

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	篠原 正信
論文題目	APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base substitutions in genomic DNA in human cells (APOBEC3B はヒト細胞においてゲノム DNA に塩基置換を導入することでゲノム安定性を傷害しうる)		
(論文内容の要旨)			
Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3 (A3) ファミリー蛋白は抗ウイルス、あるいは抗レトロトランスポゾン活性を有する細胞内の宿主因子として知られている。A3 蛋白は一本鎖 DNA に作用しシトシン残基の脱アミノ反応を惹起してウラシルに変換する酵素活性を持ち、レトロウイルスの場合では逆転写反応の際に生じるマイナス鎖 DNA に変異を導入することによりその感染性を低下させる。一方同じ APOBEC3 ファミリーに属する Activation-induced cytidine deaminase (AID) はB細胞特異的に発現し免疫グロブリン遺伝子のクラススイッチ及び somatic hypermutation に中心的な役割を果たす。AID は免疫グロブリン以外の遺伝子にも変異を導入できることが知られており、その異常発現がゲノムの安定性を傷害して発癌につながることを示されている。A3A および A3B は核内に強い発現を持つことから、これらにもゲノム DNA に変異を入れる能力があるのではないかという仮説を立てて検証を行った。まず HEK293 細胞に EGFP および A3/AID の発現ベクターを導入して EGFP の変異を検索した。C to T 変異（相補鎖では G to A）検索には Differential DNA Denaturation (3D)-PCR 法を用いた。これは DNA 中の GC 比率の差によって増幅可能な変性温度が異なる事を利用した C/G to T/A 変異検出法である。A3A、A3B、AID を発現する細胞から回収した EGFP では多数の変異が検出され、その殆どが C/G to T/A タイプであった。A3B の酵素活性部位を置換した変異体では C/G to T/A 変異は認められなかった。次にレトロウイルスを用いて HEK293 細胞のゲノムに EGFP を組み込んだ細胞株 (293/EGFP) を作成し、この細胞に A3/AID を導入して1週間ほど後に EGFP の変異を 3D-PCR で検索したところ外来性 DNA の場合と同様に A3A、A3B、AID を導入した細胞で EGFP に C/G to T/A 変異が導入されている事を確認した。A3B の活性部位変異体では変異は検出されなかった。さらに、A3/AID を導入した 293/EGFP 細胞から通常の PCR 法で EGFP を増幅して次世代シーケンサーにより deep sequencing を行ったところ、A3A、A3B、AID を発現させた細胞では mock および A3B 不活性変異体を導入した細胞と比較して高頻度に C/G to T/A の塩基置換が生じている事が確認された。以上から A3A、A3B は AID 同様にゲノム DNA を傷害しうる事を示した。次に、リンパ腫細胞株で A3 の発現を調べたところ、KIS1 など、いくつかの細胞で A3B が高レベルで発現している事が確認され、KIS1 では高頻度でがん遺伝子 (Pax5, cMyc) に C/G to T/A 変異が検出された。さらに A3B の発現が低かった SUDHL6 に A3B の発現ベクターを導入したところ、cMyc に多数の C/G to T/A 変異が導入された。近年、乳癌などいくつかのがんに C/G to T/A タイプの変異が集散的に導入されることが分かってきたが、本研究の成果は A3B がこのタイプの変異をゲノムに導入しうる事を証明し、A3B の発癌への関与を提唱するものである。			

（論文審査の結果の要旨） Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3 (A3) ファミリー蛋白は抗ウイルス活性を有する細胞内の宿主因子として知られている。一方、同じ A3 ファミリーに属する Activation-induced cytidine deaminase (AID) は B 細胞特異的に発現し免疫グロブリン遺伝子のクラススイッチ及び somatic hypermutation に中心的な役割を果たす。AID は免疫グロブリン以外の遺伝子にも変異を導入できることが知られており、その異常発現がゲノムの安定性を傷害して発癌につながることを示されている。申請者らは、これまで A3A および A3B は核内に強い発現を持つことから、これらにもゲノム DNA に変異を入れる能力があるのではないかという仮説を立てて検証を行った。まずレトロウイルスを用いて HEK293 細胞のゲノムに <i>EGFP</i> を組み込んだ細胞株（293/<i>EGFP</i>）を作製し、この細胞に <i>A3/AID</i> を導入して変異を 3D-PCR で検索したところ A3A、A3B、AID を導入した細胞で <i>EGFP</i>に C /G to T/A 変異が導入されている事を確認した。さらに、deep sequencing を行ったところ、A3A、A3B、AID を発現させた細胞では mock および A3B 不活性変異体を導入した細胞と比較して高頻度に C/G to T/A の塩基置換が生じている事が確認された。以上から A3A、A3B は AID 同様にゲノム DNA を傷害しうる事を示した。次に、リンパ腫細胞株で A3 の発現を調べたところ、いくつかの細胞で A3B が高レベルで発現している事が確認され、それらの細胞でがん遺伝子（<i>Pax5</i>, <i>cMyc</i>）に C/G toT/A 変異が検出された。さらに A3B の発現が低かった SUDHL6 細胞株に A3B を導入したところ、<i>cMyc</i>に多数の C/G toT/A 変異が検出された。 以上の研究の成果は A3B が特定の変異をゲノムに導入しうる事を証明し、A3B の発癌への関与を提唱するものであり、本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものである。 なお、学位申請者は平成 25 年 1 月 11 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			