

研究題目 抗体遺伝子多様化の分子機構

研究組織

研究代表者：本庶 佑（京都大学大学院医学研究科附属がん免疫総合研究センター）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：Begum Nasim（京都大学大学院医学研究科附属がん免疫総合研究センター）

：小林 牧（京都大学大学院医学研究科附属がん免疫総合研究センター）

：茶本健司（京都大学大学院医学研究科附属がん免疫総合研究センター）

：谷口智憲（京都大学大学院医学研究科附属がん免疫総合研究センター）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

抗体遺伝子多様化に必須の AID が抗体遺伝子周囲に形成する高次複合体の解析を行い、その分子機構を明らかにする。

[1-2]研究の方法・経過

これまでの研究から申請者らは、AID (activation-induced cytidine deaminase)が抗体遺伝子周囲に高次複合体を形成することにより、抗体遺伝子の組換えを通じた多様化を可能にすると考えている。そして AID と相互作用し、しかも抗体遺伝子多様化現象に必須の複数の分子を独自に同定した。それぞれの分子は DNA 切断、シナプス形成、または NHEJ 修復の段階で働くため、それらの機能に重複性はなく、段階ごとにユニークな複合体が形成されていると予想される。そこで、それらの複合体構成因子を免疫沈降-質量分析 (IP-MS) 法を用いて大規模に同定する。即ち、それぞれの分子の免疫沈降物をビーズ上でトリプシン消化し、LC-MS/MS 測定後にラベルフリー定量解析を行う方法をとった。今回は、AID の C 末端ドメインに特異的に結合し、かつ、シナプス段階に必須の核局在分子 X に 3XFLAG タグを導入した分子の野生型と機能欠損変異体とを用いて、B リンパ球系培養細胞 CH12 に過剰発現させた。これらを用いて抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行い、得られたタンパク質分画を質量分析にて分析した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

当該分子は RNA のメチル化酵素であると共に、ヒストンタンパク質のメチル化も行うことが報告されている。今回、通常の IP-MS からさらに、メチル化修飾についても詳細な分析をこなった結果、AID による抗体遺伝子多様化現象に機能を持つ、他の分子の修飾についても同定することができた。現在、その修飾酵素の確認と、修飾の有無の意義を確認している。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

抗体遺伝子多様化複合体のシナプスの解析を前進させる結果であった。今後、別の分子についても IP-MS を行っていくことにより、本複合体のシナプス以外の段階についても知見を集積することができると考えられる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

Refaat, A., Nakata, M., Husain, A., Kosako, H., Honjo, T., Begum, N. A. HNRNPU facilitates antibody class-switch recombination through C-NHEJ promotion and R-loop suppression. *Cell Reports*. 42, 112284, 2023.

[3-2]学会発表

小林 牧. Ago2とmiRNAはAID依存性の抗体遺伝子組換えにおけるDNA切断を促進するためにDNAトポイソメラーゼ1を減少させる. 第96回日本生化学学会大会, 11月1日, 2023

小林 牧. Activation-induced cytidine deaminase (AID)による免疫記憶形成に必要なAgo2-miRNA依存的なtopoisomerase 1 (Top1)の調節機構. 第46回日本分子生物学会年会, 12月6日, 2023

小林 牧. Ago2 and a miRNA reduce DNA topoisomerase 1 (TOP1) for enhancing DNA cleavage in antibody diversification by activation-induced cytidine deaminase (AID). 第52回日本免疫学会学術集会, 1月18日, 2024

[3-3]成果資料等

【4】今後の課題等

今後はさらに X と相互作用する分子についても IP-MS を合わせて行い、その複合体形成を明らかにしていく。