、AIDのコード領域にヒトCD2及びcreの発現カセットを挿入した基本コンストラクト(Aid-cre-cd2)を作製した。更にそれを改変し、region2を欠失させたdR2-ac-cre、サイレンサーのE2F, c-Myb結合配列を欠いたdME-ac-cre、region4を欠失させたdR4-ac-cre、そしてC/EBP結合配列を欠失させたdCEBP-ac-creを得た。これらのBAC DNAを用いて各2-5系統のTgを作製し、rosa-tdRFPマウスと交配することで、現在及び過去の<i>Aicda</i>発現をhCD2と赤色蛍光タンパク質(RFP)を指標として観察できる系を樹立し解析した。</p> <p><b>結果</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Aid-cre-cd2-Tgで観察される胚中心活性化Bリンパ球のhCD2 RFP発現は、dR2-ac-cre-TgとdR4-ac-cre-Tgでは消失する。</li> <li>2) Region4内の2つのC/EBP結合配列の欠失でも(dCEBP-ac-cre-Tg)、CD40, IL-4およびTGF-betaのシグナル伝達に関わるNF-kB, STAT6, Smad結合配列がそのまま保存されているにもかかわらず、hCD2 RFPの発現が消失する。</li> <li>3) Region2内のE2F及びc-Myb結合配列を欠失させると(dME-ac-cre-Tg)全身リンパ組織と胚中心活性化Bリンパ球でのRFP+細胞及びhCD2+RFP+細胞の比率がAid-cre-cd2-Tgに比してほぼ倍に上昇する。また、未熟Bリンパ球でもhCD2トランスジーンの転写産物量が有意に増加する。</li> <li>4) Tリンパ球でのhCD2 RFP発現増強はdME-ac-cre-Tgで検出できなかった。</li> </ol> <p>以上の結果は<i>in vivo</i>でのAIDの発現がregion4・region2の制御エレメントの活性のバランスにより至適レベルに保たれている事を示す。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

Activation-induced cytidine deaminase(AID)は抗体遺伝子クラススイッチ及び体細胞突然変に必須の分子である。加えて、プロトオンコジーンを含む広範な遺伝子への変異導入活性や染色体転座等を誘発するゲノム不安定化作用があり、そのため副次的な作用として細胞の癌化に関与しうる事も示唆されている。AIDは活性化Bリンパ球に強く発現するだけでなく、他の系列の細胞でも様々の刺激によって発現するが、その仕組みは完全には明らかではない。申請者、Le Thi Huongは、これまで*in vitro*レポーター解析でその存在が示唆されていたAID遺伝子(*Aicda*)の上流の領域及び第一イントロン内に存在するエンハンサー・サイレンサーエレメントが、実際に*in vivo*でAIDの発現に重要であることを、バクテリア人工染色体(BAC)を用いた遺伝子導入マウスの系で証明した。更に、領域内に存在する複数の転写調節因子結合配列の中で、これまでその*in vivo*での重要性が明らかではなかったC/EBP結合配列が*Aicda*の発現に必須である事と、第一イントロン内のc-Myb及びE2FエレメントがBリンパ球での*Aicda*発現に抑制的に働いている事を明らかにした。

以上の研究は*Aicda*遺伝子発現調節の分子機構の解明に貢献し、末梢リンパ球活性化に伴う抗体多様性獲得誘導機構とそれに付随するゲノム不安定化機構の理解に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成25年8月9日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降