

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

申請者らは、AID (activation-induced cytidine deaminase) が、抗体遺伝子周囲に複合体を形成することにより、抗体遺伝子の組換えを行い、遺伝子の多様化を可能にすると考えている。申請者らはこれまでにAIDと相互作用し、しかも抗体遺伝子多様化現象の各段階（転写、DNA切断、DNA近接化（シナプス）、非相同結合修復）に必須の複数の分子を独自に同定した。各々が独立して、それぞれの段階に必須な機能を持つことから、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一つずつ、免疫沈降-質量分析（IP-MS）法と近接ビオチン化法を用いて大規模に同定することを計画した。

今年度は、抗体遺伝子組換え領域であるS α 領域に特異的に集積するタンパク質の分離を目標にした。CRISPR/Cas9を用いてLexA結合配列をS α 領域に挿入し、結合するLexAタンパク質をビオチン化酵素であるultraID (Kubitz et al., *Communication Biology*, 5, 657 (2022))またはAirIDと融合、これによりS α 領域にAIDに依存的に結合するタンパク質を網羅的に同定することが可能である。事前に、HRP-streptavidin

を用いた検出法では、biotin 添加によるビオチン化タンパク質群の変化は明らかであり、また、コントロール遺伝子座の場合とS α 領域の場合を比較した場合、形成されるタンパク質の量と種類の差が明らかであった。そこで、実際にstreptavidin ビーズを用いてこれらのタンパク質を濃縮し、ビーズ上でタンパク質を消化、質量分析を行う方法に進んだ。

この手法の問題点として、ターゲットであるS α 領域遺伝子座に直接結合するultraIDの分子数が、細胞質に過剰に存在するultraIDよりもはるかに少なく、過剰なultraIDが非特異的なシグナルを生むため、細胞質の過剰なultraIDを除去するためにクロマチン分画を調整したのちに、Streptavidin ビーズで処理する手法をとった。ところが初回の質量分析の結果、3回分のサンプルデータのばらつきが大きかった。これは、クロマチン分画を調整する際に、細胞質が持ち込まれるなどの、手法のさらなる改善が必要なことを示していると考えられた。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

遺伝子座特異的なタンパク質複合体の精製の可能性が開かれた。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

抗体遺伝子組換え領域やエンハンサー領域にもこの方法を応用することで、遺伝子座特異的な機能的複合体の解析を行うことができる。

また、当初の予定では遺伝子特異的に集積するタンパク質分画のほか、抗体遺伝子多様化現象の各段階である転写、DNA 切断、DNA 近接化（シナプス）、非相同結合修復に特異的な分子についても、ビオチン化酵素との融合により、それぞれの AID 依存的な複合体同定を行う計画であり、今回の成果をさらに発展させる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

Santosh K Gothwal, Ahmed M Refaat, Mikiyo Nakata, Andre Stanlie, Tasuku Honjo, Nasim A Begum. BRD2 promotes antibody class switch recombination by facilitating DNA repair in collaboration with NIPBL. *Nucleic Acids Research*, 52: 4422–4439, 2024

[3-2]学会発表

小林 牧. FBL による抗体遺伝子組換え制御. 第 42 回染色体ワークショップ・第 23 回核ダイナミクス研究会, 大分. 1 月 29-31 日、2025 年.

[3-3]成果資料等

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

ビオチン化酵素を用いる手法の確立のためには、さらにタンパク質調整について多様な条件を試みる必要がある。細胞溶解液の調整、ストレプトアビジンビーズの洗浄なども改善の余地がある。また、他の分子とのビオチン化酵素融合タンパク質を同定し、それらのお互いの関連や重複から、新たに抗体遺伝子組換え制御に重要な分子を同定することが最終的な課題である。