

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                |     |               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 博士（ 医科学 ）                                                                                                                                                                                                                      | 氏 名 | Andre Stanlie |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Histone3 lysine4 trimethylation regulated by the facilitates chromatin transcription complex is critical for DNA cleavage in class switch recombination.<br>(FACT 複合体によって制御されるヒストン H3K4 トリメチル化修飾はクラススイッチ組換えにおける DNA 鎖切断に必須である) |     |               |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                |     |               |
| <p>クラススイッチ組換えとは、外部刺激に応じてB細胞が自身の産生する抗体分子の定常部をDNA組換えにより変化させ、その抗体が必要となる部位に適した形態（クラス）に移行させるメカニズムである。クラススイッチ組換えに伴うDNA鎖切断は抗体重鎖遺伝子座において、各クラスをコードするCセグメントの上流のスイッチ (S) 領域と呼ばれる繰り返し配列周辺で起きることが分かっている。さらに、このDNA鎖切断には、i) 2000年に本庶らが発見した核酸編集酵素AIDタンパク質の発現と、ii)S領域が転写されること、の2つが必須であることも良く知られている。すなわち例えば、IgMからIgG1へのクラススイッチは、外部刺激に応答して、AIDの発現とS<math>\mu</math>領域及びS<math>\gamma</math>1領域上での転写が誘導されることで実現される。しかし、AIDによるDNA鎖切断になぜ転写が必要であるかは解明されていなかった。</p> <p>今回、S領域が転写される際に、FACT (facilitates chromatin transcription) 複合体とよばれるタンパク質がS領域中のヌクレオソームに特定の化学修飾を発生させることでDNA鎖切断を誘導していることを明かし、転写とクラススイッチとの関係を解き明かした。FACT複合体はRNAポリメラーゼIIが転写を進行させる際に、DNAを巻き取っているヌクレオソーム構造を除去する機能を持つヒストンシャペロン型転写伸長因子である。FACT複合体をRNAi法によりノックダウンすると、マウスCH12細胞では、転写によるRNAの合成は阻害されずに、クラススイッチのみが阻害された。この阻害はDNA鎖切断の阻害によって引き起こされていた。次に、S領域中のヌクレオソーム構造の変化を解析すると、ヌクレオソームの構成タンパク質であるヒストンH3の4番目のリシン残基のトリメチル化 (H3K4me3) がFACTノックダウンによって極度に抑制されることが分かった。さらに、H3K4のメチル化酵素複合体を構成するAsh2LやWDR5タンパク質などをノックダウンすると、FACTノックダウンと同様にクラススイッチが抑制された。以上により、S領域が転写される際にFACT複合体が誘導するH3K4me3修飾が、AIDが制御するDNA鎖切断のマーキングとして機能していることが示された。</p> |                                                                                                                                                                                                                                |     |               |

H3K4のメチル化のDNA組換えにおけるマーキングとしての機能は、V(D)J組換えや減数分裂組換えなど、他のDNA組換え機構にも利用されていることが分かっている。したがって、これらの組換え機構は目的は違えど、根本的には類似した原理の上に成り立っていると考えられる。今後、H3K4me3のマーキングの認識機構などを解明することによって、今回の発見は将来的には、アレルギー疾患などクラススイッチ異常が関わると思われる疾患の治療法や、ゲノムDNAを人工的に編集する技術の確立に貢献するものと考えられる。

#### (論文審査の結果の要旨)

クラススイッチ組換えに伴うDNA鎖切断には、i) 2000年に本庶らが発見した核酸編集酵素AIDタンパク質の発現と、ii)S領域が転写されること、の2つが必須であることも良く知られている。しかし、AIDによるDNA鎖切断になぜ転写が必要であるかは解明されていなかった。

申請者は、S領域が転写される際に、FACT (facilitates chromatin transcription) 複合体とよばれるタンパク質がS領域中のヌクレオソームに特定の化学修飾を発生させることでDNA鎖切断を誘導していることを明かし、転写とクラススイッチとの関係を解き明かした。FACT複合体をRNAi法によりノックダウンすると、マウスCH12細胞では、転写によるRNAの合成は阻害されずに、DNA鎖切断の阻害が引き起こされていた。次に、S領域中のヌクレオソーム構造の変化を解析すると、ヌクレオソームの構成タンパク質であるヒストンH3の4番目のリシン残基のトリメチル化(H3K4me3)がFACTノックダウンによって極度に抑制されることが分かった。

H3K4のメチル化のDNA組換えにおけるマーキングとしての機能は、V(D)J組換えや減数分裂組換えなど、他のDNA組換え機構にも利用されていることが分かっており、進化的に意義深い。以上の研究は抗体の多様化の分子機構の解明に貢献し免疫医学に寄与するところが多い。

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24年 2月 1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。