

京都大学	博士（医学）	氏名	Sabouri Somayeh
論文題目	C-terminal region of AID is required for efficient class switch recombination and gene conversion (AIDのC末端部分は免疫グロブリン遺伝子におけるクラススイッチ組換えとジーンコンバージョンに必要である)		
(論文内容の要旨) <p>Activation-induced cytidine deaminase (AID)は、DNAの一本鎖を切断 (single strand break, SSB) することにより、免疫グロブリン (Ig) 遺伝子のクラススイッチ組換え (Class Switch Recombination, CSR)、ジーンコンバージョンおよび体細胞突然変異 (Somatic Hypermutation, SHM)を開始する。CSRの過程では、AIDがドナー及びアクセプターとなる各々のスイッチ(S)領域にSSBを形成し、DNA損傷修復機構がほとんど突出配列の無い二本鎖切断(double strand break, DSB)に処理する。その結果生じたDSB断片は、互いに引き寄せられ(synapse形成)、結合される。AID-C末端の変異体細胞では、SSBとSHMを起こす効率は、野生型細胞と同程度であるが、CSRの効率が著しく低下する。これは、AID-C末端部分がSSB後のDSB形成に必要である可能性を示している。この仮説を検証するために、修復結合とsynapse形成におけるAID-C末端部分の機能を検討した。</p> <p>まず、AID-C末端変異体によるCSRの効率は非常に低いが、そのCSRにより構成された結合部の配列を解析したところ、結合部に0-3塩基対の短い相同配列を持つクローンが減少し、逆に4塩基対以上の相同配列を持つものが増加し、古典的非相同性結合(classical non-homologous end joining, C-NHEJ)が損なわれ、代償的にAlternative end joiningが働くことが示唆された。そこで、クロマチン免疫沈降法を用い、C-NHEJに関わる分子のS領域への集積を解析したところ、AID-C末端変異体細胞ではKu80やXRCC4などのC-NHEJに関わる分子のS領域への集積が、野生型細胞と比べ低下していた。一方、SSBに特異的に結合するPARP1の集積は野生型よりも高かったため、AID-C末端変異体ではSSBからDSBへと処理する過程が障害されていると考えられた。さらに、synapse形成に重要な53BP1, DNA PKcsやUNGなどのS領域への集積も減少し、DSB形成の不良によりsynapse形成が低下している可能性が考えられた。実際に、100万塩基対離れた染色体領域同士の相互作用を検出するChromosome Conformation Capture (3C)法では、AID-C末端変異体細胞でのドナー・アクセプター間のsynapse形成低下が示された。次に、DT40細胞を用い、AIDによるSSBを起点とするジーンコンバージョン (Gene Conversion, GC)と呼ばれる相同組換え過程について検討した。この細胞では、Ig遺伝子可変(V)領域において、上流の偽V領域との間でGCを起こす。興味深いことに、AID-C末端変異体はGCの効率も野生型と比較し低下していた。これはSSBよりDSBの方がGCに有利なためと推測され、AID-C末端変異体のSSBからDSB形成への処理効率の低下を反映する結果と</p>			

考えられた。

以上の結果を総合すると、AID-C末端部分はCSRとGCの双方において、DNAのSSBからのDSBの形成とsynapse形成に必要である事が示唆された。本研究では、AIDが一本鎖DNA切断に加え、そのC末端部分を介し、一本鎖切断に続く二本鎖切断端の形成とsynapse形成において必須の機能を担うことが明らかとなった。

(論文審査の結果の要旨)

Activation-induced cytidine deaminase (AID)は、DNAの一本鎖切断 (single strand break, SSB) により、免疫グロブリン (Ig) 遺伝子のクラススイッチ組換え(Class Switch Recombination, CSR)、ジーンコンバージョン(GC)および体細胞突然変異 (Somatic Hypermutation, SHM)を開始させる。CSRの過程では、AIDが各々のスイッチ(S)領域にSSBを形成し、DNA損傷修復機構が二本鎖切断(double strand break, DSB)に処理しsynapseを形成、結合される。AID-C末端変異体細胞では、SSBとSHMを起こす効率は野生型細胞と同程度であるが、CSRの効率が低下し、AID-C末端部分がDSB形成に必要と考えられたため、修復結合とsynapse形成におけるAID-C末端部分の機能を検討した。AID-C末端変異体によるCSRにより構成された結合部に0-3塩基対の短い相同配列を持つクローンが減少、長い相同配列を持つものが増加し、古典的非相同性結合(C-NHEJ)が損なわれ、代償的にAlternative end joiningが働いていた。AID-C末端変異体細胞ではKu80やXRCC4などのC-NHEJに関わる分子のS領域への集積が低下した。一方、SSBに結合するPARP1の集積は高く、さらに、synapse形成に重要な53BP1, DNA PKcsやUNGなどのS領域への集積も減少し、DSB形成不良によりsynapse形成が低下すると考えられた。3C法では、AID-C末端変異体細胞でのsynapse形成低下が示された。AID-C末端変異体はGCの効率も野生型と比較し低下していた。これはSSBよりDSBの方がGCに有利なため、AID-C末端変異体のSSBからDSB形成への処理効率の低下を反映する。以上より、AID-C末端部分はCSRとGCの双方において、DNAのSSBからのDSBの形成とsynapse形成に必要である事が示された。本研究では、AIDが一本鎖DNA切断に加え、そのC末端部分を介し、一本鎖切断に続く二本鎖切断端の形成とsynapse形成において必須の機能を担うことが明らかとなった。

以上の研究は抗体多様性機構の解明に貢献し免疫学・遺伝学双方の発展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26年2月26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