

氏 名	むら まつ まさ みち 村 松 正 道
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2148 号
学位授与の日付	平 成 11 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA editing deaminase family in germinal center B cells (RNA editing deaminase family に属する胚中心 B 細胞特異的な新規遺伝子 AID)

論文調査委員	(主 査) 教 授 西 川 伸 一	教 授 湊 長 博	教 授 本 庶 佑
--------	----------------------	-----------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

哺乳類の胚中心は B 細胞が記憶 B 細胞や抗体産生 B 細胞に最終分化するためのユニークな構造である。ここでは B 細胞の免疫グロブリン遺伝子に体細胞超変異およびクラススイッチ組み換えがおこっている。体細胞超変異により抗体遺伝子可変領域に点変異が蓄積することにより抗体遺伝子の多様性が増し、抗原親和性の高い抗体遺伝子を持つ B 細胞が選別され affinity maturation がおこる。また、クラススイッチ組み換えにより定常領域が選ばれ外来抗原排除に適した抗体機能が抗体遺伝子に付与される。胚中心 B 細胞でおこる体細胞超変異およびクラススイッチ組み換えの分子レベルのメカニズムは現在ほとんど分かっていない。胚中心 B 細胞でおこる体細胞超変異およびクラススイッチ組み換えの分子レベルのメカニズムを解明するには、これらの現象の trans-acting 因子を分離同定することが必須である。体細胞超変異およびクラススイッチ組み換えが胚中心で特異的に起こっていることから、これらの現象の trans-acting 因子の少なくとも一部は、胚中心 B 細胞特異的遺伝子であることが想定される。

本論文では、胚中心 B 細胞に特異的に発現する新規遺伝子 AID (activation-induced cytidine deaminase) の単離について報告した。

マウス B 細胞株 CH 12 F 3-2 細胞では、IL-4 + CD 40 L + TGF- β の刺激で高効率にクラススイッチ組み換えがおこる。このクラススイッチ組み換えはタンパク合成阻害剤サイクロヘキシミド依存性であった。クラススイッチの trans-acting 因子の少なくとも一部が新規合成されクラススイッチが起こると想定し、刺激前後の CH 12 F 3-2 細胞より得た cDNA に対してサブトラクションを行った。

その結果、刺激依存的に発現が増強する 7 遺伝子を分離した。誘導の強さ、ホモロジー検索、mRNA の発現パターンより AID 遺伝子を選び解析した。AID は 198 アミノ酸からなり、RNA editing を触媒する deaminase である APOBEC-1 に 34% の相同性があった。モチーフ検索では APOBEC-1 の活性中心を構成している cytidine deaminase モチーフが AID にも保存されていた。APOBEC-1 は、基質である apolipoprotein B の mRNA の 6666 番目の cytosine を uridine に変換して終止コドンを導入させる酵素で、in vitro では cytidine deaminase 活性、RNA editing 活性、RNA 結合活性があることが知られている。AID にも同様の活性があるか、GST-AID 融合タンパクで調べたところ、APOBEC-1 と同様の cytidine deaminase 活性はあったが、apolipoprotein B の mRNA に対する RNA editing 活性と RNA 結合活性は検出されなかった。AID の mRNA の発現はパイエル板、リンパ節、脾臓に発現が限局し、調べた他の臓器では発現していなかった。脾臓 B 細胞を種々のサイトカイン存在下で培養すると AID mRNA の発現が増強した。またマウスに羊赤血球で免疫すると脾臓 B 細胞での発現が増強した。in situ hybridization では AID mRNA が胚中心特異的に局在していた。これらのことは

AIDが胚中心B細胞特異的遺伝子であることを示している。RNA editing 酵素への相同性と胚中心B細胞特異的発現パターンから、AID 遺伝子は胚中心B細胞に特異な機能、例えば体細胞超変異やクラススイッチ組み換えに関与している可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

マウスB細胞株CH12F3-2では、サイトカイン刺激依存性にクラススイッチを誘導できる。サイトカイン刺激により、新規に発現誘導されるクラススイッチに必要な分子の単離を試みた。刺激前後のCH12F3-2細胞より得たcDNAに対してサブトラクションを行い、7遺伝子を単離、そのうち新規遺伝子AIDの解析をした。CH12F3-2細胞ではAIDの発現はサイトカイン刺激により14倍増強し、この発現誘導はタンパク合成阻害剤で抑制された。またIL-4+CD40L或いはLPS存在下で脾臓B細胞を培養した時、および羊赤血球で免疫したマウス由来の脾臓B細胞でもAIDの発現が誘導されていた。in situ hybridization法では、AIDの発現はクラススイッチの起る微小環境である胚中心に局限していた。これらのことはB細胞が活性化され胚中心B細胞へ分化するのに伴ってAIDの発現が誘導されることを示している。一方AIDのアミノ酸配列はapolipoprotein BのmRNA editingを触媒するAPOBEC-1に相同性があり、APOBEC-1と同程度のcytidine deaminase活性が、組み換えAIDタンパクに於いても確認された。しかしAPOBEC-1のmRNA基質に対するRNA editing活性は組み換えAIDタンパクでは検出されなかった。RNA editing 酵素への相同性と胚中心B細胞特異的発現パターンから、AIDは胚中心B細胞に特異な遺伝情報変換、例えば体細胞超変異やクラススイッチに関与している可能性が考えられる。

以上の研究はB細胞の活性化と分化の分子機構の解明に貢献し、分子免疫学の発展に寄与するところが多い。

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11年6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。