

京都大学	博士 (医科学)	氏名	Yousif Ashraf Siddig
論文題目	Differential regulation of S-region hypermutation and class switch recombination by noncanonical functions of uracil DNA glycosylase (ウラシルDNAグリコシラーゼのnoncanonicalな機能によるS領域超変異とクラススイッチ組み換えに対する異なる制御)		
(論文内容の要旨) Activation-induced cytidine deaminase (AID) is essential to class switch recombination (CSR) and somatic hypermutation (SHM) in both V region (SHM) and S region (s-SHM). CSR and SHM are crucial genetic alterations that engrave antigen memory in the immunoglobulin (Ig) genes. Uracil DNA glycosylase (UNG), a member of the base excision repair (BER) complex, is required for SHM and CSR. Although the precise function of UNG in CSR and SHM is extensively elusive and debatable. UNG has been proposed to be involved in AID-dependent DNA cleavage by DNA deamination hypothesis, in which AID generates uracil from cytosine on DNA, providing the substrate for UNG in the Ig locus. In contrast, previously we have shown that UNG enzymatic activity is dispensable for class switch recombination. Ever since, we have followed up this finding and published additional lines of evidence that support the dispensability of UNG enzymatic activity function for CSR. Furthermore, while AID deficiency abolishes both CSR and SHM, UNG deficiency causes drastic CSR impairment and augment SHM, suggesting a novel function of UNG in CSR and SHM. Here, we made a striking finding that distinct functions of UNG are involved in s-SHM and CSR. We found that UNG actively suppresses SHM. Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) indicates that UNG serves as a scaffold for BER enzymes at AID-induced damage sites of immunoglobulin locus and suppresses s-SHM. A UNG mutant that fails to interact with BER enzymes such as flap endonuclease 1 (FEN1) does not suppress s-SHM. This suppression is caused by competitive SSB site binding of the UNG complex with error prone polymerases like Rev1 and Rev3 which introduce SHM. Furthermore, we demonstrate that UNG serves as a critical scaffold for CSR by recruiting synapsis factors like p53-binding protein 1 (53BP1) and DNA- dependent protein kinase, catalytic subunit (DNAPKcs). In collaboration with these proteins, UNG contributes for pairing of appropriate double strand break ends by the formation of chromatin high order structure, namely S-S synapsis formation. Different surfaces of UNG are required for the scaffold functions for s-SHM and CSR because several UNG mutants can distinguish s-SHM suppression and CSR promotion activities. Taken together, UNG is now shown to be a scaffold protein that plays distinct roles in s-SHM and CSR at the repair phase of the AID induced genetic alterations.			

(論文内容の要旨)

活性化誘導シチジンデアミナーゼ (AID) は、免疫グロブリンV領域の体細胞突然変異およびS領域のクラススイッチに不可欠である。クラススイッチ組み換えと体細胞突然変異によって抗原記憶が形成される。ウラシル DNA グリコシラーゼ (UNG) は塩基除去修復酵素群 (BER) のメンバーであり、体細胞突然変異とクラススイッチに必要なと言われてきた。従来、UNG のクラススイッチ組み換えと体細胞突然変異における役割についてはたくさんの議論があった。AID の作用機能としてDNA 脱アミノ仮説においては、UNG はAID がDNA 上のCをUに変換したあと、UG ミスマッチが生じるのでUを除去する酵素として提案され、その後Ape I がDNA 切断をされると考えられた。ところが、申請者の研究室ではUNG の酵素活性はクラススイッチ組み換えに必要でないことを明らかにし、この知見を支持する UNG 機能に関するデータを提供してきた。さらに、AID 欠損においてはクラススイッチと体細胞突然変異の両者が失われるが、UNG の欠損においてはクラススイッチのみが消失し、体細胞突然変異はむしろ増強することが明らかとなり、UNG はクラススイッチと体細胞突然変異で別の役割をすることが示唆された。申請者は今回、UNG がクラススイッチ組み換えと体細胞突然変異でまったく違う機能を持つことを証明した。まず、UNG は体細胞突然変異を抑制する機能を持つ。クロマチン免疫沈降法 (チップ法) により、UNG はBER 酵素群の足場タンパク質として働き、DNA によって引き起こされた免疫グロブリン遺伝子座の単鎖切断部位に BER 酵素群を集め、そして正しい修復を行うことによって体細胞突然変異を抑える。実際に、BER 酵素との結合ができない UNG 変異体では、このような体細胞突然変異の抑制効果が見られなかった。UNG がないと、過誤修復 DNA 合成酵素である Rev1、Rev3 が DNA 切断部位に結合し体細胞突然変異を亢進する。一方、クラススイッチにおいては切断された断端の対合に必要な 53BP1 と DNA PKcs を結合する足場タンパク質として UNG が働いていることを示した。UNG はこれらのタンパク質と協調して、二重鎖切断の断端のシナプス形成に働く。UNG のさまざまな変異体の解析から、同じ変異体がクラススイッチと体細胞突然変異では違う活性を示すことが明らかになり、UNG はクラススイッチに必要な UNG 足場タンパク質のタンパク表面と体細胞突然変異抑制作用に関わる UNG 足場タンパク質表面とは異なることを明らかにした。

(論文審査の結果の要旨)

クラススイッチ組み換え(CSR)、ならびに、V領域SHMとS領域SHM (s-SHM)での体細胞超変異(SHM)が生じるのに活性化誘導シチジンデアミナーゼ(AID)が不可欠である。CSRが生じるには塩基除去修復(BER)複合体のメンバーであるウラシル DNA グリコシラーゼ (UNG)が必要である。しかし、驚くべきことに、UNGが欠損するとSHMが増大する。このことは、SHMとCSRではUNGが異なる機能をしていることを示唆するものである。本論文では、UNGの酵素活性ではなく足場機能が、s-SHMに対しては負の制御を、CSRに対しては正の制御をしていることを示した。UNGのs-SHMに対する抑制的な機能は、DNA切断部位に正しい修飾を行う塩基配列除去修復 (BER) の酵素が動員され、エラー率の高いポリメラーゼと競合することによるものである。対照的に、UNGのCSR促進機能は、p53-結合タンパク質1 (53BP1)およびDNA依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット(DNA PKcs)を動員することでAID依存性S-Sシナプス形成を高める。UNGのいくつかの触媒機能喪失変異によって、CSR促進活性とSHM抑制機能を区別できた。総合すると、UNGの足場タンパク質機能が、AID誘導DNA切断後のステップを調節する。すなわち：s-SHMでは過誤修復(error prone repair)を抑制し、CSRでは末端結合を促進する。

以上の研究は免疫抗体の多様化の仕組み解明に貢献し医学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 4 月 18 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。