

京都大学	博士（医科学）	氏名	Azza Al Ismail
論文題目	Depletion of recombination-specific cofactors by the C-terminal mutant of the activation-induced cytidine deaminase causes the dominant negative effect on class switch recombination (AIDのC末端変異体は特異的共役因子を枯渇させるため、クラススイッチ組替えにドミナントネガティブ効果を及ぼす)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>Activation-induced cytidine deaminase (AID) is essential for class-switch recombination (CSR) and somatic hypermutation (SHM) of immunoglobulin (Ig) genes. Studies on <i>in vitro</i> mutagenized AID as well as its mutations in human patients with Hyper-IgM (HIGM)-syndrome type II revealed that C-terminal AID mutations were defective in CSR whereas their DNA cleavage and SHM activities remained intact. The C-terminal mutants of AID were speculated to exert the dominant negative effect on wild type WT AID whereas its mechanism remains unknown. We generated the JP41 (R190X) mutation in one allele and null mutation on the other allele in mouse B cell line (CH12F3-2A) using CRISPR/Cas9 genome editing tools and studied the effect of JP41 expression on the function of exogenously introduced WT AID fused with estrogen receptor (AIDER) in AID^{JP41/Δ}/AIDER CH12F3-2A cells. We found that JP41 expression strongly suppressed not only CSR but also <i>Igh/c-Myc</i> chromosomal translocations by AIDER. We showed the dominant negative effect is not evident at the DNA cleavage step but obvious at both deletional and inversional recombination steps. We also confirmed the dominant negative effect of other C-terminal mutants, JP8Bdel (R183X) and P20 (34-aa insertion at residue 182) in AID deficient spleen B cells. Finally, we showed that the expression of JP41 reduced the binding of AIDER with its cofactors (hnRNP L, SERBP1, and hnRNP U). Together these data indicate that dominant negative effect of JP41 on CSR is likely due to the depletion of the CSR-specific RNA binding proteins from WT AID.</p>			

(論文審査の結果の要旨)

AIDは免疫グロブリン遺伝子座DNAを切断し、その修復過程で変異が導入される一方、DNA断端の再結合によりクラススイッチ(CSR)を起こす。J41などのAIDのC末端変異体にはDNA切断活性はあるがCSR活性はなく、野生型AIDに対して競合阻害効果を持つ。申請者らはJP41アレルと全欠失アレルを持つヘテロB細胞腫瘍CH12F3-2A細胞株を作成した(AID^{JP41/Δ})。AID^{JP41/Δ}細胞ではAIDヘテロ細胞(AIS^{W/-})と比較しCSRは著しく低下したがIgh/cMyc転座は同等であった。ところが、AIDER(AID-ER融合体)を遺伝子導入したAID^{JP41/Δ}細胞ではCSRもIgh/cMyc転座も、AID^{-/-}/AIDERに比べて抑制された。この阻害機構を調べるためにAIDによるDNA切断に必須のRNA結合タンパク質hnRNPKならびにDNA断端の再結合に必須なRNA結合タンパク質hnRNPL、SEBPL、hnRNPUとAIDとの結合におよぼすJP41による結合競合の効果を免疫沈降法で調べた。JP41によりAIDとhnRNPKとの結合に低下は認められなかったが、hnRNPL、SERBP1、hnRNPUとの結合が低下した。これらの共役因子をノックダウンした場合にもCSRとIgh/cMyc転座の頻度は低下していた。JP41による競合阻害効果はCSRの組換え特異的なRNA結合タンパク質がJP41との結合競合により野生型AIDから奪われることにより生じていることが示され、AIDの機能にRNA結合タンパク質との結合が必須であることを示した。

したがって、本論文は博士（医科学）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30年2月14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。