

京都大学	博士（医 学）	氏 名	梁 国新
論文題目	RNA editing of hepatitis B virus transcripts by activation-induced cytidine deaminase (AID による B 型肝炎ウイルス RNA の編集)		
(論文内容の要旨)			
成熟 B 細胞では、抗体遺伝子多様化プロセスは、クラススイッチ組換えと somatic hypermutation によって行われている。クラススイッチ組換えは、定常領域を Cμから Cγなどの下流のいずれかの定常領域に置き換える組換えである。一方 somatic hypermutation は、可変領域に点突然変異を蓄積する現象である。Activation-induced cytidine deaminase (AID) は、クラススイッチ組換えと somatic hypermutation を抗体遺伝子座に引き起こす遺伝子産物であることが、本庶らの一連の研究により明らかにされた。AID がどのようにクラススイッチ組換えと somatic hypermutation を抗体遺伝子座に起こすかは、免疫学領域の議論的となっている。AID は DNA や RNA 上の C (シトシン) を U(ウラシル)に変換する酵素活性が想定されていることから、現在、2つのモデルで説明されている。DNA deamination 説では、AID が抗体遺伝子に直接 C-to-U をつくり、この本来 DNA 上にないはずの U が呼び水になってクラススイッチ組換えと somatic hypermutation が起こると考えられている。RNA 編集説は、AID が未だ同定されていない RNA に作用しクラススイッチ組換えと somatic hypermutation を起こすとしている。これまで申請者が所属する本庶らのグループは RNA 編集説をもとに、クラススイッチ組換えの研究を展開してきた。AID が RNA 上に C-to-U 変換を起こせるかは、これまでで誰も検証しなかった。今回、B 型肝炎ウイルスの実験系を使ってこの検証に挑戦した。 B型肝炎ウイルス(HBV)は、ヒトの肝細胞に感染して B 型肝炎を起こす病原ウイルスである。ウイルス粒子は、キャップシド (C) タンパクが表面タンパク(S)に包まれた構造を持ち、キャップシド内に DNA ゲノム(nucleocapsid という)を持つ。DNA ゲノム上には、4つの遺伝子(C, P, S, X) しかもたない比較的単純な構造を持つ small DNA virus である。肝細胞に感染後、HBV の DNA ゲノムは核に運ばれ、ウイルス複製に必要な mRNA と RNA ゲノム(pgRNA)を作る。C タンパク、pgRNA、P タンパクは、自己集合して nucleocapsid 構造を形成する。逆転写酵素と DNA 合成酵素の両方のかねたウイルスタンパク P が nucleocapsid 内で pgRNA よりウイルス DNA を合成し、nucleocapsid はさらに S に包まれて肝細胞から放出される。 本研究では HBV ウイルスの複製を行っている肝細胞株に AID を発現させた。 AID は P と pgRNA の複合体に結合し nucleocapsid 内に取り込まれる事を免疫沈降実験で確認した。AID-nucleocapsid 複合体中のウイルス DNA をシークエンスしたところ、既報の論文にあるように AID の DNA deamination 活性が検出された。その際、ウイルス DNA には nascent DNA 鎖の DNA deamination とされる G-to-A 変異以外に鋳型 RNA 由来と想定される C-to-T 変異も観察した。そこで RNA 上の C を U に変換する活性 (RNA 編集) が AID に有るかどうかを、pgRNA の逆転写産物の DNA シークエンスによって検討した。また同じファミリーに属する RNA 編集酵素 APOBEC-1 と DNA deamination 酵素 APOBEC3G も平行して比較検討した。その結果、APOBEC3G は RNA 編集を行わなかったが、AID と APOBEC1 の RNA 編集活性は確認できた。これらの結果、AID が HBV の RNA に C-to-U 変換(RNA 編集)を起こせる事を示している。 AID の RNA に対する deaminastion 活性はこれまで報告がなく、本研究は、AID の RNA 編集説の重要な基礎的知見を提供した。			

(論文審査の結果の要旨)			
Activation-induced cytidine deaminase (AID) は、クラススイッチ組換えと somatic hypermutation を抗体遺伝子座に引き起こす遺伝子産物である。AID がクラススイッチ組換えと somatic hypermutation を抗体遺伝子座に起こす機序は不明である。AID は DNA や RNA 上の C を U に変換する酵素活性が想定されていることから、2つのモデルで説明されている。DNA deamination 説では、AID が抗体遺伝子に直接 C-to-U を作る事でクラススイッチ組換えと somatic hypermutation が起こると考えられている。RNA 編集説は、AID が未だ同定されていない RNA に作用しクラススイッチ組換えと somatic hypermutation を起こすとしている。しかし AID が RNA 上に C-to-U 変換を起こせるかは、検証されていない。今回、B 型肝炎ウイルスの実験系を使ってこの検証に挑戦した。			
本研究では HBV ウイルスの複製を行っている肝細胞株に AID を発現させた。 AID はウイルスタンパクとウイルス RNA の複合体に結合し nucleocapsid 内に取り込まれる事を免疫沈降実験で確認した。 AID-nucleocapsid 複合体中のウイルス DNA をシークエンスしたところ、nascent DNA 鎖に直接導入された C-to-T 変異と鋳型 RNA 由来の両方を観察した。そこで RNA 上での C-to-T 変異 (RNA 編集) を、ウイルス RNA の逆転写産物の DNA シークエンスによって検討した。また RNA 編集酵素 APOBEC-1 と DNA deamination 酵素 APOBEC3G も平行して比較検討した。その結果、APOBEC3G は RNA 編集を行わなかったが、AID と APOBEC1 の RNA 編集活性は確認できた。これらの結果、AID が HBV の RNA に C-to-U 変換(RNA 編集)を起こせる事を示している。 AID の RNA に対する deaminastion 活性はこれまで報告がなく、本研究は、AID の RNA 編集説の重要な基礎的知見を提供した。			
従って、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 3 月 7 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			