

## リンパ細胞における脱アミノ化酵素標的機構の解明

前田和彦

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 自然免疫学研究室, 大阪大学微生物病研究所 自然免疫学分野

### 【研究の背景】

末梢リンパ組織の胚中心 B 細胞で、T 細胞依存抗原刺激によって発現上昇する分子として同定された GANP 分子は、抗体の親和性亢進に重要な役割を担っている。GANP は、抗体遺伝子多様性獲得に必須分子である活性型シチジン脱アミノ化酵素 AID と B 細胞内で結合し、免疫グロブリン V (IgV) 領域へとリクルートしている。GANP によるヒストンアセチル化亢進が IgV 領域のヌクレオソーム構造を弛緩させる。その結果、転写制御因子 Spt5 を動員しながら効率よく AID をプロモーター下流へと誘導し、変異導入に結びつくことを示した。我々は GANP が、AID のみならず APOBEC3G に対しても、標的部位へと誘導していることを見いたした。これらの成果は、GANP が AID/APOBEC ファミリーの部位選択標的化に作用していることを強く示唆しているものと考えている。

### 【目的】

外来異物を素早く認識し排除することは生体防御において特に重要である。免疫応答によって様々なウイルス感染から免れることができとなっているが、ひとたび体細胞に感染した場合には、細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞によって殺傷排除すること以外には対処がないと考えられている。AID/APOBEC ファミリー分子にはウイルスゲノムに変異導入することで、感染防御に関わることが示唆されている。その一方では、内在性酵素であるため、宿主ヒトゲノムにも変異導入する危険性を備えている。本研究では AID/APOBEC ファミリーの選択的標的化に関する分子機構を明らかとすることを目的とする。

### 【方法】

ヒトバーキットリンパ腫 Ramos 細胞を用いて、GANP に対する異なる特異的抗体によるクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法を行った。回収したゲノム DNA 品質をバイオアナライザで確認後、イルミナ社次世代シーケンサーによる ChIP-Seq 法を行った。ペアエンド法によるショートリードにより、結合領域のマッピングを行った。また、GANP と AID/APOBEC ファミリーとの相互作用を調べるため、APOBEC ファミリー遺伝子のクローニングを行い、GANP との結合を免疫沈降法で調べた。AID/APOBEC ファミリーの選択標的化を理解するため、種を越えた APOBEC1 による変異導入能に着目し、ヒト/ウサギキメラ分子に関する分子解析を行った。

### 【結果】

N 末端抗体では約 2800 万リード、C 末端抗体では 3500 万リードが 96%以上の品質でリード数を達成したが、ゲノムマッピングでは、N 末端抗体サンプルで 78%、C 末端抗体で 10%のカバレッジであった。ウエスタンプロット法の結果、C 末端抗体によって短い GANP 分子が同定された。この知見は、ヒト細胞ではショート型 GANP の存在が確認されていることと一致している。C 末端抗体の ChIP-seq 解析の結果、oncomiR を含む染色体 3、7、13、17 番に有意に enrichment していることが認められ、ゲノムアクセスに選択性があることが認められた。次に、ヒトに存在する 7 種類の APOBEC3 ファミリー分子をクローニングし、免疫沈降法によって GANP との結合を確認したところ、すべての分子との結合がみられた。変異導入制御を理解するため、種族間で感染阻止能力に違いがある APOBEC1 に着目した。ヒト/ウサギキメラ APOBEC1 を作成して、その責任領域が C 末端領域に

あることを見出した(Ikeda et al, 2016)。

### 【考 察】

GANP にはゲノムアクセス領域に選択性があることが示唆された。全ファミリー分子との結合が確認されたことにより、GANP が AID/APOBEC ファミリーの核酸標的化に強く関与しているものと考えられる。今後、どのように各ファミリー分子が、さまざまな細胞種で標的化に作動するのか研究を進める必要がある。特に、APOBEC1 で突き止めた C 末領域との相互作用が重要ななるものと考えられる。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

遺伝子変異導入は、抗体の多様性において必須メカニズムである一方で、その逸脱は我々の体細胞のゲノムに傷を入れる危険性を孕んでいる。近年、シチジン脱アミノ化酵素によるゲノム変異蓄積ががん発症前患者で認められている。内在性 AID/APOBEC 分子の標的化を解明することによって、体細胞ゲノムに変異を入れずに発がん・感染を阻止することが可能ではないかと考えられる。

### 【参考・引用文献】

Ikeda et al, Creation of chimeric human/rabbit APOBEC1 with HIV-1 restriction and DNA mutation activities. *Sci. Reports.* (6)19035, 2016