

## 72. 抗体 V 領域特異的シチジン脱アミノ化誘導の制御機構

阪口 薫雄

Key words : 抗体, 体細胞突然変異, 脱アミノ化酵素, プロテオミクス, RNA 輸送

\*熊本大学 大学院生命科学研究部  
感染免疫学講座 免疫学分野

### 緒言

DNA あるいは RNA のシトシンに脱アミノ化を誘導し、それぞれ固有の標的遺伝子に変異を誘導する内因性の酵素として発見された AID/APOBEC ファミリーシチジン脱アミノ化酵素は、ヒトでは 11 種類に及ぶ。その多くは外来の DNA の侵入に対する自然免疫防御因子として進化したが、AID は宿主細胞において免疫グロブリン遺伝子の多様性を誘導する分子として発達した。正常状態では宿主細胞の遺伝子に対しては、変異を無作為に誘導することなく、遺伝子変異の対象は限られている。このことはヒトの細胞を遺伝子変異の危険性から防御するためにきわめて重要な現象である。近年、様々なヒトのがん細胞では AID/APOBEC ファミリー分子の発現異常が検出され、その異常ががんの疾患発症や予後に大きく関連することが報告されている。本研究では AID/APOBEC ファミリー分子の標的遺伝子を明らかにし、その正当な標的への制御機構を明らかにすることを目的としている。我々は、これまでの研究で、免疫応答においてリンパ濾胞に形成される胚中心の B 細胞で発現が上昇する分子 GANP を同定している。GANP は、*ganp* 遺伝子改変マウスの解析から、抗原特異的抗体産生において AID に協調して高親和性の抗体を産生する機能分子であることが明らかになっている。GANP は、B 細胞の細胞質で AID と特異的に結合し、AID の核内への輸送と抗体遺伝子への標的化に機能していることを明らかにしている。また、GANP は APOBEC3G と結合することをヒト T 細胞で明らかとした。これらの結果、GANP は AID/APOBEC ファミリー分子の共通した補助因子として、それぞれのシチジン脱アミノ化酵素を標的基質へ適正に誘導する機能を持つ分子であると考えられる。いかにしてこの AID/APOBEC 分子を安全に機能させ、その攻撃対象を HIV-1 等のウイルスや *Ig* 遺伝子に限定することができるのかを明らかにするため、GANP 結合複合体の解析を行った。

### 方法および結果

#### 1. GANP と AID/APOBEC3 ファミリー分子との結合の解析

ヒトに存在する AID に加えて、7 種類の APOBEC3 ファミリー分子 (APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3D, APOBEC3E, APOBEC3F, APOBEC3G, APOBEC3H) をコードする cDNA を PCR 法によって遺伝子クローニングし、C 末端側に HA タグ配列を付加した哺乳細胞発現ベクターを構築した。ハプロタイプが存在する APOBEC3H については、高発現タイプを選定した。DNA シークエンス法によって各発現ベクターが正確に構築されていることを確認した。まず、AID/APOBEC3 ファミリー分子が正しく強制発現されるかどうかを調べるため、HeLa 細胞に各ベクターを FuGENE HD 試薬を用いて遺伝子導入を行った。抗 HA 抗体によるウエスタンブロット法によって、各分子間で若干の発現量に差異はあるものの、予測分子量のタンパク質が強制発現されることを確認した (図 1A 矢印)。次に、APOBEC3 ファミリー分子が GANP と結合するかどうかを調べるため、AID/APOBEC3 ファミリー分子と FLAG タグ付加した GANP 発現ベクターを HeLa 細胞に共発現をさせた。免疫沈降法によって FLAG-GANP との結合性について検討した。GANP は AID 及び APOBEC3G と特異的に結合することを確認した (図 1B 矢印)<sup>1,2)</sup>。同条件下で、沈降量に差異が認められるものの、FLAG-GANP はすべての APOBEC3 ファミリー分子との共沈降が認められた。一方、免疫沈降、ウエスタンブロットに使用した抗 FLAG 抗体、抗 HA 抗体の特異性は確認され、また陰

\*現所属：大阪大学 免疫学フロンティア研究センター

性コントロールタンパクとしての分子量に近い HSP27-HA は免疫沈降物と共沈されないことから特異的な結合であることが示された (図 1C)。以上の結果から、GANP は AID や APOBEC ファミリーの分子の共通の結合補助因子であることが確認された。

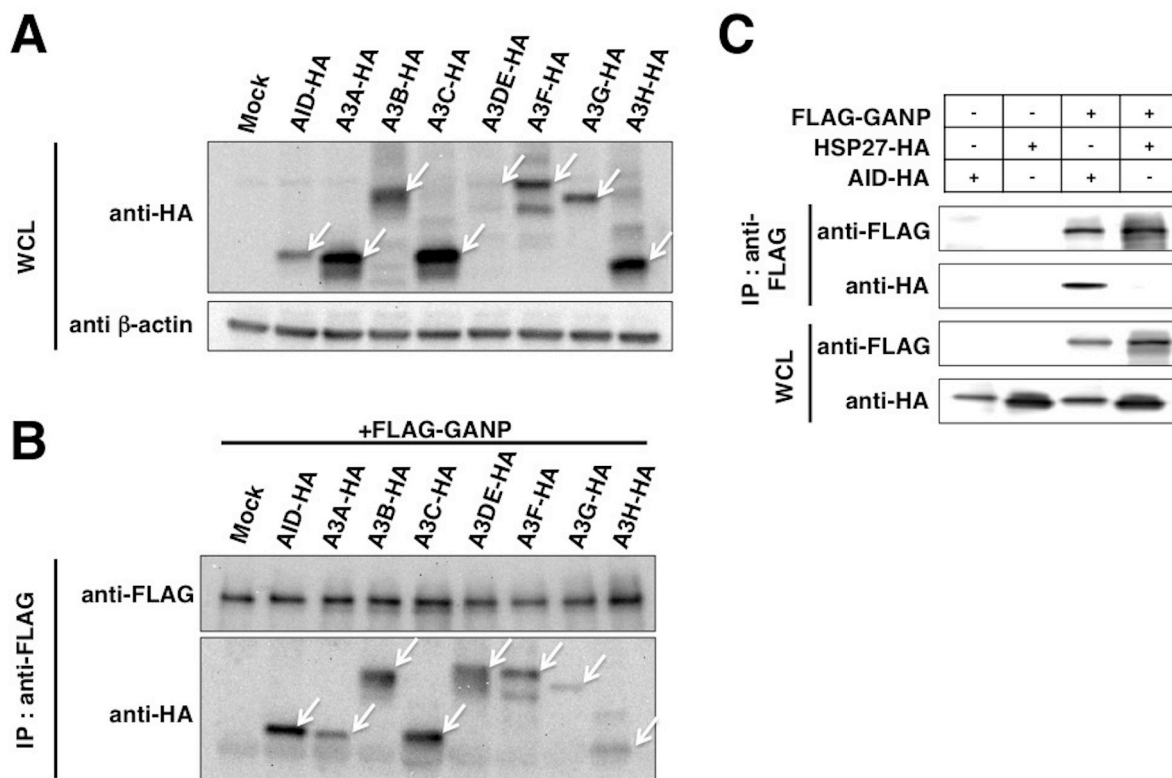


図 1. GANP と AID/APOBEC3 ファミリー分子との結合。

A) AID/APOBEC3 ファミリー分子の強制発現. B) AID/APOBEC3 ファミリー分子と FLAG-GANP との結合実験. C) GANP と AID 及び HSP27 との結合実験。

## 2. GANP 複合体要素の解析

ヒト Ramos B 細胞株の核タンパク質を 2 種類の抗 GANP 抗体を用いて免疫沈降し、2DICAL (2 Dimensional Image Converted Analysis of LCMS) 法によるプロテオミクス解析を行った<sup>3)</sup>。これら 2 種類の抗体を用いることにより、より精度の高い GANP 結合分子群を同定できている。GANP 結合因子として、種々の RNA 結合分子、スプライシング因子、核膜孔構成因子を同定した。本実験では、細胞内での GANP 結合分子群を安定的に単離するため、凍結融解法によって調製した細胞溶解液を用いて 2DICAL 解析を行った。2DICAL 解析によって得られたペプチド断片の配列情報から、期待値 0.05 以下の高い信頼度のあるものを選択し標的タンパク質の情報を得た (図 2)。得られた約 1,300 のペプチド配列情報から標的タンパク質として、通常研究室コンタミネーションとして知られているケラチンやミオシンなどを除去、さらに大部分を占めるリボゾームタンパクやマトリックスタンパクを排除して選別を行った。約 500 のペプチド配列を調べたところ、コアヒストン (H2A, H2B, H3, H4) 及びリンカーヒストン (H1) に対するペプチド断片が 30 個検出できた。これらの結果は、GANP がヒストンと結合し、GANP の HAT ドメインを介して、ヒストンのアセチル化を亢進する作用を見出した以前の実験結果と一致するものであった<sup>3)</sup>。さらに、GANP 自身のペプチド断片と PCID2, CENT, ENY2 が検出された。これらの分子群は、GANP と共に RNA 輸送を担う TREX-2 複合体を構成するコ

ンポーネントとして知られている<sup>4)</sup>。すなわち、GANP が RNA 輸送体としての状態を保持したサンプルであることを保証している。さらに、FACT 複合体を構成する Spt16 及び SSRP1 のペプチド断片が多く同定された。これらもまた AID と結合することが報告されている<sup>5)</sup>。その他、種々のスプライシング因子や翻訳関連タンパクが同定された。以上の結果は、GANP を介して巨大なスーパー複合体が形成されていることを示唆するものである。

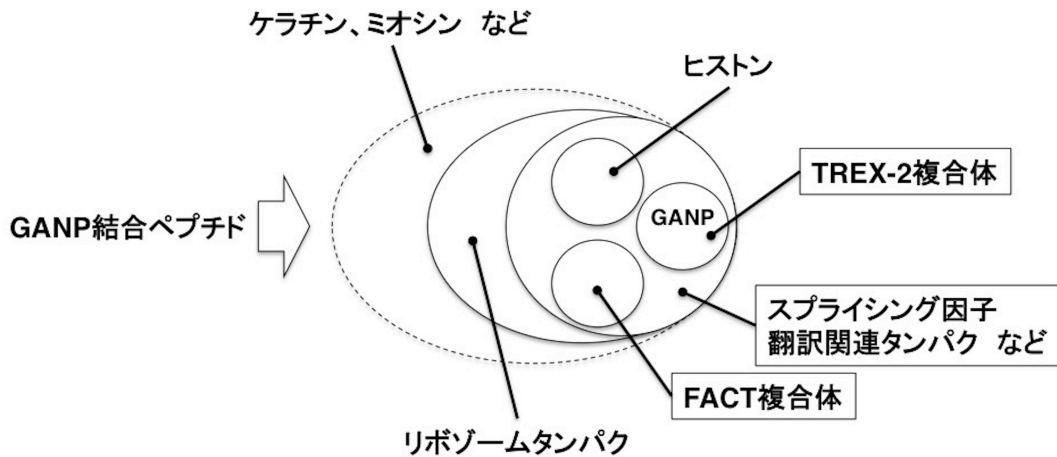


図2. GANP 結合分子のプロテオミクス解析.

ヒト B 細胞株において GANP 分子と結合するタンパク質の同定を 2DICAL 法によって行った。その結果、核内の RNA 代謝分子群が検出されている。

## 考 察

AID/APOBEC ファミリー分子は魚類で AID が ancestor 遺伝子として出現した進化的に新しい innate immunity 分子と考えられる。外来のウイルスに対する抗レトロウイルス活性を有する宿主因子群である。AID を起源とするこのファミリーは、その多様化が動物の進化に従って進み、ヒトで 11 種類を数えている。乳がん発症の原因として、Ruben Harris のグループが APOBEC3B を同定して以降、全米で sporadic な乳がん発症の原因遺伝子が見つかったということで大きな反響を呼んでいる<sup>6)</sup>。自然免疫系、獲得免疫系の重要な機能を担う AID/APOBEC ファミリー分子群は宿主ゲノムに対しても変異原性の矛先を向けたことになり、特定の細胞ストレス状況下にはがん遺伝子としての特徴を示す可能性があることが示唆された。

本研究から、GANP がすべての AID/APOBEC ファミリー分子群と結合できることを確認することができた。ヒトに特有のこの分子群が、明らかに危険な酵素活性を有するのに対して、生体内ではどのようにして安全に作動させ、そのうえで目的の標的遺伝子や外来異物 DNA にのみ限定して特異的に攻撃するように制御できるのかを解明することは極めて重要な課題である。そのようなプロセスでは、GANP がスーパー複合体形成に AID/APOBEC ファミリー分子とともに参画することによって、対象とする遺伝子への on-targeting を正しく制御しているものと予想できる。

AID/APOBEC ファミリー分子群のプロテオミクス解析からも、複合体間に存在する多数の共通因子が確認されている。GANP から AID/APOBEC を標的基質へと分子制御する過程では、相互作用に働く分子を補助して効率よく作動しているのではないかと考えられる。この on-targeting は細胞系列、分化段階特異的な信号伝達の制御を受けられることから、今後詳細な解析を行って行かなければならない。

脱アミノ化酵素の遺伝子座への適切な標的誘導が逸脱すると、継時的な変異導入が生体の重要機能遺伝子へ蓄積されるものと予想される。その結果引き起こされる恒常性維持の破綻や成人病、生活習慣病、自己免疫疾患などの原因の一端を解明することに結びつくものと考えられる。GANP を介した DNA 修復経路には選択性<sup>7)</sup>があることから、今後は GANP の制御する標的ゲノム領域の解析を進めることによって、ゲノム遺伝子保全機能が明らかになり、それぞれの

遺伝子の個別解析を進めることができるものと考えられる。これらは放射線感受性, 疾患感受性の治療前診断などにも応用できることから, 次世代の診断, 疾患予知, 予防に重要な情報を提供するものと期待している。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は, 熊本大学大学院生命科学研究部感染免疫学講座免疫学分野の前田和彦, 国立がんセンター研究所創薬臨床研究分野の尾野雅哉である。最後に, 本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Maeda, K., Singh, S. K., Eda, K., Kitabatake, M., Pham, P., Goodman, M. F. & Sakaguchi, N. : GANP-mediated recruitment of activation-induced cytidine deaminase to cell nuclei and to immunoglobulin variable region DNA. *J. Biol. Chem.*, **285** : 23945-53, 2010.
- 2) Maeda, K., Almofty, S. A., Singh, S. K., Eid, M. M. A., Shimoda, M., Ikeda, T., Koito, A., Pham, P., Goodman, M. F. & Sakaguchi, N. : GANP interacts with APOBEC3G and facilitates its encapsidation into the virions to reduce HIV-1 infectivity. *J. Immunol.*, **191** : 6030-6039, 2013.
- 3) Singh, S. K., Maeda, K., Eid, M. M. A., Almofty, S. A., Ono, M., Pham, P., Goodman, M. F. & Sakaguchi, N. : GANP regulates recruitment of AID to immunoglobulin variable regions by modulating transcription and nucleosome occupancy. *Nat. Commun.*, **4** : 1830, 2013.
- 4) Jani, D., Lutz, S., Hurt, E., Laskey, R. A., Stewart, M. & Wickramasinghe, V. O. : Functional and structural characterization of the mammalian TREX-2 complex that links transcription with nuclear messenger RNA export. *Nucleic Acids Res.*, **40** : 4562-4573, 2012.
- 5) Okazaki, I-M., Okawa, K., Kobayashi, M., Yoshikawa, K., Kawamoto, S., Nagaoka, H., Shinkura, R., Kitawaki, Y., Taniguchi, H., Natsume, T., Iemura, S. & Honjo, T. : Histone chaperone Spt6 is required for class switch recombination but not somatic hypermutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108** : 7920-7925, 2011.
- 6) Burns, M. B., Lackey, L., Carpenter, M. A., Rathore, A., Land, A. M., Leonard, B., Refsland, E. W., Kotandeniya, D., Tretyakova, N., Nikas, J. B., Yee, D., Temiz, N. A., Donohue, D. E., McDougale, R. M., Brown, W. L., Law, E. K. & Harris, R. S. : APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature*, **494** : 366-370, 2013.
- 7) Eid, M. M. A., Maeda, K., Almofty, S. A., Singh, S. K., Shimoda, M. & Sakaguchi, N. : GANP regulates the choice of DNA repair pathway by DNA-PKcs interaction in AID-dependent IgV region diversification. *J. Immunol.*, **192** : 5529-5539, 2014.