

研究題目 AID による DNA 切断メカニズムの核タンパク質プロテオミクス

による解析

研究組織

研究代表者：本庶 佑（京都大学医学研究科）
共同研究者：谷口 寿章（徳島大学疾患酵素学研究センター）
研究分担者：谷口 貴子（徳島大学疾患酵素学研究センター）
小林 牧（京都大学医学研究科）
ナシム ベガム（京都大学医学研究科）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

Topoisomerase1(Top1) は B 細胞の活性化に伴い発現する AID の誘導により、免疫グロブリン遺伝子座を特異的に切断し、クラススイッチや体細胞変異といった免疫グロブリン遺伝子の組換えに必要な DNA 切断を行うが、その特異性決定機構については不明である。すなわち、Top1 はあらゆる DNA の Topological stress を取り除くために働き、特に転写が盛んな部位では非特異的にその機能を発揮しているが、AID による DNA 切断は免疫グロブリン遺伝子など、限定されたターゲットにのみ起きている。この決定機構にはクロマチンを含めた免疫グロブリン遺伝子座の特異性があると考えられる。また、Top1 には DNA の不安定性に関連する sumo 化修飾があることが知られている。

本研究では(1)Top1 の修飾体の検出、(2) AID によるアセチル化修飾を通じて主にヒストンやクロマチンタンパク質を中心に DNA 切断や修復に関与する分子の同定を進める。

[1-2]研究の方法・経過

AID を発現させるサイトカイン刺激条件のもと、タンパク質を抽出、フーリエ変換型質量分析装置により同定し、Top1 の sumo 化修飾体を検出した。sumo 化 Top1 の量をポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後、sumo 化 Top1 に相当する 110, 130, 150, 350 kDa の部位を切り出し、MS にて解析した。

また、AID による抗体遺伝子のクラススイッチに際しては tricostatinA (TSA) のような脱アセチル化阻害剤による全般的なアセチル化促進が負の影響を

与えることがわかっている。予備的な実験ではクラススイッチに貢献するいくつかの分子がアセチル化を受けうる知見を得ており、アセチル化が AID による交代遺伝子の改変に及ぼす影響は少なくないと考えられる。このようなアセチル化タンパク質のクラススイッチへの影響を解析するため、網羅的なアセチル化タンパク質の解析を AID の有無、TSA の有無で比較検討する準備を進めた。実験条件が整い、網羅的な解析を開始したところである。

【2】研究成果

本共同研究で明らかになった研究成果

Top1 の sumo 化修飾体を検出した。sumo 化されない Top1 タンパク質は従来通り、AID の刺激下に減少したが、予想に反して sumo 化 Top1 の量は AID によって変化しなかった。

アセチル化タンパク質の同定については未だ結果を得ていない。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

Top1 については また、AID の制御を受け増減するアセチル化タンパク質の解析から、AID によるゲノム不安定性の分子メカニズムの解明、さらに発ガン機構の新たなメカニズムが明らかになることが期待される。

【3】主な発表論文等

学会発表

1. Kobayashi, M and Honjo, T. Topoisomerase 1 enrolls in diversification of Ig gene under the

regulation of activation-induced cytidine deaminase (AID). International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe 2017. 1.26-28. 2017.

2. Husain A., Honjo, T. Chromatin remodeler SMARCA4 recruits topoisomerase 1 and suppresses transcription associated genomic instability. International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe 2017. 1.26-28. 2017.

3. Kobayashi, M and Honjo, T. Activation-induced cytidine deaminase (AID) diversifies immunoglobulin gene by regulating topoisomerase 1 (Top1). Maki Kobayashi, 分子生物学会年会、横浜. 11.30-12.2. 2016.

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

AIDにより制御をうけるタンパク質については、さらにタンパク質抽出の方法の最適化が必要であり、検討を継続している。また、Sumo化やアセチル化などの修飾を受けたタンパク質の同定を進め、その機能を明らかにする。