

京都大学	博士（医学）	氏 名	TRAN HUY THINH
論文題目	B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress <i>Aicda</i> by overcoming the effects of silencers (AID の発現は B 細胞特異的及び刺激応答性のエンハンサーによる抑制解除によって起こる)		
(論文内容の要旨)			
AID は抗体遺伝子の改変現象であるクラススイッチ組換え及び体細胞突然変異に必須の分子である。AID は、抗体遺伝子改変時に DNA の切断を誘導するのに必須であるが、近年 AID が引き起こす DNA の変異は、抗体遺伝子に限らない事が明らかになってきた。c-Myc や Bcl6 など多くのプロトオンコジーンが標的に含まれる事が判っており、腫瘍発生に関わると考えられる。実際 AID を全身に強制発現させたモデル動物では T 細胞等に高頻度に腫瘍が発生する。当初 AID の発現は活性化した B 細胞に限局されると考えられたが、低いレベルでの発現は未熟 B 細胞等で認められる。また、B 細胞以外に、胃上皮細胞へのピロリ菌感染や肝細胞への炎症性サイトカインの添加などで AID が発現する事も報告され、これら非 B 細胞系の発癌への関与も示唆されている。著者らは AID の遺伝子 <i>Aicda</i> の発現を制御するシスエレメントを網羅的に解析し、その制御機構を明らかにした。			
<i>Aicda</i> 領域に、ヒト・マウス間で塩基配列がよく保存された 4 つの領域を（プロモータ領域、第一イントロン領域、下流領域、上流領域）を同定した。まず、それら領域の転写制御活性を調べるため、その DNA 断片を用いてルシフェラーゼレポーター解析を行った。細胞はマウス B 細胞株 CH12F3-2 を用いた。この細胞はサイトカイン等（インターロイキン 4、TGF-β、CD40ligand）による刺激で AID を発現し、クラススイッチを起こすので、AID 誘導シグナルの解析に適していた。また、非 B 細胞との比較のため繊維芽細胞 NIH3T3 と T 細胞株 2B4.11 を用いた。その結果、プロモータ領域は刺激に応答しない。第一イントロン領域は全体として転写を抑制する。下流領域に転写制御活性は認められない。そして上流領域は刺激に反応して強く転写を誘導する活性を持つ事が明らかになった。 さらに詳細な解析をするため、第一イントロン領域及び上流領域の DNA 断片に決失や点変異を導入したものを、最小プロモータ制御下のルシフェラーゼコンストラクトにつなげ解析した。その結果、第一イントロン領域には B 細胞分化			

に必須の転写因子 Pax5 と E 蛋白の結合配列が存在しそれらはエンハンサーとして働く事。また、c-Myb と E2f 結合配列が細胞系列非特異的に強力なサイレンサーとして働く事。上流領域にはサイトカイン刺激に応答する転写因子 NF-κB、STAT6、Smad3/4 の結合配列がありそれらがこの領域のエンハンサー活性に重要である事。それに加えて C/EBP 結合配列がその機能に重要である事が明らかとなった。 ルシフェラーゼ解析の結果を確認するため、NF-κB、STAT6、c-Myb の阻害剤や RNA 干渉を行い転写制御活性がそれら転写因子に依存する事を確認した。更に、NF-κB、STAT6、Smad4、C/EBPβ の <i>Aicda</i> 領域への実際の結合を確認するためクロマチン免疫沈降法を用いて、クラススイッチ刺激依存性にこれらの転写因子がこれら領域に結合している事を明らかにした。また、マウス B 細胞はクラススイッチ誘導刺激前後で、確かにこれらの転写因子を発現している事を RT-PCR で確認した。 以上の知見から、<i>Aicda</i> 遺伝子は細胞系列非特異的なサイレンサー、B 細胞分化に伴い機能するエンハンサー、サイトカイン等の AID 誘導刺激に応答するエンハンサーのバランスで制御されていると考えられた。この結果は、AID の主たる強発現は活性化 B 細胞に限局される反面、強い刺激などに暴露された非 B 細胞においてもある程度の発現が認められる事を良く説明する。
--

(論文審査の結果の要旨) AID (遺伝子 : <i>Aicda</i>) は抗体遺伝子の改変現象であるクラススイッチ組換え(CSR)及び体細胞突然変異(SHM)に必須の分子であり、CSR・SHM 誘導刺激により発現し、標的 DNA の切断を起こす。近年数々の報告で、AID が引き起こす DNA 変異の標的は抗体遺伝子に留まらずプロトオンコジーン等も含まれる事や、B 細胞以外でも感染や炎症に伴い AID が発現し得る事が示された。これらの報告から AID の変異誘導活性が広範な発癌に関わる可能性が示唆されている。 申請者らは <i>Aicda</i> 領域の、異種間でよく保存された部分 (プロモータ領域、第一イントロン領域、上流領域) の転写制御能を詳細に解析した。その結果、1) プロモーターは AID 発現誘導刺激に殆ど反応しない事、2) 上流領域に、AID 発現誘導刺激に応じて転写因子 NF-κB、STAT6、Smad3/4、C/EBP が結合し <i>Aicda</i> の転写活性を上昇させる事、3) 第一イントロン領域に B 細胞特異的なエンハンサーとして働く Pax5 と E 蛋白の結合配列が存在する事、加えて恒常的に強力なサイレンサーとして働く c-Myb と E2f 結合配列が存在する事を明らかにした。これらの結果から、<i>Aicda</i> の発現は常にサイレンサーで抑制されているが、細胞がサイトカイン等の刺激を受けると、エンハンサー活性が亢進し、サイレンサーによる抑制を凌駕する事で発現が起これと考えられた。 以上の研究は、<i>Aicda</i> 遺伝子発現制御機構の解明に貢献し、抗体遺伝子組換え機構の解明及び AID と細胞癌化との関わりの解明に寄与する所が多い。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 22 年 3 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 以降