

博士論文

鳥類 B 細胞における TET ファミリー DNA 脱メチル化酵素を介した
抗体遺伝子再編成の制御機構

高村 夏生

本論文の要旨	1
第1章 序論	10
1-1 抗体遺伝子多様化機構	11
1-2 AID	18
1-3 DNA のメチル化	20
1-4 TET ファミリータンパク質	22
1-5 本研究の概要	26
第2章 材料および方法	29
2-1 細胞株と培養方法	30
2-2 DT40 細胞からのゲノム DNA 抽出方法	31
2-3 DT40 細胞の遺伝子破壊株の構築	32
2-4 DT40 細胞を用いた遺伝子過剰発現株の構築	37
2-5 RT-PCR と RT-qPCR	38
2-6 Flow cytometer を用いた解析	43
2-7 抗体遺伝子軽鎖可変領域の塩基配列解析	45
2-8 ドットブロット解析	47
2-9 バイサルファイト シーケンシング	49
2-10 一般遺伝子操作	51
第3章 単一 TET タンパク質を介した鳥類 B 細胞における 抗体遺伝子多様化機構の制御	54
3-1 単一 TET タンパク質欠損株の樹立	55
3-2 単一 TET タンパク質欠損株における残存 TET タンパク質の発現量解析	55
3-3 単一 TET タンパク質欠損株における増殖速度の測定	58
3-4 単一 TET タンパク質欠損株の抗体遺伝子多様化における表現型解析	58
3-5 単一 TET タンパク質の 5mC 酸化能の評価	71
3-6 抗体遺伝子多様化制御領域におけるメチル化レベルの評価	81
3-7 単一 TET タンパク質欠損株における遺伝子発現解析	96

第4章	TET タンパク質二重欠損株を用いた抗体遺伝子多様化解析	101
4-1	TET1/2 欠損株と TET1/3 欠損株における増殖速度測定	102
4-2	TET1/2 欠損株と TET1/3 欠損株における 残存 TET タンパク質の発現量解析	104
4-3	TET1/2 欠損株および TET1/3 欠損株における 5hmC 量の測定	104
4-4	TET1/2 欠損株と TET1/3 欠損株における 抗体遺伝子座のメチル化パターン	106
4-5	TET1/2 欠損株と TET1/3 欠損株における遺伝子発現解析	106
4-6	TET1/3 欠損株における抗体遺伝子多様化の表現型	113
4-7	TET1/2 欠損株および TET1/3 欠損株における AID 発現制御領域におけるメチル化パターン	115
第5章	総合考察	120
5-1	結果の総括	121
5-2	偽遺伝子領域の DNA メチル化と遺伝子変換	123
5-3	TET タンパク質の機能分業とファミリータンパク質としての役割	125
	参考文献	128
	謝辞	147

本論文の要旨

序

高等生物の獲得免疫において主要な役割を担う抗体は、その抗原認識部位を自ら書き換えることで、無数に存在する病原体への応答性を実現している。この抗体遺伝子多様化機構は、長らくその詳細について研究がなされており、現在、可変領域の多様化機構としては、V(D)J 組換え、体細胞高頻度突然変異、遺伝子変換が、定常領域の配列変換機構としてはクラススイッチ組換えが知られている。可変領域の多様化機構は生物種によって異なっており、V/D/J 断片が複数存在するヒトやマウスでは V(D)J 組換えと体細胞高頻度突然変異が用いられる一方、V/D/J 断片の多様性が限られるニワトリやウシ、ウマなどでは、遺伝子変換と体細胞高頻度突然変異が利用されている。

所属研究室では、ニワトリ B 細胞である DT40 細胞を用いて、抗体遺伝子の迅速な改変技術の開発を行ってきた。この技術開発は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の添加により遺伝子変換が促進されるという先行研究を基盤としており、所属研究室では抗体遺伝子多様化におけるヒストン修飾の生理機能についても研究を行ってきた。

ヒストン修飾は DNA のメチル化と関連することが知られている。さらに近年では、DNA メチル化を能動的に除去する TET (Ten-eleven translocation) ファミリータンパク質（以下 TET タンパク質）が同定され、その DNA 脱メチル化機能について精力的に研究がなされている。そこで本研究では、抗体遺伝子多様化機構のより包括的な理解を目的に、TET タンパク質による DNA のメチル化制御を介した抗体遺伝子多様化機構について検討することにした。TET タンパク質の単一欠損株と二重欠損株を構築し、その表現型を解析することで、抗体遺伝子多様化における TET タンパク質の機能と、DNA のメチル化が果たす役割について明らかにすることを試みた。

結果および考察

TET3 依存的な抗体遺伝子多様化と偽遺伝子領域のメチル化

DT40 細胞を用いて構築した TET1 欠損株、TET2 欠損株、TET3 欠損株の抗体遺伝子多様化頻度を測定した結果、いずれの欠損株においても多様化頻度が低下することが示されたが、TET3 欠損株において顕著な低下が確認された。この頻度低下は、変異のスペクトラム（DNA 損傷以降の後期経路の選択; 遺伝子変換か、体細胞高頻度突然変異か）を変えるものではなかったため、TET3 が抗体遺伝子多様化反応の初期の過程を制御している可能性が示唆された。

TET タンパク質による 5-メチルシトシン (5mC) の酸化産物であり、脱メチル化反応の中間体でもある 5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) の量が、野生株、TET1 欠損株、TET2 欠損株と比較して、TET3 欠損株において有意に減少していることが示された。これにより、TET3 が DT40 細胞において主要な 5mC 酸化作用をもつことが明らかとなった。そこで、抗体遺伝子多様化関連領域において TET3 の脱メチル化作用の標的となる領域を探索した。まず、抗体遺伝子座と、抗体遺伝子座の変異導入に必須であるとされる DIVAC (diversification activator) 配列と呼ばれる領域について調べたが、TET3 欠損株においてメチル化レベルが有意に上昇しているものの、絶対的な DNA メチル化レベルは基底レベルであった。遺伝子変換は、抗体遺伝子座上流にある偽遺伝子領域を鋳型とした相同組換え反応である。そこで、偽遺伝子領域の DNA メチル化パターンを解析したところ、偽遺伝子領域において顕著に DNA メチル化レベルが上昇していることが判明した。興味深いことに、この DNA メチル化は非 CpG 配列中のシトシンに生じていることも示された。メチル化非 CpG シトシンは、MeCP2 (methyl-CpG binding protein 2) との結合能があり、ヘテロクロマチン状態を誘導する可能性がある。以上から、DT40 細胞の抗体遺伝子多様化には TET3 が中心的に関与し、偽遺伝子領域のメチル化・脱メチル化を介して制御している可能性が示唆された。

抗体遺伝子多様化における TET1、TET2、TET3 の転写制御

(1) 単一種の TET タンパク質による転写制御

ニワトリ B 細胞の抗体遺伝子多様化機構が、遺伝子変換と体細胞高頻度突然変異を利用していることは先にも述べたが、これら 2 つの反応は AID (activation-

induced cytidine deaminase) というシトシン脱アミノ化酵素によるシトシンからウラシルへの変異導入により開始されることが知られている。前項で述べた通り、TET3 欠損株より程度は低いものの、TET1 欠損株および TET2 欠損株でも抗体遺伝子多様化頻度の低下が確認された。この表現型と一致して、TET1 では野生株と比べ 40 %程度の AID の発現減少が確認された。一方、TET2 欠損株は、抗体遺伝子座の転写量がわずかに低下（抗体遺伝子の転写量と抗体遺伝子多様化は相関することが報告されている）したのみで、顕著な表現型は示さなかった。これは、抗体遺伝子の多様化と転写を促進するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤処理時において、TET2 欠損株の抗体遺伝子多様化頻度が野生株と同等であったことにも合致する。加えて、TET3 欠損株では、AID と抗体遺伝子の転写がいずれも低下することが示された。しかしながら、それらの低下は TET3 欠損株における抗体遺伝子多様化頻度の顕著な低下を説明するほどではなかった。またいずれの単一種の TET タンパク質欠損株においても、残りの TET 遺伝子の発現が上昇することはなかった。以上より、TET1、TET2、TET3 は抗体遺伝子多様化において異なる遺伝子発現制御を担うことが明らかにされた。

（２）二種の TET タンパク質による転写制御

単一種 TET タンパク質欠損株に続いて構築した TET1・TET2 二重欠損株（以下 TET1/2 欠損株）および TET1・TET3 二重欠損株（以下 TET1/3 欠損株）の解析から、TET タンパク質のさらに複雑な転写制御が明らかとなった。いずれの二重欠損株においても残存する *TET* 遺伝子の発現が低下しており、TET タンパク質同士が、直接的あるいは間接的に転写を制御している可能性が示唆された。加えて、この全体的な TET タンパク質の発現低下は、ゲノム中の 5hmC 量の低下を伴うもので、TET1/2 欠損株、TET1/3 の欠損株のいずれにおいても DNA の脱メチル化反応が障害されていると考えられた。しかしながら、TET2 欠損株、TET3 欠損株の表現型から期待されるほど、TET1/2 欠損株、TET1/3 欠損株では抗体遺伝子座の転写量は減少しておらず、TET1/3 欠損株においては野生株と有意差がなかった。この理由として、TET1/3 欠損株では *de novo* メチラーゼである DNMT3A の発現が顕著に低下していたこと、TET タンパク質と DNA メチル化酵素 (DNMTs) の間には種々の相互作用が報告されていることから、抗体遺伝子座の転写は TET タンパク

質に担われるのではなく、DNMTs などその他の因子と協調的に制御される可能性が考えられた。

これらの転写制御に加えて、最も顕著な表現型として確認されたのが、両二重欠損株における AID の発現の低下である。いずれの二重欠損株も野生型と比較して 80 %以上の発現の減少が見られた。この発現制御機構を検討するため、AID のプロモーター領域の DNA メチル化状態を解析したが、野生株といずれの二重欠損株との間に顕著な変化は確認されなかった。近年、TET タンパク質によるエンハンサー領域の DNA メチル化制御が報告されていることから、今後は AID のエンハンサーとして推定される領域も含めて解析対象を拡大し、TET タンパク質による AID の発現制御機構を明らかにしていきたい。

略語表

2-OG	2-oxoglutarate
5mC	5-メチルシトシン
5hmC	5-ヒドロキシメチルシトシン
5fC	5-ホルミルシトシン
5caC	5-カルボキシシトシン
AID	activation-induced cytidine deaminase
APOBEC-1	apolipoprotein B mRNA editing enzyme 1
AP 部位	apurinic/aprimidinic 部位
BER	base excision repair (塩基除去修復)
BRCA1	breast cancer 1
BRCA2	breast cancer 2
BSA	bovine serum albumin
DIVAC 配列	diversification activator 配列
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma (びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNMTs	DNA methyltransferases (DNA メチル化酵素)
DSBH ドメイン	double-stranded β helix ドメイン
dsDNA	double strand DNA (二本鎖 DNA)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FA	Fanconi anemia (ファンコニ貧血)
FITC	fluorescein isothiocyanate
GC / GCV	遺伝子変換 (gene conversion)
HRP	horseradish peroxidase (西洋ワサビペルオキシダーゼ)
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
JBP1	J-binding protein 1
JBP2	J-binding protein 2
LPS	lipopolysaccharide
MeCP2	methyl-CpG binding protein 2
MSH2	MutS homolog 2

MSH6	MutS homolog 6
NHEJ	non-homologous end joining (非相同性末端結合)
PARP1	poly(ADP-ribose) polymerase 1
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PM	点変異 (point mutation)
PBS	リン酸緩衝生理食塩水
RSS	recombinational signal sequence
RT	reverse transcription
SHM	体細胞高頻度突然変異 (somatic hypermutation)
ssDNA	single strand DNA (一本鎖 DNA)
TBST	Tris Buffered Saline with Tween 20
TDG	thymine DNA glycosylase (チミン DNA グリコシラーゼ)
TE	Tris-EDTA
TET タンパク質	Ten-eleven translocation ファミリータンパク質
TSA	トリコスタチン A (trichostatin A)
UHRF1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1
XRCC2	X-ray repair cross complementing 2
XRCC3	X-ray repair cross complementing 3

第 1 章

序論

序

ヒトを含む脊椎動物は、体内に侵入した病原体などの異物を認識し、排除する「免疫系」という生体防御システムを持つ。この免疫系は2種類に大別され、個々の病原体に対しては非特異的であるものの、病原体の侵入から短時間のうちに惹起される「自然免疫」と、病原体に特異的で、感染により応答が増幅される「獲得免疫」がある。この獲得免疫はさらに、Tリンパ細胞による感染細胞の傷害を主とする「細胞性免疫」とBリンパ細胞による抗体産生を主とする「体液性免疫」に分かれる。体液性免疫において抗体は、ウイルスや毒素に結合して病原性を抑制する（中和作用）ほか、抗原との結合により貪食作用を促進し（オプソニン化）、また補体系を活性化することで、効率的な病原体の排除を担う。

抗体の物質的実体は、免疫グロブリンタンパク質である。これは重鎖と軽鎖の2種類のポリペプチド鎖からなるY字型のタンパク質であり、抗原認識を担う可変領域と、抗体間で配列が共通する定常領域に分かれる。この可変領域における膨大な配列多様性が、無数に存在する病原体との抗原抗体反応を可能にすることから、抗体遺伝子多様化機構は長らくその詳細について研究がなされてきた。

本研究はその流れを汲みながら、近年、急速に研究が進んでいるDNA脱メチル化酵素のTET (Ten-eleven translocation) ファミリータンパク質に着目し、DNAのメチル化・脱メチル化という観点から抗体遺伝子多様化機構を検討するものである。そこで以下では、抗体遺伝子多様化機構についてこれまで蓄積された知見を概観したのち、DNAのメチル化およびTETファミリータンパク質の機能について近年の研究成果を概括する。そして最後に、本研究で用いた実験系と共に、本研究の設定課題について述べる。

1-1 抗体遺伝子多様化機構

1-1-1 V(D)J 組換え

抗体可変領域遺伝子は、V(D)J 組換えと呼ばれる組換え機構により、抗体遺伝子座に存在する遺伝子断片（V断片、D断片、J断片からなる）が組み合わさることで構成される (Dudley et al., 2005; Tonegawa, 1983)。ヒトやマウスでは、V断片、D断片、J断片がそれぞれ数個～数十個存在し、V(D)J 組換えにおいて、各種類（V/D/J）の断片から一つずつが選ばれて結合する。従って抗体可変領域遺伝子は、この組み合わせによる膨大なレパトアを有することになる。加えてV(D)J 組換えでは、遺

伝子断片の選択による多様性が生じるだけでなく、各断片の不正確な結合によっても配列が多様化している。従って V(D)J 組換えは、ヒトやマウスにおいて抗体の多様性を担保する主要な機構として働いている (Fugmann et al., 2000) (図 1-1)。

一方で、ニワトリを始め、ウシやブタ、ウマ、ウサギでは、遺伝子断片の多様性が極めて少なく (Arakawa and Buerstedde, 2004; Butler, 1998)、V(D)J 組換えによっては十分に抗体遺伝子が多様化しない。これらの動物では、後述する遺伝子変換と呼ばれる機構により抗体遺伝子が多様化することが知られている (Arakawa and Buerstedde, 2004; Butler, 1998) (図 1-1)。

V(D)J 組換えにおいては、シトシンのメチル化・脱メチル化もその制御に関与することが報告されている。V(D)J 組換えでは、各遺伝子断片に隣接するシグナル配列 (recombinational signal sequences, RSS) に二重鎖切断が生じることが反応の契機となる (Fugmann et al., 2000; Schatz, 2004) が、RSS 中のシトシンのメチル化はこの切断を阻害することが報告されている (Nakase et al., 2003)。その知見と一致して、V(D)J 組換えが起きたアレルでは関連領域がメチル化されていないのに対し、起きていないアレルではメチル化状態が維持されていることが報告されている (Mostoslavsky et al., 1998)。従って、B 細胞への分化の過程で抗体軽鎖の V(D)J 組換えが起きている pre-B 細胞の後期では、V(D)J 組換えに先立ち抗体軽鎖 Ig κ 鎖の片アレルが脱メチル化されると考えられている (Vettermann and Schlissel, 2010)。

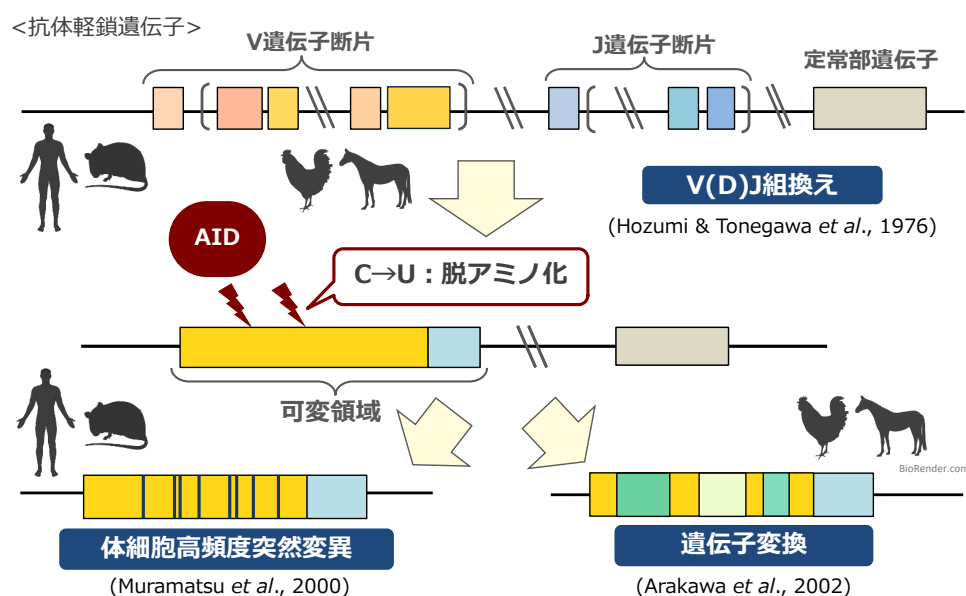


図 1-1 抗体遺伝子多様化機構の全体図

1-1-2 体細胞突然変異

体細胞高頻度突然変異 (somatic hypermutation, SHM) は、V(D)J 組換え後、抗体可変領域に高頻度に点変異が入る現象を指す (Di Noia and Neuberger, 2007; Rajewsky, 1996) (図 1-1)。抗体の抗原に対する親和性の向上 (親和性成熟) に寄与し、抗体遺伝子の二次多様化機構 (第一の多様化機構である V(D)J 組換え後の多様化機構) に分類される。体細胞高頻度突然変異は、後述する遺伝子変換およびクラススイッチ組換えと同様に、AID (activation-induced cytidine deaminase) によるシトシンの脱アミノ化を契機として生じる (Muramatsu et al., 2000)。しかし、AID による作用の結果として、4 塩基全てに変異が起きることが確認されており、その仕組みとして、AID により生じた U:G ミスマッチが処理される過程において多様な点変異が導入されると考えられている (Di Noia and Neuberger, 2007)。例えば、U:G ミスマッチがそのまま複製を経た場合には T:A への塩基置換 (トランジション)、ウラシル DNA グリコシラーゼによりウラシルが除去され、生じた塩基欠失部位で損傷乗り越え DNA 合成酵素 Rev1 が働くと C:G への塩基置換 (トランスバージョン)、またその他の損傷乗り越え酵素の働きにより A:T あるいは T:A への置換が起こる、とするモデルが提唱されている。また、U:G ミスマッチ部位において、ミスマッチ修復酵素である MSH2 (MutS homolog 2) /MSH6 (MutS homolog 6) を介して不正確なパッチ (複数塩基) 修復が起こる (ミスマッチ修復系 (DNA mismatch repair, MMR)) ことによっても、A:T ペアにおいて変異が生じると考えられている (Di Noia and Neuberger, 2007)。

体細胞高頻度突然変異は、ヒトやマウスの抗体の二次多様化機構を担うが、様々な動物でも利用されている (Arakawa and Buerstedde, 2004; Butler, 1998)。例えばニワトリでは、後述の遺伝子変換が抗体多様化を担う主要な機構であるものの、遺伝子変換関連因子の破壊により体細胞高頻度突然変異が促進される例が複数報告されている (Abe et al., 2018a)。従って体細胞高頻度突然変異は、遺伝子変換を主に利用する動物においても重要な抗体遺伝子多様化機構であると言える。

1-1-3 遺伝子変換

先述のように、ニワトリを始め、ウシ、ウサギ、ブタ、ウマなどでは V(D)J 組換えにより実現される抗体遺伝子レパトアが極めて限られており (Arakawa and Buerstedde, 2004; Butler, 1998)、例えばニワトリの抗体軽鎖遺伝子は単一の V-J レパ

トアしか持たない (Reynaud et al., 1985)。そこでこれらの生物では、相同組換えと同様の機構を有する遺伝子変換と呼ばれる反応を利用し、鋳型依存的な変異導入を介して抗体遺伝子を多様化している (Arakawa and Buerstedde, 2004; Maizels, 2005) (図 1-1)。以下では、遺伝子変換を利用している生物の中でも、最もその機構について研究がなされているニワトリの遺伝子変換について述べる。

(1) 遺伝子変換の機構

遺伝子変換は、相同組換えと同様の反応を利用して、鋳型依存的に抗体遺伝子を多様化する機構である (図 1-2)。相同組換えとの共通性は、相同組換え酵素である RAD51 のパラログである XRCC2/3 (X-ray repair cross complementing 2/3) (Sale et al., 2001) や ホモロジーサーチを行う RAD54 (Bezzubova et al., 1997)、また相同組換え反応を促進する BRCA1 (breast cancer 1) (Cousineau et al., 2005) や BRCA2 (breast cancer 2) (Hatanaka et al., 2005) の破壊時に遺伝子変換が減少することからも支持されている。

遺伝子変換の鋳型として利用されるのは、抗体可変領域遺伝子と相同ではあるものの、遺伝子としては機能していない偽遺伝子と呼ばれる配列である。偽遺伝子はニワトリ抗体遺伝子の軽鎖および重鎖の上流に位置し、軽鎖上流には 25 の偽遺伝子配列 (Reynaud et al., 1987) が、重鎖上流には約 80 から 100 に渡る偽遺伝子配列 (Diaz and Flajnik, 1998; Reynaud et al., 1989) が存在すること報告されている。各偽遺伝子はプロモーター配列、リーダーエクソン、V(D)J 組換えシグナル配列を欠くが、抗体可変領域遺伝子と比較した際にストップコドンあるいはフレームシフト変異を持つものはごく限られている (Arakawa and Buerstedde, 2004)。偽遺伝子の大半は可変領域遺伝子の 5'端あるいは 3'端部分が切り詰められた配列をしている。偽遺伝子の中でも、抗体遺伝子座近傍に存在するか、抗体遺伝子とは逆方向に配置された偽遺伝子配列が、より効率的に遺伝子変換に利用されることが報告されている (Arakawa and Buerstedde, 2004; McCormack and Thompson, 1990)。なおこれらの特徴の内、高い相同性や近接性は、相同組換えが成立する上でも重要な要件でもある (Renkawitz et al., 2014)。これら偽遺伝子が鋳型 (ドナー配列) となって、抗体可変領域遺伝子 (レシピエント配列) の塩基配列を一方向性に何度も「上書き」することで、抗体遺伝子が多様化していく (Arakawa and Buerstedde, 2004; Maizels, 2005)。

また、遺伝子変換が起きるには、体細胞高頻度突然変異と同様に AID が必要である。AID の欠損により遺伝子変換が消失することから (Arakawa, Hauschild, & Buerstedde, 2002)、上記の相同組換えとの類似性も踏まえて、遺伝子変換は、AID による脱アミノ化を契機とした修復応答を利用した反応であると考えられている (Tang and Martin, 2007)。

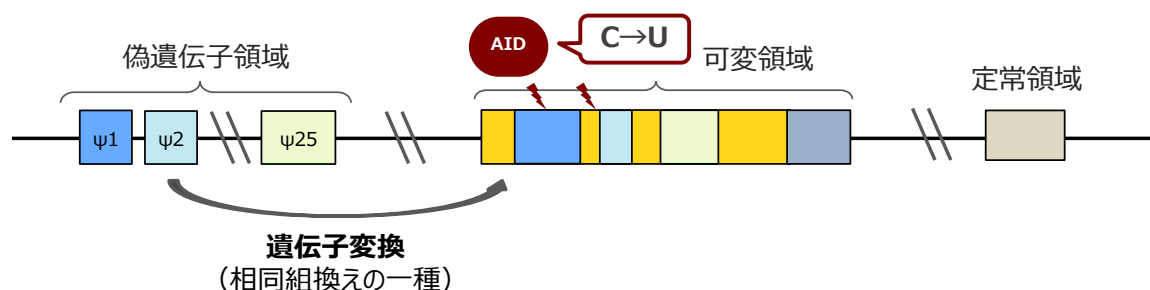


図 1-2 遺伝子変換の機構

(2) 遺伝子変換の制御因子

遺伝子変換では AID がその反応の起点となっているため、AID 自身や、AID の発現あるいは機能に関与する因子により、第一にその反応が制御されている。例えば、マウスにおいて二次リンパ組織内での胚中心（活性化した B 細胞や T 細胞の反応場となる微小構造）の形成や B 細胞の形質細胞への分化に関わることが報告されている転写因子 Bach2 (Muto et al., 2004; Ochiai et al., 2006) は、ニワトリにおいては AID の発現を誘導し、後続の遺伝子変換や体細胞高頻度突然変異を制御することが報告されている (Budzyńska et al., 2017)。また、AID と特異的に相互作用する因子として同定された CTNNBL1 については、その相互作用の消失により抗体遺伝子多様化およびクラススイッチ組換えが障害されることも報告されている (Conticello et al., 2008)。

第二に、AID によるシトシン脱アミノ化の下流では、遺伝子変換と体細胞高頻度突然変異の経路選択が起きていると考えられる。遺伝子変換が、相同組換え反応と同様の機構を利用していることは先に述べたが、偽遺伝子の欠失や (Arakawa et al., 2004)、相同組換え因子の欠損 (Hatanaka et al., 2005; Sale et al., 2001) により、

遺伝子変換が減少すると共に体細胞高頻度突然変異が誘導されることが報告されている。従って、偽遺伝子および相同組換え因子は遺伝子変換に必須であるというだけでなく、それらが利用できる状態にあることにより、修復経路として相同組換え機構が選択され、遺伝子変換が生じると考えられる。

第三に、先述の通り、遺伝子変換は体細胞高頻度突然変異と共に、AID により生じた U:G ミスマッチに対する修復応答として理解される。そこで、広く DNA 損傷に対する修復反応に参加する因子も、正常な遺伝子変換を行う上で必要である。例えば、損傷乗り越え DNA 合成 (translesion DNA synthesis, TLS) 酵素である POL η (Hirota et al., 2010; Kawamoto et al., 2005) は、その働きにより DNA 損傷部位に点変異を誘導する (体細胞高頻度突然変異につながる) が、遺伝子変換にも寄与することが欠損株の解析により明らかにされている (Hirota et al., 2010; Kawamoto et al., 2005)。この知見は、POL η を含む一部の TLS 酵素が、相同組み換え中に生じる D-loop (二重鎖 DNA に一本鎖 DNA が挿入された構造) の伸展に寄与するという先行研究にも支持されている (McIlwraith et al., 2005; Sebesta et al., 2013)。さらに、DNA 鎖間架橋 (inter-strand crosslink, ICL) の修復を行うファンコニ貧血 (Fanconi anemia, FA) 経路に関わる因子の中には、非相同末端結合 (non-homologous end joining, NHEJ) を抑制する等の働きにより相同組換えにも寄与するものがあり (Ceccaldi et al., 2016)、FA 因子である FANCD2 も遺伝子変換に関与することが示されている (Yamamoto et al., 2005)。また、DNA 損傷応答因子であり、同様に NHEJ の抑制能が報告されている PARP1 (poly(ADP-ribose) polymerase 1) (Hochegger et al., 2006; Saberi et al., 2007) も、その欠損により DT40 細胞において遺伝子変換が減少することが報告された (Paddock et al., 2010)。他にも、ワルシャワ破壊症候群の原因遺伝子であり、DNA 損傷センサーである RAD9-HUS1-RAD1 複合体 (クランプ型複合体 9-1-1) と協働して ICL 修復に寄与する DDX11 ヘリカーゼ (Abe et al., 2018b)、二重鎖切断 (double strand break, DSB) 部位のヒストンをユビキチン化し、他の修復因子の集積を促進させるユビキチンリガーゼ RNF8 (Mohiuddin et al., 2016; Oestergaard et al., 2012) などが、遺伝子変換への関与が示されている。これらの因子は、相同組換えに特化していない修復応答因子であるため、その欠損により体細胞高頻度突然変異が障害されることも報告されている (Abe et al., 2018a)

(3) 遺伝子変換と関連領域のアクセシビリティ

上でも触れたように、上述した反応関連因子の存在だけでなく、AID の基質である抗体遺伝子座や偽遺伝子領域の利用しやすさも遺伝子変換を制御する要因となる。例えば AID は一本鎖 DNA (single strand DNA, ssDNA) を基質とすることが報告されているが (Larijani and Martin, 2012)、遺伝子変換および体細胞高頻度突然変異には抗体遺伝子座の転写が必要であること、また AID の変異導入頻度が転写レベルと相関することが示されてきた (Bachl et al., 2001; Fukita et al., 1998; Peters and Storb, 1996; Teng and Papavasiliou, 2007)。

加えて本研究室の先行研究として、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A (trichostatin A, TSA) 添加培地で DT40 細胞を培養すると、抗体遺伝子座のヒストンアセチル化の亢進と共に遺伝子変換が促進されることが明らかとなった (Seo et al., 2005)。後続の研究で、転写因子 E2A を介したヒストン H4 のアセチル化が遺伝子変換を誘導すること (Kitao et al., 2008)、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC1 および HDAC2 が遺伝子変換のパターンに関与する (Kurosawa et al., 2010; Lin et al., 2008) ことが報告されている。

これらの研究は全て、遺伝子変換における抗体遺伝子座のクロマチン状態の重要性を指摘する一方で、偽遺伝子領域におけるクロマチン状態の変化による影響を除外しているものではない。実際に、偽遺伝子領域に人為的にヘテロクロマチン状態を誘導すると遺伝子変換が抑制されること (Cummings et al., 2007)、またユークロマチン状態を誘導すると促進されること (Cummings et al., 2008) が報告されている。これらの変化は抗体遺伝子座の転写変化を伴ってはならず、偽遺伝子領域のアクセシビリティ自体が、遺伝子変換に重要であることを示している。

1-1-4 クラススイッチ組換え

上記の抗体遺伝子多様化機構は、可変領域における多様化を実現する仕組みであるが、抗体の定常領域も配列が変化することが知られている。抗体のクラス (アイソタイプ) は重鎖定常領域の配列により決定され、細胞表面のレセプターと結合する役割を担うが、このクラスは外部刺激によって初期のクラス (マウスでは IgM と IgD) から異なるクラス (IgG, IgA, IgE) へと変換され、その機構をクラススイッチ組換えと呼ぶ (Stavnezer et al., 2008)。

重鎖定常領域には各クラスに対応する複数の C セグメントが並んで存在しており、各 C セグメントの上流にはクラス特異的なスイッチ (S) 領域と呼ばれる領域が存在する。クラススイッチ組換えでは、2 箇所の S 領域において二重鎖切断が生じ、間の配列が切り出されることで異なる定常領域配列に変換される。この二重鎖切断は、体細胞高頻度突然変異や遺伝子変換と同様に AID によって引き起こされることが知られている (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000; Rush et al., 2004; Schrader et al., 2005)。

1-2 AID

1-2-1 AID の脱アミノ化能

抗体遺伝子多様化において主要な役割を担う AID は、1999 年、活性化 B 細胞のみに発現し、mRNA のシトシンをウラシルに変換する APOBEC1 (apolipoprotein B mRNA editing enzyme 1) と高い相同性を持つタンパク質として同定された (Muramatsu et al., 1999)。後続の研究により、体細胞高頻度突然変異、遺伝子変換、クラススイッチ組換えを引き起こすことが明らかとなったのは上に述べた通りである。

AID の基質は、mRNA 編集酵素である APOBEC-1 とは異なり、DNA 中のシトシンであることが示されてきた (Bransteitter et al., 2003; Fritz et al., 2013; Petersen-Mahrt et al., 2002; Pham et al., 2003)。特に、二本鎖 DNA (double strand DNA, dsDNA) や RNA-DNA ハイブリッド鎖ではなく、RNase 処理下の ssDNA や、転写状態に近い dsDNA に生じるバブル中の DNA を基質とすることが報告されている (Bransteitter et al., 2003; Pham et al., 2003)。

1-2-2 AID の抗体遺伝子座へのターゲティング

AID のシトシン脱アミノ化による変異導入は、抗体遺伝子座特異的に生じることが知られている (Liu et al., 2008)。AID の抗体遺伝子外へのミスターゲティングは、染色体転座やリンパ腫の形成を引き起こすことから (Casellas et al., 2016)、AID を抗体遺伝子座ヘリクルートをする機構について幅広く研究がなされてきた (Chandra et al., 2015; Odegard and Schatz, 2006)。

その仕組みの一つとして、ニワトリの B 細胞においては、抗体遺伝子座転写開始点から約 9.8 kb に渡る領域が AID による変異導入に必要であることが示された

(Blagodatski et al., 2009)。この領域を非抗体遺伝子座に挿入すると変異導入が促進されたことから、この領域は DIVAC 配列 (diversification activator) と名付けられ、AID による変異導入に必要かつ十分な条件として提示された (Blagodatski et al., 2009)。後続の研究において、この DIVAC 配列の中でも特に重要な配列 (コア配列) が特定され、定常領域遺伝子の下流に存在する、抗体遺伝子のエンハンサー内部の 200 bp (F2 core) と、エンハンサーとニワトリリピート配列 (CR1) の間に存在する 350 bp (F3 core) が重要であることが報告されている (Kohler et al., 2012)。これらの配列を介してどのように AID がリクルートされるかは明らかになっていないが、ニワトリ B 細胞において、DNA 配列依存的な抗体遺伝子多様化機構が存在することの証左となっている。

1-2-3 AID とシトシンのメチル化

ここまで AID のシトシンの脱アミノ化反応に着目してきたが、AID は複数の先行研究において、5-メチルシトシン (5mC) の脱メチル化反応へ関与することが示唆されてきた。これまでに、*in vitro* で AID により 5mC からチミンへの塩基置換が引き起こされること (5mC の脱アミノ化はチミンへの塩基置換となる) (Morgan et al., 2004)、ゼブラフィッシュ胚において AID 及び G:T ミスマッチ特異的チミングリコシラーゼである Mbd4 (methyl-binding domain protein 4) の共強制発現により脱メチル化が促進されること (Rai et al., 2008)、AID 欠損マウスの始原生殖細胞においてメチル化レベルがゲノムワイドに上昇すること (Popp et al., 2010)、マウス ES 細胞とヒト融合細胞におけるリプログラミングの過程で、OCT4 と Nanog の発現を誘導するプロモーターの脱メチル化に AID が必要であること (Bhutani et al., 2010) 等が報告されている。

加えて、B 細胞は免疫の初期応答において、抗原提示を受けていないナイーブ B 細胞から、抗原提示を受けて活性化され、二次リンパ組織内で胚中心を形成し抗体遺伝子の多様化をさらに促進させる胚中心 B 細胞へと分化するが、AID 欠損マウスの B 細胞において、この胚中心 B 細胞への分化に伴い生じる部位特異的な脱メチル化が障害されること (Dominguez et al., 2015)、またびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) においても AID 依存性のメチル化の変化が確認されること (Teater et al., 2018) も報告されている。以下で述べる TET

ファミリータンパク質による脱メチル化機構の研究初期では、TET タンパク質と AID が協働して脱メチル化を担うモデルも提唱されていた (Pastor et al., 2013)。

しかしながら、AID はメチルシトシンを含む修飾シトシンに対する反応性が低いことも示されている。AID によるシトシンの脱アミノ化能がシトシン 5 位の軌道の大きさに反比例することが報告され、メチルシトシン (5mC) では大きく低下し、ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) では脱アミノ化反応が確認されないことが示されてきた (Nabel et al., 2012; Rangam et al., 2012)。

この報告と一致して、*in vitro* において CpG 配列中のメチルシトシンが非メチル化シトシンと比較して AID による脱アミノ化から保護されていることも報告されている (Larijani et al., 2005)。また同報告においては、保護されたメチル化 CpG 配列付近のシチジンは脱アミノ化されることも示され、メチル化による AID からの保護は、メチルシトシン特異的であることが示唆された。これらの報告に加え、野生型、AID 欠損型、AID 過剰発現型の各マウス由来の B 細胞間でメチル化レベルの差が見出されないなど (Fritz et al., 2013)、AID による脱メチル化を支持しない報告も複数存在する (Bochtler et al., 2017)。そこで現在では、体細胞高頻度突然変異と同様に、シトシンの脱アミノ化を契機としたパッチ型の修復反応においてメチルシトシンが除去されるモデルが提唱されている (Bochtler et al., 2017) が、AID による脱メチル化反応への寄与は、議論が分かれるところとなっている。

1-3 DNA のメチル化

1-3-1 メチル化の生理機能

DNA のメチル化とは、シトシン 5 位の炭素に、メチル基が共有結合により付加される現象を指す。この 5-メチルシトシン (5mC) は組織や細胞によって異なる分布を示し、体細胞においては、シトシン-グアニンの 2 塩基の並びである 5'-CpG-3' 中のシトシンに見られる一方、ES 細胞や神経細胞などの一部の細胞においては非 CpG 配列にも存在することが知られる (Jang et al., 2017; Lister et al., 2009)。

しかしながらメチルシトシンの研究は CpG 部位のメチル化が長らく主流であったため、以下では断らない限り「DNA のメチル化」は CpG 配列のメチル化を指す。DNA のメチル化により、当該シトシンへの他タンパク質による結合特性が変化すること、またそれに伴い異なるクロマチン状態が誘導されることが知られる。その結果として、DNA のメチル化は、発生や分化における種々の反応、またがんを

始めとする数多くの疾患に関与することが報告されてきた (Bird, 2002; Cedar and Bergman, 2009; Jaenisch and Bird, 2003; Robertson and Wolffe, 2000)。

そのように多様な細胞機能に関与する DNA のメチル化は、生じる DNA 領域によって異なる生理的意義を示すことが知られている。例えばヒトのゲノムにおいては 60 – 80 % の CpG 部位がメチル化されているが (Lister et al., 2009)、CpG 部位全体のうち約 7% が存在する「CpG アイランド (CGI)」(高い CG 密度をもつ配列領域) ではメチル化抵抗性があることが報告されている (Deaton and Bird, 2011)。

そして、多くのハウスキーピング遺伝子や発生に関与する遺伝子のプロモーター内に CGI に見つかっており、それらが低メチル化状態であることが確認されている (Saxonov et al., 2006)。この低メチル化はエンハンサー領域でも見られており (Stadler et al., 2011)、メチル化されたプロモーター下流の遺伝子発現が抑制されることも含めて (Smith and Meissner, 2013)、プロモーター/エンハンサー領域のメチル化により遺伝子発現が制御されると考えられている。一方、gene body のメチル化はその役割がより細胞背景依存的で、ヘテロクロマチン状態と関連づけられることもあるが、転写が活性化されている遺伝子のマークとしても報告されている (Kulis et al., 2012; Suzuki and Bird, 2008; Varley et al., 2013; Yang et al., 2014)。またトランスポゾンなどの反復配列は高メチル化により抑制されているが、細胞の分化やがん化などに伴いメチル化状態が動的に変化することが示されている (Law and Jacobsen, 2010; Su et al., 2012; Suzuki and Bird, 2008)。

1-3-2 DNA メチル化機構

シトシン 5 位炭素へのメチル基付加反応は、DNA メチル基転移酵素 (DNA methyltransferase; DNMTs) によって担われている (Goll and Bestor, 2005)。DNA メチル基転移酵素は複数の酵素からなるファミリータンパク質であり、その働きは既存のメチル化を複製時に維持する機能と、新規にメチル基を付加する機能に大別される。DNMT1 は細胞周期の S 期には複製箇所にも局在し、UHRF1 (ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1) と協働して片鎖のみに存在する CpG 配列のメチル化を認識して相補鎖の CpG 配列をメチル化する。従って DNMT1 は、複製時のメチル化パターンの維持を支える「維持メチラーゼ」として認識されている。一方、DNMT3A と DNMT3B はメチル化されていない CpG 配列を選択的に

メチル化することから、新規のメチル化を担う「de novo メチラーゼ」として理解されている (Goll and Bestor, 2005)。

いずれの DNMTs も同様の機構でメチル基を付加するが、その反応性は異なっている。DNMT1 は DNA 鎖から離れずに (processive)、スライドしながら連続的に DNA のメチル化を行うのに対し、DNMT3A は DNA 鎖から離れつつ (distributive)、メチル化を行う際には DNA に協働的に結合して一度に複数の部位をメチル化する。DNMT3B は協働的ではなく、DNA 鎖から離れずに複数の部位をメチル化することが報告されている (Ravichandran et al., 2018)。

加えてこれらの DNMTs では基質となる DNA 配列の選好性も異なる。DNMT1 が CpG 配列のシトシンを選択的にメチル化するのに対し、DNMT3A と DNMT3B は非 CpG 配列を *in vitro* でメチル化することが示された (Aoki et al., 2001; Gowher and Jeltsch, 2001)。さらに DNMT3A の過剰発現で非 CpG 配列のメチル化が亢進することや (Ramsahoye et al., 2000)、DNMT3A や DNMT3B の欠損により非 CpG 配列のメチル化が低下することが報告され (Arand et al., 2012; Liao et al., 2015)、de novo メチラーゼは非 CpG 配列のメチル化も担うことが明らかにされている。

1-4 TET ファミリータンパク質

1-4-1 TET ファミリータンパク質の酸化作用と構造

TET (Ten-eleven translocation) ファミリータンパク質 (以下、TET タンパク質) とは、TET1、TET2、TET3 からなる DNA の脱メチル化を担うファミリータンパク質である。TET1 は当初、10 番染色体と 11 番染色体間で転座のある急性骨髄白血病患者細胞において、MLL (mixed lineage leukemia) 遺伝子の結合相手として同定された (Lorsback et al., 2003)。しかし 2009 年の Rao 氏らの研究により、TET1、TET2、TET3 が、チミン 5 位のメチル基を除去する酵素であるトリパノソーマの JBP1 と JBP2 のホ乳類におけるホモログとして、改めて同定された (Tahiliani et al., 2009)。さらに同研究にて、TET1 が 2-oxoglutarate (2-OG) と Fe(II) 依存的に 5-メチルシトシン (5mC) を酸化し、5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) に変換する機能をもつことが報告された。後続の研究で、TET2 および TET3 にも同様の酵素活性があること、さらに TET タンパク質による酸化作用は、5hmC を 5-ホルミルシトシン (5fC)、5-カルボキシシトシン (5caC) へと連続的に変換することが示された (He et al., 2011; Ito et al., 2010, 2011)

TET タンパク質の構造について、TET1、TET2、TET3 は共通してシスチンリッチなドメインと二重鎖 β ヘリックス (double stranded β helix, DSBH) ドメインを有している (Pastor et al., 2013)。システインリッチなドメインは、TET タンパク質そのものの構造と、TET タンパク質と DNA の相互作用の安定化に寄与し、DSBH ドメインは、Fe(II) および 2-OG を補因子とする酸化作用を担うことが報告されている (Hu et al., 2013)。その他のドメインとして、ヒトやマウスの TET1 および TET3 では CXXC ドメインが存在するが、これらの DNA への結合性については議論が分かれており、またスプライシングアイソフォームの中には CXXC ドメインを欠くものも存在する (Frauer et al., 2011; Jin et al., 2016; Wu and Zhang, 2017; Xu et al., 2011, 2012)

加えて、TET2-DNA の構造解析から、対象となるシトシンと隣接するグアニンとの塩基スタッキング相互作用が、TET2 によるメチル化 CpG 配列の認識に重要であることが明らかとなっている (Hu et al., 2013)。同研究の 5mCpG、5mCpA、5mCpC を用いた基質特異性に関する試験では、TET2 が 5mCpG に特異的に作用し、5mCpA、5mCpC のメチルシトシンをほとんど酸化しないことも示された (Hu et al., 2013)。従って、上述の TET タンパク質による酸化作用は、CpG 配列中のメチルシトシン特異的に働くと考えられている。

1-4-2 TET ファミリータンパク質を介した DNA 脱メチル化機構

DNA の脱メチル化は複数の経路により生じると考えられている (Kohli and Zhang, 2013; Pastor et al., 2013; Wu and Zhang, 2017)。一つは、DNTM1 等による維持メチル化機能が不十分で、複製時に 5mC が新規鎖に引き継がれずに、メチル化が「希釈」されていく場合である。この反応は受動的脱メチル化とも呼ばれている。

一方、TET タンパク質はより能動的に脱メチル化に寄与する。先述の通り、TET タンパク質は 5mC を 5hmC、5fC、5caC と段階的に酸化する。これらの酸化産物は DNA の複製時に引き継がれず、複製依存的に通常のシトシンに置き換わることになる (Hashimoto et al., 2012; Inoue and Zhang, 2011)。加えて、5fC と 5caC はチミン DNA グリコシラーゼ (thymine DNA glycosylase, TDG) により除去されることが報告されている (He et al., 2011; Maiti and Drohat, 2011)。これにより生じる塩基欠失 (apurinic/apyrimidinic, AP) 部位が、塩基除去修復経路 (base excision repair; BER) を介して修復され、通常のシトシンに置換されることも示された (Weber et al.,

2016)。以上のように、TET タンパク質は 5mC の酸化を起点に、複製依存的あるいは TDG-BER 依存的な経路を介して能動的に DNA の脱メチル化を行うと考えられている。

1-4-3 TET ファミリータンパク質の生理機能

(1) 発生における TET タンパク質の役割と、単一 TET タンパク質欠損、二重欠損、三重欠損の表現型

TET タンパク質は、その酸化作用を介した DNA の脱メチル化によって、多様な細胞機能に関与することが知られている。特に研究が進んでいるのが、発生において TET タンパク質が果たす役割である (Wu and Zhang, 2017)。例えば、Tet1 欠損オスマウスの始原生殖細胞および精細胞ではインプリント部位のメチル化パターンが変化し、このマウスと野生型メスマウスをかけ合わせて生まれた仔には发育障害を含む様々な異常が現れた (Yamaguchi et al., 2013)。このインプリント部位のメチル化異常は Tet1・Tet2 欠損マウスにおいても確認されている (Dawlaty et al., 2013)。

また TET1 および TET2 の発生への関与は、マウスの ES 細胞でも確認されている。Tet1 あるいは Tet2 のノックダウンにより 5hmC の低下と遺伝子発現の変化が見られ、Tet1 は特にプロモーターを、Tet2 はよく発現している遺伝子の gene body およびエンハンサーを標的にしていることが示されている (Hon et al., 2014; Koh et al., 2011)。しかし Tet1 あるいは Tet2 のいずれのノックアウトマウスも生存可能であることが確認された。Tet1・Tet2 の二重ノックダウンあるいはノックアウトでは、ゲノム中のほとんどの 5hmC が消失するものの、多分化能が維持されることも報告されている (Dawlaty et al., 2013; Lu et al., 2014)。また Tet1/2 DKO マウス胚は多くが出生前に死ぬが、中には正常に発生するものも確認された (Dawlaty et al., 2013)。マウス ES 細胞では Tet1・Tet2・Tet3 三重ノックアウト株も樹立されており、これらの株では多能性マーカーの発現は確認されたものの、5hmC が完全に消失し、分化および発生に障害が見られている (Dawlaty et al., 2014)。Tet1/2/3 TKO で最もメチル化が亢進したのがエンハンサー領域であり、bivalent promoter (同じあるいは近傍領域に H3K4me3 と H3K27me3 の相反するヒストンマーカーを有しているプロモーター領域) が大きく影響を受けたことも報告されている (Lu et al., 2014)。なおこの結果は、ヒト TET1/2/3 TKO ES 細胞において、bivalent promoter で特異的にメチル化が亢進することを示した報告とも一致している (Verma et al., 2018)。以上の報告

は、TET タンパク質による脱メチル化が部位特異的に生じる傾向があること、そしてファミリータンパク質間で機能の共有と分業があるために、単一欠損、二重欠損、三重欠損でそれぞれに特徴的な表現型が生じることを示している。

(2) B細胞における TET ファミリータンパク質の機能

本研究が対象とする B 細胞においても、TET タンパク質が果たす機能について知見が蓄積してきている。TET2 の欠損あるいは機能欠損をもたらす変異は、骨髄系細胞のがんと関連が早くから指摘されてきたが (Delhommeau et al., 2009; Weissmann et al., 2012)、TET2 の変異はびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) を含む様々な B リンパ腫でも確認されている (Asmar et al., 2013; Quivoron et al., 2011)。加えて、ヒト非ホジキン B リンパ腫においては TET1 のプロモーターが高メチル化し、その発現が抑制されていること、そして Tet1 欠損マウスでは B リンパ腫の形成が促進され、ヒト非ホジキン B リンパ腫でよく見られる変異が導入されていたことが明らかとなった (Cimmino et al., 2015)。さらに、Tet1/2 二重欠損マウスにおいては、骨髄がんではなく B リンパ腫の形成が誘導されることも報告されている (Zhao et al., 2015)。また、ヒトの骨髄がんでは TET3 の変異は確認されていないものの (Abdel-Wahab et al., 2009)、Tet2/3 DKO B 細胞において B リンパ腫が形成されたことも確認されている (Lio et al., 2016)。しかし、Tet2 および Tet3 のそれぞれの機能については明らかになっておらず、Tet2 および Tet3 の単一欠損 B 細胞はいずれも観察可能な表現型を示さないと報告された一方で (Lio et al., 2016)、Tet2 の欠損によりクラススイッチ組換えや形質細胞への分化が障害される例も示されている (Dominguez et al., 2018)。

この報告のように、近年では B 細胞の分化における TET タンパク質の役割も明らかにされつつある。B 細胞では分化の過程で、ゲノム上でグローバルな脱メチル化が生じることが知られているが (Kulis et al., 2015)、Tet2/3 欠損マウス B 細胞では、この系列特異的な脱メチル化が消失することが報告された (Orlanski et al., 2016)。加えて Tet2/3 欠損マウス B 細胞では、pro-B 細胞から pre-B 細胞への分化が障害され、Ig κ 鎖の転写および V κ -J κ の再編成が低下することも示されている (Lio et al., 2016)。さらに後続の研究として、LPS (lipopolysaccharide: グラム陰性細菌の細胞壁成分) およびサイトカイン IL-4 による活性化時に、Tet2/3 欠損マウス B 細胞で

は AID の発現が十分に誘導されず、クラススイッチ組換えが障害されることも報告された (Lio et al., 2019)。

(3) TET ファミリータンパク質と DNMTs の競合作用

ここまで DNA のメチル化・脱メチル化に関して、メチル化を担う DNMTs と脱メチル化を担う TET タンパク質として、それぞれの機能を分けて述べてきた。しかしこれらは、同じ基質 DNA に対して相反する作用をもたらす酵素であり、細胞の機能を実現するための最終的なメチル化パターンは、両酵素群の競合的作用によって確立される。ごく近年になって、この観点からの研究も複数報告されるようになった。例えばマウス ES 細胞においては、Tet1 の欠損により、野生株では Tet1 が結合する領域において Dnmt3A の結合が増加することが報告された (Gu et al., 2018)。さらに、先述のヒト TET1/2/3 TKO ES 細胞における bivalent promoter における高メチル化は、DNMT3B の作用によるものであることが示されている (Verma et al., 2018)。加えてマウスの造血幹細胞では、Tet2 あるいは Dnmt3a の単独欠損よりも、Tet2 および Dnmt3a の二重欠損がより顕著な DNA の脱メチル化が誘導されること、また Tet1 欠損マウス ES 細胞では、Dnmt3a のゲノム上の局在が変化していることも報告された (López-Moyado et al., 2019)。さらにヒト ES 細胞を用いた研究では、TET1/2/3 および DNMT3A/B の複合的な欠損により、DNMT3A/B の標的領域である体細胞発現遺伝子のエンハンサーに TET タンパク質がリクルートされることが示された (Charlton et al., 2020)。他に、DNMTs によるメチル化と TET タンパク質による脱メチル化の反応速度を推定し、それぞれのメチル化パターンへの寄与を検討した報告もなされている (Ginno et al., 2020)。このように現在、DNMTs と TET タンパク質の両方の作用を考慮しながら、総合的にメチル化の意義を検討する研究が行われつつある。

1-5 本研究の概要

1-5-1 DT40 細胞

本研究の概要を述べるにあたり、本研究で用いたニワトリ B 細胞である DT40 細胞について、その生物学的背景と特徴をまとめる。DT40 細胞は、トリ白血病ウイルス (avian leukosis virus, ALV) 誘発型 B リンパ腫細胞である。1 日齢の Hyline SC 系統ニワトリに RAV-1 (ラウス随伴ウイルス 1 型) を感染させ、ファブリキウス嚢

で形成された B リンパ腫から採取した細胞を、同系の若いニワトリに静脈注射し、そのニワトリにおいて形成された B リンパ腫をさらもう一度移植してから培養細胞として樹立された (Baba et al., 1985)。

膜型 IgM を産生すること (Baba et al., 1985)、また、*in vitro* の培養下においても低頻度ながら抗体軽鎖遺伝子で遺伝子変換が継続的に起きていることが報告されている (Buerstedde et al., 1990)。このような表現型から、分化段階としてはファブリキウス嚢の幹細胞程度で停止していると考えられている (Winding and Berchtold, 2001)。

加えて DT40 細胞からは、抗体可変領域遺伝子内に 1 塩基フレームシフト変異があり、膜型 IgM を発現していないサブクローンが細胞株として樹立されている (CL18 株) (Buerstedde et al., 1990)。CL18 株を用いて、その膜型 IgM の再発現の割合を遺伝子変換の指標として利用する実験系 (膜型 IgM リバージョンアッセイ) が、塩基配列解析を伴わない抗体遺伝子多様化解析法として広く用いられてきた (Arakawa and Buerstedde, 2004; Arakawa et al., 2002; Budzyńska et al., 2017; Seo et al., 2005)。

他の DT40 細胞の特長としては、増殖速度が早い (約 8~10 時間の倍化時間) (Kurosawa et al., 2010; Lin et al., 2008) ことや、高い相同組換え効率を活かして簡便な遺伝子ターゲティングを行えることが知られている (Buerstedde and Takeda, 1991)。

1-5-2 本研究の設定課題

既に述べたように、所属研究室の先行研究として、DT40 細胞において TSA の添加により遺伝子変換が促進されることが見出された (Seo et al., 2005)。この知見はその後、抗体遺伝子の迅速改変方法の研究へとつながり (Hashimoto et al., 2016; Seo et al., 2020)、その基礎的理解を深めるべく、並行してヒストン修飾を介した抗体遺伝子多様化機構について研究が行われてきた (Kurosawa et al., 2010; Lin et al., 2008)。

しかし、ヒストン修飾と DNA メチル化が連関すること、また AID の DNA メチル化に対する相反する作用を踏まえると、遺伝子変換を含む抗体遺伝子多様化に DNA のメチル化が寄与する可能性は否定できない。さらに近年、そのメチル化を動的に制御する因子として TET タンパク質の研究が進展し、B 細胞における機能についても明らかにされつつある。

そこで本研究では、抗体遺伝子多様化のより包括的な理解を目的に、当該機構において TET タンパク質が果たす機能について検討を行った。具体的に、DT40 細胞において可能である高効率な遺伝子ターゲティングを利用して、TET タンパク質の単一欠損株（TET1 欠損株、TET2 欠損株、TET3 欠損株）および二重欠損株（TET1・TET2 欠損株、TET1・TET3 欠損株）を構築し、抗体遺伝子多様化の表現型を解析した。本論文では、その解析を通じて明らかになった、抗体遺伝子多様化における TET タンパク質の役割を報告する。

第 2 章

材料および方法

2-1 細胞株と培養方法

2-1-1 DT40 細胞

(1) 通常培養

39.5 °C、5 %CO₂ 条件下で、下記組成の培地を使用し、継代培養を行った。

表 M1 DT40 細胞の培地組成

IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)	(Thermo Fisher Scientific)	
Fetal bovine serum	(Biowest)	10 %
Chicken serum	(Thermo Fisher Scientific)	1 %
Penicillin/streptomycin	(Thermo Fisher Scientific)	1 %
2-mercaptoethanol	(Thermo Fisher Scientific)	55 µM

(2) TSA 添加時の培養

上記の組成で調整した培地に、最終濃度が 10 nM となるようにトリコスタチン A (TSA, 富士フイルム) を添加した。その他培養条件は上記と同一である。

(3) 薬剤添加時の培養

形質転換後の薬剤選抜において、下記の薬剤を記載の最終濃度で培地に添加した。その他の培地組成、培養条件は上記と同一である。

表 M2

G418 (neomycin)	(Calbiochem)	1500 µg/mL
Histidinol	(Sigma Aldrich)	450 µg/mL
Zeocin	(Invivogen)	1600 µg/mL

2-1-2 HEK293T 細胞

(1) 通常培養

37 °C、5 % CO₂ 条件下で、下記組成の培地を使用し、継代培養を行った。

表 M3 HEK293T 細胞の培地組成

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	(Thermo Fisher Scientific)	
Fetal bovine serum	(Thermo Fisher Scientific)	10 %
Penicillin/streptomycin	(Thermo Fisher Scientific)	1 %

(2) レトロウイルスベクターのトランスフェクション前の培養
37°C、5 % CO₂ 条件下で、下記組成の培地を使用し、継代培養を行った。

表 M4 HEK293T 細胞のトランスフェクション前の培地組成

DMEM	(Thermo Fisher Scientific)	
Fetal bovine serum	(Thermo Fisher Scientific)	20 %
Penicillin/streptomycin	(Thermo Fisher Scientific)	1 %

2-2 DT40 細胞からのゲノム DNA 抽出方法

2-2-1 NaCl を用いた方法

以下の組成で調整した Lysing solution に、使用直前に下記表に記載の濃度となるように 2-mercaptoethanol、Proteinase K を添加した (2-mercaptoethanol-, Proteinase K+)。細胞 (2 x 10⁶ 個) を 1,100 x g で 3 分間遠心することで回収し、500 µL の Lysing solution (2-mercaptoethanol、Proteinase K +) を添加した。ボルクテックスによる攪拌後、55 °C で一晚 (8~12 時間) 静置した。250 µL の 5M NaCl を添加後、再びボルクテックスで攪拌し、氷上で 15 分間静置した。4 °C、20,000 x g で遠心分離後、上清を回収し、750 µL のエタノールを添加した。転倒混和後、室温で 2 分間静置し、4 °C、3,300 x g で 1 分間遠心分離を行なった。上清を除去し、1 mL の 70 %エタノールを加えた。再び 4 °C、3,300 x g で遠心分離を行い、上清を除去したのち、得られた DNA を風乾した。精製された DNA は 50 µL の TE に溶解し、後続の実験に使用した。

表 M5 Lysing solution (2-mercaptoethanol-, Proteinase K-) の組成

5M NaCl	200 mM
0.5M EDTA	20 mM
1M Tris-HCl	40 mM
10% SDS	0.5 %

表 M6 Lysing solution (2-mercaptoethanol-, Proteinase K+) の組成

Lysing solution	
2-mercaptoethanol	0.5 %
Proteinase K(20mg/mL)	200 μ L/mL

2-2-2 キットを用いた抽出法

NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel)を使用し、付属のプロトコルに従ってゲノム DNA を精製した。2 x 10⁶ – 5 x 10⁶ 個の細胞から DNA を抽出し、付属の Elution Buffer に溶出した。

2-3 DT40 細胞の遺伝子破壊株の構築

TET1 欠損株は、本研究室 卒業生である近藤早紀子氏が構築したものを使用した。*TET1* の破壊に用いられたベクターは近藤氏 修士論文に記載の通りである。また、*TET1* 破壊用ベクターを含む全ての遺伝子破壊ベクターの元となっているプラスミド p3loxNeo は、荒川博士 (Helmholz Zentrum München – German Research Center for Environmental Health) より寄与していただいた。

なお TET1・TET2 二重欠損株、TET1・TET3 二重欠損株は、TET1 欠損株に対して *TET2* 遺伝子の破壊あるいは *TET3* 遺伝子の破壊を行うことで構築した。以下には単一 TET タンパク質欠損株および二重欠損株の構築に使用したプラスミドおよびプライマーと、全破壊株に共通する構築法を記す。

2-3-1 TET タンパク質欠損株構築に用いたプラスミド

(1) *TET2* 破壊用ベクター

野生型 DT40 細胞 (CL18 株) のゲノムを鋳型に、プライマー TET2KO-1、TET2KO-2 を用いて *TET2* 遺伝子 intron4 から exon6 の内部領域 3,104 bp を増幅した。得られた断片を p3loxNeo の SacI サイト (neomycin 耐性遺伝子のプロモーター上流に位置) に挿入し、pTET2koN-1 とした。次に、同じく野生型 DT40 細胞のゲノムを鋳型に、プライマー TET2KO-3、TET2KO-9 を用いて *TET2* 遺伝子 exon9 から *TET2* 遺伝子下流領域までの 3,031 bp を増幅した。得られた断片を pTET2koN-1 の KpnI サイト (neomycin 耐性遺伝子の下流に位置) に挿入し、pTET2koN-2 とした。各ライゲーション反応には、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ) を使用した。

pTET2koH-2 は、p3loxNeo の neomycin 耐性遺伝子カセットを histidinol 耐性遺伝子カセットに置き換えたプラスミドである p3loxhisD を使用し、pTET2koN-2 と同様の方法で作製した。また pTET2koH-2 の histidinol 耐性遺伝子カセットを zeocin 耐性カセットに置き換え、pTET2koZ-1 とした。

pTET2koN-2 は *TET2* 欠損株の構築に、pTET2koH-2 は *TET2* 欠損株および *TET1*・*TET2* 二重欠損株の構築に、pTET2koZ-1 は *TET1*・*TET2* 二重欠損株の構築に使用した。

表 M7 *TET2* 破壊用ベクター作製に使用したプライマーの塩基配列 (5' > 3')

T2KO-1

TATAGGGCGAATTGGGAGCTGGCATCCCCGCTCACTCCTTTAC

T2KO-2

CACCGCGGTGGAGCTCATCAGGGTTGACAGATTCTGCAAATGGGATTCTA

T2KO-3

GGGGGGGCCCCGGTACGTATGTAAGGTTGCCTAATCCAGCCAGTGCTTAT

T2KO-4

AGGGAACAAAAGCTGGTACCACGCGTGTAGCAGGCTGAGTAGCACCATGATG
TGAATTC

(2) *TET3* 破壊用ベクター

野生型 DT40 細胞 (CL18 株) のゲノムを鋳型に、プライマー TET3KO-1 と TET3KO-2 を用いて *TET3* 遺伝子 exon1 から intron3 の内部領域 2,993bp を増幅した。得られた断片を、p3loxNeo の neomycin 耐性遺伝子カセット上流に位置する SpeI サイトに挿入し、pTET3koN-1 とした。次に、同じく野生型 DT40 細胞のゲノムを鋳型に、プライマー TET3KO-3 と TET3KO-4 を用いて *TET3* 遺伝子 exon9 から *TET3* 遺伝子下流の領域 3,037 bp を増幅した。得られた断片を pTET3koN-1 の SalI サイト (neomycin 耐性カセット下流) に挿入し、pTET3koN-2 とした。各ライゲーション反応には、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ) を使用した。また、同様の方法で p3loxhisD を元に pTET3koH-2 を作製し、pTET3koH-2 の histidinol 耐性遺伝子カセットを zeocin 耐性遺伝子カセットに置き換えて pTET3koZ-1 を作製した。

pTET3koN-2 は *TET3* 欠損株の構築に使用し、pTET3koH-2 は *TET3* 欠損株および TET1・*TET3* 二重欠損株、pTET3koZ-1 は TET1・*TET3* 二重欠損株の構築に使用した。

表 M8 *TET3* 破壊用ベクター作製に用いたプライマーの塩基配列 (5' > 3')

T3KO-1	TGGCGGCCGCACTAGTGGGCAGCACCGAATACATCGCCACG
T3KO-2	TTATGGATCCACTAGCATGGGCTTGGGGTGCCAGAGTGAC
T3KO-3	TATCGATACCGTCGAGCAACCACGGCCTGGCGCTGTGGG
T3KO-4	CCCCCTCGAGGTCGACCCGGACCAGTTTGAGCCTCCCTTCAAG

2-3-2 DT40 細胞の形質転換

上記のノックアウトベクターを用いた DT40 細胞の形質転換には、エレクトロポレーション法を使用した。形質転換に用いるプラスミド DNA を 40 µg 用意し、計 200 µL の反応系で制限酵素処理をして線状化した。フェノール/クロロホルムおよびエタノール沈殿により DNA を精製し、500 µL の PBS に溶解した。

宿主細胞となる DT40 細胞 (CL18 株) 1×10^7 個を遠心分離 (1,100 x g、3 分間) により回収し、10 mL の PBS で洗浄した。再び遠心分離を行なったのち、上清を除去し、300 µL の PBS で懸濁した。この細胞溶液に、先述の PBS に溶解した直鎖 DNA 溶液を添加し、ピペッティングにより静かに混合した。この混合溶液 800 µL

をキュベット（4 mm、Bio-Rad）に移し、氷上で 10 分間静置した。このキュベットに対し、Gene Pulser（Bio-Rad）を 550 V、25 μ F、 $\infty \Omega$ 、cuvette 4 mm の条件で使用し、形質転換を行なった。キュベットを再び氷上に移し、10 分間静置したのち、溶液全量を事前に 37 °C に調整していた培地 20 mL に添加した。37 °C、CO₂ 5 % の条件下で 24 時間培養したのち、10 mL ずつに培地を分け、それぞれから遠心分離により細胞を回収した。この細胞を、選抜用の薬剤を添加した 40 mL の培地に懸濁し、よく混和したのち、200 μ L ずつ 96-well プレートに分注した。細胞は 39.5 °C、CO₂ 5 % の条件下で 1 週間程度、コロニーが形成されるまで培養した。

2-3-3 安定的形質転換株の選抜

薬剤添加下で 96-well プレートにてシングルコロニーの形成が見られた細胞について、well 内の培養液全量（200 μ L）を 24-well プレートに移し、2 mL の薬剤添加培地を加えて拡大培養を行なった。十分に増殖した時点で細胞を回収し、NaCl 法によりゲノム DNA を抽出した。このゲノムを鋳型に、薬剤耐性遺伝子からベクター挿入箇所の上流あるいは下流の領域を対象に、KOD-Fx（東洋紡）を用いて以下の反応系で PCR を行い、薬剤カセットの導入を確認した。これらの PCR において、遺伝子破壊株として想定される DNA の増幅が見られた株に対して、破壊遺伝子を対象とする RT-PCR を行い、形質転換の反転を行なった。

表 M9 形質転換判定用 PCR 反応の溶液組成（25 μ L 系）

Template DNA	1 μ L
2x KOD-Fx Buffer	12.5 μ L
2mM dNTPs	5 μ L
Forward Primer (10 μ M)	0.75 μ L
Reverse Primer (10 μ M)	0.75 μ L
KOD-Fx	0.5 μ L
H ₂ O	4.5 μ L

表 M10 PCR 反応サイクル

94 °C 2 min

98 °C	10 sec	}	x 5 cycles
74 °C	1 min/kb		
98 °C	10 sec	}	x 5 cycles
72 °C	1 min/kb		
98 °C	10 sec	}	x 5 cycles
70 °C	1 min/kb		
98 °C	10 sec	}	x 25 cycles
68 °C	1 min/kb		
68 °C	7 min		
4 °C	∞		

表 M11 遺伝子破壊確認用プライマーの塩基配列

TET2 欠損株選抜用 (neomycin 耐性)

T2-1 CGAAGAGTAAGTGACACAGAGGGCG

N-2 CATCTTGTTC AATGGCCGATCCC

TET2 欠損株選抜用、TET1/2 欠損株選抜用 (histidinol 耐性)

H-1 CAAGCTTGCCATGAGCTTCAATACCCTGATTGACTGG

T2-2 GGTATATGACAAGTAGGAACATCACTCAAACCT

TET1/2 欠損株選抜用 (zeocin 耐性)

T2-1 上述と同じ

Z-4 TCAGTCCTGCTCCTCGGCCAC

TET3 欠損株選抜用 (neomycin 耐性)

N-1 TCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTC

T3-1 CCAACCTAAGGTCTGACTTGCCATG

TET3 欠損株選抜用 (histidinol 耐性)

H-1 上述と同じ

T3-1 上述と同じ

TET3 欠損株選抜用 (zeocin 耐性)

Z-3 ATGGCCAAGTTGACCAGTGC

T3-1 上述と同じ

2-4 DT40 細胞を用いた遺伝子過剰発現株の構築

レトロウイルスベクターである pMSCV-MCS-IRES-EGFP は京都大学の笹沼博之博士から提供いただいた。

2-4-1 TET3 過剰発現用プラスミド

野生型 DT40 細胞の cDNA から増幅した *TET3* cDNA を搭載しているプラスミドから、プライマー InF_F_pchT3OE、InF_R_pchT3OE を用いて *TET3* cDNA 領域を増幅し、In-Fusion システムを利用して pMSCV-MCS-IRES-EGFP の MCS サイトに導入した。これにより *chTET3* cDNA と EGFP が IRES 配列により隣接するため、プラスミド導入後、EGFP の蛍光発現により *chTET3* cDNA の導入が確認できる。得られたプラスミドはサンガーシーケンシングにより配列を確認後、pMSCV-*chTET3* とし、後続の実験に使用した。

表 M12 pMSCV-*chTET3* 作製に使用した In-Fusion 用プライマーの塩基配列 (5' > 3')

Forward	GCTCGAGATAGAATTCATGCAGCCGGACAAGCCG
Reverse	TTAAATAGGGCGGCCGCTCAGCGGGTTTAAACTTAATT

2-4-2 HEK293T 細胞へのトランスフェクション

トランスフェクションの前日に、通常培養していた HEK293T 細胞を PBS で洗浄し、トリプシン処理をしたのち、通常培地に懸濁して細胞数を計測した。細胞を遠心分離 (1,100 x g、3 分間) により回収し、トランスフェクション前の培地 (FBS 20 %) に 1×10^5 cells/mL になるように懸濁し、6-well プレートに 2.5 mL ずつ分注した。一晚培養後、レトロウイルスパッケージングプラスミドである pCLAmpho (Novus) と pMSCV-*chTET3*、gene juice (Sigma Aldrich)、Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) を下記の組成で混合し (計 100 μ L)、30 分間室温で静置した。この混合溶液に 400 μ L の通常培地を添加して混和し、HEK293T 細胞の各 well に 80 μ L ずつ添加した。トランスフェクションから 24、48、72 時間後に EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific) により GFP 発現を確認し、十分な蛍光が確認されたら培養上清をウイルス含有溶液として回収し、-80 °C で保管した。

表 M13 トランスフェクション溶液 (100 μ L 系)

Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific)

pCLAmpho 1 μ g

pMSCV-chTET3 1 μ g

gene juice 5 μ L

2-4-3 DT040 細胞へのウイルスベクターによる遺伝子導入

通常培地で培養している DT40 細胞を遠心分離により回収し、 2×10^5 cells/mL になるように培地に懸濁し 1 mL ずつ 6-well プレートに分注した。上記の方法で得られたウイルス液 500 μ L を各 well に添加し、 $1,100 \times g$ 、30 分、 32°C の条件下で遠心操作を行なった。一晩、通常培養を行い、フローサイトメーターにて GFP の発現を確認した。GFP 発現細胞は SH800 (Sony) を用いてソーティングし (後述)、拡大培養して後続の実験に用いた。

2-5 RT-PCR と RT-qPCR

2-5-1 DT40 細胞からの RNA の抽出法

(1) TRIzol を用いた方法

2×10^6 個の細胞を遠心分離 ($1,100 \times g$ 、3 分間) で回収し、1 mL の TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) を加えて、ボルテックスにより攪拌した。室温で 2 分間静置したのち、200 μ L のクロロホルムを添加して穏やかに攪拌した。さらに室温で 2 分間静置したのち、室温、 $12,000 \times g$ の条件で 15 分間遠心分離を行った。上清を回収し、500 μ L のイソプロパノールを加えて転倒混和後、再び室温で 10 分間静置した。遠心分離を室温、 $12,000 \times g$ の条件で 10 分間行なった後、上清を除去し、1 mL の 75% エタノールを加えてボルテックスで攪拌した。 $7,000 \times g$ 、室温で再度 5 分間遠心分離を行い、上清を除去したのち、得られた RNA を風乾した。精製された RNA を 100 μ L の UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (Thermo Fisher Scientific) に溶解し、Nanodrop で濃度および純度を確認したのち、後続の実験に使用した。

(2) キットを用いた方法

NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) を使用して RNA を精製した。2 x 10⁶–5 x 10⁶ 個の細胞を遠心分離 (1,100 x g、3 分間) によって回収し、付属のプロトコルに従って RNA を精製した。キット付属の RNase-Free water を用いて RNA を溶出し、Nanodrop で濃度および純度を確認したのち、後続の実験に使用した。

2-5-2 RT-PCR

(1) 逆転写反応

上記の方法で回収した RNA 500 µg に対して、PrimeScript RT-PCR Kit (タカラバイオ) を用いて逆転写反応を行なった。下記の通りに調整した逆転写反応溶液 (I) を、65 °C、5 分間反応させたのち、氷上に 2 分間静置した。反応溶液全量を用いて逆転写反応溶液 (II) を調整し、30 °C、10 分間、42 °C、30 分間、70 °C、15 分間の順に反応させたのち、4 °C で静置した。その後 TE を 30 µL 加え、計 50 µL の cDNA 溶液を得た。

表 M14 逆転写反応溶液 (I) (10 µL 系)

dNTP Mix (10mM)	1 µL
Oligo dT Primer (2.5µM)	1 µL
Random 6mers (20µM)	3.5 µL
RNA (100ng/µL)	3.5 µL
H ₂ O	3.5 µL

表 M15 逆転写反応溶液 (II) (20 µL 系)

上記の反応溶液	10 µL
5x Prime Script Buffer	4 µL
RNase Inhibitor(40U/µL)	0.5 µL
Prime Script RTaseII(200U/µL)	0.5 µL
H ₂ O	5 µL

(2) cDNA を用いた PCR 反応

上記の方法で得られた cDNA に対して、KOD-Fx（東洋紡）を用いて以下の PCR 反応を行なった。

表 M16 溶液組成（25 μ L 系）

Template cDNA	1 μ L
2x KOD Fx Buffer	12.5 μ L
2mM dNTPs	5 μ L
Forward Primer(10 μ M)	0.75 μ L
Reverse Primer(10 μ M)	0.75 μ L
KOD-Fx	0.5 μ L
H2O	4.5 μ L

表 M17 PCR 反応サイクル

94 °C	2 min	
98 °C	10 sec	x30 cycles
55 °C	30 sec	
68 °C	1 min/kb	
4 °C	∞	

表 M18 RT-PCR 使用プライマーの塩基配列（5' > 3'）

TET2 欠損確認用	
TET2-1	CAGAATCTGTCAACCCTGATGGCAC
TET2-2	GAGCTCACGTTTCGCACACTCTATG
TET3 欠損確認用	
TET3-1	GACACAACCAAGAGGAGAAGCTGC
TET3-2	GTAGGGACTCCACTGCTGCTCC
内部標準用（ <i>GAPDH</i> ）	
chGAPDH-3	GTCCTCTCTGGCAAAGTCCAAGTG
chGAPDH-2	GACCATCAAGTCCACAACACGGTTG

2-5-3 RT-qPCR

(1) 逆転写反応

PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を使用して、逆転写反応を行なった。上述の方法で精製した RNA 500 ng を用いて以下の反応溶液を調整し、37 °C で 15 分間反応させた。85 °C で 5 秒間熱処理を行い、酵素を失活させた後、4 °C で静置した。

表 M19 逆転写反応溶液 (10 µL 系)

5 x PrimeScript Buffer	2 µL
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 µL
Oligo dT primer (50 µM)	0.5 µL
Random 6 mers (100 µM)	0.5 µL
total RNA	500 ng
RNase Free dH ₂ O	up to 10 µL

(2) リアルタイム PCR

上記で得られた cDNA に対して、KAPA SYBR qPCR Master Mix (2x) ABI Prism (Kapa Biosystems) を使用して下記の通り反応溶液を調整した。リアルタイム PCR には StepOnePlus System (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

表 M20 リアルタイム PCR 反応溶液 (10 µL)

2 x KAPA SYBR qPCR Master Mix (2x)	5 µL
Forward Primer (10 µM)	0.2 µL
Reverse Primer (10 µM)	0.2 µL
cDNA	1.0 µL
H ₂ O	3.6 µL

表 M21 リアルタイム PCR で用いたプライマーの塩基配列 (5' > 3')

TET1 検出用

Forward GCCCAGACTGTCGGCTTGGATC
Reverse GAATCACCCCGACTCTCCGGTTG

TET2 検出用

Forward CAGAATCTGTCAACCCTGATGGCAC
Reverse GCTGCTCATCTTCAGGTGTTTGG

TET3 検出用

Forward CACTGGGAAGGAGGGGAAGAGC
Reverse GATGATGATGACAGCATTTCTGGC

IgV λ 検出用

Forward GCTCCACAAACACATTAACCATCACTGG
Reverse TCCTCCTTTGACGGTGGGAAGAG

AID 検出用

Forward TGCACCAGAGGGCTGAACAGTC
Reverse ACAACATAACAGAGGTAGGTTTCACGAC

CTNNB1 検出用

Forward CTCTCAGGTTTCGCAGGAGG
Reverse GGCCTGAGGACCATCTTTCC

BACH2 検出用

Forward AGCGAGTACTTCTTGCAGGC
Reverse GGCAAAGTGTAGCAATGGACC

FANCD2 検出用

Forward AACTGCCTCTTGCCATGC
Reverse TCCAAGCAGCAGCTTAATGA

DDX11 検出用

Forward ACAACGAGGAGGAGCTGATTC
Reverse GTCACATGCTCTTCTTCCAAGT

PARP1 検出用

Forward GAGAGCATCGCCAAGGACT
Reverse AGCTGTAGTGGTGCCAGTGA

POL η 検出用

Forward GAGAAGGCCACCGGATTCAG

Reverse ATACCAGTGTCTGGCGGTTG

RNF8 検出用

Forward CTGCGCACAGAACAAGTACA

Reverse TCCTTCAGATTCTCTTCCCCATC

DNMT1 検出用

Forward TGTCCATCTTCGACGCCAAC

Reverse CATAGATGGGCTTCACGGCA

DNMT3A 検出用

Forward GGGTGAGCGACAAAAGGGAC

Reverse TGGAGTTGGAGCGAGTGGTG

β -actin 検出用 (内部標準)

Forward CGTGCTGTGTTCCCATCTATCGTG

Reverse TACCTCTTTTGCTCTGGGCTTCATC

2-6 Flow cytometer を用いた解析

2-6-1 膜型 IgM の発現解析

(1) 限界希釈によるサブクロンの取得

各株の培養液における細胞濃度を Z2 Particle Counter (Beckman Coulter) を用いて測定後、50 μ L の培養液を 10,000 倍希釈した。50 個の細胞を含む量の希釈溶液を 20 mL の培地に添加し、軽く攪拌したのち、200 μ L ずつ 96-well プレートに分注した。39.5 $^{\circ}$ C、CO₂ 5 % の条件下で約 5 日間、コロニーが形成されるまで培養した。シングルコロニーが確認できた well の培養液全量を 24-well プレートに植え継ぎ、数日間培養した。増殖に問題がなく、膜型 IgM を発現していない細胞集団をサブクローンとして使用した。

(2) Flow cytometer を用いた膜型 IgM の発現解析

各細胞株のサブクローン培養液から、1 x 10⁶ 個の細胞を遠心分離 (1,100 x g、4 $^{\circ}$ C、3 分間) により回収し、上清を除去後、500 μ l の FCM buffer (組成は下記参照) で懸濁した。同条件にて再度、遠心分離を行なって細胞を回収し、上清を除去した。抗ニワトリ IgM 抗体 (Goat anti-chicken IgM FITC conjugated ; Bethyl、cat #A30-102F)

を FCM buffer で 250 倍希釈し、100 μ L の希釈溶液で細胞を懸濁した。4 $^{\circ}$ C、遮光下で 15 分間静置した後、1,100 x g、4 $^{\circ}$ C で 3 分間の遠心分離を行なった。上清を除去し、1 mL の FCM buffer で細胞を懸濁したのち、再び同条件で遠心分離を行なった。上清を除去後、1 mL の FCM buffer に細胞を懸濁して、測定に用いた。測定には Novocyte flow cytometer (Agilent Technologies) を使用し、sIgM(+)である野生型 DT40 細胞を同様に処理した場合と同程度の FITC 蛍光強度をもつ細胞群を、sIgM(+)細胞としてゲーティングした。

表 M22 FCM buffer の組成

1 x PBS		
BSA	(Sigma Aldrich)	0.5 %
EDTA		2 mM

表 M23 1 x PBS

Phosphate Buffered Saline Powder (0.01mol/l, pH7.2-7.4) (Wako)	1 包
H ₂ O	1 L

2-6-2 膜型 IgM の発現を指標としたシングルセルソーティング

本実験で用いた野生型 DT40 細胞は CL18 株であるため、通常時は IgM を発現しておらず、抗体遺伝子座の mRNA 量も低下している。そこで、抗体遺伝子座の転写量解析のために sIgM(+)細胞をシングルセルソーティングによって回収した。

1 x 10⁶ 個の細胞を上述の膜型 IgM の発現解析時と同様に処理し、500 μ l の FCM buffer に懸濁した。この懸濁溶液をフィルター滅菌後、SH800 (Sony) にて FITC 蛍光強度を測定し、野生型 sIgM(+)DT40 細胞が示す蛍光強度と比較して十分に強いシグナルが検知された細胞群をゲーティングして、シングルセルソートを行なった。細胞は各 well 200 μ l の通常培地が入った 96-well プレートにソートされ、約 1 週間、コロニーが形成されるまで 39.5 $^{\circ}$ C、CO₂ 5 % の条件下で培養を行なった。

2-6-3 GFP の発現を指標としたシングルセルソーティング

レトロウイルスベクターにより *chTET3* 遺伝子が導入された DT40 細胞株を樹立するため、ウイルスベクター *chTET3* 下流の IRES 直下にある EGFP が発現している細胞を、シングルセルソートして拡大培養した。

1 x 10⁶ 個の細胞を遠心分離 (1,100 x g、3 分間) により回収し、上清を除去後、通常培地に懸濁した。再度、同条件にて遠心分離を行い、新鮮培地で懸濁したのち、フィルター滅菌を行なって測定に用いた。セルソートには前項と同様に SH800 (Sony) を用い、pmaxGFP 発現細胞が示す蛍光強度と比して、十分に強い蛍光強度が確認された細胞を 96-well プレートにシングルセルソートした。約 1 週間、コロニーが形成されるまで 39.5 °C、CO₂ 5 % の条件下で培養を行ない、後続の実験に使用した。

2-7 抗体遺伝子軽鎖可変領域の塩基配列解析

2-7-1 塩基配列の取得

各条件で培養した細胞から NucleoSpin Tissue kit を用いて精製したゲノム DNA に対し、プライマー VL-1 と VL-2 および KOD-plus (東洋紡) を用いて抗体遺伝子軽鎖可変領域を増幅した。得られた PCR 断片をカラム精製し、クローニングに用いた。ベクタープラスミドには pBluescript II SK(-) 使用し、EcoRI と NotI で制限酵素処理後、アガロースゲル精製を行った。精製した PCR 産物を、ゲル精製を行なったベクターに In-Fusion 反応によりクローニングし、得られたプラスミドを大腸菌 (DH5α) に導入した。LB プレートに生えたコロニーに対して、GoTaq Green Master Mix (Promega) を用いてコロニーPCRを行い、アガロースゲル電気泳動により断片長を確認した。形質転換体で想定される断片長が得られた反応液を鋳型に、サンガーシーケンシングによる塩基配列解析 (FASMAC、Genewiz) を行なった。

表 M24 PCR 反応溶液組成 (25 µl 系)

Template DNA	0.5 µL
10 x KOD Plus buffer	2.5 µL
2 mM dNTPs	2.5 µL
25 mM MgSO ₄	1.5 µL
Forward Primer (10 µM)	0.75 µL
Reverse Primer (10 µM)	0.75 µL
KOD Plus (東洋紡)	0.5 µL
H ₂ O	16.0 µL

表 M25 PCR 反応サイクル

94 °C	2 min	
94 °C	15 sec	x30 cycles
60 °C	30 sec	
68 °C	1 min	
68 °C	1 min	
4 °C	∞	

表 M26 抗体遺伝子軽鎖可変領域の増幅に用いた In-Fusion 用プライマー(5' > 3')

VL-1	GCTTGATATCGAATTCCACACCTCAGGTACTCGT
VL-2	ACCGCGGTGGCGGCCGCTCAGCGACTCACCTAGGA

表 M27 コロニーPCR 反応溶液組成 (25 µl 系)

GoTaq Green Master Mix (Promega)	12.5 µl
M13F (100 µM)	0.075 µL
M13R (100 µM)	0.075 µL
H ₂ O	12.35 µL

表 M28 コロニーPCR 反応サイクル

95 °C	5 min	
95 °C	30 sec	x35 cycles
52 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

表 M29 抗体軽鎖可変領域の配列解析に使用したプライマーの塩基配列 (5' > 3')

VL-seq	TCAGCGACTCACCTAGGACGG
--------	-----------------------

2-7-2 取得配列の変異解析

得られた塩基配列は、Geneious (Biomatters) を用いて抗体遺伝子座および偽遺伝子領域にアラインメントを行なった。変異の分類は先行研究に従った (Romanello, Schiavone, Frey, & Sale, 2016; Sale, Calandrini, Takata, Takeda, & Neuberger, 2001)。この分類では、2 つ以上の変異を含む 8 bp 以上の配列について、偽遺伝子領域に適合する配列がないか探索し、該当する偽遺伝子が存在する場合に遺伝子変換 (GCV) とした。また複数の偽遺伝子が適合する場合には、連続する相同部位が最も長い偽遺伝子を遺伝子変換の鋳型として同定した。1 つの変異のみを含む 8 bp 以上の配列で、偽遺伝子領域に相同配列が存在する場合は、遺伝子変換と体細胞突然変異による点変異の両方の可能性があるとした (Ambiguous)。1 塩基の置換で、その周囲の 8 bp の配列が、偽遺伝子領域に相同配列を持たない場合は点変異 (PM) として分類した。

2-8 ドットプロット解析

NucleoSpin Tissue を用いて精製したゲノム DNA について、Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度を測定し、30 ng/uL に溶液を調整した。解析に用いる全ての株のゲノム溶液 (濃度調整済み) を混合し、スタンダード溶液とした。スタンダード溶液は滅菌蒸留水で段階希釈を行い、解析対象のゲノム溶液は 1/3 に希釈 (10 ng/uL) して使用した。ゲノム溶液を 95 °C、5 分間熱処理を

行い、氷上で急冷して変性させた。ニトロセルロース膜（Roche）に 25 ng 分のゲノム DNA をスポットし、DNA-FIX（ATTO）を用いて 125 mJ の UV を照射し、クロスリンクした。メンブレンをブロッキングバッファーに浸し、室温、2 時間振盪した。TBST 溶液で 5 分間、4 回洗浄したのち、抗 5hmC 抗体溶液（Active Motif、cat#39769）に浸し、4 °C で一晩振盪した。TBST 溶液で 5 分間、4 回洗浄したのち、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体溶液（GE healthcare）に浸し、室温で 2 時間振盪した。TBST 溶液で 5 分間、4 回洗浄したのち、Amersham ECL Western Blotting Analysis System（GE Healthcare）を付属プロトコルに従って使用し、顕色した。化学蛍光は ImageQuant LAS4000 mini（GE Healthcare）を用いて検出した。蛍光シグナルの定量には ImageJ ソフトウェアを使用した。

表 M30 TBST 溶液の組成

Tris-HCL (pH 8.0)	10 mM	
NaCl	150 mM	
Tween 20	0.1 %	使用直前に添加

表 M31 ブロッキングバッファーの組成

TBST	
Skim Milk (BD)	5 %

表 M32 抗 5hmC 抗体溶液、抗ウサギ IgG 抗体溶液の組成

TBST	
Skim milk	0.1 %
抗体溶液	10,000 倍希釈

2-9 バイサルファイトシーケンシング

NucleoSpin Tissue Kit を用いてゲノム DNA を抽出し、Qubit dsDNA HS Assay を使用して DNA 濃度を測定した。20μL のゲノム溶液に対し、MethylEasy Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (Human Genetic Signatures) を用いてバイサルファイト

ト処理を行なった。バイサルファイト処理後のDNAは遮光して-20°Cで保管した。対象ゲノム領域の増幅には、EpiMark Hot Start Taq DNA Polymerase (New England Biolabs)を使用して、下記のPCR反応を行なった。このPCR産物を鋳型にして、KOD-plusを用いてnested PCRを行なった。得られたPCR産物は通常のプライマーで増幅した場合にはTAクローニングを行い、In-Fusion用のプライマーを用いた場合にはIn-Fusionによりクローニングを行なった。得られたプラスミドで大腸菌(DH5αあるいはXL10gold)を形質転換後、コロニーPCRにおいて目的断片長が確認された溶液を鋳型にして、サンガーシーケンシングを行なった(FASMAC、Genewiz)。

表 M33 バイサルファイト処理後のPCR反応溶液組成 (25 μL 系)

5 x Buffer	5 μL
2 mM dNTPs	2.5 μL
Forward Primer (10 μM)	0.5 μL
Reverse Primer (10 μM)	0.5 μL
EpiMark Hot Start Taq DNA polymerase	0.125 μL
Template DNA	3.0 μL
H ₂ O	13.375 μL

表 M34 バイサルファイト処理後のPCR反応サイクル

95 °C	30 sec	
95 °C	20 sec	} x 35 cycles
50 °C	30 sec	
68 °C	1 min/kb	
68 °C	5 min	
4 °C	∞	

表 M35 バイサルファイト 処理後の PCR に使用したプライマーの塩基配列 (5' > 3')

ψ7 増幅用

Forward TTGTTTATTTAGTAATGTGGGATAGGG

Reverse TCTAAAATCTCCTCCCCATAAAAA

ψ8 増幅用

Forward TGGTTTTAGGAGAAATTTGG

Reverse ACATTCATAACATAACCATACAAATAAAACAAAAAAC

ψ10 増幅用

Forward TAAGGAAGGTATTTATAAGTATGGTTATGTAGAGAAG

Reverse TCCTACTATCCCATATATATCTATATACTCAACAACC

IgVλ 増幅用

Forward GTGGGGATATATAGTTGTTGGGAT

Reverse AAAAACAAAACCTCAACCCAAACTAT

DIVAC (F2 core) 増幅用

Forward TAAAGAGTTGGGTTATTGTGGGTAGTA

Reverse TATATACCCCATCCCATATACCCAAAC

nested PCR の反応は「抗体遺伝子軽鎖可変領域の塩基配列解析」内の「塩基配列の取得」を参照 (KOD-plus を用いた PCR)。

表 M36 nested PCR で用いたプライマーの塩基配列 (5' > 3')

ψ7 増幅用

Forward GCTTGATATCGAATTTGTGTAGTAATAAGGAGGGGAGG

Reverse ACCGCGGTGGCGGCCTCAAACACTAAACCCCATTTTCTC

ψ8 増幅用

Forward GCTTGATATCGAATTTTTGATTGTTATTTAGATTATATT

Reverse ACCGCGGTGGCGGCCTCACCATAACAACACTAATAC

ψ10 増幅用

Forward GCTTGATATCGAATTATGGTTAATGTGGTTGTGGAGT

Reverse ACCGCGGTGGCGGCCTCATCCCACTACCAAACAAAAA

IgV λ 増幅用

Forward GCTTGATATCGAATTTTTTTTTTTAGGTTTTTTGGTGTA

Reverse ACCGCGGTGGCGGCCACCCAATAATAATTAATATATTT

DIVAC (F2 core) 増幅用

Forward GCTTGATATCGAATTGGGGAGAGGGTAAGTATTAGG

Reverse ACCGCGGTGGCGGCCCCCATCCCATATACCCAAAC

2-10 一般遺伝子操作

2-10-1 プラスミド DNA の抽出

(1) 小スケール (培養液量 : 2 - 3 mL)

Pure Yield Plasmid Miniprep Sysmte (Promega)を使用してプラスミド抽出を行なった。37 °C、110 rpm で一晩振盪培養した菌液 (2 - 3 mL) に対し 10,000 x g、3 分間の遠心分離を行い集菌した。培養上清を除去後、大腸菌を滅菌蒸留水 600 μ l に溶解し、キット付属のプロトコルに従い、付属の Elution Buffer にプラスミドを抽出した。プラスミド DNA 溶液は、Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度および純度を確認して後続の実験に使用した。

(2) 大スケール (培養液量 : 35 - 70 mL)

QIAquick Midi Kit (Qiagen)を使用してプラスミド抽出を行なった。37 °C、110 rpm で一晩振盪培養した菌液 (35 - 70 mL) に対し、60,000 xg、15 分間の遠心分離を行い集菌した。培養上清を除去後、キット付属のプロトコルに従い、滅菌蒸留水にプラスミドを溶出した。プラスミド DNA 溶液は、Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度および純度を確認して後続の実験に使用した。

2-10-2 ライゲーションおよびクローニング方法

(1) ライゲーション

制限酵素処理した DNA 断片のライゲーションには、DNA Ligation Kit Mighty Mix (タカラバイオ)を使用した。ベクターとインサートのモル比をそれぞれの長さに応じて 1:1 ~1:10 の割合になるように調整し、DNA 溶液と等量の Mighty Mix を加えて混合後、16 °C、30 分間インキュベーションした。このライゲーション産物を大腸菌の形質転換に利用した。

(2) TA クローニング

a) アデニン付加

目的 DNA 断片（インサート）を用いて下記の組成で溶液を調整し、72°C、15 分間インキュベートした。反応溶液はカラム精製（QIAquick PCR Purification kit; Qiagen）を行い、後続のライゲーション反応に用いた。

表 M37 溶液組成（50 μ L 反応系）

Purified DNA	27 μ L
10x Ex Taq buffer	5 μ L
2.5 mM dNTPs	4 μ L
Ex Taq (5 U/ μ L)	0.25 μ L
H ₂ O	13.75 μ L

b) T ベクターを用いた DNA 断片の融合

TOPO TA Cloning Kit for Subcloning (Thermo Fisher Scientific)を使用し、以下の組成で反応溶液を調整し、室温で 20 分間インキュベートした。得られた産物を後続の大腸菌の形質転換に用いた。

溶液組成（3 μ L 反応系）

Purified DNA	2 μ L
Salt Solution	0.5 μ L
TOPO vector	0.5 μ L

(3) In-Fusion システムを用いた DNA 断片の融合

In-Fusion システム（Takara Bio）では、ベクターの末端配列 15 塩基を目的 DNA 増幅用プライマーに付加して、PCR 産物を調整する。この PCR 産物とベクター間の重複 15 塩基を利用して DNA 断片の融合を行うシステムである。In-Fusion 用のプライマーで調整した PCR 産物とベクターを In-Fusion molar ratio calculator (<https://www.takarabio.com/Learning-centers/cloning/primer-design-and-other-tools/in-fusion-molar-ratio-calculator>)に従って混合し、5x In-Fusion HD Enzyme Premix (タカラ

バイオ)を加えて、50 °C、15 分間インキュベーションした。この In-Fusion 産物を大腸菌の形質転換に利用した。

2-10-3 大腸菌の形質転換

氷上で溶解した大腸菌コンピテントセル (DH5 α または XL10gold) 50 μ L に対し、ライゲーション産物を 5 μ L 添加後、10 分間氷上に静置した。その後、42 °C、30 秒間ヒートショックを与え、再び2分間氷上に静置した。得られた大腸菌溶液をアンピシリン含有 LB プレート (最終濃度 100 μ g/mL) に塗布し、37 °C で一晩培養した。なお TA クローニングを行う際には、ブルー/ホワイト選抜を行うため、大腸菌を塗布前に、LBプレートにIPTG (最終濃度 0.1 mM) と X-gal (最終濃度 0.004 %) をこの順で塗布してから使用した。

2-10-4 PCR および制限酵素処理後の DNA の精製

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)を使用し、付属のプロトコルに従って PCR 産物あるいは酵素反応溶液から DNA を精製した。DNA の溶出には付属の Elution Bufferを使用し、Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度および純度を確認した。

2-10-5 アガロースゲルからの DNA の抽出

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を使用し、付属のプロトコルに従って、アガロースゲルから DNA を精製した。DNA の溶出には付属の Elution Bufferを使用し、Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度および純度を確認した。

第 3 章

単一 TET タンパク質を介した 鳥類 B 細胞における抗体遺伝子多様化機構の制御

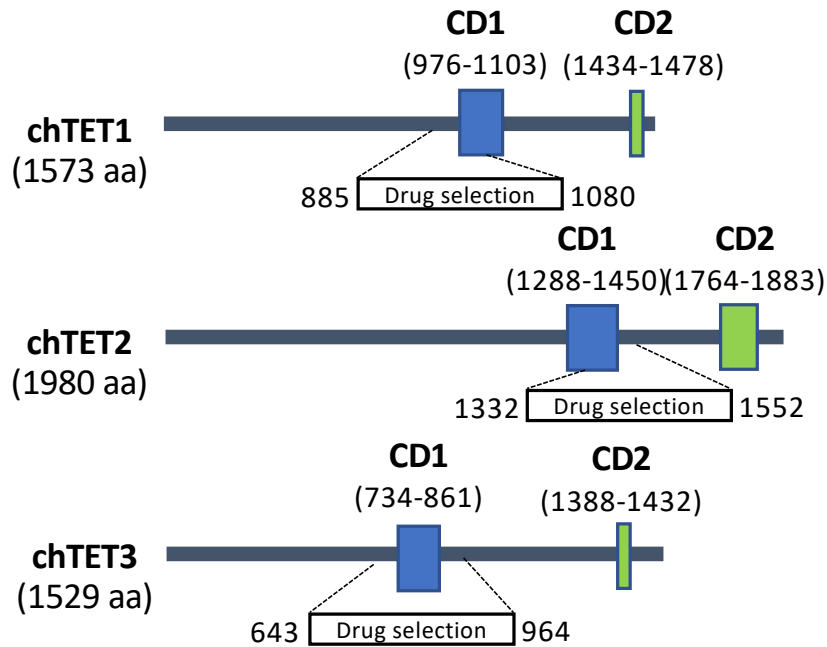
3-1 単一 TET タンパク質欠損株の樹立

本章で使用した TET1 欠損株は太田研究室の近藤早紀子氏が確立したものを利用した（近藤早紀子修士論文）。TET1 欠損株と同じく、TET2 欠損株、TET3 欠損株の樹立には、ニワトリ免疫細胞 DT40 細胞の CL18 株を用いて、ノックアウトベクターによる相同組換えを利用した遺伝子破壊を行った（第 2 章 材料と方法）。ノックアウトベクターは、薬剤耐性遺伝子カセットの 5'端側と 3'端側に、ターゲット領域のゲノム配列と相同な配列を搭載したデザインをしている。このベクターをエレクトロポレーションにより DT40 細胞に導入すると、DT40 細胞の高い相同組換え効率により、ベクター上の相同領域を介して標的部位に薬剤カセットが導入される。TET1、TET2、TET3 のいずれのノックアウトベクターも TET タンパク質の酸化作用触媒ドメインである DSBH ドメインを標的とした（図 3-1 (a)）。ベクター導入による遺伝子の破壊は、近傍のゲノム領域から薬剤マーカーにかけての PCR と（図 3-1 (b)）、RT-PCR による該当遺伝 cDNA の不検出によって確認した。

3-2 単一 TET タンパク質欠損株における残存 TET タンパク質の発現量解析

序章でも述べたように、TET1、TET2 および TET3 はファミリータンパク質である。いずれの TET タンパク質も触媒ドメインである DSBH ドメインを有し、5mC に対し同様の酸化作用を示すことが明らかにされている (Ito et al., 2010)。従って、単一 TET タンパク質欠損株の解析を通じて、各 TET タンパク質の機能の評価を試みる場合、それぞれの欠損株において残存する TET タンパク質の発現量が変動していないこと、特に欠損を補償するような発現上昇が起きていないことを確認する必要がある。そこで、各 TET 欠損株の *TET* 遺伝子 mRNA を定量するため RT-qPCR を行なった（図 3-2）。その結果、いずれの TET タンパク質欠損株においても、残存する TET タンパク質の発現変動は認められなかった。加えて、各 TET タンパク質の欠損についても確認することができた。従って、以降の単一 TET タンパク質欠損株の表現型は、残りの TET タンパク質による機能補償は限定的で、真に各 TET タンパク質の機能が損なわれたことによって生じていると推測された。

(a)



(b)

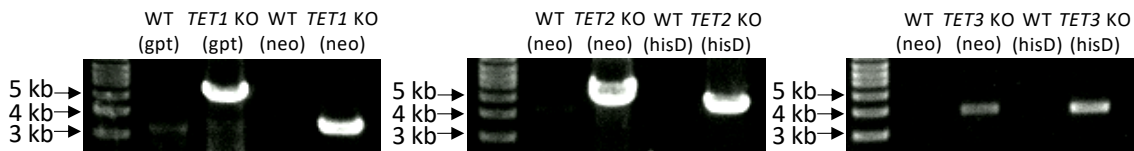


図3-1 *TET1*、*TET2*、*TET3*ノックアウトベクターを用いた遺伝子破壊

- (a) それぞれのノックアウトベクターにより破壊される領域を図示した。CD1およびCD2は各TETタンパク質のDSBHドメインを指す (CD1、CD2: catalytic domain 1、2、aa: amino acid)。配列情報は、NCBIデータベースを参照した (*TET1*: NC_006093.3, *TET2*: NC_006091.3, *TET3*: NC_006109.3)。
- (b) ゲノムPCRによる薬剤マーカーの導入確認。薬剤マーカーからゲノム領域に対してPCRをかけて、標的部位へのベクター導入を確認した。野生株ではバンドが出ない。想定されるバンド長は以下の通り: *TET1* KO (gpt) 5.2 kbp、(neo) 3.4 kbp、*TET2* KO (neo) 4.7 kbp、(neo) 4.6 kbp、*TET3* KO (neo) 4.0 kbp、(neo) 4.0 kbp。

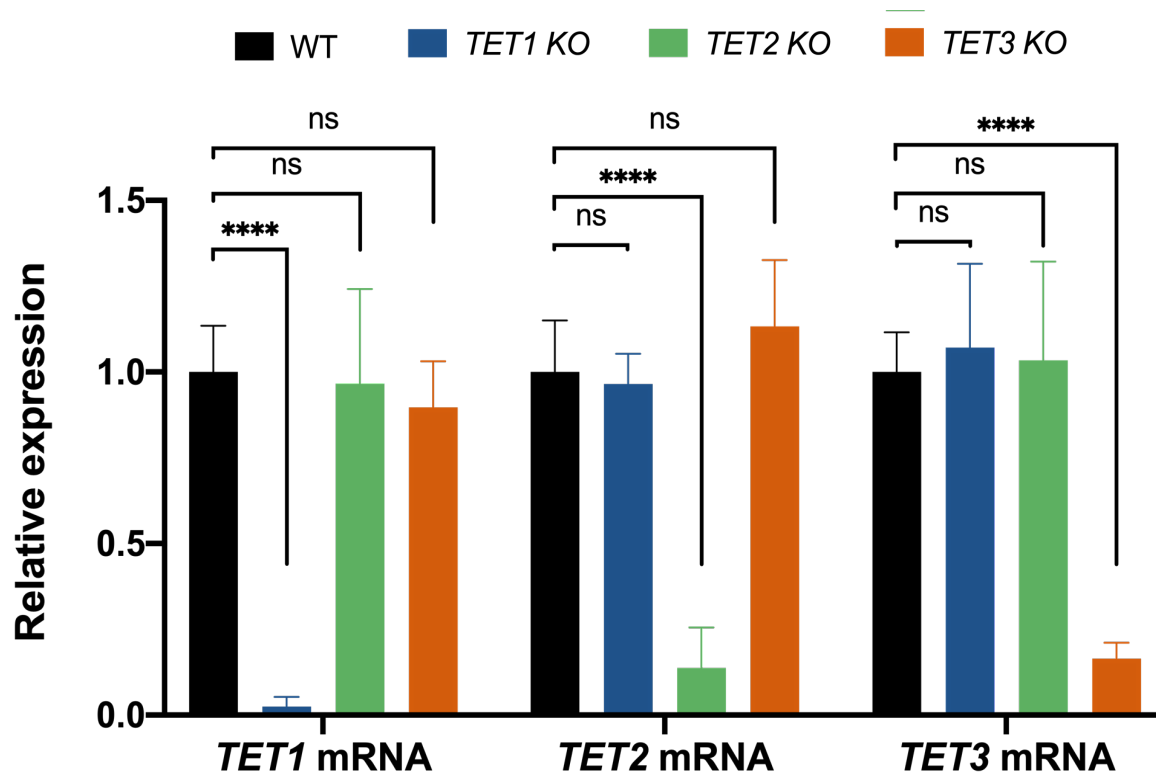


図3-2 単一TETタンパク質欠損株における残存TET遺伝子の発現量

野生株および各欠損株における *TET1*、*TET2*、*TET3* の転写量をRT-qPCRにより測定した。測定値は β -actinの値で標準化したのち、野生株に対する相対値をとった。棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を表す（*TET1* mRNA：野生株 $n = 8$ 、TET1欠損株 $n = 6$ 、TET2欠損株 $n = 16$ 、TET3欠損株 $n = 19$ 、*TET2* mRNA：野生株 $n = 8$ 、TET1欠損株 $n = 12$ 、TET2欠損株 $n = 4$ 、TET3欠損株 $n = 19$ 、*TET3* mRNA：野生株 $n = 7$ 、TET1欠損株 $n = 12$ 、TET2欠損株 $n = 16$ 、TET3欠損株 $n = 4$ ）。検定にはウェルチのt検定を用いた（ns = not statistically significant ($p > 0.05$)、**** $p < 0.0001$ ）。

3-3 単一 TET タンパク質欠損株における増殖速度の測定

一般に、増殖速度の解析により、各遺伝子の生存における重要性および細胞周期に与える影響を評価することができる。特に本研究の背景と照らし合わせると、遺伝子変換の契機となる AID が ssDNA に作用することから (Larijani & Martin, 2012)、遺伝子変換と細胞周期の関連が指摘されており、細胞周期特異的に抗体遺伝子座に作用する因子も報告されてきた (Le & Maizels, 2015; Tang & Martin, 2007; Yabuki, Ordinario, Cummings, Fujii, & Maizels, 2009)。そこで、野生株と単一 *TET* 遺伝子破壊株の増殖速度を測定し比較することで、各 *TET* 遺伝子が細胞周期に関する機能を持ちうるかを評価することにした。

7日間、24時間ごとに培養液中の細胞濃度を測定し、継代時の希釈率から各時点における 1 mL あたりの細胞数を算出してプロットした (図 3-3 (a))。その結果、本測定においては、野生株と単一 *TET* タンパク質欠損株の間に、顕著な増殖速度の差は確認されなかった。また、この計測値に基づいて各細胞株の倍化時間も算出した (図 3-3 (b))。増殖速度曲線から得られた結果と一致して、野生株と単一 *TET* タンパク質欠損株の間に倍化時間の有意な差は認められなかった。さらに、各細胞株の平均倍化時間として得られた約 7.6 ~ 7.7 時間という値は、通常の DT40 細胞の増殖速度と一致していた (Kurosawa, Lin, & Ohta, 2010; Lin, Hashimoto, Seo, Shibata, & Ohta, 2008)。以上の結果から、いずれの *TET* タンパク質も DT40 細胞の生存に不可欠ではなく、細胞周期への作用を介して抗体遺伝子多様化機構を制御する可能性も非常に低いことが明らかとなった。

3-4 単一 TET タンパク質欠損株の抗体遺伝子多様化における表現型解析

3-4-1 sIgM リバージョンアッセイ

次に、各単一 *TET* タンパク質の欠損により、抗体遺伝子多様化機構へ影響が生じるかを評価するため、野生株および各欠損株を用いて膜型 IgM (sIgM) リバージョンアッセイを行なった (図 3-4)。本研究で用いた野生株は、抗体軽鎖可変領域 CDR1 の遺伝子内に 1 塩基フレームシフト変異を有し、膜型 IgM を産生できない CL18 株である (sIgM (-)) (Buerstedde et al., 1990)。このフレームシフト変異が遺伝子変換を主とする抗体遺伝子多様化機構を介して修復されることで、CL18 株は膜型 IgM を細胞表面に発現する (sIgM(+)) ようになる (膜型 IgM リバージョン)。

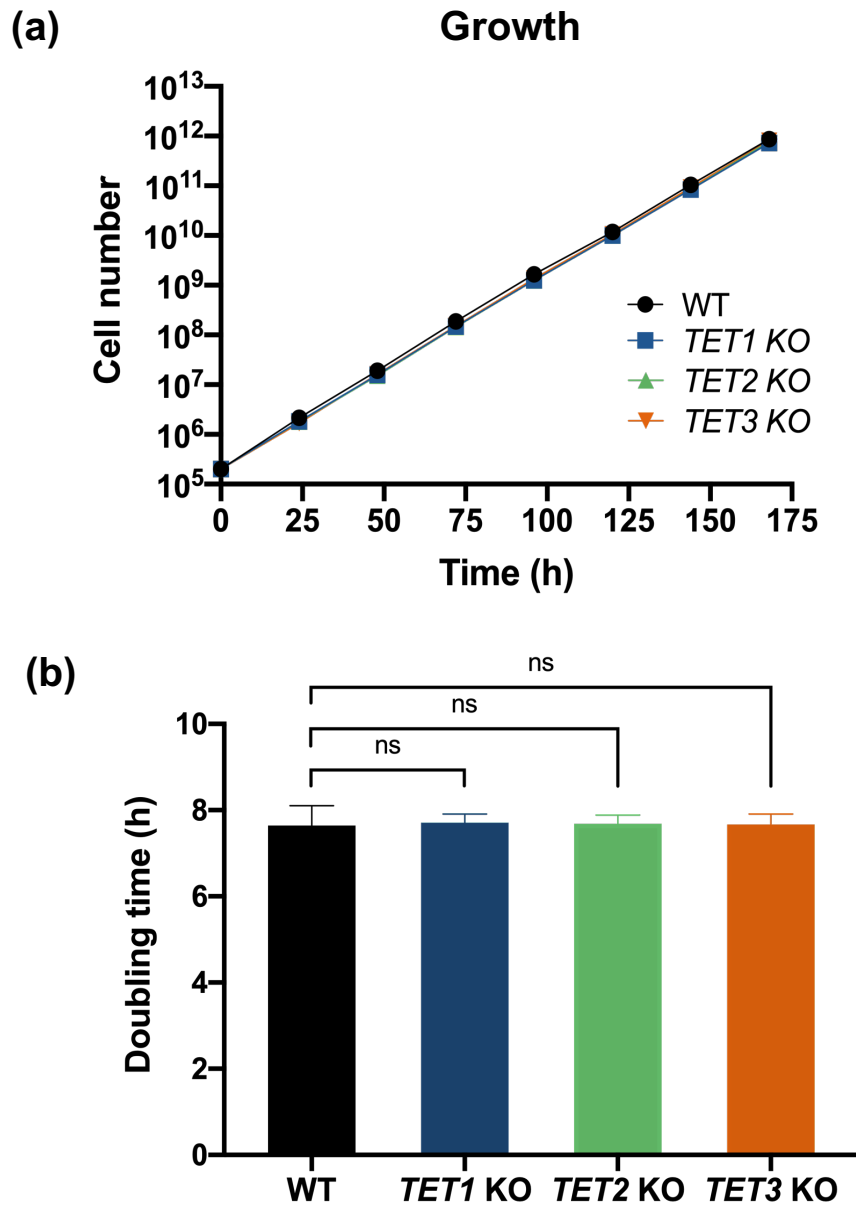


図3-3 単一TETタンパク質欠損株の増殖速度

- (a) 野生株および各欠損株の培養液1 mlあたりの細胞数を24時間ごとに7日間測定した。野生株は2クローン、各欠損株は3クローンをを用い、平均値をプロットしている。
- (b) (a)における増殖速度の測定から、各細胞株の倍化時間を算出した。棒グラフはそれぞれの細胞株のクローンおよび7日間の測定値の平均値、エラーバーは標準偏差を示している（野生株 $n = 14$ 、各欠損株 $n = 21$ ）。検定にはウェルチのt検定を用いた（ns = not statistically significant ($p > 0.05$ ））。

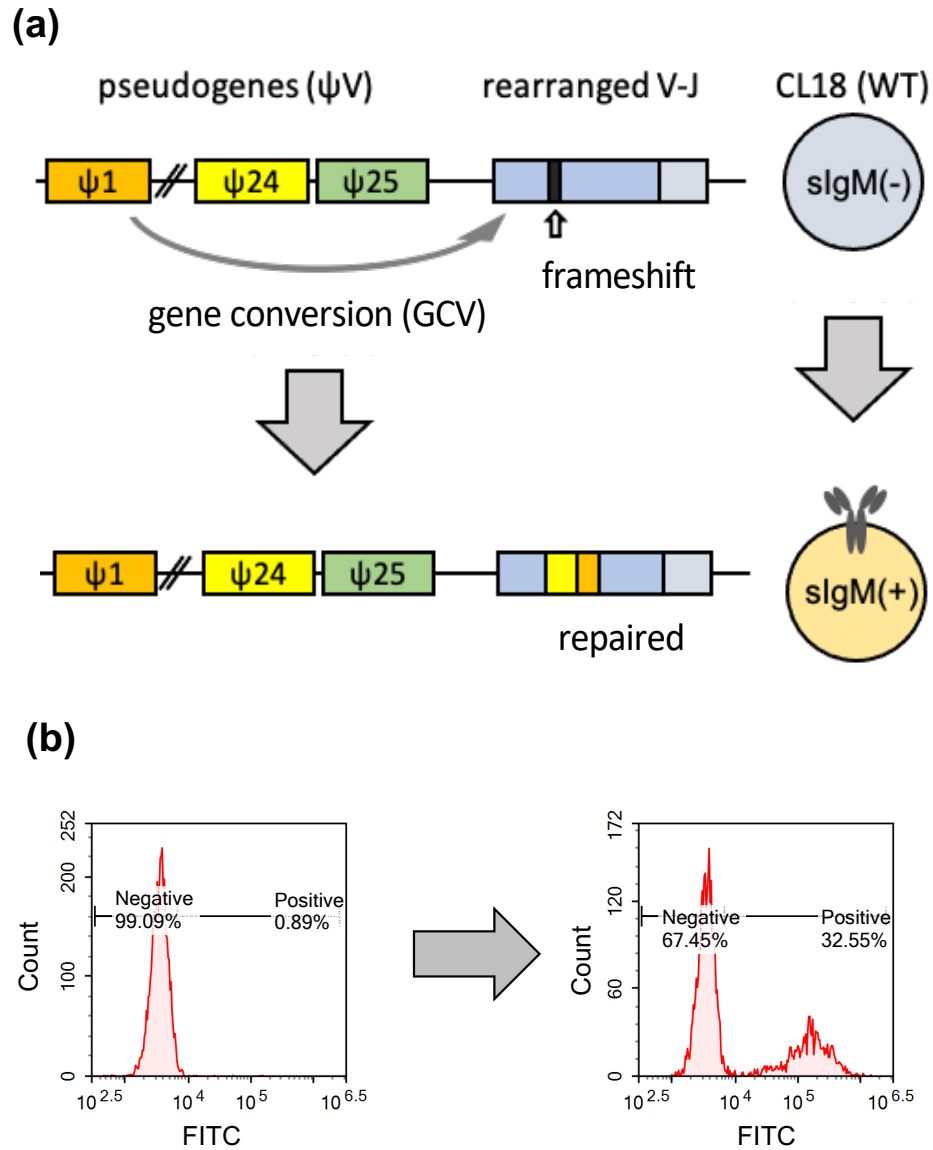


図3-4 CL18株を用いた膜型IgMリバージョンアッセイのスキーム

- (a) DT40細胞 CL18株は、抗体遺伝子座にフレームシフト変異をもち、培養開始時は膜型IgMを発現していない (sIgM(-))。そのフレームシフト変異が、主に抗体遺伝子座上流の偽遺伝子配列を利用した遺伝子変換により修復されることで、膜型IgMを発現するようになる (sIgM(+))。培養細胞中のsIgM(+)細胞の割合は、その細胞株の遺伝子変換を中心とする抗体遺伝子多様化頻度を反映する。
- (b) sIgM(+)細胞の細胞の割合は、FITC-conjugated抗chIgM抗体で細胞を染色したのち、フローサイトメーターで測定した。培養を経るにしたがって、sIgM(+)細胞の割合が増加する様子を示した。

この sIgM(+) 細胞の割合が抗体遺伝子座の配列多様化頻度を反映することから、膜型 IgM リバージョンアッセイは、配列解析を経ない抗体遺伝子多様化機構の評価系として広く用いられている (Arakawa, HauschiLd, & Buerstedde, 2002; Budzyńska et al., 2017; Seo et al., 2005)。

各細胞株から限界希釈により単一細胞クローン（サブクローン）を単離し、各株 28 サブクローンを用いて解析を行なった（図 3-5 (a)）。なお本実験系では、単離後に拡大培養を経たサブクローンを抗ニワトリ IgM 抗体で染色し、フローサイトメトリーで最初に sIgM(+) 細胞の割合（%）を計測した日を Day 0 としている。その後、Day 7、Day 14、Day 21、Day 33 に測定を行なった。

培養を経るに従って sIgM(+) 細胞の割合が増加していることから、いずれの欠損株においても抗体遺伝子多様化が生じていることが示唆された。しなしながら、Day 33 における測定結果を対象とすると、TET1 欠損株と TET2 欠損株において、軽微ではあるものの、野生株と比較して統計的に有意なリバージョン頻度の低下が確認された（sIgM(+) 細胞の割合（平均値）：野生株 18.15 %、TET1 欠損株 9.88 %、TET2 欠損株 5.68 %）。さらに TET3 欠損株では、より顕著に sIgM(+) 細胞の割合が低下していた（平均値：TET3 欠損株 1.75 %）。この結果は、いずれの TET タンパク質も抗体遺伝子多様化に関与する可能性を示しており、その中でも TET3 が主要な機能を果たすことを示唆している。また、図 3-5 には代表的な結果を示しているが、TET3 欠損株におけるリバージョン頻度の低下は、同アッセイにて再現的に確認されていることを付記しておく。

さらに、本研究室の先行研究において、TSA 添加により抗体遺伝子多様化が促進することが明らかになっている (Seo et al., 2005)。そこで、TSA 添加培地においても同様の膜型 IgM リバージョンアッセイを行なった（図 3-5 (b)）。なお、本実験でも各株 28 サブクローンを用い、Day 0 から TSA 添加を開始した。Day 28 の測定結果を対象とすると、TSA 非添加培地における結果と一致して、TET1 欠損株ではわずかなではあるものの、野生株と比較して統計的に有意なリバージョン頻度の低下が見られた（平均値：野生株 46.4 %、TET1 欠損株 31.2 %）。一方、TET2 欠損株では野生株との間に有意な差は見られなかった（平均値：TET2 欠損株 39.0 %）。そして TET3 欠損株では、再び顕著な sIgM(+) 細胞の割合の低下が確認された（平均値：TET3 欠損株 17.4 %）。

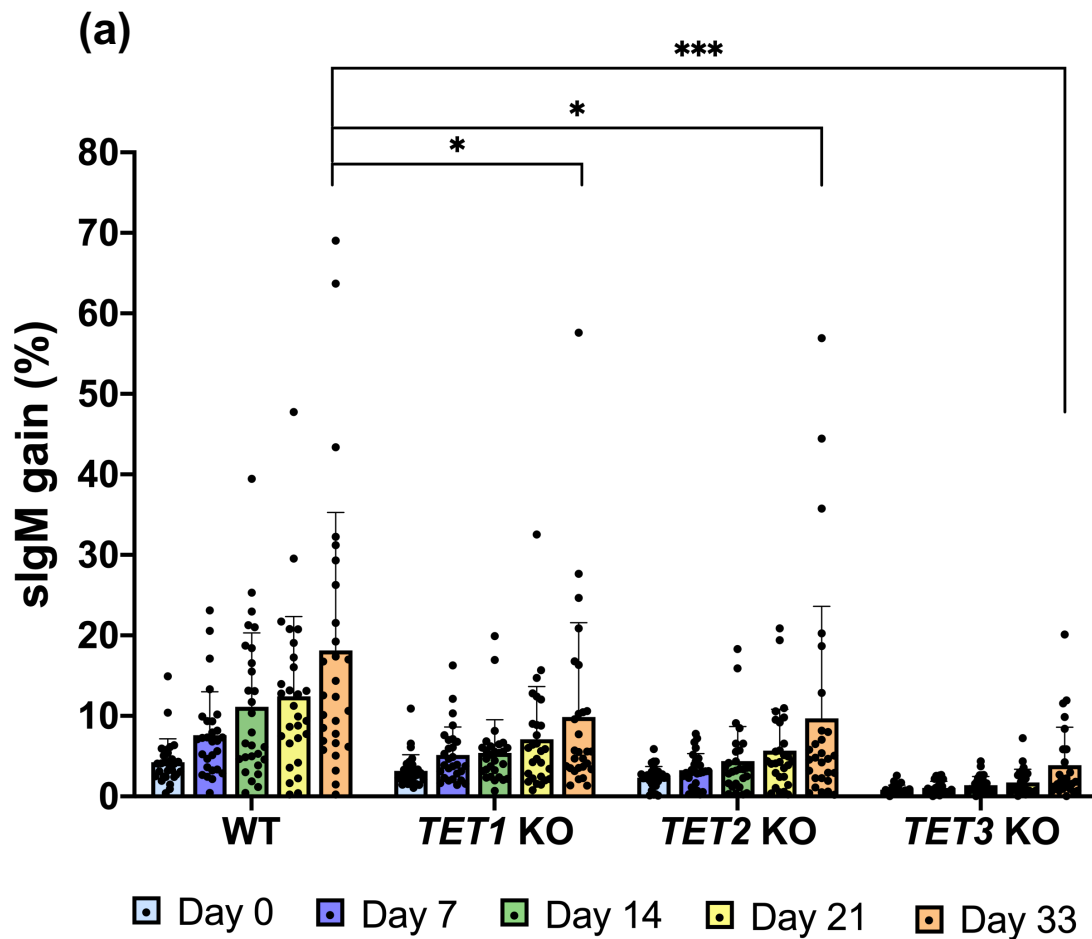


図3-5 単一TETタンパク質欠損株を用いた膜型IgMリバージョンアッセイ
 (a) TSA非添加培地における各株のsIgM(+)細胞の割合。各株から単一細胞クローン（サブクローン）を取得し拡大培養後、一ヶ月間継代培養を行い、記載の培養日数時にフローサイトメーターを用いて測定を行なった。各株28サブクローンを測定対象とした。棒グラフは28サブクローンの平均値、エラーバーは標準偏差、棒グラフ上の点は各サブクローンが示した値を表している。検定にはウェルチのt検定を用いた（* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ ）。

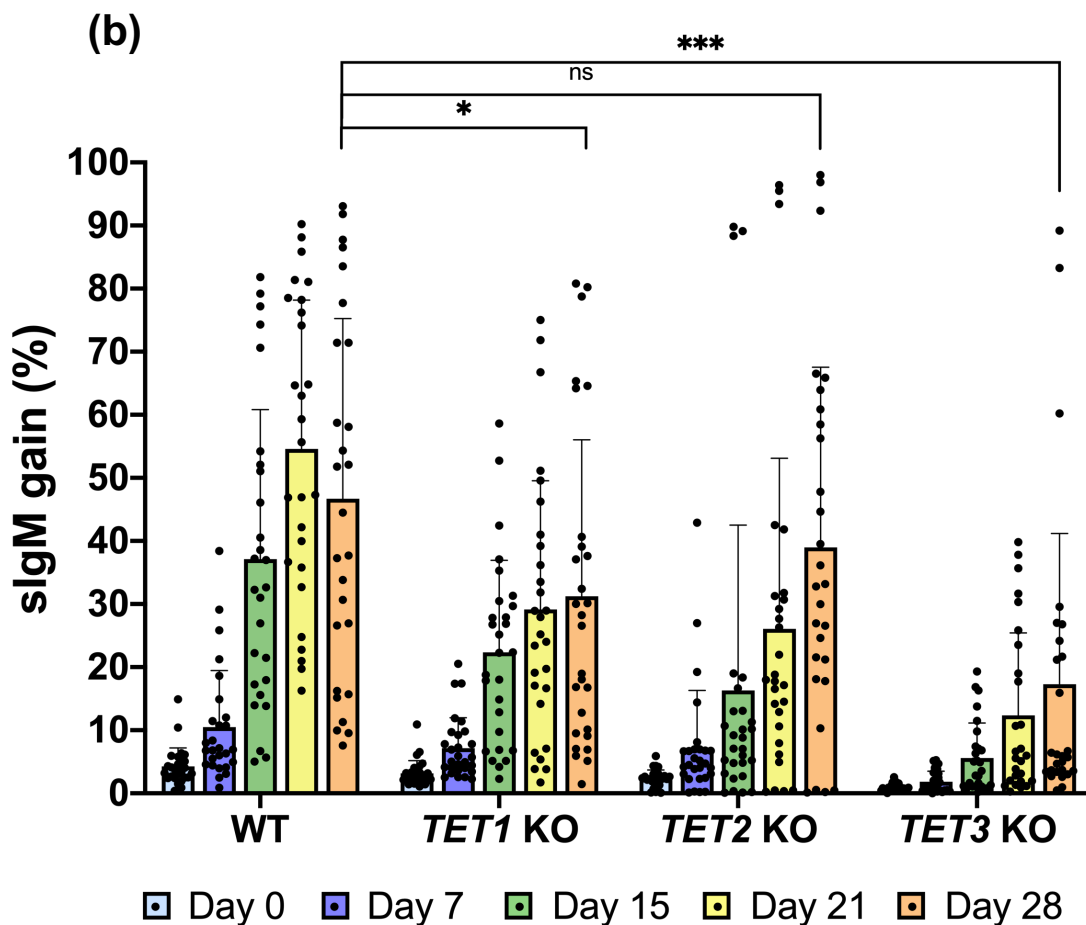


図3-5 単一TETタンパク質欠損株を用いた膜型IgMリバージョンアッセイ (続)
 (b) TSA添加培地における各株のsIgM(+)細胞の割合。TSAはDay 0に添加した。一ヶ月間継代培養を行い、記載の培養日数時に測定を行なった。サブクローン数グラフの表示、使用した検定法は(a)と同じである (ns = not statistically significant ($p > 0.05$)、* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$)。

TSA 非添加時の結果と合わせると、抗体遺伝子多様化の制御において、TET1 が一部の制御に関与すること、そして TET3 がより重要な役割を担うことが強く示唆された。なお、TSA 添加時と TSA 非添加時の結果を比較した場合、野生株と単一 TET 欠損株いずれの場合も、TSA 添加によりリバージョン頻度の平均値が上昇していた（図 3-5 (a)、(b)）。このことは、TET タンパク質の抗体遺伝子多様化への効果が、TSA によるヒストン修飾への影響（ヒストンアセチル化の促進）とは異なる経路によるものであることを示唆している。

3-4-2 野生株および TET3 欠損株における抗体遺伝子座配列解析

前項の通り、膜型 IgM リバージョンアッセイは抗体遺伝子座の多様化レベルを反映しているものの、系としては特定のフレームシフト変異の修復に依存した評価系となっている。そのため、抗体遺伝子座全体の多様化頻度を正確に捉えるには、対象領域の塩基配列解析が必要である。特に、膜型 IgM リバージョンアッセイにより、TET3 欠損株において顕著な sIgM(+)細胞の割合の低下が見られたことから、その多様化レベルの詳細を解析する必要がある。そこで、野生株と TET3 欠損株の抗体軽鎖可変領域に対する塩基配列解析を行なった。なお本解析では抗体軽鎖可変領域遺伝子の exon 1 内部から exon 2 末端（可変領域末端）までの 444 bp を対象とし、野生株では 98 配列、TET3 欠損株では 103 配列の解析を行なった。

野生株と TET3 欠損株における多様化の全体像を図 3-6 (a) に示す。各変異は、培養開始時の配列と比較を行って推定し、さらに遺伝子変換（利用されたと推定される偽遺伝子番号を記載）、遺伝子変換あるいは点変異のいずれかによるもの（Amb: ambiguous）、点変異（PM）、塩基欠失（Del: deletion）、塩基挿入（Ins: insertion）に分類を行った。

まずは野生株と TET3 欠損株での多様化レベルを比較するため、解析領域内に導入された変異イベント数を調べた（図 3-6 (b)）。なお、序章でも述べたように、DT40 細胞における遺伝子変換では、抗体遺伝子可変領域の配列が偽遺伝子配列（複数の変異を有する場合がある）に置換されるため、一度の遺伝子変換（1 イベント）で複数の変異が導入される可能性がある。従って、先行研究に準じて一つの偽遺伝子から来たと考えられる連続した変異は、便宜上 1 回の変異イベントとして計測した（変異数ではなく変異イベント数としているのはそのためである）。

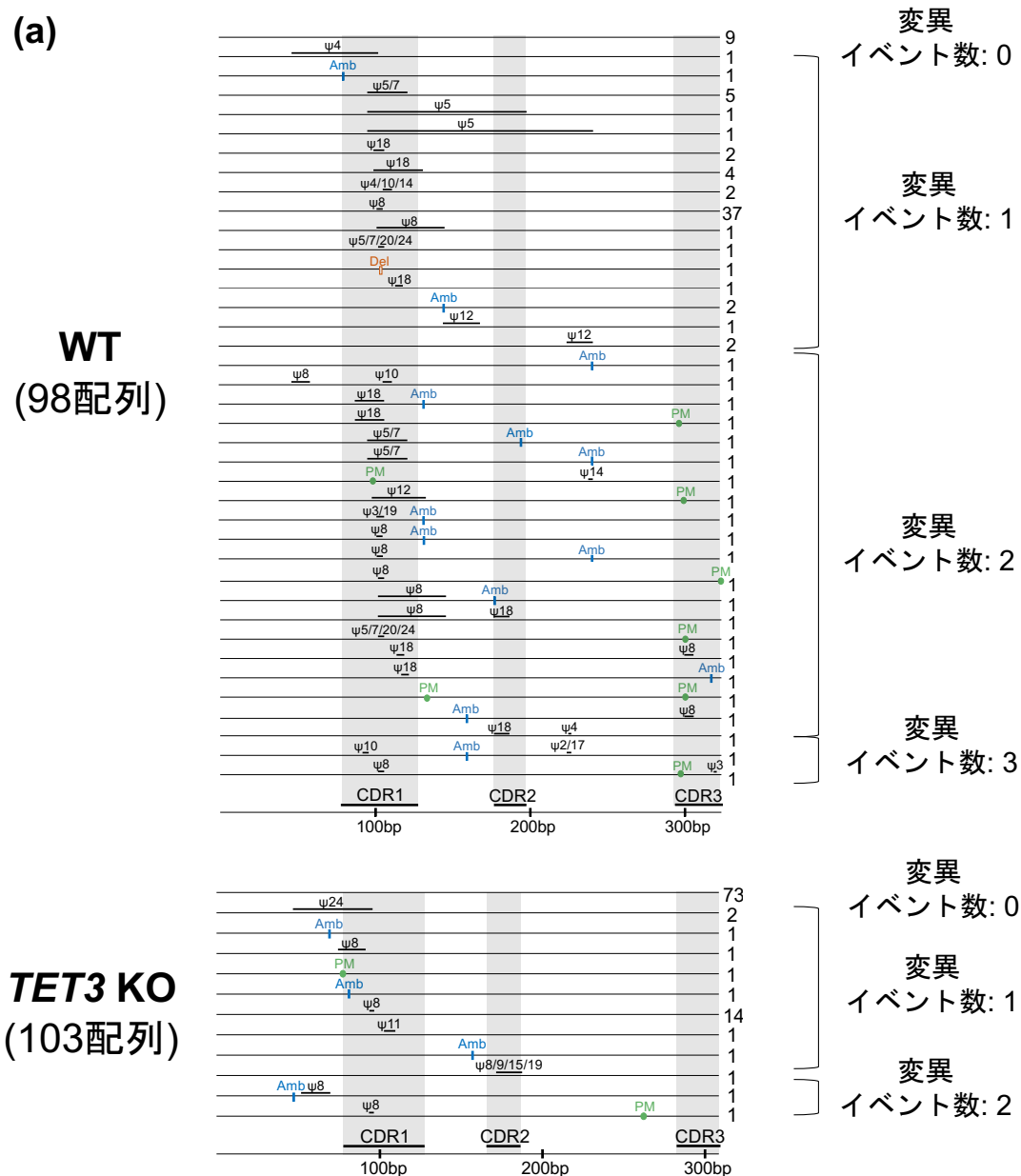


図3-6 野生株およびTET3欠損株における抗体遺伝子座配列解析

(a) 野生株98配列、TET3欠損株103配列における変異の全体像を示す。28日間培養した野生株およびTET3欠損株のゲノムを取得し、抗体軽鎖可変領域exon1内部からexon2末端（可変領域末端）までの444 bpを対象にサンガーシーケンシングを行なった。各直線は一配列を、直線上のバーは、連続する変異が一つの偽遺伝子由来の遺伝子変換と考えられる場合の、最初の変異部位から最後の部位までを示している。推定される偽遺伝子の番号は上に記した。Amb = ambiguous（遺伝子変換および点変異どちらの可能性もある変異）、PM = point mutation（体細胞突然変異による点変異）、Del = deletion（塩基欠失）。

その結果、野生株では 98 配列中、変異イベント数が 0 である配列が 9 配列（全体の約 9.2%）のみであったのに対し、TET3KO 株では 103 配列中 76 配列（約 73.8%）を占めていた。同様に変異イベント数が 1 である配列は、野生株 65 配列（約 66.3%）、TET3KO 株 25 配列（約 24.2%）、変異イベント数が 2 である配列は、野生株 22 配列（約 22.4%）、TET3KO 株 2 配列（約 1.9%）であり、変異イベント数が 3 である配列は野生株にしか確認されなかった（2 配列、約 2.0%）。以上の結果は、膜型 IgM リバージョンアッセイの結果と矛盾しておらず、TET3 欠損株において抗体遺伝子の多様化が顕著に抑制されることを示している。

また、この解析結果を定量的に扱うため、増殖速度の測定で求められた各細胞株の倍化時間をもとに、1 kb・1 細胞分裂あたりの変異イベント頻度を算出した (Romanello, Schiavone, Frey, & Sale, 2016)。その結果、野生株では 0.0300 events/kb・cell division、TET3KO 株では 0.0072 events/kb・cell division（野生株の約 24%程度）であり、統計的にも有意な差が確認された（図 3-6 (c)）。なお、DT40 細胞における変異イベント頻度そのものは、DT40 細胞のクローン（本研究における CL18 株に相当する）によっても異なり、培養条件によっても変わりうるため先行研究と一概に比較することはできない。しなしながら、今回確認された野生株と TET3 欠損株間の差は、先行研究を踏まえると十分に顕著な差を有するものだと考えられる (Budzyńska et al., 2017; Romanello et al., 2016)。具体的な先行研究事例では、転写因子 BACH2 欠損株（DT40 細胞）の表現型を報告した Budzyńska et al. では、欠損株における変異導入頻度は野生株の 2-3 割程度にまで減少し、この場合は AID の発現減少を伴っていた (Budzyńska et al., 2017)。また Romanello et al. が報告したヒストン H3.3 欠損 DT40 細胞では、野生株の約 1/15-20 程度まで減少しており、AID の基質である ssDNA の形成障害を伴っていた (Romanello et al., 2016)。

上述の解析により、TET3 の欠損による配列変化の減少が確実となったため、次にその減少が、特定の変異導入経路を障害しているかどうかを明らかにすべく、野生株と TET3 欠損株の配列変化のスペクトラム（変異の種類とその導入頻度）を比較した（図 3-6 (d)）。野生株 98 配列中に確認された 115 変異イベント、TET3KO 株 103 配列中に確認された 29 変異イベントについて図 3-6 (a) の通りに分類したところ、それぞれが全体の変異数に占める割合は、順に野生株で 76.5 % (GC)、12.2 % (Amb)、9.6 % (PM)、1.7 % (Del)、0 % (Ins)、TET3 欠損株では

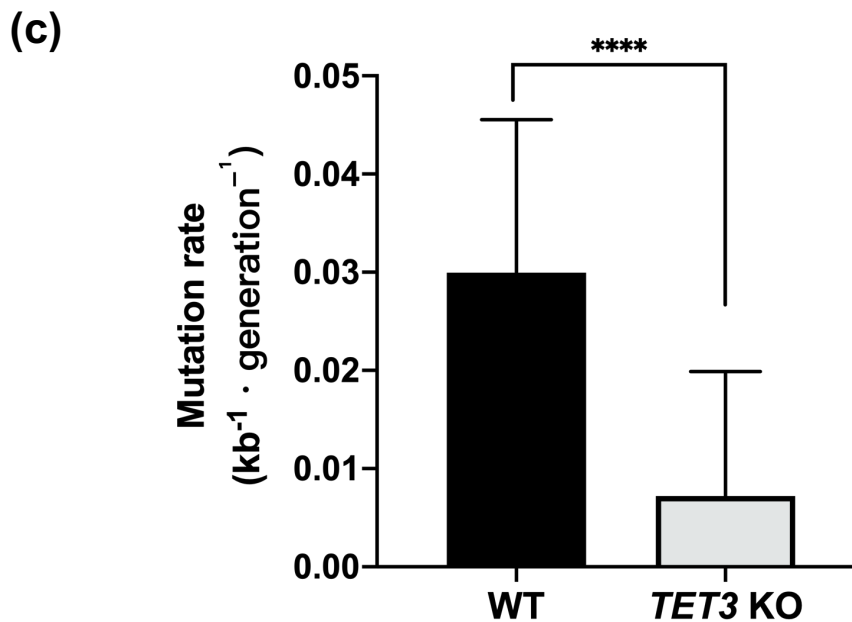
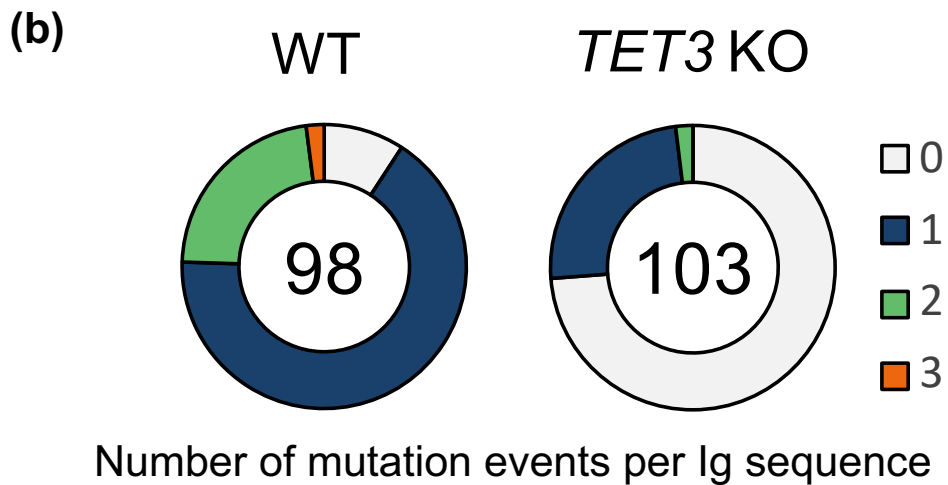


図3-6 野生株およびTET3欠損株における抗体遺伝子座配列解析（続）

(b) 野生株98配列、TET3欠損株103配列を一配列中に確認された変異イベント数で分類した結果を示した。

(c) 増殖速度の解析から求められた倍化時間を元に、一世代、1 kbあたりに導入される変異数を算出した（Mutation rate）。棒グラフは野生株98配列、TET3欠損株103配列の平均値を、エラーバーは標準偏差を示す。検定にはウェルチのt検定を用いた（**** $p < 0.0001$ ）。

75.9 % (GC) 、13.8 % (Amb) 、6.9 % (PM) 、3.5 % (Del) 、0 % (Ins) であった。すなわち、野生株と TET3 欠損株の間で、スペクトラム上の大きな違いは確認されなかった。なお、この遺伝子変換が優勢な変異スペクトラムは、CL18 株の表現型として先行研究とも合致している (Budzyńska et al., 2017; Kitao et al., 2008; Kurosawa et al., 2010)。

以上を総合すると、TET3 欠損は配列変化のスペクトラムに影響を与えないと結論づけることができる。先の変異イベント数の解析結果と合わせると、TET3 欠損株では変異スペクトラムを維持したまま、抗体遺伝子多様化の頻度が全般的に減少したと考えられる。このことは TET3 が、(DNA 切断反応を誘起すると考えられる) AID によるシトシン脱アミノ化以降の DNA 修復や変異導入経路 (Abe, Branzei, & Hirota, 2018) の制御に関与しているのではなく、そのさらに上流の段階での制御に関与している可能性を示唆している。

3-4-3 野生株と TET3 欠損株の遺伝子変換に用いられた偽遺伝子の比較

前項において確認されたように、野生株と同様に TET3 欠損株も、抗体遺伝子多様化機構として遺伝子変換を主に利用していることには変わりはない。しかし、もし遺伝子変換の初期段階で TET3 が関与している場合、鋳型として用いられる偽遺伝子の使われ方に影響が生じている可能性がある。

そこで次に、野生株と TET3 欠損株の遺伝子変換における各偽遺伝子の利用度を比較することにした (図 3-6(e))。多様化後の各クローンについて、抗体遺伝子座の配列解析を行い、偽遺伝子の利用頻度を調べたところ、TET3 欠損株では利用される偽遺伝子の多様性が著しく減少していることが明らかとなった。具体的に、野生株において遺伝子変換に使われた可能性があると考えられる偽遺伝子は 14 種類 ($\psi 3$ 、 $\psi 4$ 、 $\psi 5$ 、 $\psi 7$ 、 $\psi 8$ 、 $\psi 10$ 、 $\psi 12$ 、 $\psi 13$ 、 $\psi 14$ 、 $\psi 17$ 、 $\psi 18$ 、 $\psi 19$ 、 $\psi 20$ 、 $\psi 24$) であったのに対し、TET3 欠損株では 3 種類 ($\psi 8$ 、 $\psi 11$ 、 $\psi 24$) のみであった。このことは、野生株の偽遺伝子領域が、部位により選好性はあるものの、ほぼ全域 ($\psi 3$ - $\psi 24$) に渡って遺伝子変換に利用することが可能であったのに対し、TET3 欠損株では、ごく限られた偽遺伝子しか利用できなかった可能性を示唆している。

(d)

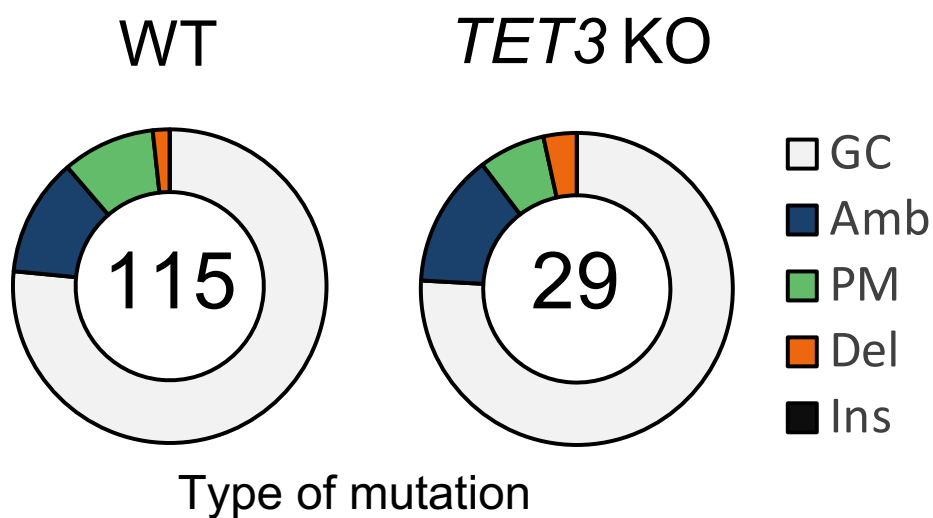


図3-6 野生株およびTET3欠損株における抗体遺伝子座配列解析（続）
(d) 野生株98配列、TET3欠損株103配列中に確認された全変異イベントにおける各変異種の割合を示した。GC = 遺伝子変換、Amb、PM、Delは(a)に記載の通り、Ins = Insertion（挿入）。ただし、野生株およびTET3欠損株にて遺伝子変換以外の塩基挿入は確認されなかった。

(e)

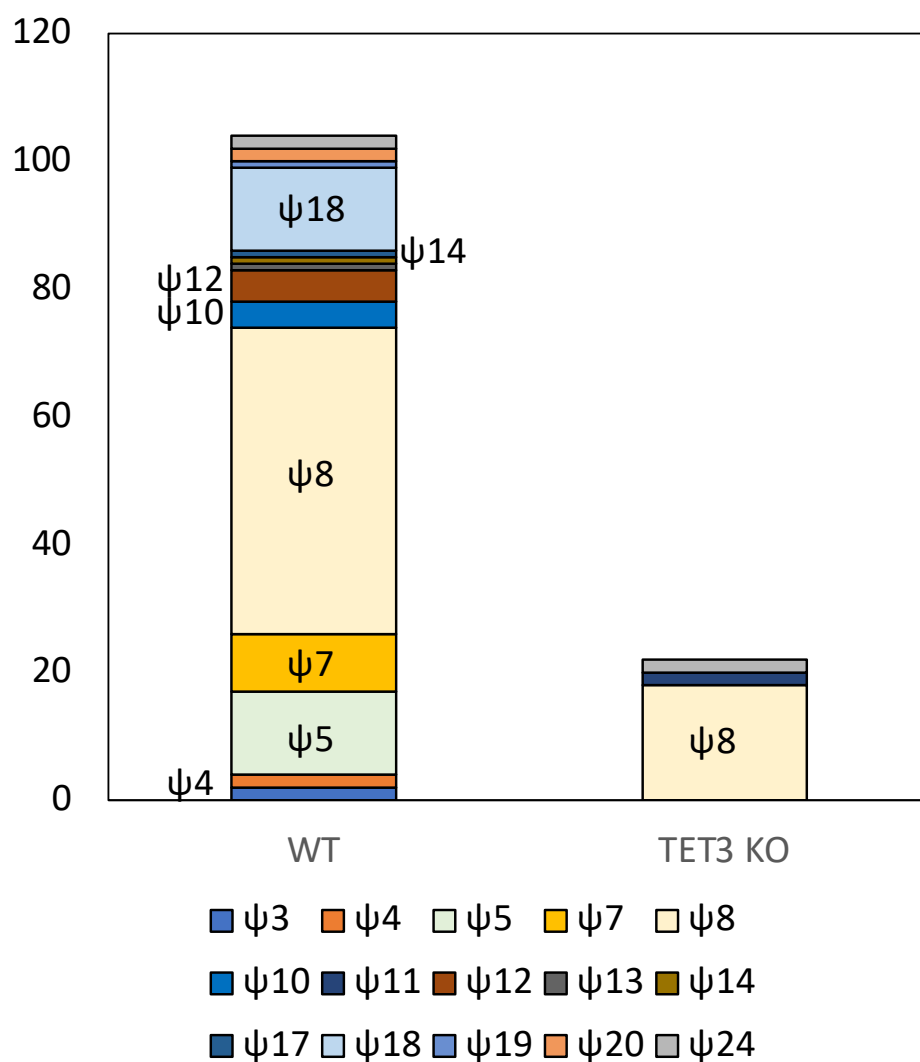


図3-6 野生株およびTET3欠損株における抗体遺伝子座配列解析（続）

(e) 野生株およびTET3欠損株において利用されたと推定される偽遺伝子の頻度を示した（偽遺伝子の同定は第2章 材料と方法を参照）。

3-5 単一 TET タンパク質の 5mC 酸化能の評価

3-5-1 単一 TET タンパク質欠損株における 5hmC 量の測定

前項の抗体遺伝子多様化における表現型の解析から、TET3 が抗体遺伝子多様化機構の上流に関与していること、そして偽遺伝子領域の利用度を調節している可能性が示唆された。序論でも述べたように、抗体遺伝子の多様化は、抗体遺伝子座を含めた多様化関連領域のアクセシビリティにより制御されることが示されている (Cummings, Bednarski, & Maizels, 2008; Cummings et al., 2007; Seo et al., 2005)。そこで、TET3 が、シトシン脱メチル化を介してゲノム領域のアクセシビリティを調整することで抗体遺伝子多様化に関与する可能性を検討するべく、各 TET タンパク質による 5mC の酸化反応を評価することにした。

野生株と単一 TET タンパク質欠損株から抽出したゲノムに対して、抗 5hmC 抗体を用いてドットプロット解析を行ったところ、TET1 欠損株では明確な差は見られなかったものの、TET2 欠損株では軽微な、そして TET3 欠損株では顕著なシグナル強度の低下が見られた (図 3-7 (a))。またこの結果について ImageJ を用いて定量すると、TET1 欠損株および TET2 欠損株で野生株と比して約 15-20%程度のシグナル強度の上昇および減少が見られたが、TET3 欠損株においては約 50%の減少が見られた (図 3-7 (b))。この結果は、DT40 細胞のゲノム全体の 5mC の酸化反応において、TET3 が主要な役割を担う可能性を示している。さらに、5hmC が 5mC の酸化産物であることから、TET3 欠損株において、野生株とは異なるメチル化状態になっていることも示唆された。

3-5-2 TET3 による 5mC 酸化能の評価

前項の欠損株の解析から、TET3 が、DT40 細胞における 5mC から 5hmC への酸化反応に寄与することが示された。しかしながら、ニワトリの TET タンパク質の機能に関する報告は限られている (PubMed 2020 年 11 月現在)。そこで、DT40 における TET3 の 5mC 酸化能をより直接評価すべく、ニワトリ TET3 (chTET3) cDNA を導入した TET3 過剰発現株を作製し、その株における 5hmC 量を定量した。

過剰発現株の作製は、レトロウイルスベクターを用いて行なった (第2章 材料と方法)。TET3 cDNA 発現カセットおよびその下流に GFP 発現カセットを搭載したレトロウイルスベクタープラスミドを作製し、パッケージングベクタープラス

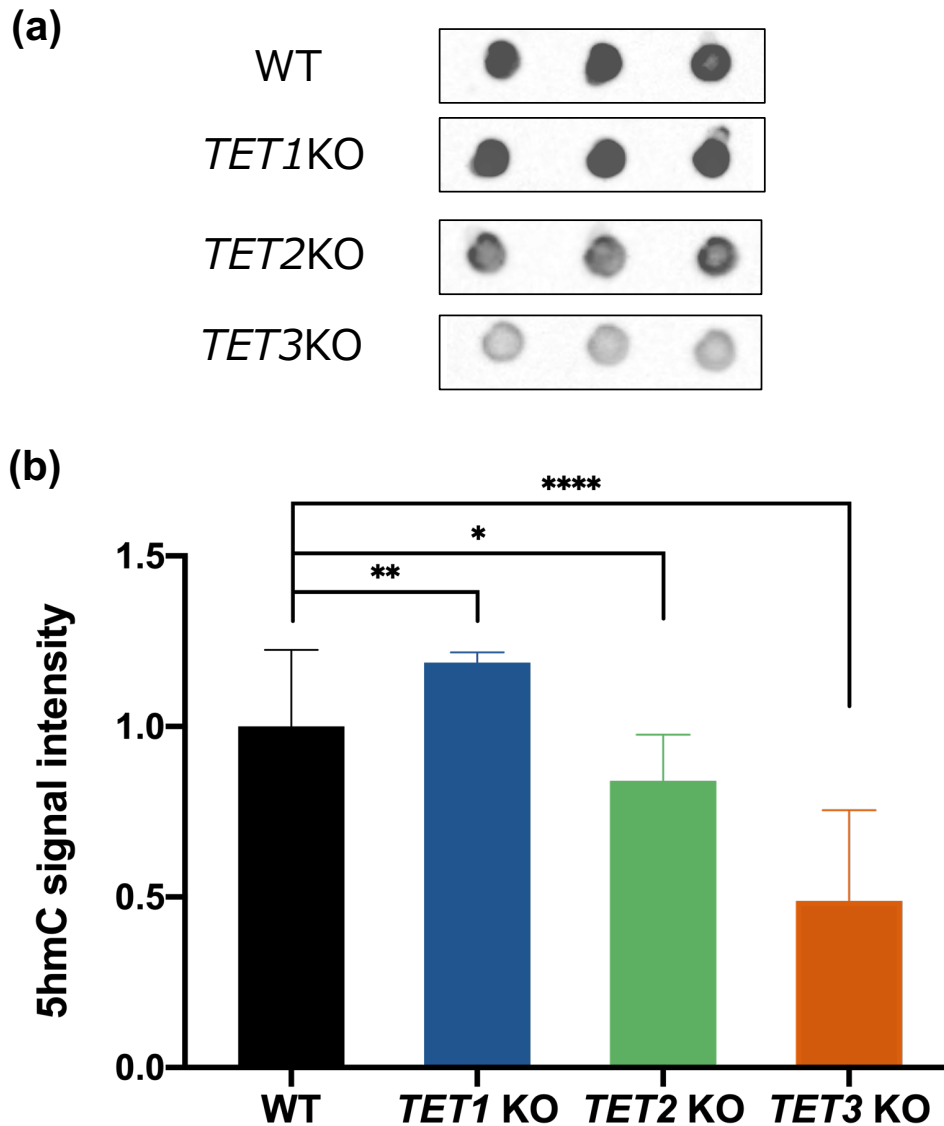


図3-7 単一TETタンパク質欠損株における5hmC量

- (a) 野生株各欠損株から取得したゲノムDNAに対し、抗5hmC抗体を用いたドットブロット解析を行なった。各スポット25 ngのDNAを含むように調整した。5hmCのシグナルは、HRP標識2次抗体で抗5hmC抗体を染色したのち、ECL系 (enhanced-chemiluminescence)を用いて測定した。
- (b) 上記のドットブロット解析の結果を、ImageJを用いて定量した。棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を表す (野生株 $n = 6$ 、*TET1*欠損株 $n = 3$ 、*TET2*欠損株 $n = 6$ 、*TET3*欠損株 $n = 9$)。検定にはウェルチのt検定を用いた (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、**** $p < 0.0001$)。

ミドと共に HEK293 細胞にコトランスフェクションした。HEK293 細胞のウイルスベクターの発現は蛍光顕微鏡で確認し、その培養上清（ウイルスを含む）を用いて、野生株に対してウイルス感染を介した chTET3 cDNA の導入を行なった。GFP 発現細胞をシングルセルソートし（図 3-8 (a)）、拡大培養したのち、RT-qPCR によって chTET3 mRNA を定量したところ（図 3-8 (b)）、解析した 4 株のうち、WT+chTET3-2 でのみ、TET3 の過剰発現が認められた（野生株の約 7 倍）。

これらの株から抽出したゲノム DNA に対して、抗 5hmC 抗体を用いたドットブロットを行なった（図 3-9）。RT-qPCR の結果と一致して、TET3 を過剰発現している WT+chTET3-2 のみ、5hmC シグナル強度の増加が見られた。この結果より、ニワトリ TET3 が確かに 5mC を 5hmC に酸化する能力をもつことが示された。

一方、これらの株由来のゲノム DNA に対して、抗 5mC 抗体を用いてドットブロットを行なった。その結果、WT+chTET3-2 ではゲノム DNA 全体のメチル化シトシンの低下は見られず、TET3 の過剰発現が観察できなかった株（WT+chTET3-3 および WT+chTET3-4）同様に、相対的に強い 5mC シグナルが得られた（図 3-10）。この結果は、WT+chTET3-2 において 5mC の酸化亢進が生じたにもかかわらず、ゲノム全体の DNA メチル化レベルには顕著な影響を及ぼさないことを示す。このような 5hmC と 5mC のレベルの非連動性は先行研究においても示されている。また、このような非連動性は、先行研究においてゲノム中の 5mC と 5hmC の濃度の違いからも説明されている (Charlton et al., 2020; Dawlaty et al., 2013)。

3-5-3 TET3 過剰発現株における抗体遺伝子多様化

3-4 項にて TET3 が抗体遺伝子多様化に寄与することが示され、さらに 3-5-1 では TET3 過剰発現株における酸化作用の亢進が見られたことから、過剰 TET3 に誘導された脱メチル化により、抗体遺伝子多様化が促進される可能性を検討することにした。

シングルセルソーティング後、21 日間培養した野生株（WT-1）および WT+chTET3-2 の抗体遺伝子座の配列解析を行ったところ、両株間で配列多様化レベルに大きな差がないことが示された（図 3-11 (a)）。変異イベント数を数えても、野生株と WT+chTET3-2 では同程度であった（図 3-11 (b)）。なおこの結果が、TET3 の過剰発現による増殖速度の変化の影響を受けていないことは、両株の増殖

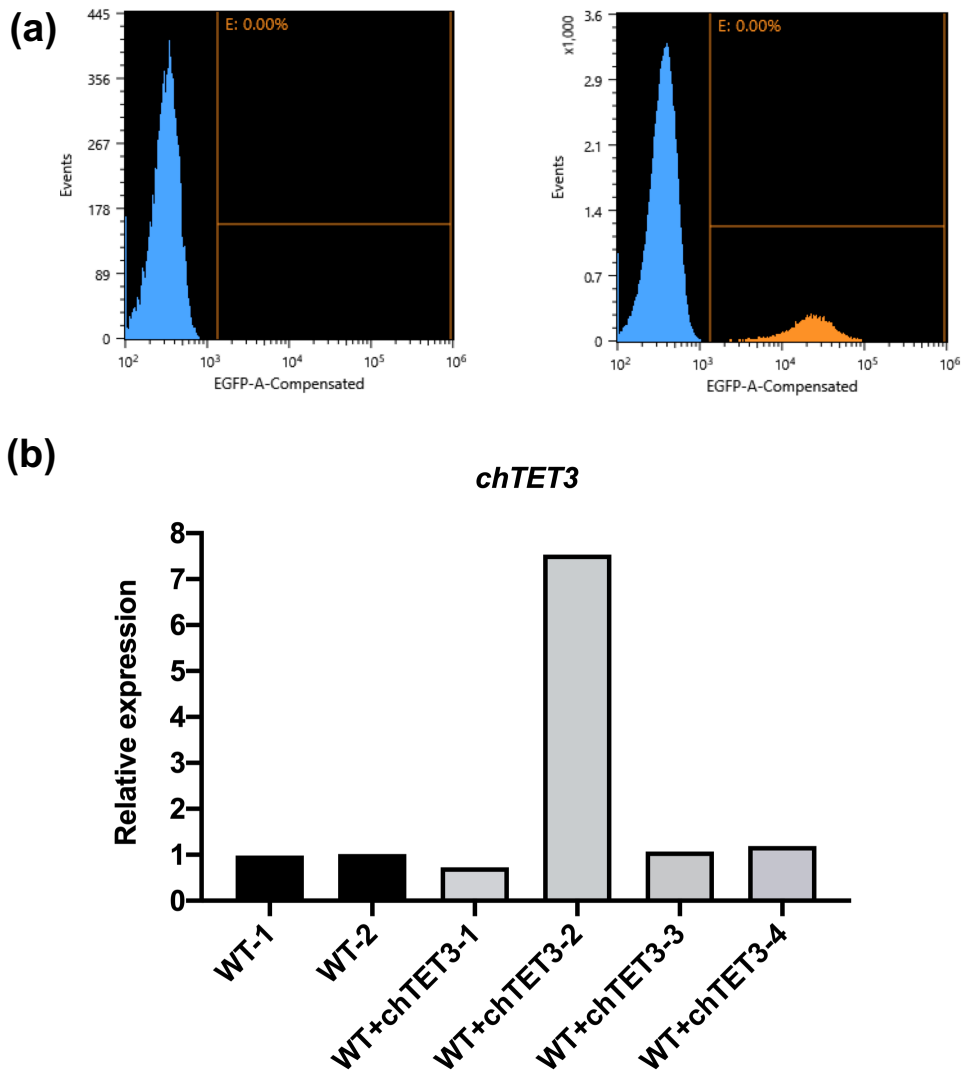


図3-8 TET3過剰発現株の作製

- (a) ウイルスベクターのトランスフェクションが成功したHEK293細胞の培養上清を添加して、ウイルスに感染させたDT40細胞をフローサイトメーターで解析した様子。ウイルスに感染して *TET3* cDNAが導入されるとGFPを発現する。縦軸が細胞数、横軸がGFPの発現シグナルを示している。(左) コントロール、(右) ウイルス感染DT40細胞。GFPを発現している細胞をシングルソーティングして後続の実験に使用した。
- (b) シングルソーティングした野生株 (WT-1、WT-2) およびGFP発現細胞 (WT+chTET3-1 – 4) を拡大培養後、RNAを取得し *TET3* mRNA量を定量した (RT-qPCR)。WT+chTET3-1 – 4はいずれもGFPを発現していたが、*TET3* を過剰発現していたのはWT+chTET3-2のみであった。

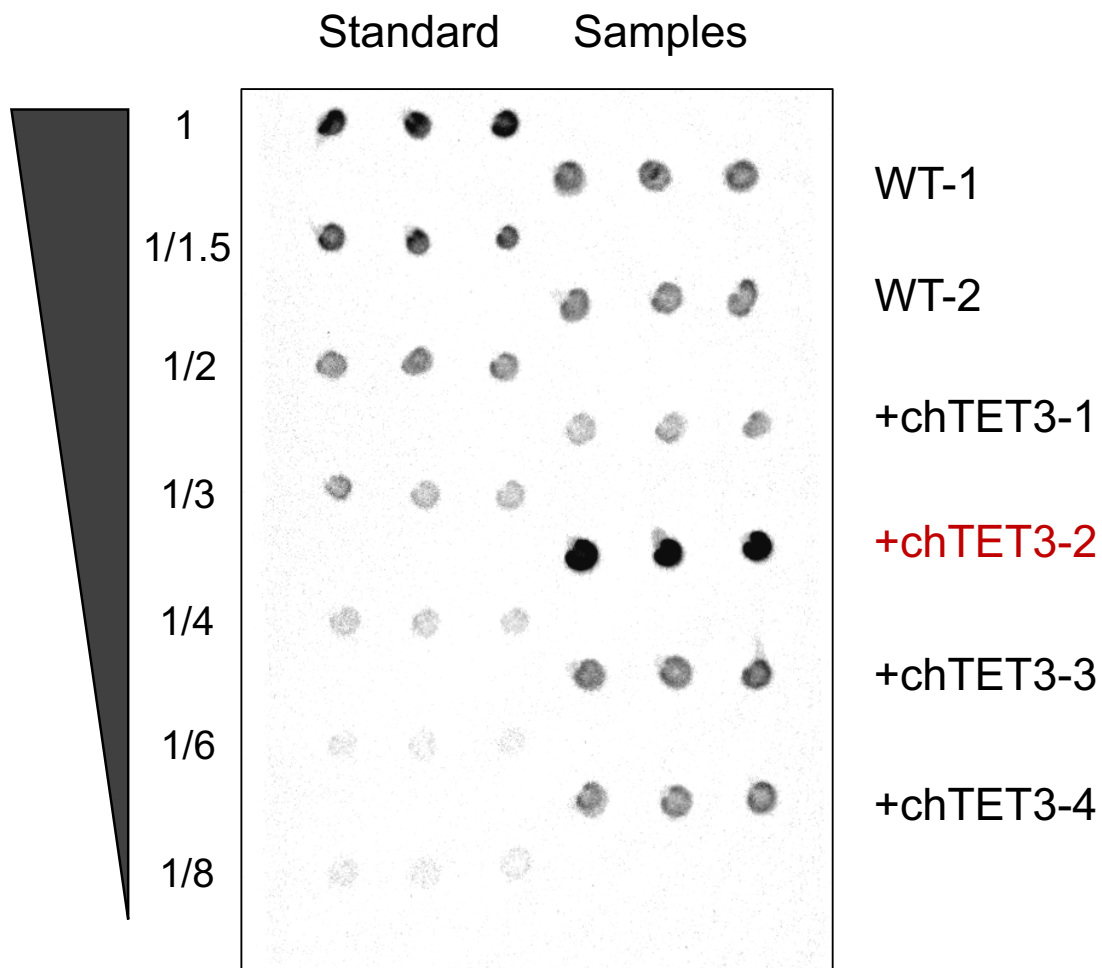


図3-9 TET3過剰発現株における5hmC量

前述のRT-qPCRを行なった6株（野生株2株、GFP発現細胞4株）に関して、図3-6と同様に抗5hmC抗体を用いたドットブロットを行なった。左3列は段階希釈を行なったスタンダード、右3列は枠外に記載した各細胞株由来のゲノムDNAのスポット（各25 ng dsDNA）である。RT-qPCRにおいてTET3の過剰発現が確認されたWT+chTET3-2のみで5hmCシグナルの上昇が確認された。

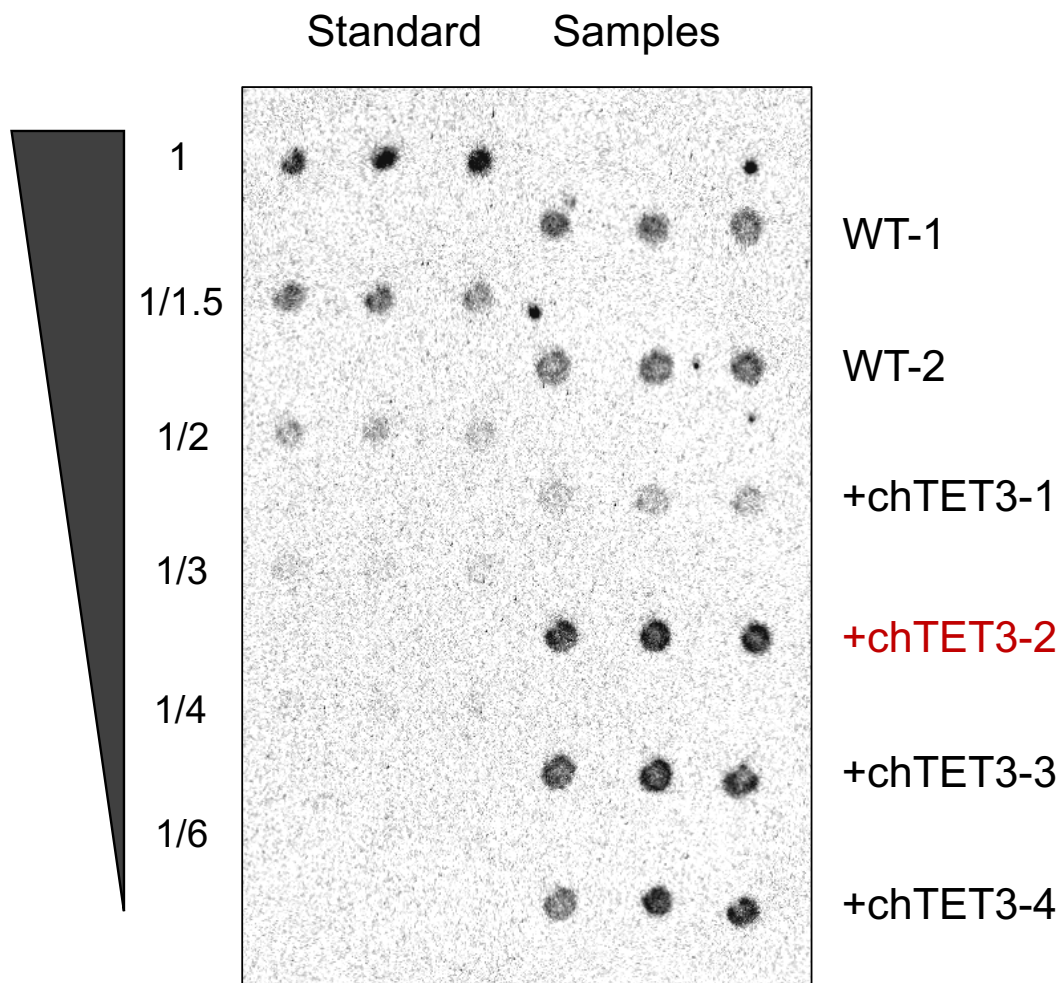


図3-10 TET3過剰発株における5mC量

前述のRT-qPCRを行なった6株（野生株2株、GFP発現細胞4株）に関して、抗5mC抗体を用いたドットブロットを行なった。左3列は段階希釈を行なったスタンダード、右3列は枠外に記載した各細胞株由来のゲノムDNAのスポット（各25 ng dsDNA）である。WT+chTET3-2ではゲノム全体の5hmC量が増加していたが、全体的な5mC量の低下を引き起こさなかった。

速度が同程度であったことから確認されている（図 3-11 (c)）。この結果は、TET3 が正常な遺伝子変換の維持に必要なではあるものの、変異導入そのものを促進するものではないことを示している。3-4-2 項の結果も踏まえると、TET3 は遺伝子変換の発生段階において、単に反応効率に影響するような形で関与しているのではなく、別種の初期段階の制御に寄与することが推測される。

3-5-4 単一 TET タンパク質欠損株における DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMTs) の発現量測定

3-5-2 項において、TET タンパク質の脱メチル化の亢進が、必ずしも全般的なメチル化レベルの変化を引き起こさないことを述べたが、ゲノム全体のメチル化パターンは、DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMTs) と TET タンパク質が競合することによって実現されることがわかってきている (Charlton et al., 2020; Ginno et al., 2020)。そこで、単一 TET タンパク質欠損株におけるメチル化レベルが、DNMTs の発現変動に影響を受けているかを調べるため、DNMTs の mRNA レベルを RT-qPCR により測定した（図 3-12）。

まず *DNMT1* の発現量について、TET3 欠損株において、野生株と比較して、ごくわずかではあるものの統計的に有意な上昇が確認された（図 3-12 (a)）。しかしながら、その増加は野生株に対して 1.18 倍であり、この差が生理的な違いを引き起こすとは考えにくい。特に、統計的に有意でないながら、上昇傾向を示している TET2 株（野生株比 平均 1.17 倍）において、増膜型 IgM リバージョンアッセイでは野生株から大きく異なった表現型は確認されなかった（図 3-5）。したがって、少なくともこの *DNMT1* の発現量の差が、抗体遺伝子多様化制御機構に影響を与えた可能性は低いと考えられる。

また *DNMT3A* の発現量については、野生株と各欠損株において有意な発現量の変動は確認されなかった（図 3-12 (b)）。したがって、単一 TET タンパク質欠損株におけるメチル化レベルの変化は、各 TET タンパク質の欠損によるものとして判断できることが示された。

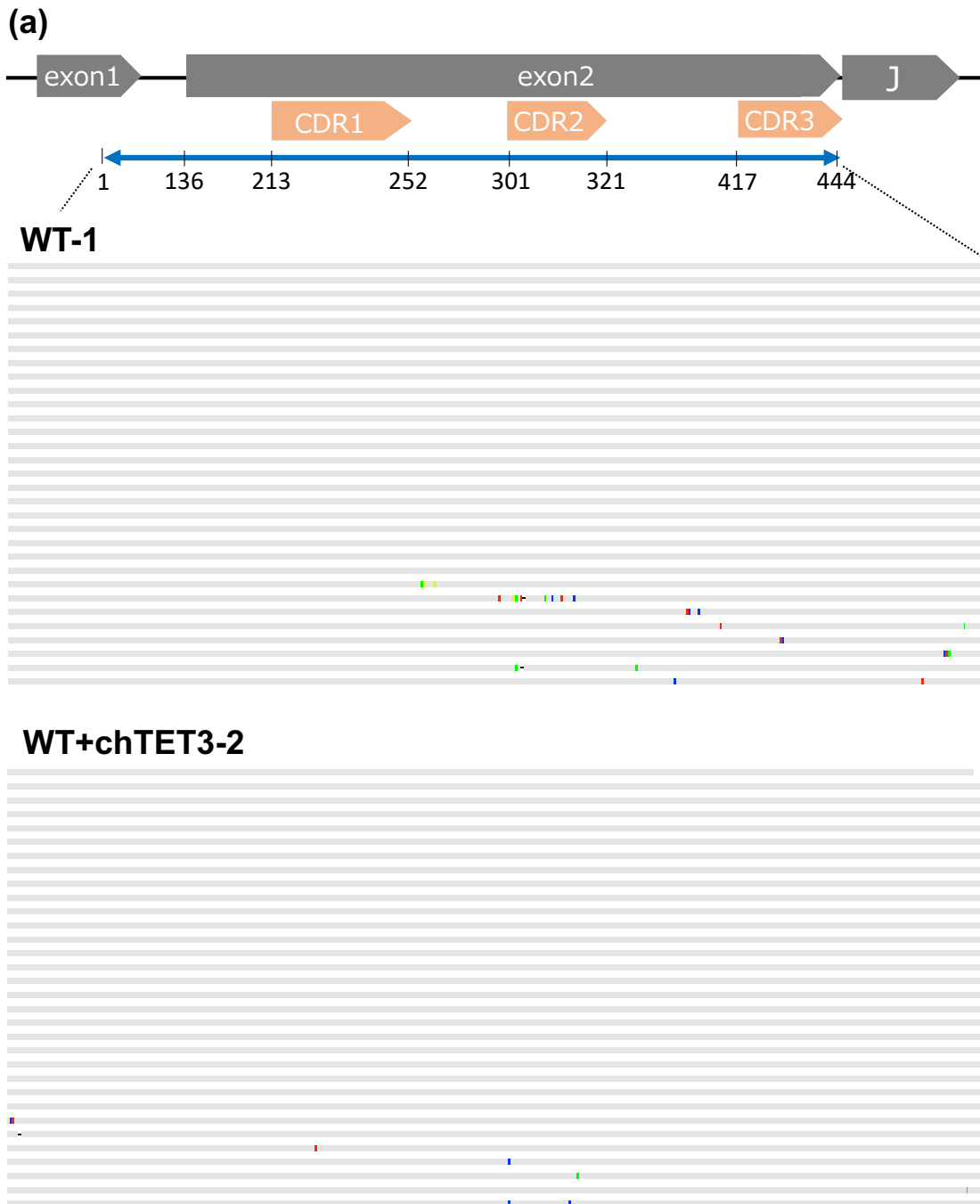
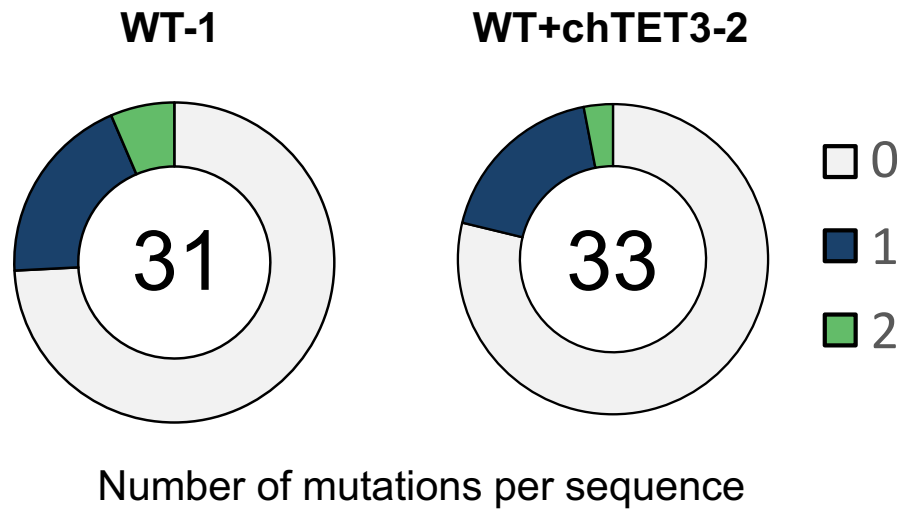


図3-11 TET3過剰発現株における抗体遺伝子多様化

(a) 野生株31配列、TET3過剰発現株33配列における抗体遺伝子座の配列変化の全体像。21日間培養した野生株およびTET3過剰発現株のゲノムを取得し、抗体軽鎖可変領域exon1内部からexon2末端（可変領域末端）までの444 bpを対象にサンガーシーケンシングを行なった。色がついている塩基が変異導入部位。

(b)



(c)

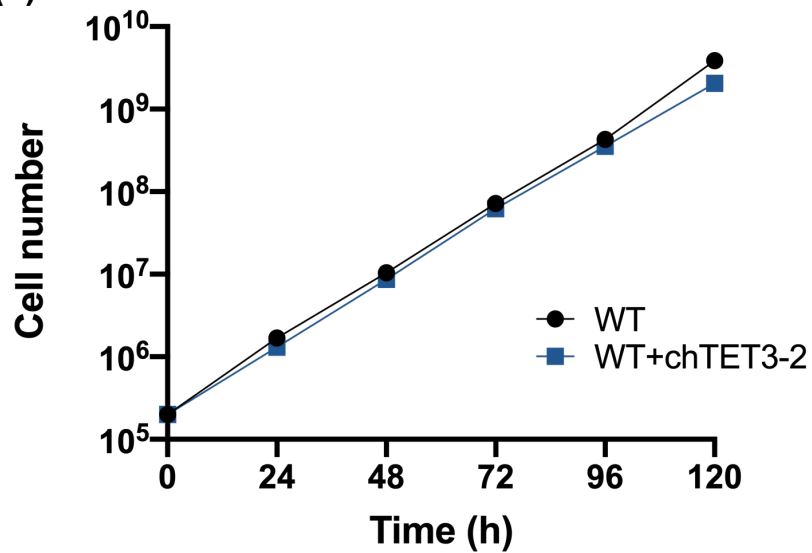


図3-11 TET3過剰発現株における抗体遺伝子多様化 (続)

(b) 野生株31配列、TET3過剰発現株33配列を一配列中に確認された変異イベント数で分類した結果を示した。

(c) 野生株およびTET3過剰発現株の増殖速度。培養液1 mlあたりの細胞数を24時間ごとに7日間測定した結果を示す。

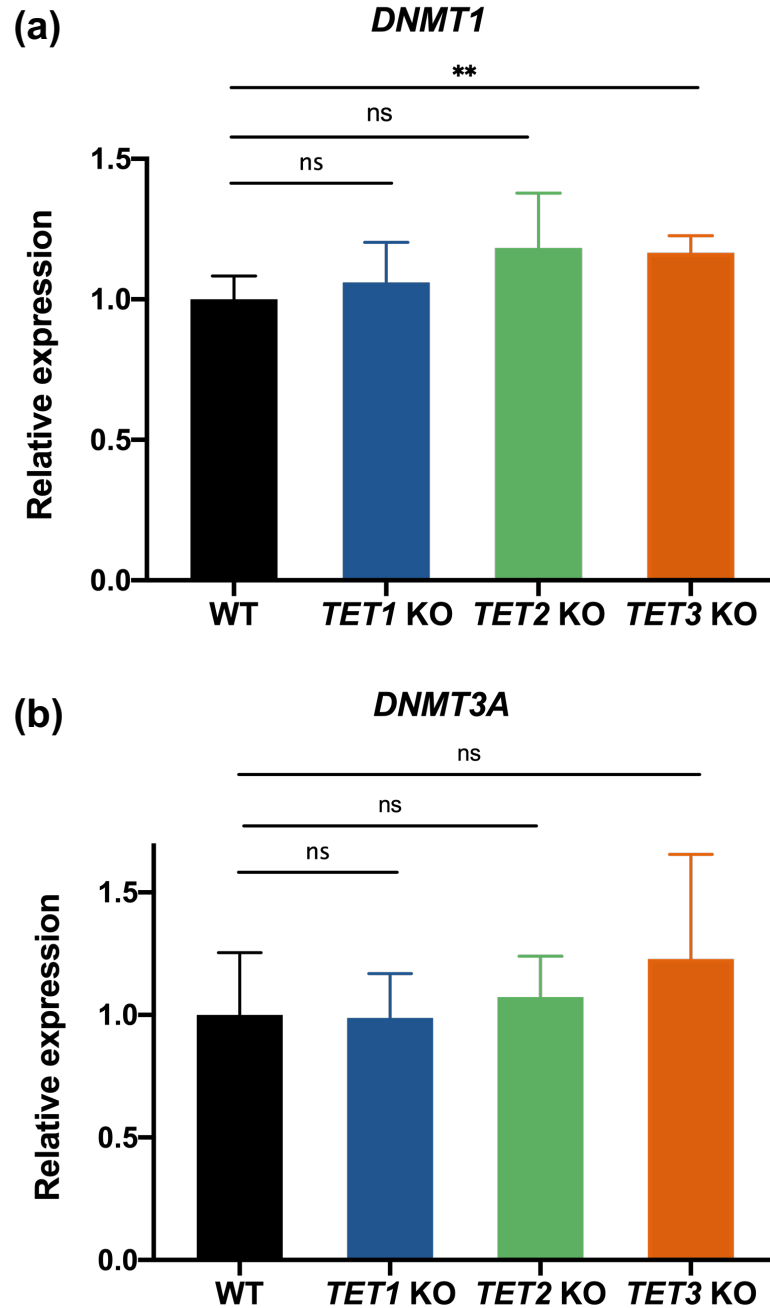


図3-12 野生株と単一TETタンパク質欠損株におけるDNMTsの発現量
 (a) 各株の*DNMT1*のmRNA量をRT-qPCRで定量した。棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を示す（野生株 $n = 4$ 、TET1欠損株 $n = 3$ 、TET2欠損株 $n = 3$ 、TET3欠損株 $n = 3$ ）。検定にはウェルチのt検定を用いた（ns: $p > 0.05$ 、** $p < 0.01$ ）。
 (b) 各株の*DNMT3A*のmRNA量をRT-qPCRで定量した。グラフの表示、サンプル数、検定法は(a)と同じである。

3-6 抗体遺伝子多様化制御領域におけるメチル化レベルの評価

前項の結果より、TET3 の酸化作用によってもたらされる脱メチル化は、ゲノム全体ではなく部位特異的に生じる可能性が示唆された。このような、TET タンパク質依存的な脱メチル化反応における領域特異性は過去にも報告されている (Charlton et al., 2020; Verma et al., 2018)。そこで、TET3 が抗体遺伝子多様化機構の制御領域におけるメチル化に関与することで、多様化を調節している可能性を検討することにした。

3-6-1 抗体軽鎖可変領域における変異分布とメチル化パターン解析

既に述べたように、抗体遺伝子の多様化は、AID が抗体遺伝子座のシトシンを脱アミノ化（ウラシルへ変換）することで開始すると考えられている。加えて、シトシンがメチル化されている場合、AID によるシトシンへの触媒作用が低下することが報告されていることから (Nabel et al., 2012)、TET3 欠損によるゲノム領域特異的な影響を検討する上で、まず抗体遺伝子座を解析対象とした。

野生株と TET3 欠損株における抗体遺伝子座に導入された変異の分布とその頻度をまとめると、図 3-13 の通りであった。これにより、野生株において、CDR1 内の解析領域 230 bp 付近に変異導入のピークがあることがわかる。またこのピークは、野生株に比べて緩やかではあるものの、TET3 欠損株においても共通して確認されており、 $\psi 8$ による遺伝子変換に由来すると考えられる。さらに、野生株においては CDR1 領域より頻度は少ないながら、CDR2 および CDR3 領域にも変異導入が確認された。一方、TET3 欠損株においては、CDR2 および CDR3 領域にはほとんど変異が生じていなかった。この結果は、野生株内でも抗体遺伝子座の部位によって変異の入りやすさがあること、また TET3 欠損株では、領域全体にわたり変異が入りづらくなっていることを示している。なお、CDR1 領域における変異導入頻度の高さは、本研究室の先行研究においても確認されていることから (Lin et al., 2008)、野生株に共通する表現型だと考えられる。

このような変異の分布がシトシンのメチル化と連関している可能性を調べるため、抗体軽鎖可変領域に対してバイサルファイトシーケンシングを行ない、領域内のメチル化シトシンを同定した（図 3-14）。その結果、野生株および TET3 欠損

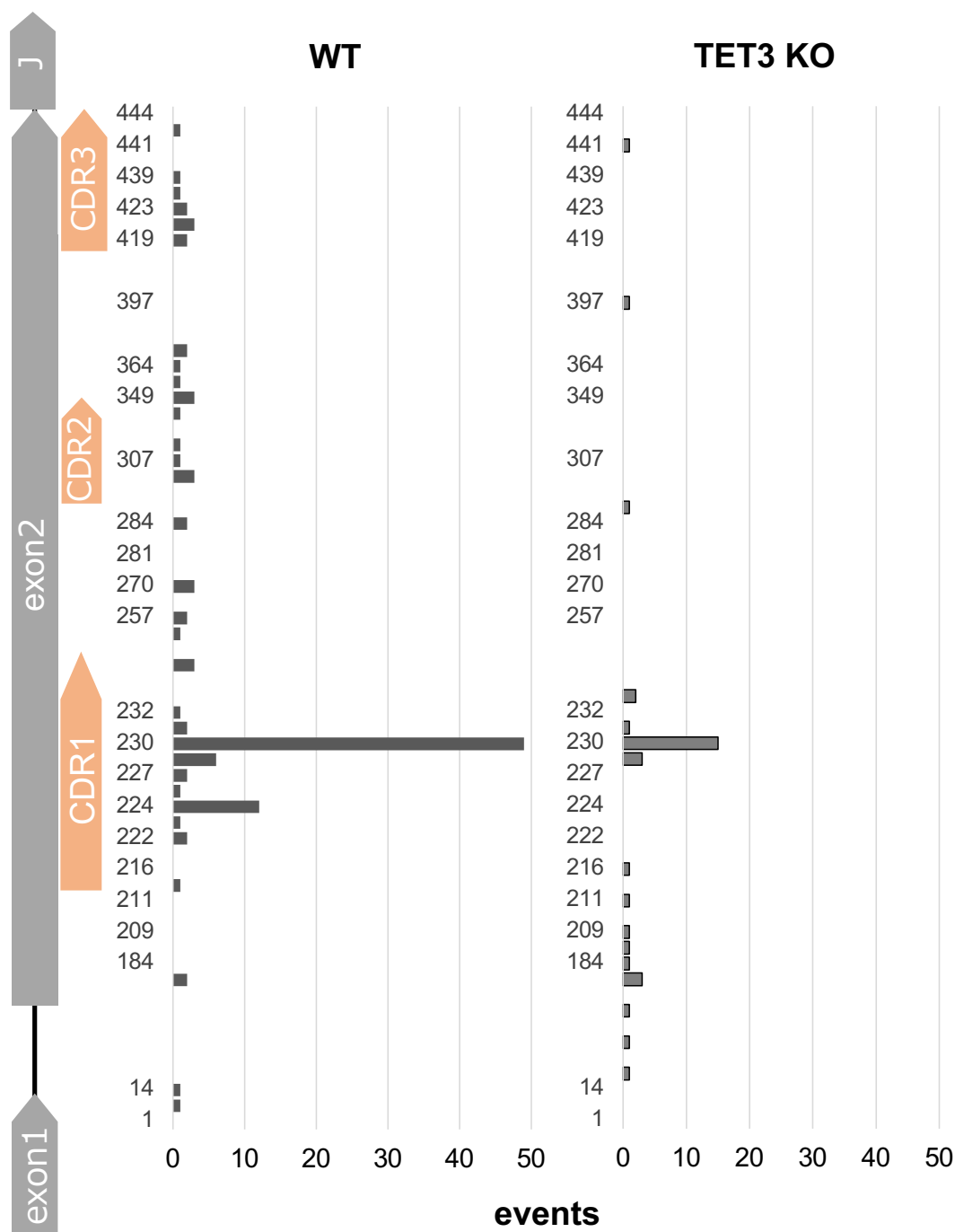


図3-13 野生株とTET3欠損株の抗体遺伝子座における変異の分布と頻度
 28日間の培養中に導入された変異について、その部位と頻度をまとめた。
 なお遺伝子変換によると推定される変異については、一連の変異の5'端
 にある変異部位を便宜上の導入部位としている。

株のいずれにおいても、解析領域においてシトシンのメチル化はほぼ起きておらず、部位特異的なメチル化を確認することはできなかった（図 3-14 (a)）。

次項以降の他領域での解析結果と比較するため、抗体遺伝子座の解析領域内の全シトシン中のメチル化シトシンの割合（mC/C(%)）を算出すると、野生株では平均 2.18 %（中央値 0%）、TET3 欠損株では平均 2.51%（中央値 1.19%）メチル化していた。なお、ここでの平均値および中央値とは、シーケンシングを行なった各配列におけるメチル化の割合を算出した上での、全解析配列の平均値および中央値を指している（図 3-14 (b)）。

さらに、TET タンパク質は主に CpG 配列中のシトシンを標的とすることから (Hu et al., 2013; Ravichandran, Jurkowska, & Jurkowski, 2018)、領域中のシトシン（全 85 個）を CpG 内（以降、CpG シトシンと呼ぶ）あるいは非 CpG（non-CpG）内（以降、非 CpG シトシンと呼ぶ）に分類したところ、CpG シトシンのメチル化割合は、野生株で平均 4.52%（中央値 0.00%）、TET3 欠損株で平均 4.37%（中央値 0.00%）、非 CpG シトシンでは、野生株で平均 1.81%（中央値 0.00%）、TET3 欠損株で平均 2.24%（中央値 1.35 %）であった（図 3-14 (c) – (e)）。

ここで、全シトシン中のメチル化割合と、非 CpG シトシン中のメチル化割合について、野生株と TET3 欠損株間の差は統計的に有意であったが、いずれもメチル化割合はごく小さく、生理的な違いを引き起こしてはいないと考えられた。また、この 2 郡の差のみが有意であった（CpG シトシンのメチル化割合では、野生株と TET3 欠損株の間に有意な差が見られなかった）のは、非 CpG シトシンが領域中のシトシンの大半を占め（73 個、85.9%）、その影響が全体のメチル化割合にも反映されたためだと考えられる。以上の結果より、TET3 欠損による抗体遺伝子多様化頻度の減少は、抗体遺伝子座のメチル化パターンの変化を介したものでないことが示された。

3-6-2 DIVAC 配列におけるメチル化パターン解析

3-4-2 における解析より、TET3 欠損株においては、抗体遺伝子の多様化が全般的に障害されていることが示唆された。しかし前項の結果より、その変化は抗体遺伝子座のメチル化を介したものではなかった。序論でも述べたように、AID の抗体遺伝子軽鎖可変領域へのターゲティングは、抗体軽鎖定常領域下流に存在する

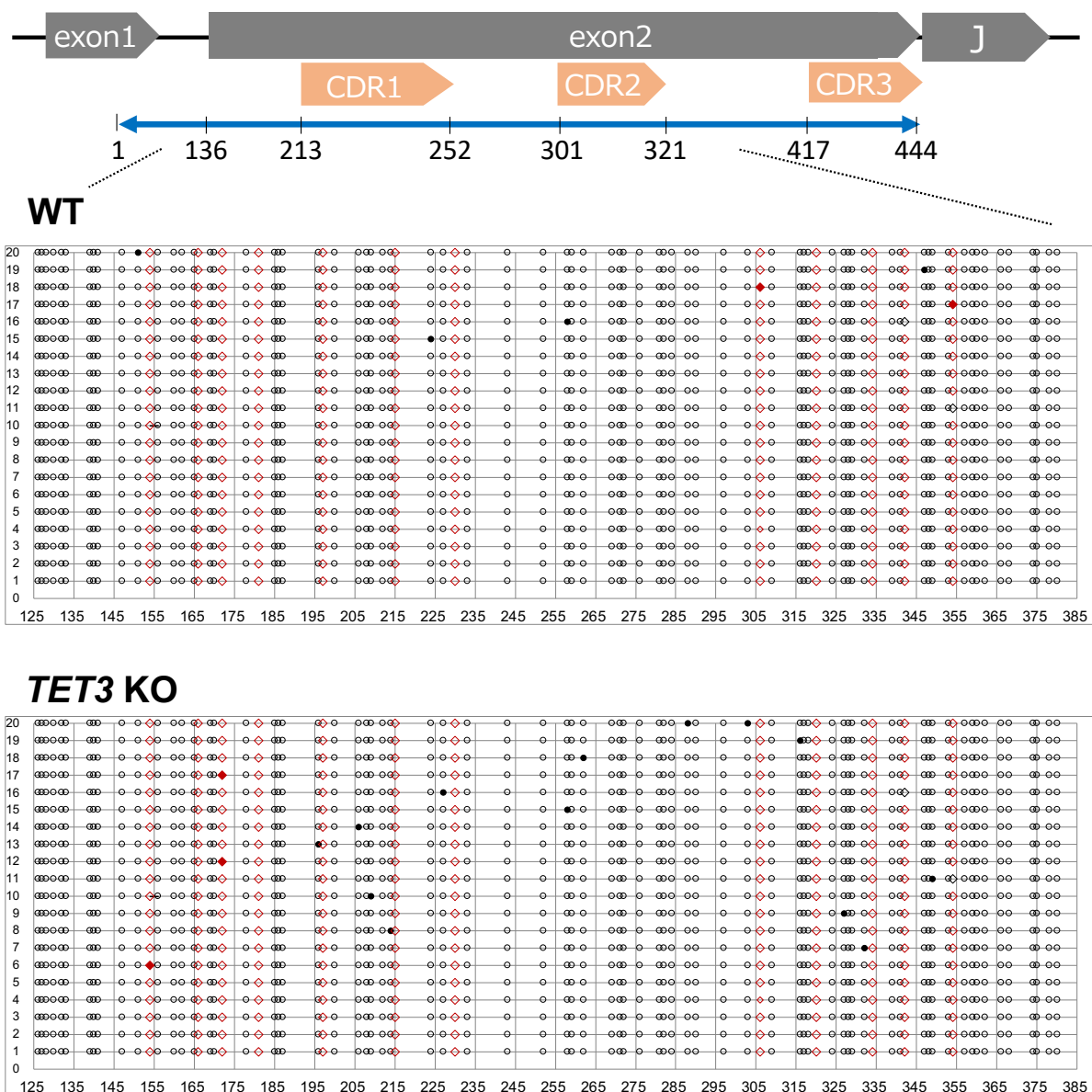


図3-14 野生株およびTET3欠損株の抗体遺伝子座のメチル化パターン比較

(a) 各株における抗体遺伝子座のメチル化パターンの模式図。解析配列の内、領域全体のメチル化レベルが中央値の最近傍にある20配列の結果を示している。配列中のCpGシトシンを赤い四角、非CpGシトシンを黒丸で表し、メチルシトシンは塗りつぶしで表現している。

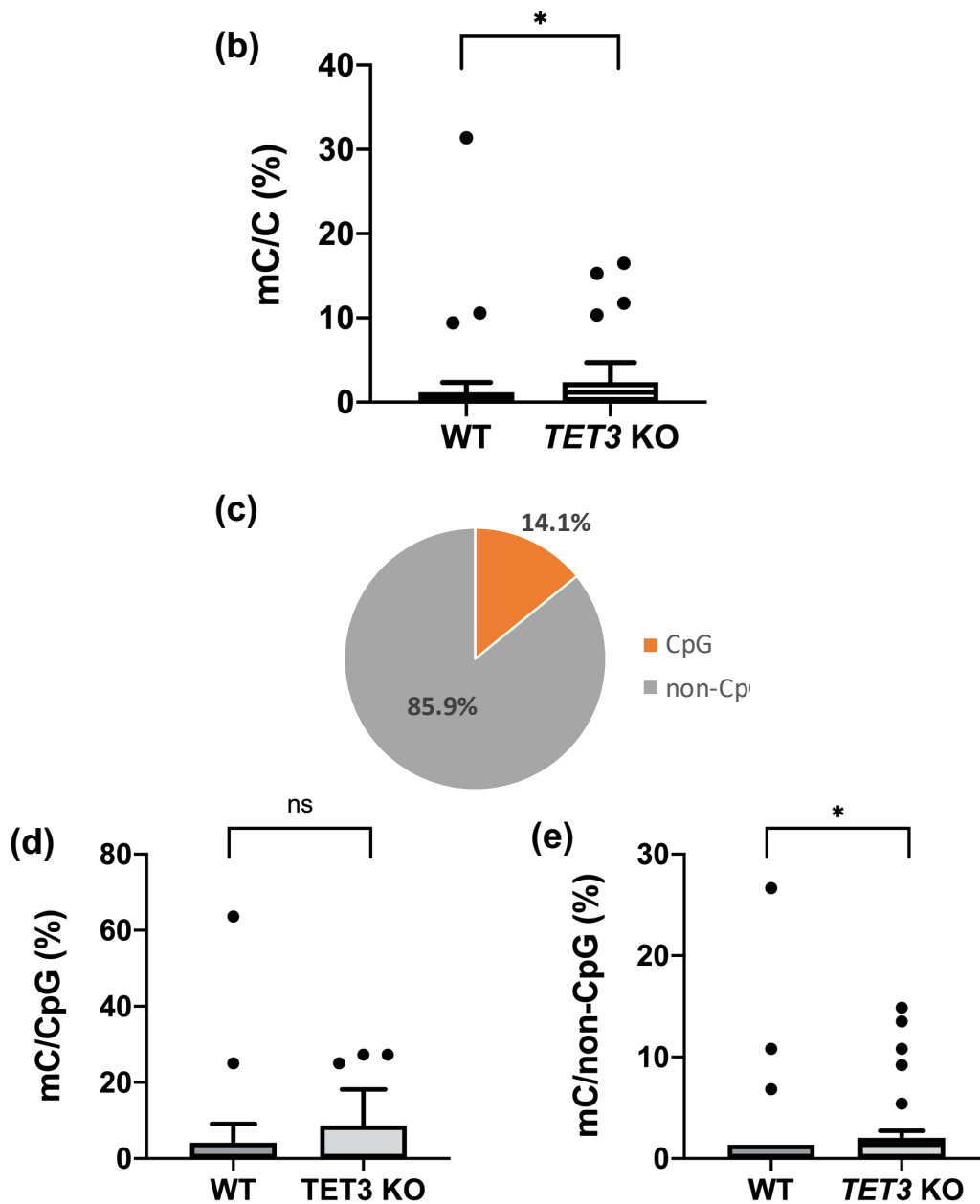


図3-14 野生株とTET3欠損株の抗体遺伝子座のメチル化パターン (続)

(b) 領域中の全シトシンのメチル化割合。箱ひげ図はTukey法による箱ひげ図 (野生株 $n = 29$ 、TET3欠損株 $n = 37$)。検定にはマン・ウィットニー検定を用いた。

(c) 領域中のCpGシトシンと非CpGシトシンの割合。

(d) 領域中のCpGシトシンのメチル化割合。表記および検定は(b)に同じ。

(e) 領域中の非CpGシトシンのメチル化割合。表記および検定は(b)に同じ。

DIVAC 配列に依存することが先行研究にて示されている (Blagodatski et al., 2009; Kohler et al., 2012)。また、TET タンパク質による脱メチル化は、特にエンハンサー領域を対象とすることも報告されている (Charlton et al., 2020; Ginno et al., 2020; Hon et al., 2014; Lu, Liu, Jiang, Yamaguchi, & Zhang, 2014)。そこで、DIVAC 配列の中でも抗体軽鎖遺伝子のエンハンサー領域内に存在する DIVAC 配列コア領域 (Kohler et al., 2012) に関してバイサルファイトシーケンシングを行い、当該領域のメチル化の変化が、AID のターゲティングを障害している可能性を検討することにした。

その結果を図 3-15 に示す。領域全体のシトシンに関して、TET3 欠損株にて有意なメチル化レベルの上昇が見られたが、抗体遺伝子座と同様に、その程度は両株においても低かった (野生株 平均値 0.49% (中央値 0.00%)、TET3 欠損株 平均値 2.00% (中央値 0.97%)) (図 3-15 (a))。加えて、CpG シトシンと非 CpG シトシンに分けて評価したところ (図 3-15 (b))、CpG シトシンと非 CpG シトシンの両方において、TET3 欠損株におけるメチル化の亢進が確認されたが、非 CpG 配列における差の方が顕著であった (図 3-15 (c)、(d))。具体的には、CpG シトシンでは野生株において平均 0.56% (中央値 0.00%)、TET3 欠損株では平均 2.64% (0.00%) のメチル化が見られたのに対して、非 CpG シトシンでは野生株にて平均 0.48% (中央値 0.00%)、TET3 欠損株にて平均 1.88% (中央値 1.14%) のメチル化が確認された。しかし、野生株と TET3 欠損株に共通してメチル化レベルは低く、両株間の差が、TET3 欠損株に見られたような顕著な抗体遺伝子多様化の減少を引き起こすとは考えにくい。以上より、TET3 による DIVAC 配列のメチル化を介した抗体遺伝子多様化制御は起きていないと考えられる。

3-6-3 偽遺伝子領域におけるメチル化パターン解析

前二項により、TET3 欠損の帰結として抗体遺伝子座および DIVAC 配列のメチル化が亢進することはないことが示された。ここで、3-4-2 および 3-4-3 の結果より、TET3 欠損株において遺伝子変換は優位であるもののその頻度が大きく減少し、さらに偽遺伝子の利用度も低下している可能性が示されたことに着目した。この点を踏まえて次に、TET3 の欠損が偽遺伝子領域のメチル化状態に及ぼす影響を評価し、それが抗体遺伝子多様化を調節する可能性を検討することにした。

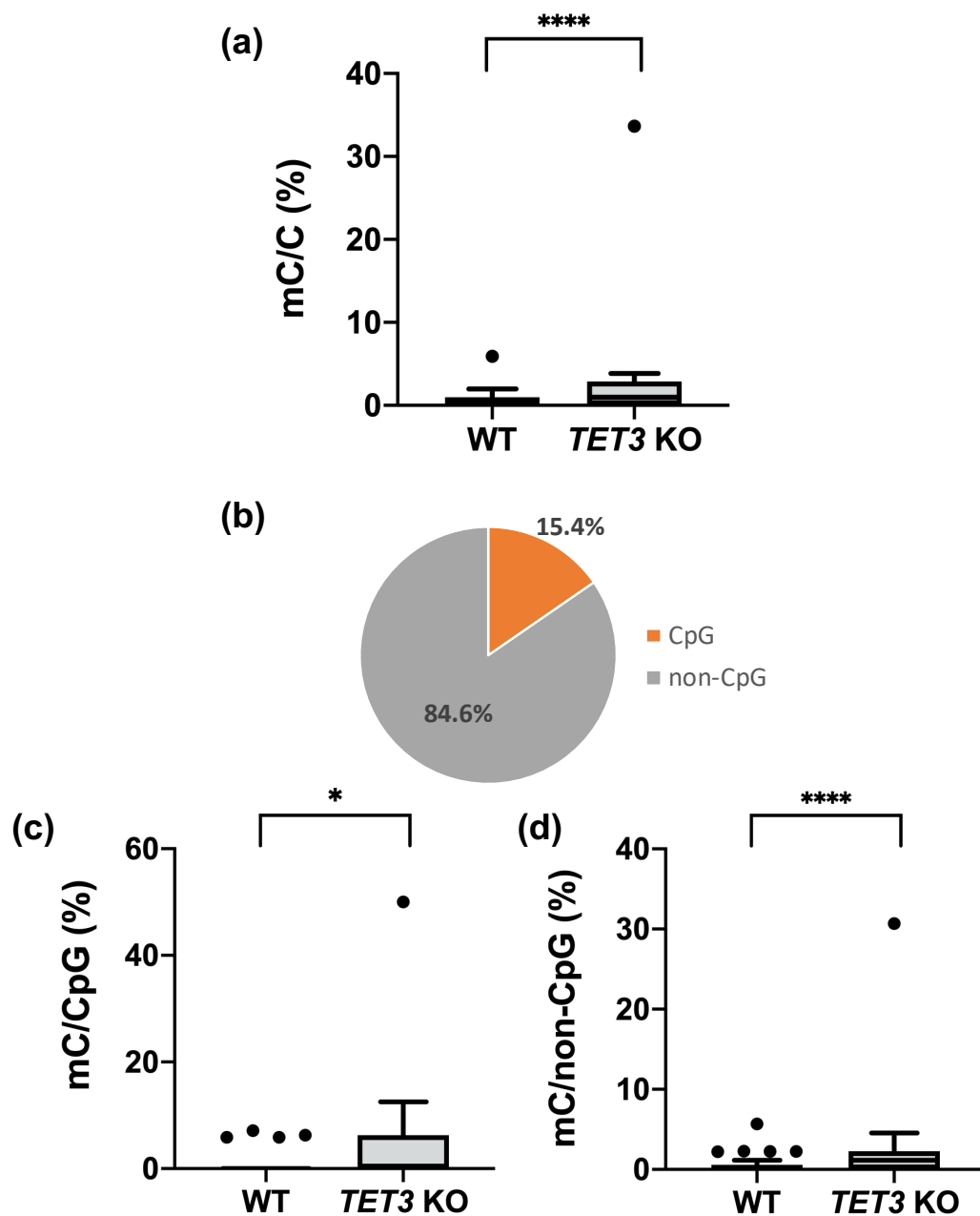


図3-15 野生株とTET3欠損株のDIVAC領域のメチル化パターン

(a) 領域中の全シトシンのメチル化割合。箱ひげ図はTukey法による箱ひげ図（野生株 $n = 45$ 、TET3欠損株 $n = 55$ ）。検定にはMann-Whitneyの検定を用いた。

(b) 領域中のCpGシトシンと非CpGシトシンの割合。

(c) 領域中のCpGシトシンのメチル化割合。表記および検定は(a)に同じ。

(d) 領域中の非CpGシトシンのメチル化割合。表記および検定は(a)に同じ。

3-6-3 (A) 偽遺伝子の利用頻度の制御要因

ここで改めて整理すると、考察対象は3つの要素、「遺伝子変換」「偽遺伝子領域のメチル化」「TET3」を含み、検討したい可能性は(1) TET3 が偽遺伝子領域のメチル化を制御し、(2) メチル化された偽遺伝子を用いた遺伝子変換が減少する、という2段階から成り立っている。しかし留意しなければならないのは、野生株において既に偽遺伝子の利用頻度に差があるということである(図3-6(e))。すなわち、TET3 の関与を検討しながら偽遺伝子のメチル化と利用頻度を対応させる上で、野生株に既に存在する偽遺伝子の選好性を考慮する必要がある。

野生株における偽遺伝子の利用度について、遺伝子変換の分子機構は、相同組換えと多くを共有しており、それは相同組換え関連因子の欠損により遺伝子変換も障害されることから支持されている(Tang & Martin, 2007)。そして相同組換えと同様に、鋳型となる偽遺伝子と抗体遺伝子座の相同性が、遺伝子変換の起こりやすさを考える上で重要な指標であることが先行研究で指摘されてきた(Arakawa & Buerstedde, 2004; McCormack & Thompson, 1990; Sayegh, Drury, & Ratcliffe, 1999)。

ただし、遺伝子変換に寄与する相同性の種類には議論の余地がある。特に偽遺伝子と抗体遺伝子座間での5'側の相同性(positional homology)が重要である一方で、各偽遺伝子領域全体との相同性は、相対的に評価されてこなかった(McCormack & Thompson, 1990)。しかしながら、例えば3-4-3の解析結果において、野生株の抗体遺伝子座98配列中、46配列(約46.9%)で利用されたと考えられる $\psi 8$ は、抗体遺伝子座との間に300bpの相同部位があり、それは $\psi 8$ と抗体遺伝子座のアラインメント長(330bp)の90.9%を占め、高い相同性を持つ。そこで、野生株における偽遺伝子の選好性の要因を把握するべく、各偽遺伝子と抗体遺伝子座との相同性を調べ、実際に遺伝子変換に利用された頻度と比較することにした。

図3-16は、各偽遺伝子全長と抗体遺伝子座間の相同性の程度をまとめたものである。図3-16(a)には抗体遺伝子座に対して各偽遺伝子の全長をマッピングした様子を示し、図3-16(b)には、各々の偽遺伝子と抗体遺伝子座をペアワイズアラインメントした際の、アラインメント長およびそれに対する相同部位塩基数を示している。これより、先述した $\psi 8$ 以外については、 $\psi 4$ (相同部位287bp、Pairwise identity 83.7%)、 $\psi 5$ (同291bp、85.6%)、 $\psi 10$ (同278bp、84.2%)、 $\psi 11$ (同293

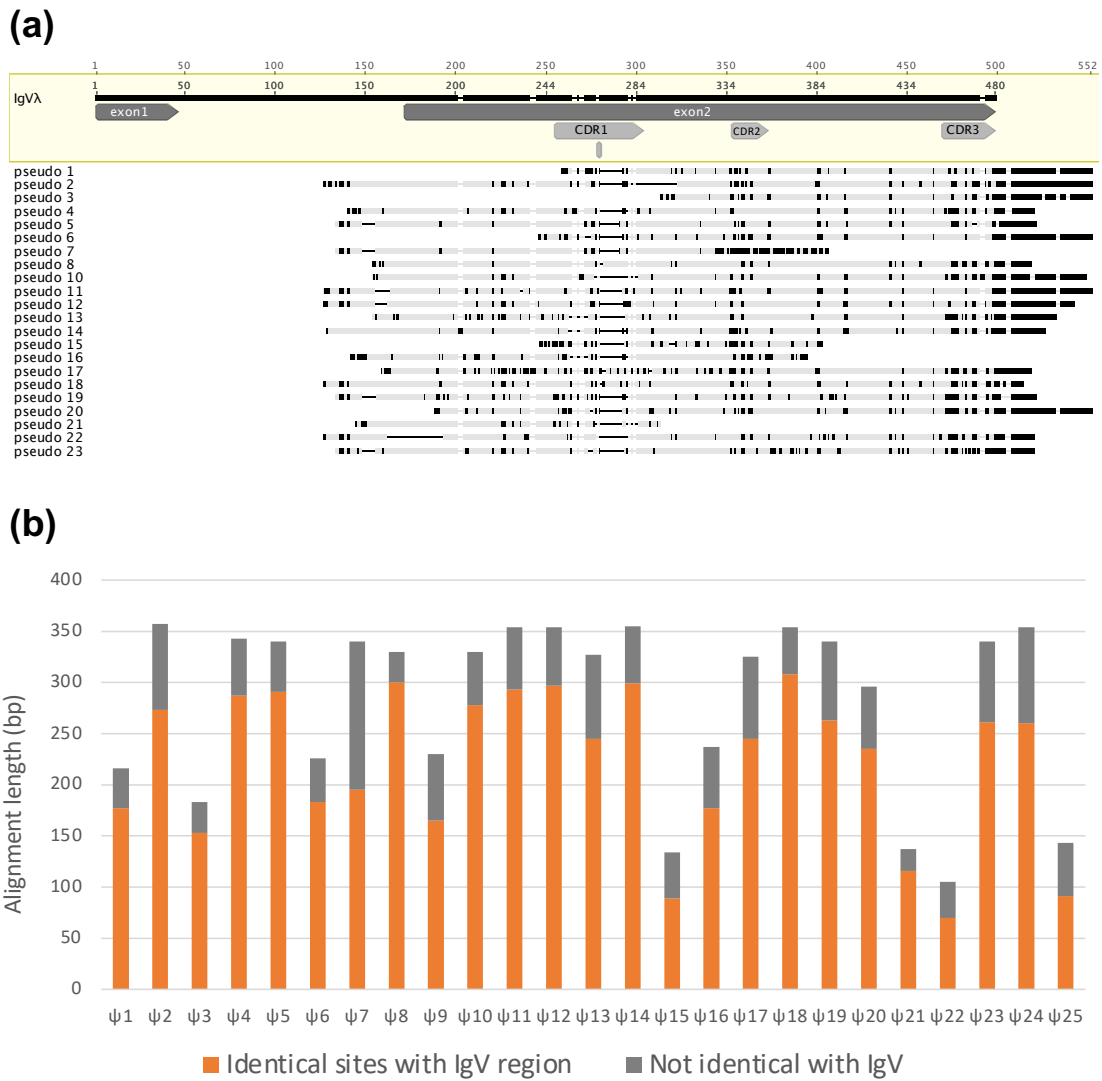


図3-16 各偽遺伝子の抗体遺伝子座との相同性

- (a) 各偽遺伝子の領域全体を抗体遺伝子座にマッピングした様子を示す。灰色の部位は相同部位、黒色の部位は非相同部位。CDR = complementarity determining region (相補性決定領域)。
- (b) ペアワイズアラインメント時の各偽遺伝子のアラインメント長とその内の相同塩基数 (bp) を示した。

bp、82.8%)、 $\psi 12$ (同 297bp、83.9%)、 $\psi 14$ (同 299bp、84.2%)、 $\psi 18$ (同 308bp、87.0%) が、アラインメント長が長く、また相同性も高い偽遺伝子であることがわかる。この結果と 3-6-2 (A) で示した偽遺伝子の利用度 (図 3-6 (e)) を照らし合わせると、野生株において、 $\psi 5$ 、 $\psi 18$ は相同性の高さにも一致して高頻度に利用されたが、 $\psi 4$ 、 $\psi 10$ 、 $\psi 11$ 、 $\psi 12$ は、相同性に比して利用度が低かったと推定される。一方で、 $\psi 7$ については、相同性が比較的高くない (相同部位 195 bp、Pairwise identity 57.4 %) にも関わらず、よく利用された可能性がある。しかしその他の相同性の低い偽遺伝子は、野生株でも TET3 欠損株においても、ほとんど遺伝子変換に利用されていなかった。

これらを踏まえると、偽遺伝子全体と抗体遺伝子座の相同性は、遺伝子変換の鋳型として使われる上で十分条件では無いが、必要条件である可能性はある。そこで、相同性に比して野生株で利用度が高く、しかし TET3 欠損株では用いられていなかった $\psi 7$ と、相同性が高いながらも比較的に利用されなかった $\psi 4$ 、10、11、12 の内、 $\psi 8$ の近傍にあり、かつ野生株と TET3 欠損株との間で利用度の差も確認された $\psi 10$ についてメチル化パターンの解析を行い、相同性に加えて遺伝子変換を制御する要因として偽遺伝子領域の DNA メチル化が働きうるか、そしてそこに TET3 が寄与しうるのかを、検討することにした。

3-6-2 (B) 野生株における偽遺伝子領域のメチル化パターン比較

偽遺伝子の利用頻度とメチル化の関連について調べるため、まずは野生株における $\psi 7$ 、 $\psi 8$ 、 $\psi 10$ のメチル化レベルを比較した (図 3-17)。領域全体のシトシン中のメチル化レベルを見ると、 $\psi 7$ が平均 6.13% (中央値 6.06%)、 $\psi 8$ が平均 10.78% (中央値 10.34%)、 $\psi 10$ が平均 13.27% (中央値 13.89%) であった (図 3-17 (a))。差は大きくは無いが、いずれも有意であり (Dunn's test)、 $\psi 7$ で相対的な低メチル化、 $\psi 10$ で同じく相対的な高メチル化が生じていると言える。

次に、抗体遺伝子座での解析と同様に、CpG 配列と非 CpG 配列のシトシンに分けて調べると、CpG シトシンでは、 $\psi 7$ で平均 38.00% (中央値 36.36%)、 $\psi 8$ で平均 91.07% (中央値 91.67%)、 $\psi 10$ で平均 60.64% (中央値 63.64%) がメチル化しており、 $\psi 7$ の CpG シトシンは顕著にメチル化が低下している結果となった (図 3-17 (b)、(c))。また $\psi 10$ でも、領域全体では相対的にメチル化レベルが高かったが、CpG シトシンでは $\psi 8$ に比してメチル化が低下していた。この低下が全体のメチル

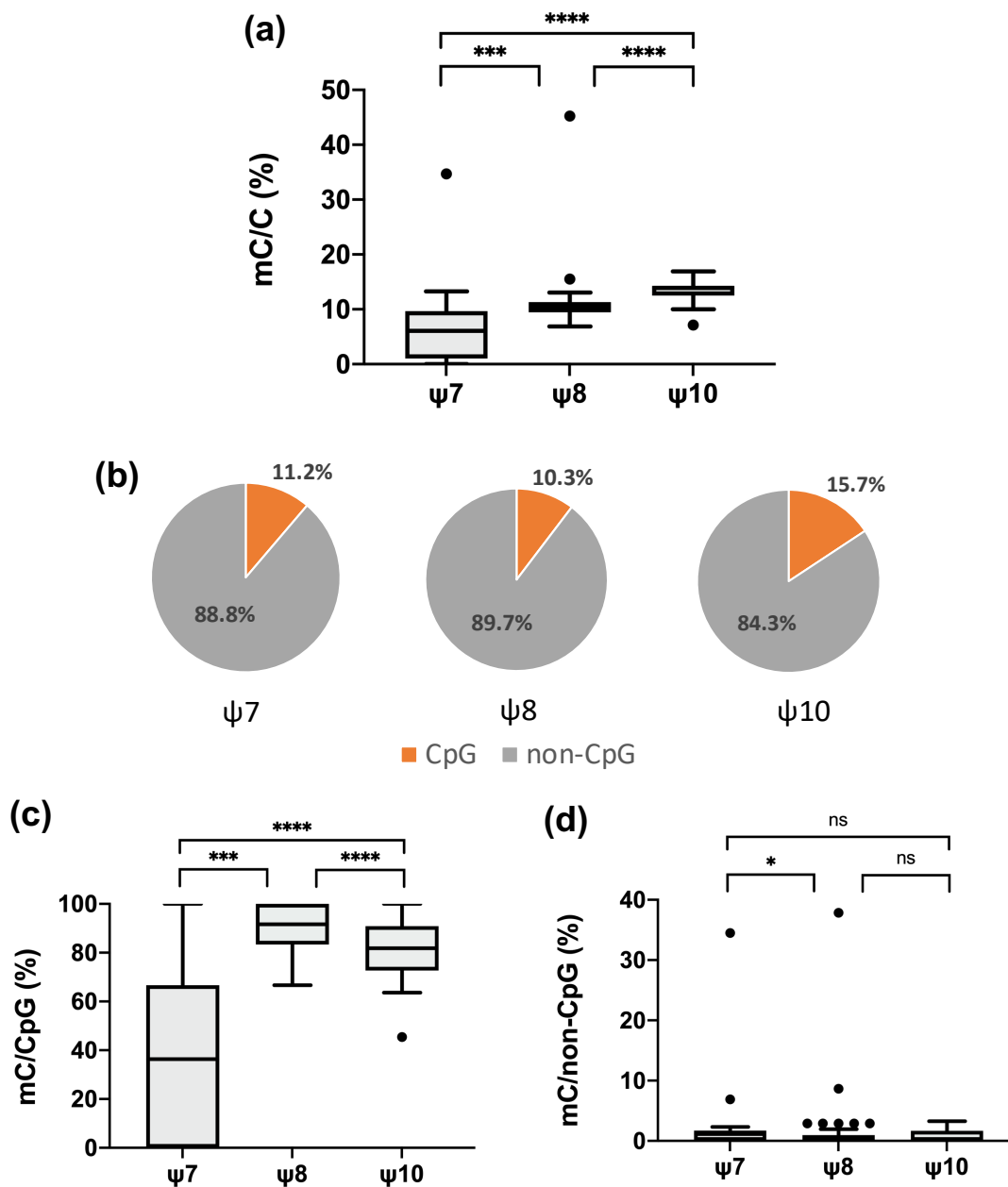


図3-17 野生株における各偽遺伝子のメチル化パターン

- (a) 各偽遺伝子における領域中の全シトシンのメチル化割合。箱ひげ図はTukey法による箱ひげ図 ($\psi 7$: $n = 45$ 、 $\psi 8$: $n = 70$ 、 $\psi 10$: $n = 43$)。検定はKruskal-Wallis検定後、Dunnの検定を行なった (*** $p = 0.001$ 、**** $p < 0.0001$)。
- (b) 各領域中のCpGシトシンと非CpGシトシンの割合。
- (c) 各領域中のCpGシトシンのメチル化割合。表記および検定は(a)に同じ。
- (d) 各領域中の非CpGシトシンのメチル化割合。表記および検定は(a)に同じ。

化レベルの差として反映されなかったのは、抗体遺伝子座や他の偽遺伝子領域と同様に、CpG シトシンが占める割合が小さい（15.7%）ためだと考えられる（図 3-17 (b)）。

一方で、非 CpG 配列を見ると、 $\psi 7$ が平均 1.79%（中央値 1.15%）、 $\psi 8$ が平均 1.20%（中央値 0.00%）、 $\psi 10$ が平均 0.62%（中央値 0.00%）であった（図 3-17 (d)）。 $\psi 7$ の非 CpG シトシンは $\psi 8$ より有意にメチル化していたが差はごく小さく、何れも低メチル化状態であることは共通していた。以上の結果と相同性を考慮した場合の $\psi 7$ 、 $\psi 8$ 、 $\psi 10$ の利用度とを照らし合わせると、 $\psi 7$ 、 $\psi 8$ 、 $\psi 10$ の順で DNA メチル化が亢進していることは、当該領域の DNA メチル化の程度が遺伝子変換の頻度に影響している可能性は否定できない。加えて、非 CpG 配列がほぼ一様に低メチル化状態であるのに対し、CpG 配列ではメチル化レベルに顕著な違いを確認できたことから、偽遺伝子領域の CpG シトシンにおいて、領域別あるいは動的にメチル化パターンが形成されていることが示唆された。

3-6-2 (C) 野生株と TET3 欠損株における偽遺伝子領域のメチル化パターン比較

前項より、偽遺伝子領域の DNA メチル化パターンが遺伝子変換に寄与する可能性が示唆された。そこで、野生株と TET3 欠損株における偽遺伝子領域のメチル化レベルを比較した（図 3-18）。全てのシトシンにおけるメチル化の割合を比較すると、 $\psi 7$ と $\psi 8$ において、TET3 欠損株において顕著にメチル化が亢進していることがわかった（図 3-18 (a)）。具体的に、野生株のメチル化レベルが、 $\psi 7$ 平均 6.13%（中央値 6.06%）、 $\psi 8$ 平均 10.78%（中央値 10.34%）、 $\psi 10$ 平均 13.27%（中央値 13.89%）であったのに対し（前項既出）、TET3 欠損株では、 $\psi 7$ 平均 20.75%（中央値 21.43%）、 $\psi 8$ 平均 28.25 %（中央値 28.58%）、 $\psi 10$ 平均 18.48%（中央値 15.39%）であった。 $\psi 10$ では、TET3 欠損株においてメチル化が亢進している配列も見られたものの、野生株と比較して統計的に有意な差は無かった。この結果は、 $\psi 7$ と $\psi 8$ が、TET3 欠損株と比して野生株において頻回に利用され、 $\psi 10$ が野生株および TET3 欠損株の双方において利用されなかったこととも一致する（図 3-6 (e)）。また、 $\psi 7$ と $\psi 8$ におけるメチル化は各領域全域に渡って確認された。図 3-18 (b)には、その様子を示す（ $\psi 8$ のみ）。

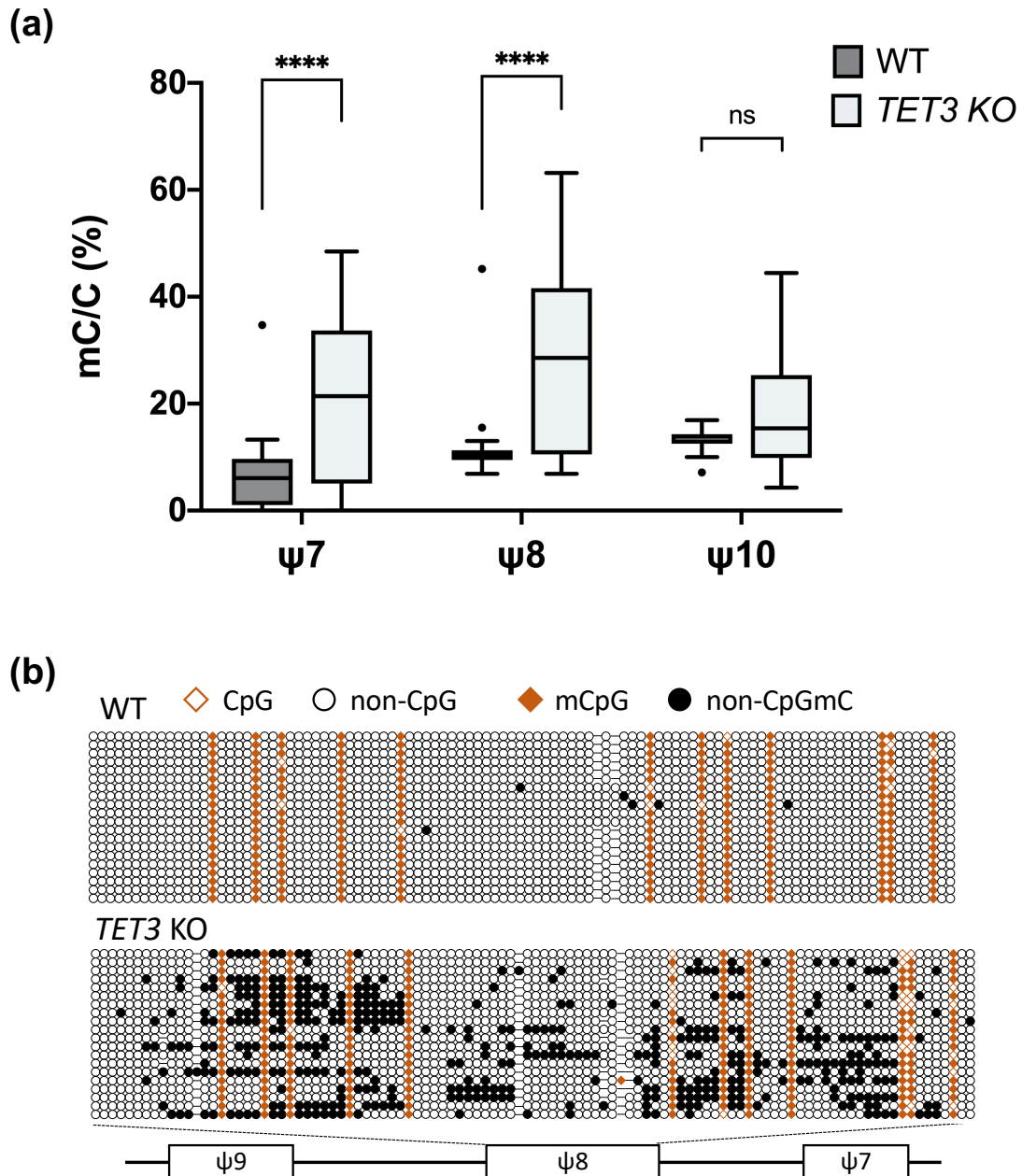


図3-18 野生株およびTET3欠損株の偽遺伝子のメチル化パターン比較

(a)各偽遺伝子における領域中の全シトシンのメチル化割合を示す。箱ひげ図はTukey法による箱ひげ図（野生株のサンプル数は図3-16と同じ、TET3欠損株 $\psi 7$: $n = 47$ 、 $\psi 8$: $n = 70$ 、 $\psi 10$: $n = 44$ ）。検定はMann-Whitneyの検定を行った（ns : $p > 0.05$ 、**** $p < 0.0001$ ）。

(b)メチル化状態の模式図。 $\psi 8$ の解析配列の内、領域全体のメチル化レベルが中央値の最近傍にある20配列について、配列中のCpGシトシンおよび非CpGシトシンのメチル化状態を表した。

次に、これまでの解析と同様に領域内のシトシンを CpG シトシンと非 CpG シトシンに分けて評価したところ、CpG シトシンでは、 $\psi 7$ と $\psi 8$ において野生株と TET3 欠損株において有意な変化は確認されなかった（図 3-18 (c)）。一方 $\psi 10$ では、TET3 欠損株で野生株と比較して有意にメチル化レベルが低下していた。ここで、野生株においても $\psi 7 < \psi 10 < \psi 8$ の順で、CpG シトシンがメチル化していたことを指摘しておく（図 3-17 (c)）。したがって、 $\psi 10$ では野生株と TET3 欠損株間で変化が確認されたものの、偽遺伝子領域の CpG シトシンのメチル化については、偽遺伝子配列間のばらつきが大きいと考えられる。これは、抗体遺伝子座および DIVAC 配列における CpG シトシンのメチル化に関して、野生株と TET3 欠損株の間で変化が小さかったことと一致する（図 3-14 (d)、図 3-15 (c)）。また、 $\psi 7$ 、 $\psi 8$ 、 $\psi 10$ の領域における CpG シトシンのメチル化レベルは、野生株および TET3 欠損株いずれ場合でも、抗体遺伝子座および DIVAC 配列よりも顕著に高いレベルであった（図 3-14 (d)、図 3-15 (c)）。CpG シトシンのメチル化レベルは、染色体の各領域間で大きく差がある可能性を示唆している。

より注目すべき点として、非 CpG シトシンに関しては、TET3 欠損株の 3 つの偽遺伝子すべてにおいて顕著にメチル化が亢進していた。具体的に、野生株の $\psi 7$ が平均 1.79%（中央値 1.15%）、 $\psi 8$ が平均 1.20%（中央値 0.00%）、 $\psi 10$ が平均 0.62%（中央値 0.00%）メチル化されていたのに対し（前項既出）、TET3 欠損株では、 $\psi 7$ が平均 17.48%（中央値 19.54%）、 $\psi 8$ が平均 21.17%（中央値 21.63%）、 $\psi 10$ が平均 10.63%（中央値 4.19%）メチル化されていた。この結果は、抗体遺伝子座および DIVAC 配列の非 CpG シトシンにおいて、程度は低いながら TET3 欠損株において有意なメチル化の亢進が見られたことと整合性がある。

以上より、TET3 は非 CpG シトシンのメチル化状態に作用し、とくに特定の偽遺伝子領域に強い影響をもたらすことが示された。TET3 欠損株における利用偽遺伝子の多様性の減少（3-4-3）、野生株の偽遺伝子利用とメチル化の関係（3-6-2 (B)）、そして DNA メチル化が直接的（当該領域へのタンパク質の結合を阻害する）にも間接的（ヘテロクロマチン化を誘導する）にもその DNA 領域へのアクセシビリティを低下することに寄与するという先行研究を踏まえると (Cedar & Bergman, 2009; Jaenisch & Bird, 2003)、特定の偽遺伝子の DNA メチル化上昇は、その偽遺伝子領域の活用度を下げ、結果的に遺伝子変換が抑制される可能性が示唆された。

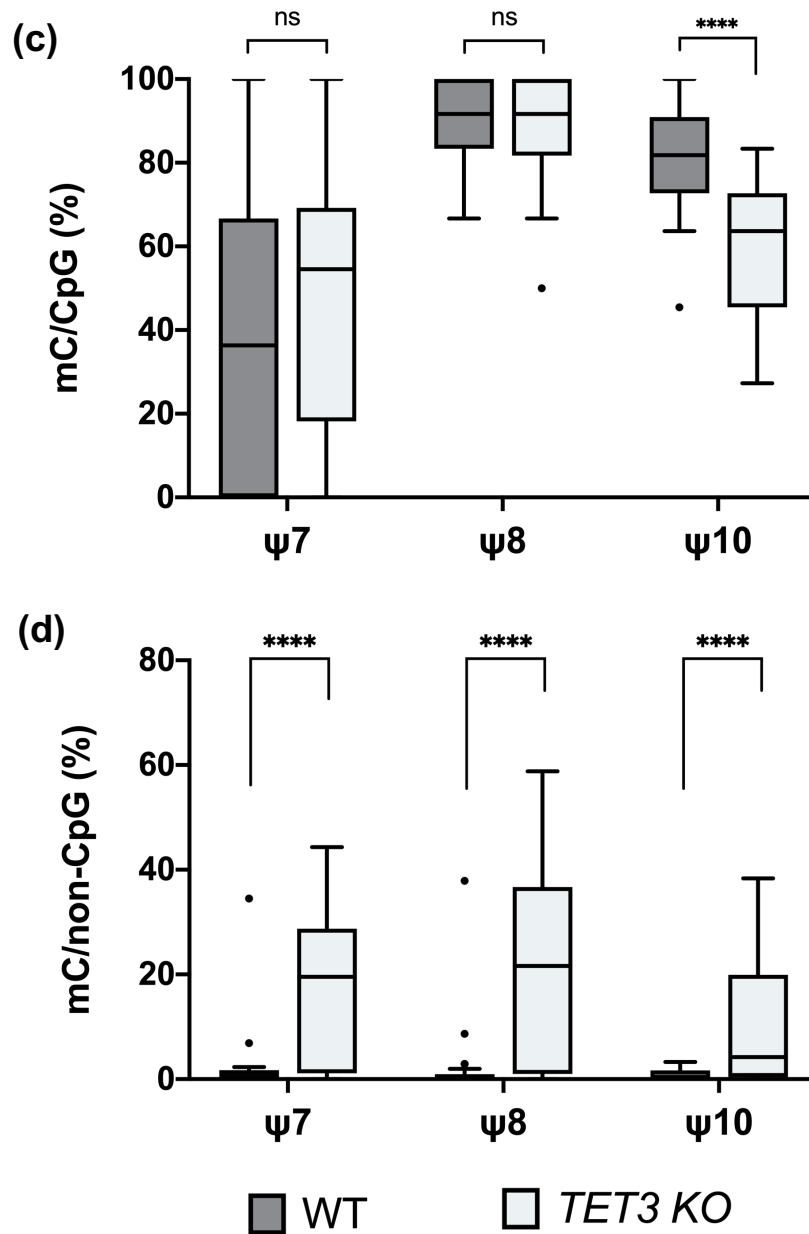


図3-18 野生株およびTET3欠損株の偽遺伝子のメチル化パターン比較 (続)
 (c)各偽遺伝子におけるCpGシトシンのメチル化割合。サンプル数、表記、検定は(a)に同じ。
 (d)各偽遺伝子における非CpGシトシンのメチル化割合。サンプル数、表記、検定は(a)に同じ。

3-7 単一 TET タンパク質欠損株における遺伝子発現解析

3-7-1 単一 TET タンパク質欠損株における抗体遺伝子座の転写量解析

ここまで、膜型 IgM リバージョンアッセイより TET3 欠損株が顕著な表現型を示したこと、そして 5hmC ドットプロット解析にて TET3 が DT40 細胞における主要な脱メチル化酵素であることが示唆されたことから、TET3 欠損株のメチル化パターンに焦点を当てながら、TET3 の抗体遺伝子多様化における機能を検討してきた。しかし序論でも述べたとおり、TET タンパク質の主要な生理的機能は、プロモーターやエンハンサー領域の脱メチル化を介した遺伝子発現の制御である (Pastor, Aravind, & Rao, 2013; Rasmussen & Helin, 2016; Wu & Zhang, 2017)。また TET1 欠損株、TET2 欠損株においても、TET3 欠損株と比べると軽度ではあるが、膜型 IgM リバージョンアッセイにおいて、遺伝子変換の低下が示唆された (図 3-5)。そこで、抗体遺伝子多様化レベルの制御要因として報告されている抗体遺伝子座の転写量について (Di Noia & Neuberger, 2007)、野生株と 単一 TET タンパク質間で比較することにした。

その結果、TET2 欠損株および TET3 欠損株において、有意な抗体遺伝子転写量の低下が確認された (図 3-19 (a))。両株ともに、野生株から約 25%程度の減少であった。これは TSA 非添加培地において、TET2 欠損株における sIgM(+)へのリバージョン頻度が低下したことと一致する (図 3-5 (a))。また、TSA は抗体遺伝子座の転写を促進することから (Lin et al., 2008; Seo et al., 2005)、TSA 添加培地にて野生株と TET2 欠損株間に有意な差が確認されなかった点とも反しない (図 3-5 (b))。ただし、TET2 欠損株と TET3 欠損株における抗体遺伝子座転写量の減少が同程度であったのに対し、sIgM(+)へのリバージョン頻度の低下が TET3 欠損株でより顕著であったことから、TET3 欠損株における抗体遺伝子多様化の減少は、この抗体遺伝子座転写量の減少だけによって説明されるものではない。以上より、TET2 および TET3 は抗体遺伝子座の転写制御に寄与する可能性が示唆されたが、その抗体遺伝子多様化への限局的であると考えられた。

3-7-2 単一 TET タンパク質欠損株における AID の転写量解析

既に繰り返し述べてきたように、抗体遺伝子多様化において主要な役割を果たすのが AID である。そこで各 TET タンパク質欠損株における AID の転写量も確認し

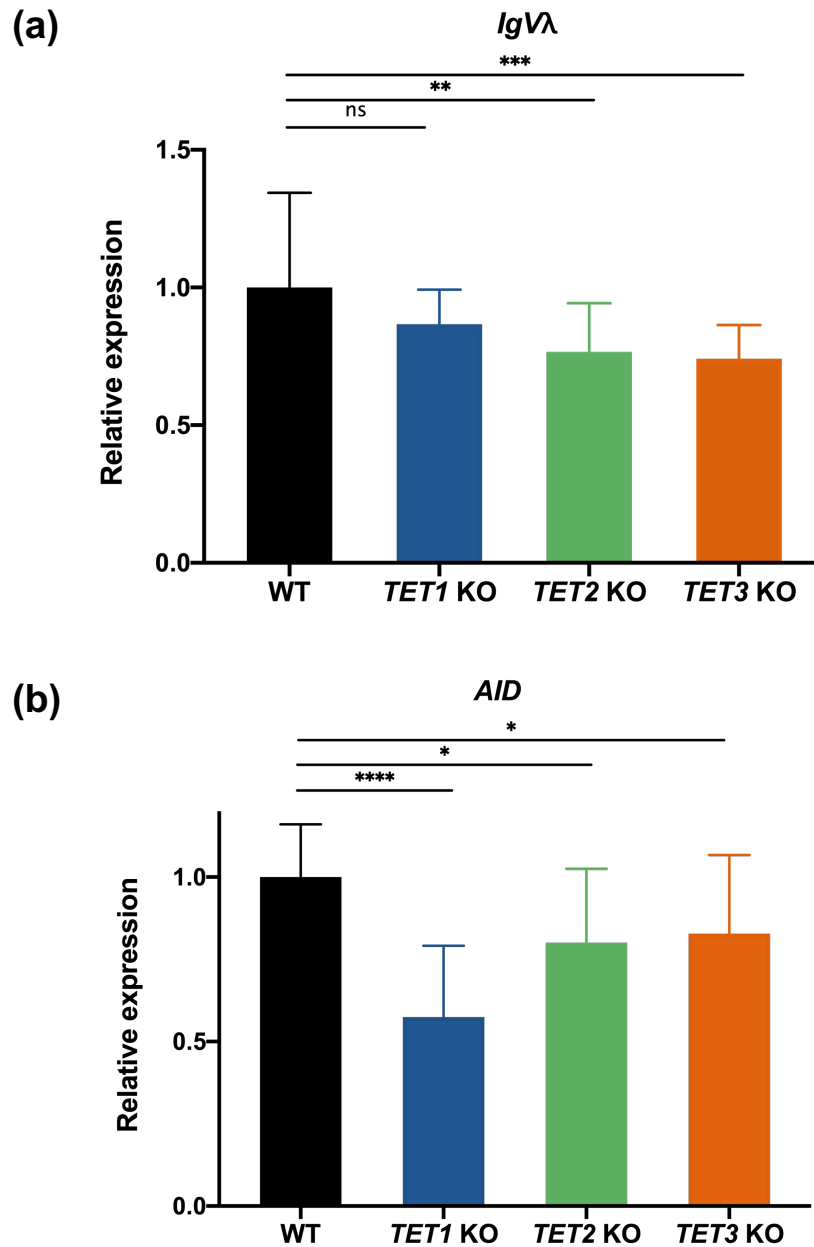


図3-19 野生株およびTET3欠損株における抗体遺伝子座とAIDの発現量

(a) 各株の抗体遺伝子座のmRNA量をRT-qPCRで定量した。棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を示す（野生株 $n = 20$ 、TET1欠損株 $n = 6$ 、TET2欠損株 $n = 9$ 、TET3欠損株 $n = 6$ ）。検定にはウェルチのt検定を用いた（ns: $p > 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ ）。

(b) 各株の*AID*のmRNA量をRT-qPCRで定量した。表記、検定は(a)に同じ（野生株 $n = 4$ 、TET1欠損株 $n = 12$ 、TET2欠損株 $n = 16$ 、TET3欠損株 $n = 19$ ）

た。その結果、TET1 欠損株にて有意な発現量の低下が確認され、野生株と比して約 40 %程度減少していた（図 3-19 (b)）。この結果は、TSA 添加培地、非添加培地に共通して TET1 欠損株にて sIgM(+)へのリバーシジョン頻度が低下していたこととも一致する（図 3-5 (a)、(b)）。一方、TET2、TET3 欠損株においても野生株と比べて約 20 %程度の発現量の減少が見られたが（図 3-19 (b)）、TET2 欠損株の膜型リバーシジョンアッセイにおける表現型を考慮すると、この程度の減少は、抗体遺伝子多様化に大きな影響をもたらさなかったと考えられる。以上より、TET1、TET2、TET3 の全てが AID の発現制御に関与する可能性が示唆されたが、TET1 による寄与が最も大きいことが示された。

3-7-3 TET3 欠損株における抗体遺伝子多様化関連因子の発現解析

3-4-2 における解析より、TET3 欠損株においては遺伝子変換だけでなく体細胞高頻度突然変異も減少することが明らかとなっている（図 3-6 (a)、(d)）。この現象は、前二項において確認された、抗体遺伝子および AID の転写量の低下に起因する可能性がある。しかし序論でも述べたように、先行研究において、遺伝子変換および体細胞突然変異の双方に関与する因子が複数報告されている (Abe, Branzei, et al., 2018)。そこで、TET3 欠損株において、これらの因子の発現レベルも検討することにした。

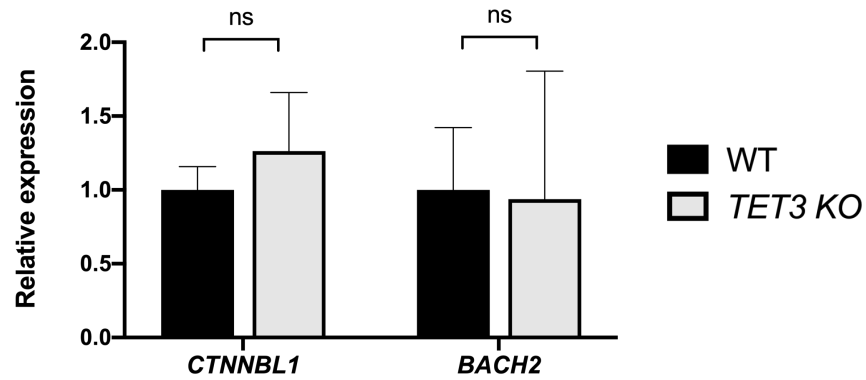
まず、AID の制御因子として報告されている CTNNB1 (Conticello et al., 2008)と、BACH2 (Budzyńska et al., 2017) について発現量を確認した。CTNNB1 は AID と相互作用して抗体遺伝子多様化を促進する機能があり、BACH2 は AID の発現を誘導する因子である。しかし両遺伝子とも、TET3 欠損株における転写量の低下は見られず（図 3-20 (a)）、TET3 によるこれらの因子の発現制御およびそれを介した AID の作用の低下は起きていないことが示された。

次に、相同組換えおよび損傷乗り越え DNA 合成 (TLS) に関わる因子について、発現量を確認した。両反応には数多くの因子が関与するが、その中でも欠損により体細胞突然変異が減少、あるいは変化せず、遺伝子変換の低下を伴うことが報告された DDX11 (Abe, Ooka, et al., 2018)、POLη(Kawamoto et al., 2005)、RNF8 (Mohiuddin et al., 2016) を対象とした。しかしこれらの因子においても、TET3 欠損株における発現量の低下は確認されなかった（図 3-20 (b)）。

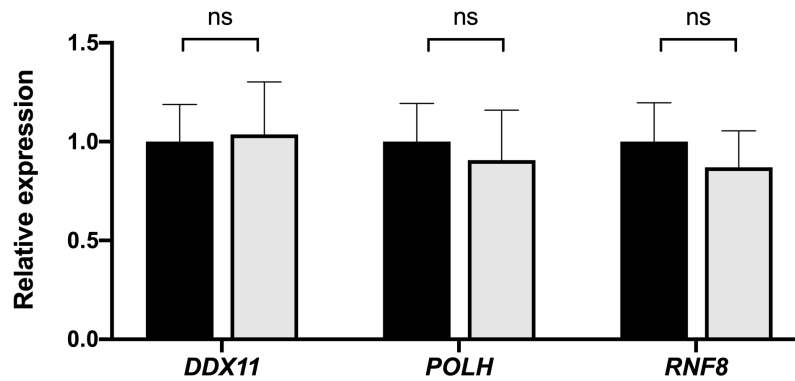
加えて、同様の表現型が報告されている因子として、FA 経路因子である FANCD2、DNA 損傷の修復経路の選択に関わる PARP-1 についても転写量を確認したが、いずれの TET3 欠損株における低下は見られなかった（図 3-20 (c)、(d)）。

以上より、TET3 欠損株における遺伝子変換および体細胞突然変異の減少は、両者に関与する既知の転写因子や DNA 修復関連因子の発現低下を伴ったものではないことが示された。

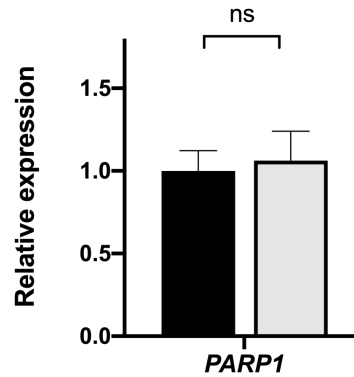
(a)



(b)



(c)



(d)

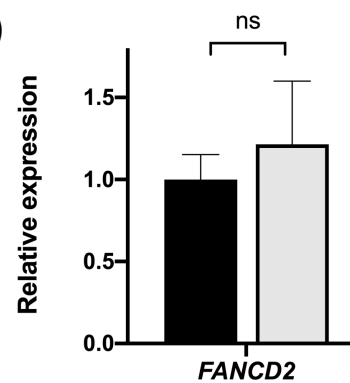


図3-20 野生株およびTET3欠損株における抗体多様化関連因子の発現量

- (a) 各株の *CTNNB1* および *BACH2* の発現量 (RT-qPCR)。棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を示す (全株 $n = 3$)。検定にはウェルチのt検定を用いた (ns : $p > 0.05$)。
- (b) 各株の *DDX11*、*POLH* (*POLH*)、*RNF8* の発現量 (RT-qPCR)。表記、サンプル数、検定は(a)に同じ。
- (c) 各株の *PARP1* の発現量 (RT-qPCR)。上に同じ。
- (d) 各株の *FANCD2* の発現量 (RT-qPCR)。上に同じ。

第 4 章

TET タンパク質二重欠損株を用いた 抗体遺伝子多様化解析

序

第3章における解析から、TET ファミリータンパク質の中の TET3 が、DT40 細胞における抗体遺伝子多様化に主要な役割を果たすことが示された。しかしながら、TET1 欠損株、TET2 欠損株においても、TET3 欠損株よりその程度は低いものの膜型 IgM リバージョン頻度の低下が見られた。さらに TET1 欠損株では *AID* 発現量の低下が、TET2 欠損株では抗体遺伝子座転写量の低下が確認された。先行研究より、TET ファミリータンパク質はその二重欠損により、単一欠損時には見られなかった顕著な表現型を示すことが報告されている (Dawlaty et al., 2013, 2011; Dominguez et al., 2018; C. W. Lio et al., 2016; Orlanski, 2016)。そこで、TET1・TET2 二重欠損株（以下 TET1/2 欠損株）および TET1・TET3 二重欠損株（以下、TET1/3 欠損株）を構築し、単一 TET タンパク質の欠損株では捉えきれない、複数の TET タンパク質によって維持される抗体遺伝子多様化制御機構について検討を行うことにした。

4-1 TET1/2 欠損株と TET1/3 欠損株における増殖速度測定

第3章より、各単一 TET タンパク質は、DT40 細胞の生存および増殖に影響を与えないことが明らかになっている（第3章 3-3）。しかしながらマウスの先行研究において、TET1 あるいは TET2 の単一欠損マウスは生存可能であるのに対し (Dawlaty et al., 2011; Ko et al., 2011; Li et al., 2011; Moran-Crusio et al., 2011)、TET1/2 二重欠損では出生前に多くが死亡することが報告されるなど (Dawlaty et al., 2013)、TET タンパク質の単一欠損と二重欠損とでは細胞の生存および増殖に与える影響が異なることが考えられる。そこで単一 TET タンパク質欠損株と同様に、TET1/2 欠損株および TET1/3 欠損株においても増殖速度の測定を行なった。

その結果、TET1/2 欠損株、TET1/3 株の両株において、わずかではあるが野生株と比較して増殖速度の低下が見られた（図 4-1 (a)）。増殖速度曲線をもとに各株の倍化時間を算出したところ、野生株が平均 8.4 時間であったのに対し、TET1/2 欠損株では 9.1 時間、TET1/3 欠損株では 9.4 時間であった（図 4-1 (b)）。またこれら二重欠損株と野生株との差は統計的に有意であった。この結果は、DT40 細胞においても、TET タンパク質が互いに機能を補完し合い、冗長的に細胞の生存に寄与していることを示唆している。しかし一方で、増殖の遅れは、TSA 添加により引き

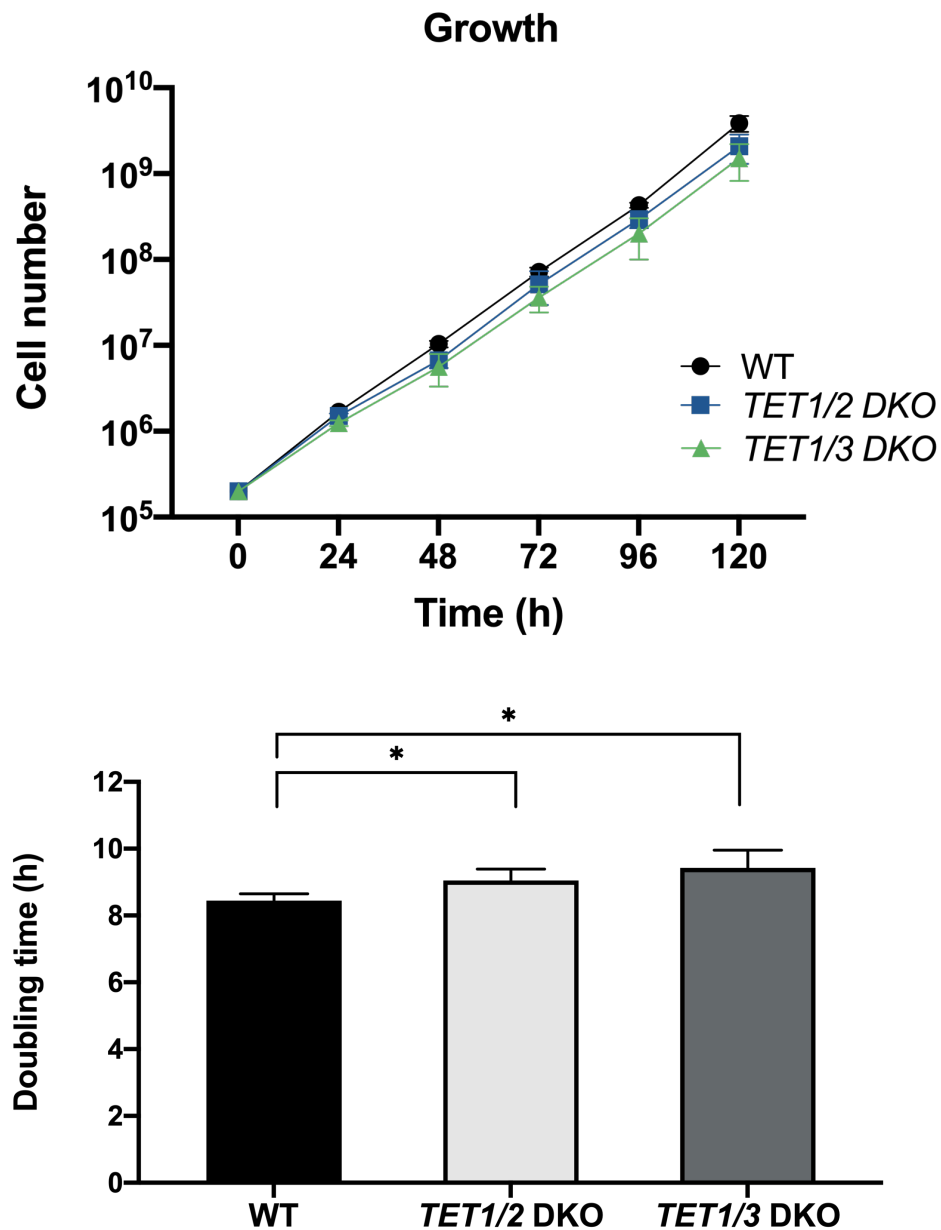


図4-1 TET1/2欠損株およびTET1/3欠損株の増殖速度

- (a) 野生株および各欠損株の培養液1 mlあたりの細胞数を24時間ごとに5日間測定した。各株ともに4サブクローンを用い、平均値をプロットしている。エラーバーは標準偏差を示す。
- (b) (a)における増殖速度の測定から、各細胞株の倍化時間を算出した。棒グラフはそれぞれの細胞株のクローンおよび5日間の測定値の平均値、エラーバーは標準偏差を示している（各株 $n = 20$ ）。検定にはウェルチのt検定を用いた（* $p < 0.05$ ）。

起こされる増殖速度の低下と比べても、極めて限定的であるといえる (Kurosawa, Lin, & Ohta, 2010; Lin, Hashimoto, Seo, Shibata, & Ohta, 2008)。したがって、この増殖の遅れが、以降で解析対象となる抗体遺伝子多様化に大きな影響を与えることはないと推定した。

4-2 TET1/2 欠損株と TET1/3 欠損株における残存 TET タンパク質の発現量解析
第 3 章において、TET タンパク質の単一欠損では、その他の TET タンパク質の発現に影響が見られないことを示した (第 3 章 3-2)。一方、先行研究において、TET1 や TET2 の単一欠損ではその他の *TET* 遺伝子の発現に影響を受けないにも関わらず (Dawlaty et al., 2011; Ko et al., 2011; Li et al., 2011)、二重欠損によって残りの *TET* 遺伝子の発現が上昇する現象が報告されている (Dawlaty et al., 2013)。しかしながら、TET1/3 を欠損したマウス胚盤胞や TET2/3 欠損マウス B 細胞においては、残余の *TET* 遺伝子の発現が誘導されないという報告もある (Kang et al., 2015; C. W. Lio et al., 2016)。したがって、*TET* 遺伝子の二重欠損株における残余 *TET* 遺伝子への発現影響は、細胞種や発生の段階に依存して異なると推察される。

そのため、今回は鳥類 B 細胞における影響について慎重に検証することとした。本実験で作製した TET1/2 欠損 DT40 細胞株および TET1/3 欠損株における残存 *TET* 遺伝子の発現量を RT-qPCR にて確認した。その結果、TET1/2 欠損株では *TET3* の発現量が野生株と比べて 30%程度低下し、TET1/3 欠損株では *TET2* の発現量が野生株と比べて 40%弱低下していることがわかった (図 4-2)。これは、上述したマウス B 細胞を用いた先行研究とは異なる傾向であった。以上より、鳥類 B 細胞においては、いずれの TET 二重欠損株においても、残余の TET タンパク質への影響が比較的に顕著であることが示された。

4-3 TET1/2 欠損株および TET1/3 欠損株における 5hmC 量の測定

4-2 の残存 *TET* 遺伝子の発現解析から、TET 二重欠損株においては 5mC の酸化作用も大きく阻害されている可能性が示唆された。そこで、TET1/2 欠損株および TET1/3 欠損株における脱メチル化作用を評価すべく、両株に対してドットブロット解析を実施してゲノム全体の 5hmC 量を測定した。

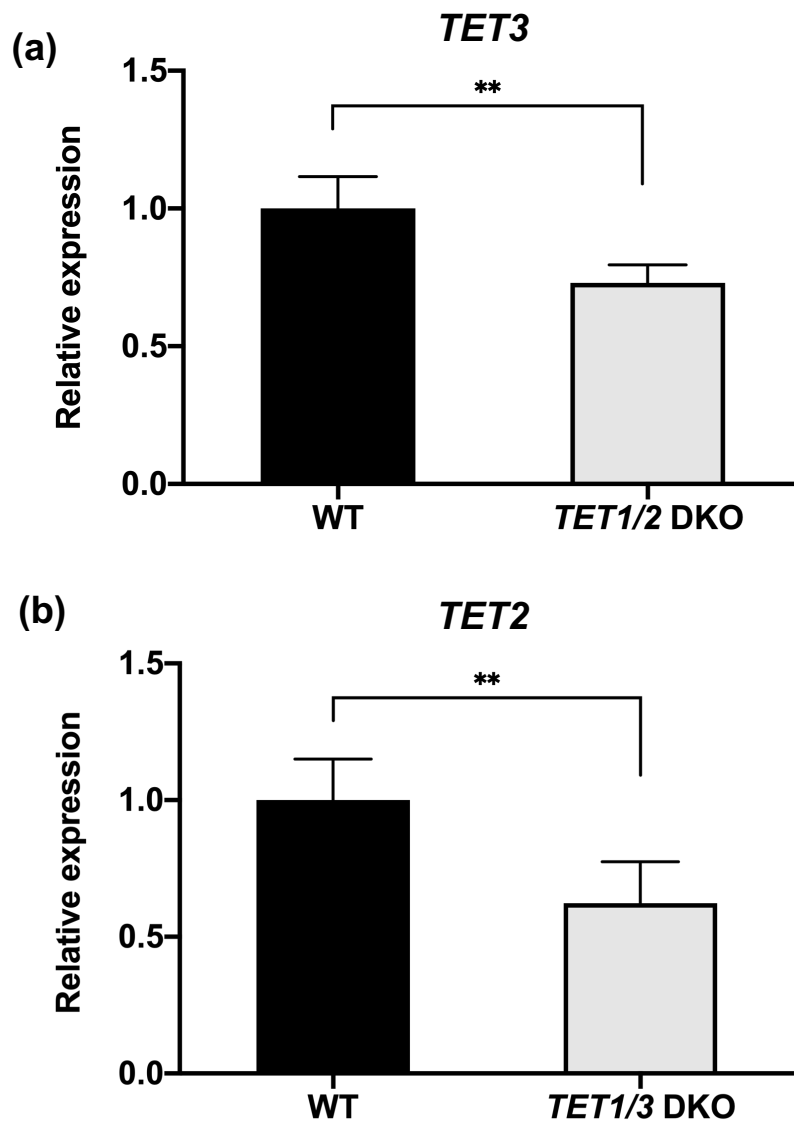


図4-2 TET二重欠損株における残存 *TET* 遺伝子の発現量解析

- (a) TET1/2欠損株における *TET3* mRNA量をRT-qPCRにより測定した。測定値は β -actinの値で標準化したのち、野生株に対する相対値をとった。棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を表す (WT n = 8、*TET1/2*DKO n = 4)。検定にはウェルチのt検定を用いた (**p < 0.01)。
- (b) TET1/3欠損株における *TET2* mRNA量をRT-qPCRによる測定した。以下上に同じ (WT n = 8、*TET1/3* DKO n = 4)。

その結果、いずれの TET 二重欠損株においても、顕著な 5hmC 量の低下が確認された（図 4-3）。この結果は、残存 *TET* 遺伝子の発現低下を示した前項の RT-qPCR の結果とも一致する。以上の結果より、TET1/2 欠損 DT40 細胞株および TET1/3 欠損株では、野生株および *TET* 遺伝子単一欠損と比して、DNA 脱メチル化が著しく低下していることが示唆された。

4-4 TET1/2 欠損株と TET1/3 欠損株における抗体遺伝子座のメチル化パターン

本研究では、AID を介した抗体遺伝子多様化現象（遺伝子変換および体細胞突然変異）に注目している。前項の結果より、*TET* 遺伝子二重欠損株では単一欠損株よりもゲノム上のメチル化レベルが亢進している可能性が示唆された。これまで *TET* 遺伝子の単一欠損株においては抗体遺伝子座における DNA メチル化パターンにはほとんど変化が見られなかった。しかし、TET 二重欠損株においてはより強い影響が生じる可能性がある。そこで、TET1/2 欠損株および TET1/3 欠損株における抗体遺伝子座の DNA メチル化状況を解析すべく、バイサルファイトシーケンシングを行なった。

その結果、いずれの TET 二重欠損株においても、単一欠損株と同様に、抗体遺伝子座のメチル化はほとんど亢進していないことが明らかとなった（図 4-4）。この結果は、第 3 章における単一欠損株の結果、また 4-2 項および 4-3 項の結果と合わせると、抗体遺伝子座は TET ファミリータンパク質による DNA メチル化制御の対象外であることを示している。加えて、TET 二重欠損株においては TET ファミリータンパク質全体の発現が大きく減少している（4-2 項）にも関わらずメチル化が亢進していないということは、この領域に対する *de novo* のメチル化も生じていないことを示唆する。したがって、DT40 細胞の抗体遺伝子座は、他の転写活性の高い遺伝子座同様に、安定的に DNA メチル化から保護されていると考えられる。

4-5 TET1/2 欠損株と TET1/3 欠損株における遺伝子発現解析

4-2 および 4-3 より、TET 二重欠損株ではメチル化が亢進している可能性が示唆されたが、前項の結果より、抗体遺伝子座においてその影響が確認されることはなかった。そこで、抗体遺伝子多様化における重要な制御要因であり、かつ単一

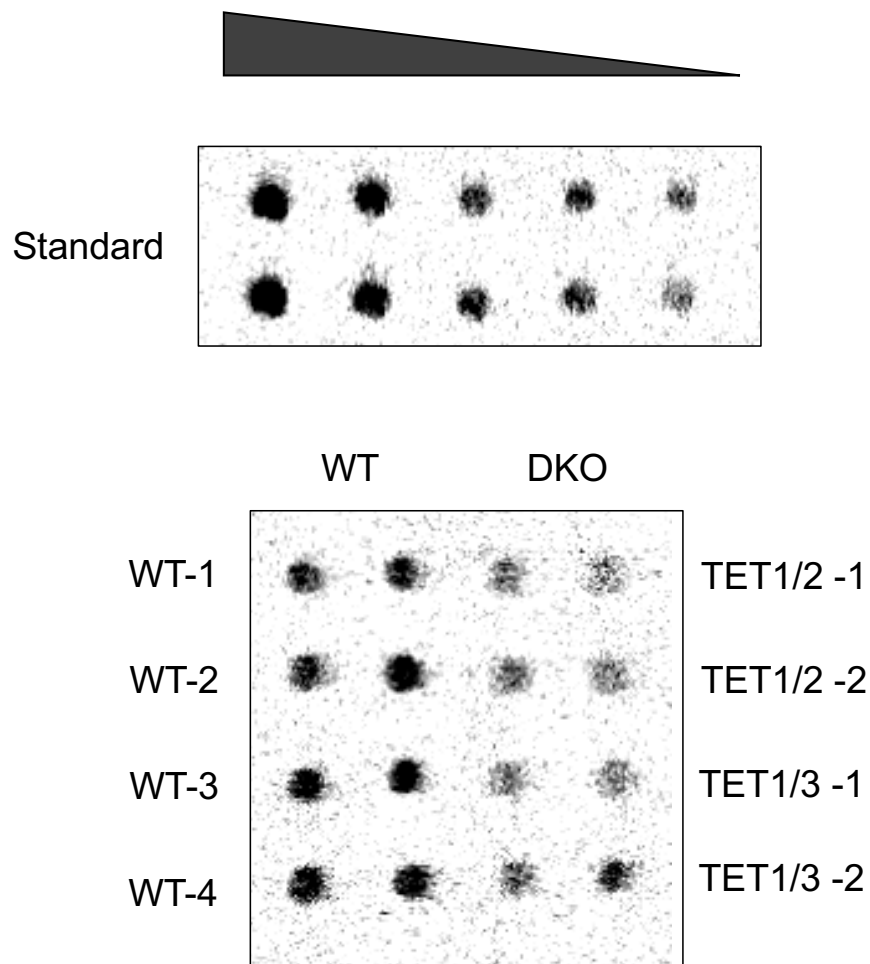


図4-3 TET二重欠損株における5hmC量の評価

野生株および各欠損株から取得したゲノムDNAに対し、抗5hmC抗体を用いたドットプロット解析を行なった。各スポット25 ngのDNAを含むように調整した。5hmCのシグナルは、HRP標識2次抗体で抗5hmC抗体を染色したのち、ECL系 (enhanced-chemiluminescence)を用いて測定した。

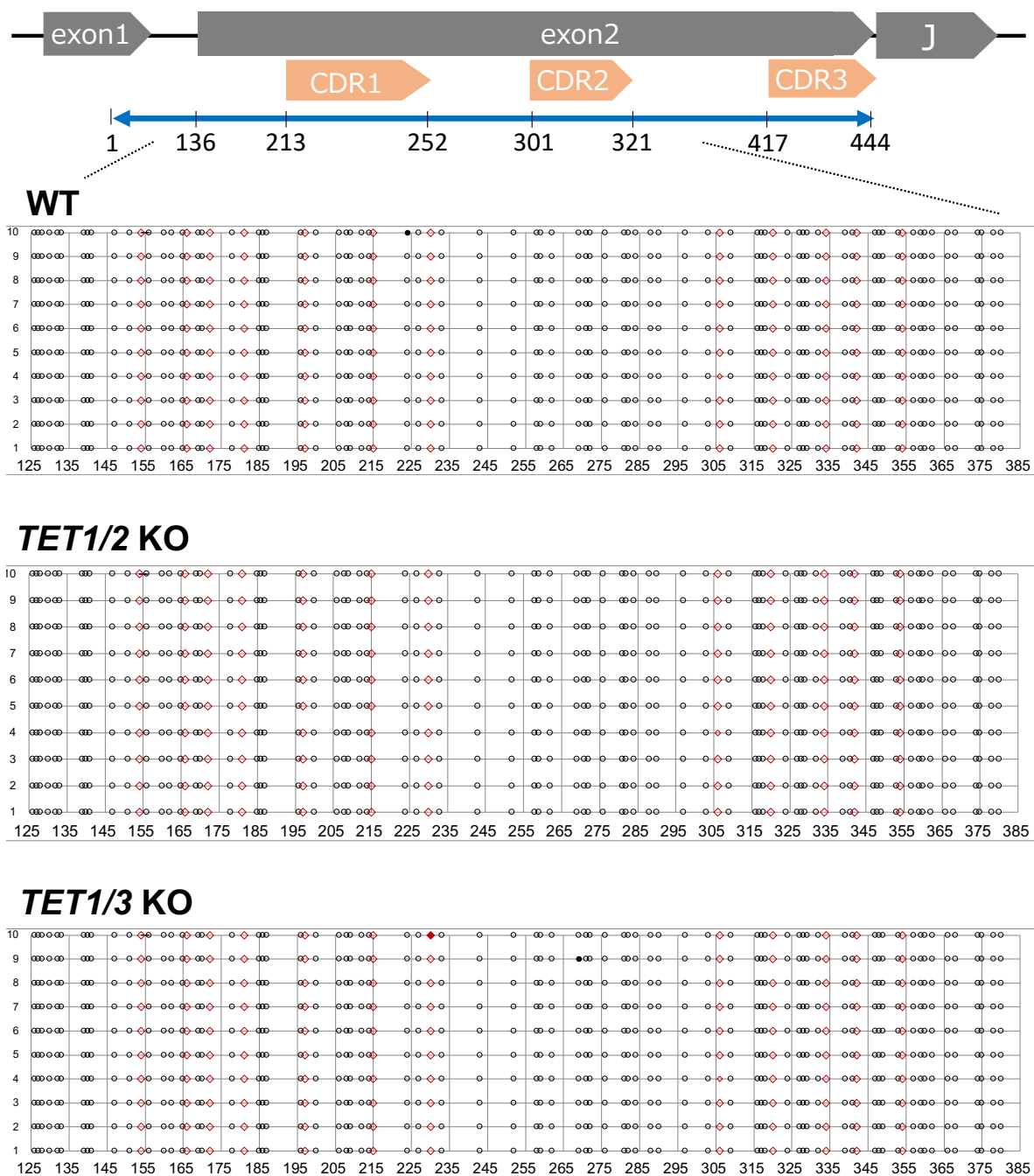


図4-4 抗体遺伝子座のメチル化パターン

各株における抗体遺伝子座のメチル化パターンの模式図。解析配列の内、領域全体のメチル化レベルが中央値の最近傍にある10配列の結果を示している。配列中のCpGシトシンを赤い四角、非CpGシトシンを黒丸で表し、メチルシトシンは塗りつぶしで表現している。

TET タンパク質欠損株において発現変動が見られた抗体遺伝子および AID について、その発現量を TET 二重欠損株でも確認することにした。

4-5-1 TET1/2 欠損株と TET1/3 欠損株における抗体遺伝子座の転写解析

第3章にて、TET2欠損株およびTET3欠損株では、抗体遺伝子多様化への影響（cf. 膜型 IgM リバージョンアッセイ）は限定的であったものの、抗体遺伝子の転写量が野生株と比べて有意に減少することが示された（図 3-19 (a)）。加えて 4-2 の結果より、TET1/2 欠損株および TET1/3 欠損株のいずれにおいても、残存する *TET3* あるいは *TET2* の発現が低下していることから、二重欠損株では単一欠損株以上に抗体遺伝子座の転写が減少していることが想定された。

しかしながら、TET1/2 欠損株では野生株と比して 20%程度しか抗体遺伝子座の発現が減少していなかった（図 4-5 (a)）。これは TET2 の単独欠損株で見られた減少（約 25%）と比較すると、やや少なめの減少であった（図 3-19 (a)）。さらに TET1/3 欠損株においては、TET3 欠損株において 25%程度の減少が見られたにも関わらず、野生株と比して有意な差は確認されなかった（図 4-5 (a)）。単独欠損の方が二重欠損に比べてより強く影響を受けるように見える結果であるが、いずれもその差はかなり限定的である。DT40 細胞においては、抗体遺伝子座は TET タンパク質による発現制御の主要な標的ではなく、影響が限定的に留まると考えられる。

4-5-2 TET1/2 欠損株と TET1/3 欠損株における AID の転写解析

第3章の結果より、*TET1* 欠損株では *AID* の発現量が減少し（野生株と比して約 40 %程度の低下）、TET2 欠損株および TET3 欠損株でも軽度の発現減少（約 20 %程度の低下）が確認されていた（図 3-19 (b)）。そこで TET 二重欠損株でも一定程度の *AID* の発現低下が想定されたが、TET1/2 欠損株および TET1/3 欠損株のいずれにおいても、単一欠損株の線形な効果と考えられる以上に *AID* の発現が減少していた（図 4-5 (b)）。具体的に、TET1/2 欠損株では野生株と比して約 90 %、TET1/3 欠損株では約 85%の発現低下が確認された。この結果は、先行研究にて報告された *TET2/3* DKO マウスの B 細胞における *Aicda* の発現減少よりもさらに劇的な変化である (C. W. J. Lio et al., 2019)。また、単一欠損株よりも二重欠損株にて発

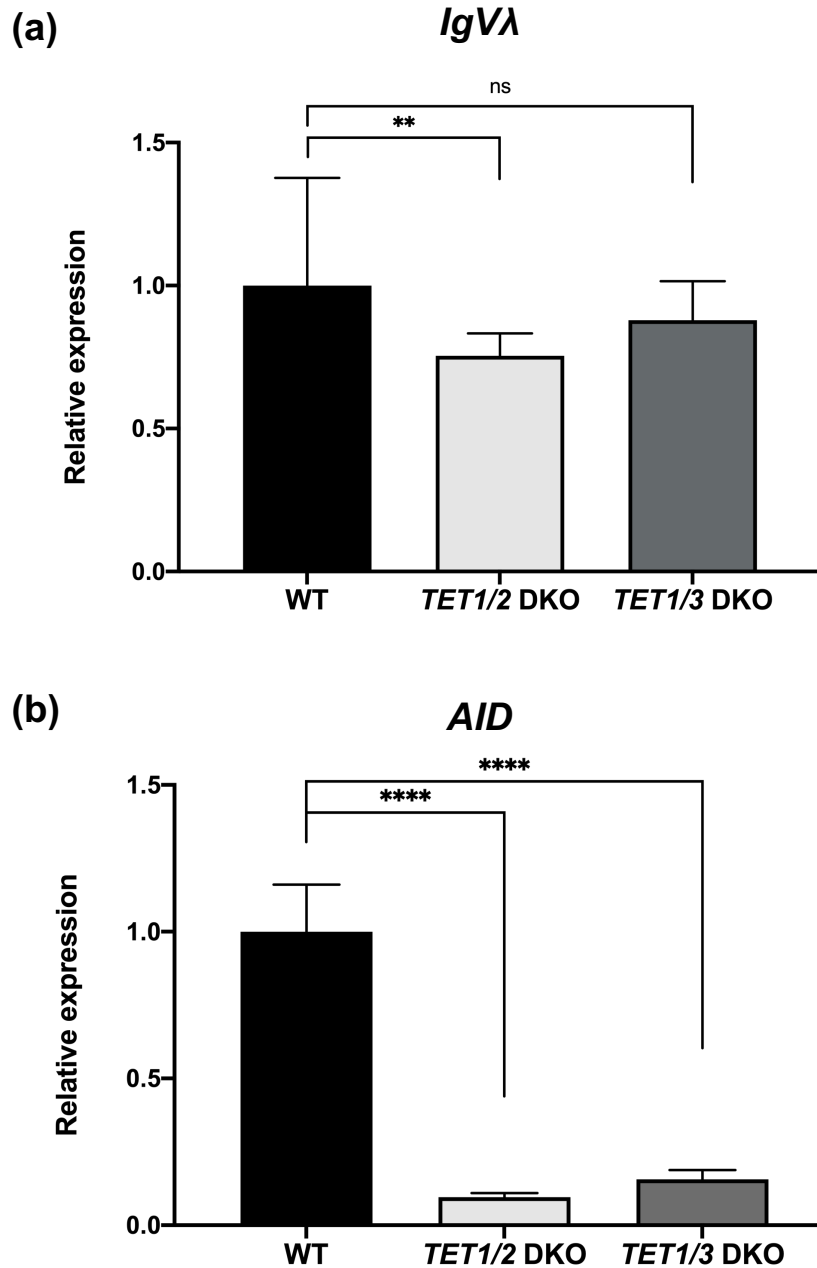


図4-5 TET二重欠損株における抗体遺伝子座および*AID*の転写量解析
 (a) 各株の抗体遺伝子座のmRNA量をRT-qPCRで定量した。棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を示す (WT n = 20、DKO n = 4)。内部標準は β -actin、野生株との相対値を表している。検定にはウェルチのt検定を用いた (**p < 0.01、****p < 0.0001)。
 (b) 各株の*AID*のmRNA量をRT-qPCRで定量した。表記、検定は(a)に同じ (WT n = 8、DKO n = 4)。

現変動が見られなかった、前項の抗体遺伝子座の解析結果とも対照的である。以上より、DT40 細胞における AID の発現制御には TET1 を含む 2 種以上の TET タンパク質が関与していることが示唆された。

4-5-3 TET1/2 欠損株と TET1/3 株における DNMTs の転写解析

前項および前々項の結果より、TET タンパク質の二重欠損株では、単一欠損株から単純には推定できない遺伝子発現への影響が生じていることが示唆された。ここで、TET タンパク質による脱メチル化を介した制御を考える上で、第3章でも述べたように、TET タンパク質と競合して働く DNMTs の発現を考慮する必要がある (Charlton et al., 2020; Ginno et al., 2020; Gu et al., 2018; Verma et al., 2018; Zhang et al., 2016)。

単一 TET タンパク質欠損株では DNMTs の顕著な発現変動は確認されなかったが、前述の抗体遺伝子座と AID の解析結果も踏まえて、TET 二重欠損株における DNMTs の発現量を確認することにした。その結果、*DNMT1* の発現量は、単一欠損株と同様に TET1/2 欠損株および TET1/3 欠損株のいずれにおいても変化していないことが示された (図 4-6 (a))。一方、*DNMT3A* については、TET1/2 欠損株では野生株との間に有意な差は見られなかったものの、TET1/3 欠損株では顕著な発現低下が見られ、野生株と比して約 60% 程度減少していた (図 4-6 (b))。この結果も、単一欠損株の表現型からは想定されなかった変化である。

TET タンパク質による DNMTs の発現制御に関しては先行研究が限られているが、*DNMT3A* に関してはマウスの ES 細胞にて、TET1 のノックダウンで発現が低下、TET2 ノックダウンで変化なし、TET1/2 ダブルノックダウンではマウスの ES 細胞の中でも低下、変化なし、上昇のいずれも見られており、ダブルノックアウト (二重欠損) では変化なしなど、一貫しないデータが報告されている (Yang et al., 2016)。またヒト ES 細胞における *TET* 遺伝子のトリプルノックアウト (三重欠損) では、DNMTs の発現量に変化は見られなかったとの報告もある (Verma et al., 2018)。TET タンパク質の欠損と DNMTs 発現の表現型が一定でないことは、TET タンパク質だけでなく DNMTs も相互に機能を共有し、また細胞種や分化過程において発現が大きく変わる因子であることと反しない。いずれにしても、TET1/3 欠損株では

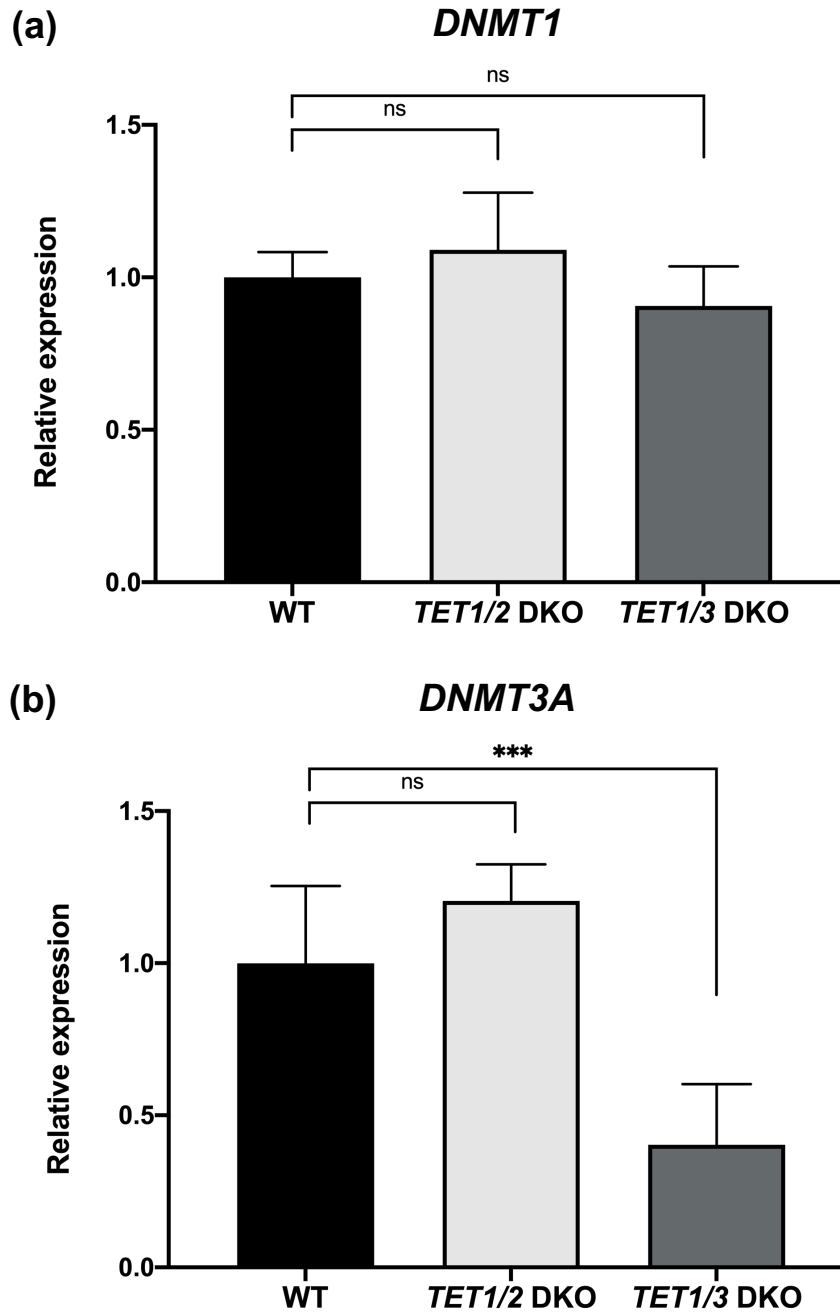


図4-6 TET二重欠損株におけるDNMTsの転写量解析

a) 各株の *DNMT1* のmRNA量をRT-qPCRで定量した。表記や検定はこれまでに同じ (WT n = 4、DKO n = 3)。

(b) 各株の *DNMT3A* のmRNA量をRT-qPCRで定量した。表記、検定は(a)に同じ (WT n = 4、DKO n = 3)。

DNMT3A の発現低下も伴っていたことから、TET タンパク質の二重欠損による単純な DNA メチル化の亢進は起きていない可能性が示唆された。

4-6 TET1/3 欠損株における抗体遺伝子多様化の表現型

4-5-2 項の結果より、TET1/2 欠損株および TET1/3 欠損株では、AID の発現が顕著に低下していた。そのため、いずれの株でも抗体遺伝子多様化が障害されていると推定できる。一方、第 3 章で示唆されたように、TET3 欠損による抗体遺伝子多様化の減少が偽遺伝子の DNA メチル化の亢進に起因するものと考ええると、TET1/3 欠損株における DNMT3A の発現低下は抗体遺伝子多様化を促進する方向に作用する可能性がある。そこで、これらの影響の効果を検証するため、TET1/3 欠損株における抗体遺伝子多様化を、膜型 IgM リバージョンアッセイで解析した。

TSA 非添加培地では、Day21 において TET1/3 欠損株において顕著なリバージョン頻度の低下が見られた（図 4-7 (a)）。野生株では平均 14.54%が sIgM(+)細胞であったのに対し、TET1/3 欠損株では 6.19%であった。この頻度の低下は TET 単一欠損株における結果（第 3 章 3-4-1）と TET1/3 欠損株における AID の発現低下（4-5-2）とも一致する。しかしながら、TET1/3 欠損株における AID の劇的な減少を考慮すると、想定よりも影響は小さいと考えられる。さらに Day28 においては、野生株では平均 17.74%、TET1/3 欠損株では平均 12.24%のリバージョンが観察された。この差について検定を行ったが、有意な差と判定されなかった。

一方 TSA 添加培地では、Day21 の時点で、TSA 非添加培地の結果と比べても顕著な野生株と TET1/3 欠損株の差が見られ、野生株では平均 48.3%が sIgM(+)細胞であったのに対し、TET1/3 欠損株では平均 8.64%のみであった。Day 28 においては野生株で平均 62.45%、TET1/3 欠損株で 25.21%であり、引き続き TET1/3 欠損株で明確に sIgM(+) 細胞の割合が低下していた。これらの TET1/3 欠損株における膜型 IgM リバージョン効率の低下は、4-5-2 項で確認された AID の顕著な発現低下と一致している。

なお、TSA 非添加培地に比べ、TSA 添加培地で野生株と TET1/3 欠損株との差が明確に確認された点について考察が必要である。TET1/3 欠損株では、膜型 IgM リバージョン効率は、TSA 非添加培地と添加培地間で大きな変動が見られなかった。一方、野生株においては、TSA 非添加時に比べ、TSA 添加時にリバージョン頻度

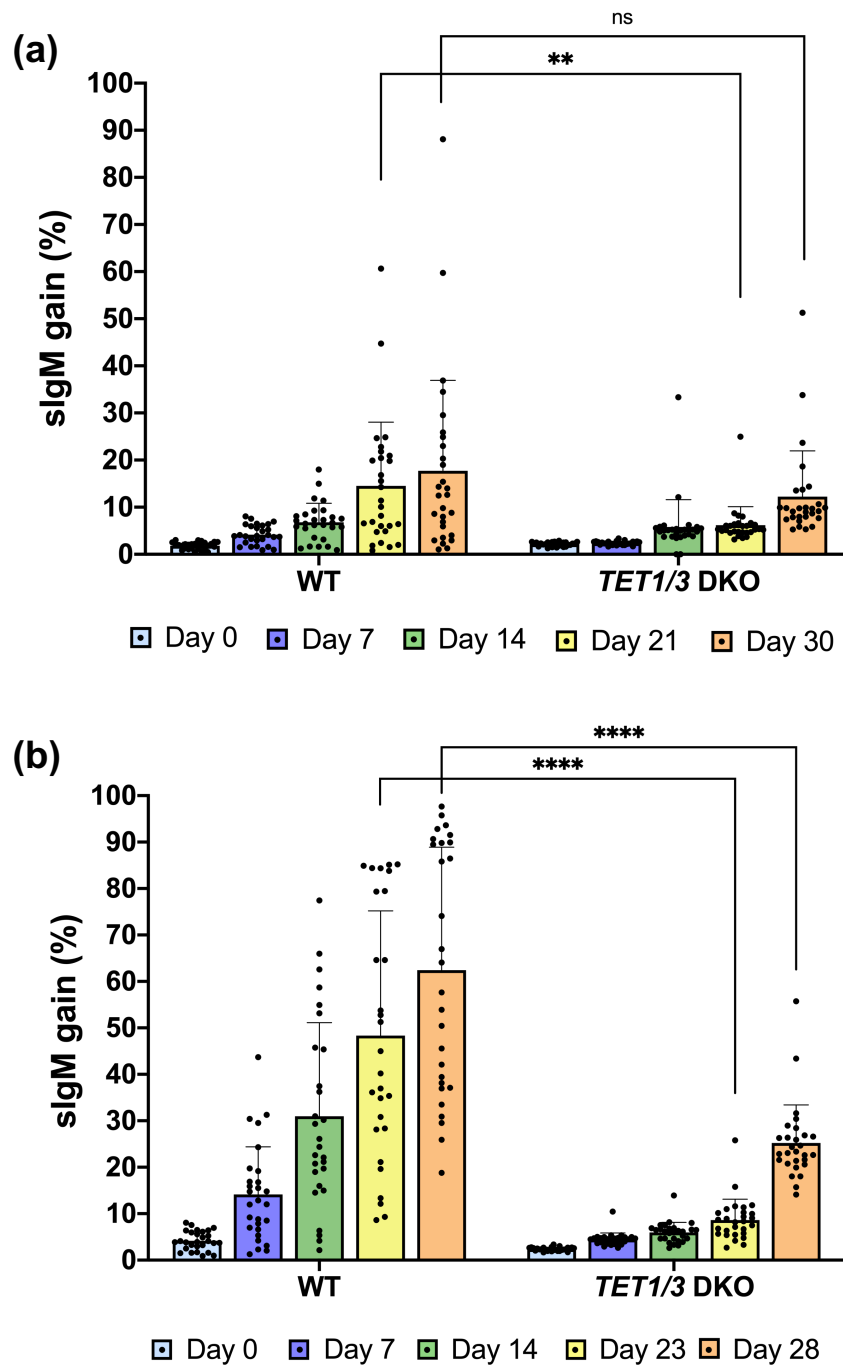


図4-7 TET1/3欠損株の抗体遺伝子多様化

a) TSA非添加培地、b) TSA添加培地における各株のsIgM(+)細胞の割合。各株から取得した28単一細胞クローン（サブクローン）を測定対象とした。棒グラフは28サブクロンの平均値、エラーバーは標準偏差、棒グラフ上の点は各サブクローンが示した値を表している。検定にはウェルチのt検定を用いた（** $p < 0.01$ 、**** $p < 0.0001$ ）。

が著しく亢進した。すなわち、TET1/3 欠損株では TSA の遺伝子変換促進効果が相対的に小さく現れていることになる。既に述べたように、TSA の作用機序はヒストンアセチル化を誘発して、抗体遺伝子多様化関連領域の DNA アクセシビリティを上げることで多様化を促進するものだと考えられている (Seo et al., 2006, 2005)。上記で TET1/3 欠損株において DNMT3A および AID の発現が減少することを示した。DNMT3A の発現抑制は DNA アクセシビリティの上昇に寄与することが予想され、AID の発現低下は抗体遺伝子多様化を抑制すると考えられる。両者は正反対の効果をもたらす可能性があるが、クロマチン環境をオープンにする効果があると思われる TSA 存在下では、AID の発現減少の影響が強く出るものと考えられる。

4-7 TET1/2 欠損株および TET1/3 欠損株における AID 発現制御領域におけるメチル化パターン

4-5-2 における結果より、TET1/2 欠損株および TET1/3 欠損株にて顕著な AID の発現低下が確認された。この原因として、TET ファミリータンパク質による AID のプロモーター/エンハンサー領域における脱メチル化を介した発現制御が障害されたことにより生じた可能性が考えられる。序論でも述べたように、AID の発現制御エレメントについてはヒトやマウスでは研究が進んでおり、現在までにプロモーター領域と 5 つのエンハンサー領域が同定・報告されている (Crouch et al., 2007; Kieffer-Kwon et al., 2013; C. W. J. Lio et al., 2019; Tran et al., 2010; Zan & Casali, 2013) (図 4-8 (a))。またプロモーター領域に結合する転写因子としては Sp1、HoxC4、NF- κ B などが考えられており、その他に Stat6、C/EBP、Smad3/4、Pax5、E2A、BATF などがエンハンサー領域に結合することで AID の発現が誘導され则认为されている (Park et al., 2009; Zan & Casali, 2013)。

しかしながら、このプロモーター領域は種間（ヒト、チンパンジー、マウス、ラット、イヌ、ウシ）で一定の配列共通性が確認されているものの (Park et al., 2009)、ニワトリでは配列が保存されておらず、エンハンサー領域も同定されていない。そこで、まずはニワトリ AID 遺伝子のプロモーター領域に関してその特徴を概観すべく、AID 遺伝子プロモーターが存在すると考えられる転写開始点上流の 1500 bp に関して、先行研究にて報告されている AID の発現を誘導する転写因子について、その推定結合部位の分布を確認した (図 4-8 (b))。なお推定にはオープンデータベースである JASPAR 2020 (Fornes et al., 2020)を利用し、図には推定された

領域の中でもスコアの比較的高かった (Score > 8.0) 結合部位を示している (推定された全ての領域は (図 4-8 (c)) に一覧にした)。

その結果、ニワトリ *AID* 遺伝子上流には、ヒトおよびマウスで同定されている転写因子の結合部位ではあるものの、複数の推定結合部位が存在していることがわかった。そこで、この領域におけるメチル化を介して *AID* の発現制御が起きている可能性は十分にあると判断し、その可能性を検討するべく、野生株と TET 二重欠損株にて *AID* 遺伝子上流領域に対しバイサルファイトシーケンシングを行なった (図 4-8 (d))。

その結果、TET1/2 欠損株においては一部のシトシンでメチル化が亢進していることが確認されたが、いずれも転写因子の推定結合部位ではなく、また数も少なく場所も散在しているため、このメチル化が転写因子の結合阻害あるいはヘテロクロマチン化を誘導して *AID* の発現を抑制するとは考えられなかった。

TET1/3 欠損株においても、TET1/2 欠損株に比べると一部領域にメチル化の亢進が見られたが、解析配列間にもばらつきが見られ、また上記で推定された結合部位とも外れていることから、TET1/3 二重欠損株における *AID* の発現減少を説明するものではないと考えられた。以上より、DT40 細胞における TET ファミリータンパク質による *AID* の発現制御は、*AID* 遺伝子のプロモーター領域に対するメチル化制御を介したものではないことが明らかとなった。

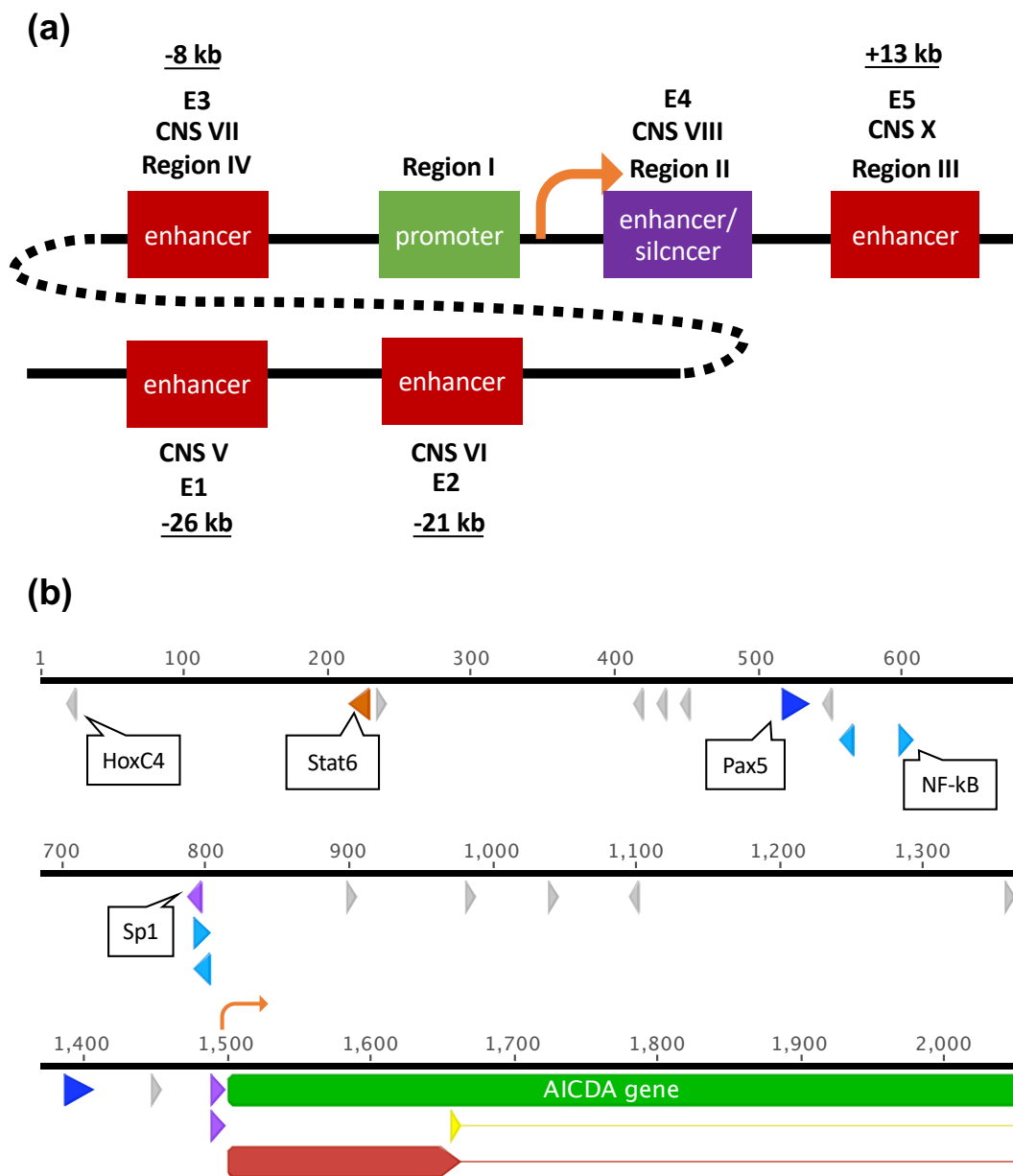


図4-8 AIDの発現制御領域におけるメチル化レベルの評価

- (a) マウスの*AID*発現制御エレメントの模式図。プロモーターとこれまで同定されているエンハンサー領域5つを、それぞれ報告された論文における名前と共に記載した。下線部の距離は転写開始点からの距離。
- (b) ニワトリ*AID*の転写開始点から上流1500 bpにおける、転写因子の推定結合部位を図示した。推定にはJASPAR 2020 (Frnes et al., 2020) を用いた。

(c)

Matrix ID	Name	Score	Relative score	Start	End	Strand	Predicted sequence
MA0079.3	SP1	11.5276	0.926171498	1489	1499	+	ACTCCTCCCCT
MA0014.1	Pax5	11.164	0.848729291	517	536	+	GAAGTAATGGAGCAGGACAG
MA0014.1	Pax5	11.062	0.846669815	1388	1407	+	AGTGCAGTGAGGAGAGGCAG
MA0079.3	SP1	9.90591	0.905768352	788	798	-	ATCCCTCCTCT
MA0105.2	NFKB1	9.37491	0.826811984	557	567	-	GGGGCTATCCC
MA0079.2	SP1	9.31411	0.865864622	1490	1499	+	CTCCTCCCCT
MA0520.1	Stat6	9.05157	0.86316524	215	229	-	CAGCTCCACAGAAGT
MA0014.3	PAX5	8.84402	0.846176942	202	213	+	GAGTATGACCAT
MA0014.3	PAX5	8.72765	0.843731338	497	508	-	GGGCATGACTGT
MA0079.2	SP1	8.6905	0.850159307	1290	1299	+	CCCAGGCCCC
MA0105.2	NFKB1	8.57376	0.807728192	598	608	+	GGAGGTTCTCC
MA0105.2	NFKB1	8.52275	0.806513146	793	803	-	GTGGAATCCCT
MA0105.2	NFKB1	8.3103	0.801452488	793	803	+	AGGGATTCCAC
MA0079.3	SP1	8.13581	0.883498532	1369	1379	-	GGCCCTCCCAG
MA0014.3	PAX5	7.72561	0.822673266	944	955	+	ATGCATGACACT
MA0520.1	Stat6	7.34866	0.839804528	72	86	-	CTATTCTACATAACA
MA0014.3	PAX5	7.18418	0.81129506	1328	1339	-	TAGCATGACGAG
MA0079.2	SP1	7.14351	0.811199401	788	797	-	TCCCTCCTCT
MA0520.1	Stat6	7.06117	0.835860712	1348	1362	-	AAATTATTCTGAATT
MA0014.3	PAX5	6.8732	0.804759763	378	389	-	ATGCGTGAAGCC
MA0079.2	SP1	6.78701	0.802221384	222	231	-	CCCAGCTCCA
MA0079.2	SP1	6.78701	0.802221384	550	559	-	CCCTGCTCCA
MA0079.3	SP1	6.52443	0.863225442	992	1002	+	ACACCACCCCT
MA0520.1	Stat6	5.78567	0.818363434	71	85	+	CTGTTATGTAAGAATA
MA0520.1	Stat6	4.52898	0.801124059	1344	1358	+	TATTAATTCAGAATA
MA0079.3	SP1	3.78639	0.828777845	1294	1304	+	GGCCCCCTCT
MA0079.3	SP1	3.55715	0.825893762	1321	1331	+	TTCCTGCCTCG
MA0079.3	SP1	3.52629	0.825505425	1395	1405	-	GCCTCTCCTCA
MA0079.3	SP1	3.34143	0.823179665	912	922	+	TGCCCCGCTCCT
MA0079.3	SP1	3.13626	0.820598438	563	573	+	GCCCCTACCTG
MA0079.3	SP1	3.01927	0.819126524	29	39	-	GCTGCTCCCTT
MA0079.3	SP1	2.47226	0.81224453	223	233	-	TTCCCAGCTCC
MA0079.3	SP1	2.41111	0.811475201	551	561	-	ATCCCTGCTCC
MA0079.3	SP1	2.35451	0.810763146	659	669	-	TCTGCTCCTCT
MA0079.3	SP1	2.18499	0.808630365	1099	1109	-	TCTCCTCCATT
MA0079.3	SP1	1.86547	0.804610477	914	924	+	CCCGCTCCTTT

図4-8 AIDの発現制御領域におけるメチル化レベルの評価 (続)

(c) JASPAR 2020 (Fornes et al., 2020) によるニワトリ *AID* 遺伝子上流1500 bp における転写因子の推定結合部位。(b)の図にはこのうち、相対的にスコアが高かったものを図示した。

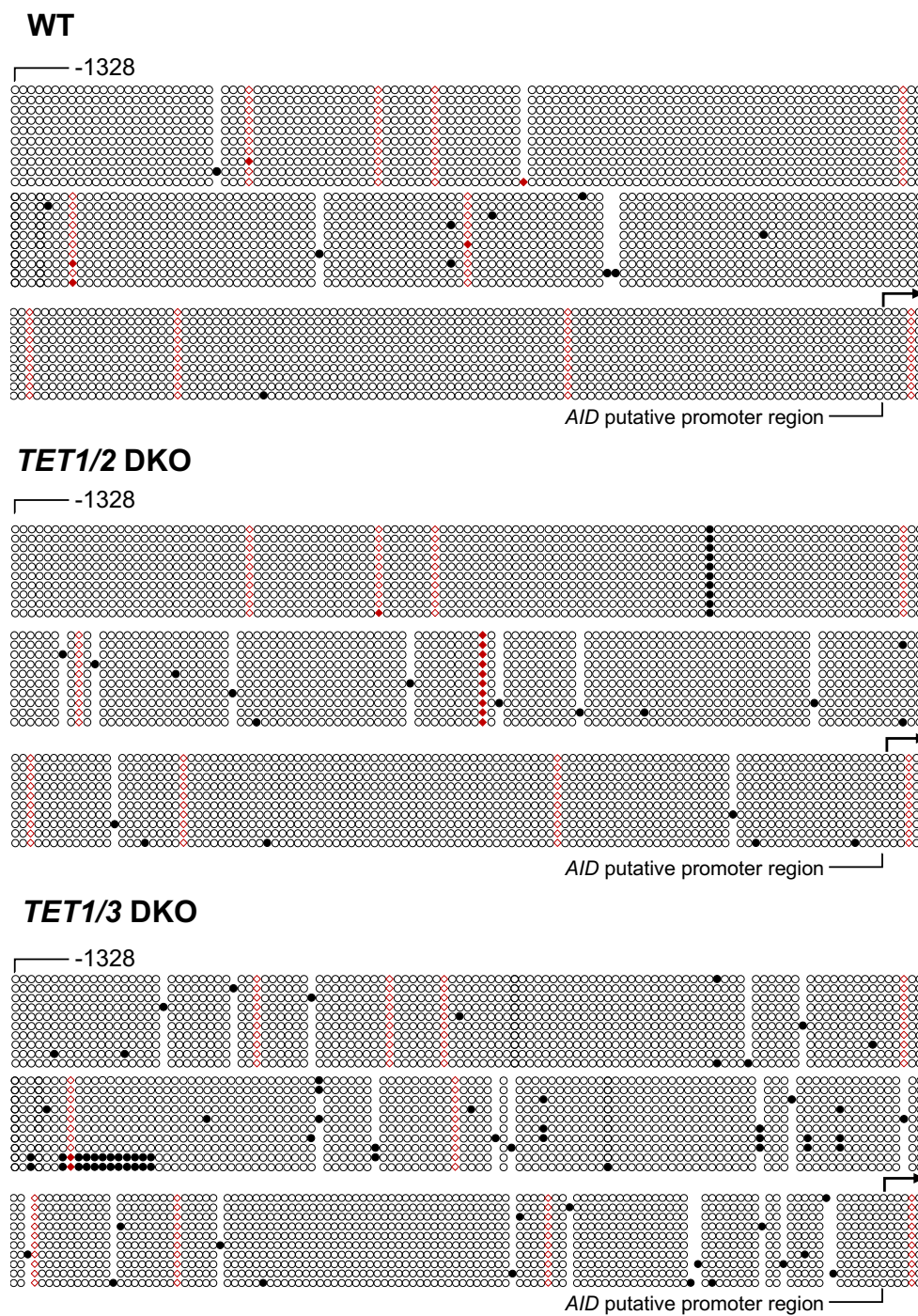


図4-8 *AID*の発現制御領域におけるメチル化レベルの評価（続）

(d) ニワトリ *AID* 遺伝子上流1500 bpにおけるバイサルファイト シーケンシングの結果の模式図。図には、解析配列中の代表的な10配列を図示した。黒丸が非CpGシトシン、赤丸がCpGシトシン、メチルシトシンは塗りつぶしで表現している。

第 5 章

総合考察

5-1 結果の総括

本研究では抗体遺伝子多様化のより包括的な理解を目的に、TET タンパク質欠損 DT40 細胞を構築してその表現型を解析した。これらの複数の変異株の表現型は複雑で多岐にわたるため、まず各欠損株および過剰発現株について野生株と比較した際の表現型を下記の表にまとめることにした。

表 D-1 各変異株の表現型のまとめ

※ 各表現型は、抗体遺伝子多様化表現型に対する効果あるいは結果で色分けし、程度が大きいものは太字で表した；（**促進**） **抑制** **変化なし** **未知**

TET1 欠損株	(1) 残存 TET 遺伝子の発現： TET2、TET3 ともに変化なし (2) 増殖速度： 変化なし (3) 抗体遺伝子多様化頻度（膜型 IgM リバージョンアッセイ） 【TSA 非添加】 低下 【TSA 添加】 低下 (4) ゲノム全体の 5hmC 量： 若干の増加 (5) 抗体遺伝子座の転写量： 変化なし (6) AID の転写量： 低下 (7) DNMTs の発現量：(DNMT1) 変化なし (DNMT3A) 変化なし
TET2 欠損株	(1) 残存 TET 遺伝子の発現： TET1、TET3 ともに変化なし (2) 増殖速度： 変化なし (3) 抗体遺伝子多様化頻度（膜型 IgM リバージョンアッセイ） 【TSA 非添加】 低下 【TSA 添加】 統計的に有意差なし （低下傾向） (4) ゲノム全体の 5hmC 量： 若干の低下 (5) 抗体遺伝子座の転写量： 低下 (6) AID の転写量： N%の低下 (7) DNMTs の発現量 (DNMT1) 変化なし (DNMT3A) 変化なし
TET3 欠損株	(1) 残存 TET 遺伝子の発現： TET1、TET2 ともに変化なし (2) 増殖速度： 変化なし (3) 抗体遺伝子多様化頻度（膜型 IgM リバージョンアッセイ） 【TSA 非添加】 低下 【TSA 添加】 低下

	<p>(4) ゲノム全体の 5hmC 量：低下</p> <p>(5) 抗体遺伝子座の転写量：低下</p> <p>(6) AID の転写量：低下</p> <p>(7) DNMTs の発現量： (DNMT1) ごくわずかな増加 (1.17 倍) (DNMT3A) 変化なし</p> <hr/> <p>(A) 抗体遺伝子の配列変化： (A-1) 変異導入頻度：低下 (A-2) 変異スペクトラム：変化なし</p> <p>(B) 偽遺伝子の利用：種類の減少</p> <p>(C) 抗体遺伝子座のメチル化：【全体】微増 (低メチル化状態) 【CpG】変化なし 【非 CpG】微増</p> <p>(D) DIVAC 配列のメチル化：【全体】微増 (低メチル化状態) 【CpG】増加 【非 CpG】微増</p> <p>(E) 偽遺伝子領域のメチル化： 【全体】$\psi 7$：増加 $\psi 8$：増加 $\psi 10$：変化なし 【CpG】$\psi 7$：変化なし $\psi 8$：変化なし $\psi 10$：低下 【非 CpG】$\psi 7$：増加 $\psi 8$：増加 $\psi 10$：増加</p> <p>(F) 抗体遺伝子多様化関連</p>
TET3 過剰発現株	<p>(1) ゲノム全体の 5hmC 量：増加</p> <p>(2) ゲノム全体の 5mC 量：増加 (低下せず)</p> <p>(3) 抗体遺伝子多様化頻度：変化なし</p> <p>(4) 増殖速度：変化なし</p>
TET1/2 欠損株	<p>(1) 増殖速度：ごくわずかな低下</p> <p>(2) 残存 TET 遺伝子：低下 (TET3)</p> <p>(3) ゲノム全体の 5hmC 量：低下</p> <p>(4) 抗体遺伝子座のメチル化：変化なし</p> <p>(5) 抗体遺伝子座の転写量：低下</p> <p>(6) AID の転写量：低下</p> <p>(7) AID プロモーター領域のメチル化：変化なし</p> <p>(8) DNMTs の発現量：(DNMT1) 変化なし (DNMT3A) 変化なし</p>
TET1/3 欠損株	<p>(1) 増殖速度：若干の低下</p> <p>(2) 残存 TET 遺伝子：低下 (TET2)</p> <p>(3) ゲノム全体の 5hmC 量：低下</p> <p>(4) 抗体遺伝子座のメチル化：変化なし</p> <p>(5) 抗体遺伝子座の転写量：変化なし</p> <p>(6) AID の転写量：低下</p> <p>(7) AID プロモーター領域のメチル化：変化なし</p>

	(8) DNMTs の発現量：(DNMT1) 変化なし (DNMT3A) 低下 (9) 抗体遺伝子多様化頻度（膜型 IgM リバージョンアッセイ） 【TSA 非添加】(Day 21) 低下 (Day 28) 統計的有意差無し（低下傾向） 【TSA 添加】(Day 21) 低下 (Day 28) 低下
--	---

以下では、以上の表現型を踏まえ、抗体遺伝子多様化における偽遺伝子を中心とした抗体遺伝子関連領域における DNA メチル化の意義と、TET タンパク質が果たす役割について議論する。

5-2 偽遺伝子領域の DNA メチル化と遺伝子変換

(1) 偽遺伝子領域の DNA メチル化の意義

これまで述べてきたように、遺伝子変換はヒストン修飾により制御されることが明らかとなっている (Kitao et al., 2008; Kurosawa et al., 2010; Lin et al., 2008; Seo et al., 2005)。特に、抗体遺伝子座のヒストン修飾に加えて、偽遺伝子領域におけるヒストン修飾およびそれを介して誘導されるクロマチン状態が遺伝子変換において重要であることも指摘されてきた (Cummings et al., 2007, 2008)。

しかし、転写因子などの結合を阻害し、またヘテロクロマチンを誘導する可能性もある DNA のメチル化について、遺伝子変換を含む抗体遺伝子多様化機構におけるその役割は十分に検討されてこなかった。本研究はその空白に、TET タンパク質という第 3 の因子を介して迫るものであったが、結果として、偽遺伝子領域の DNA メチル化により、抗体遺伝子多様化が抑制される可能性が示されたと言える。この特性は、野生株において、偽遺伝子におけるメチル化レベルがその偽遺伝子の利用のしやすさと負に関係していたこと（図 3-16）からも示唆されたが、TET3 欠損株において、遺伝子変換の大きな減少が偽遺伝子領域の高メチル化を伴っていたことから（図 3-17）、より強く支持された。

偽遺伝子領域のメチル化が遺伝子変換を抑制する仕組みとしては、大別して（1）遺伝子変換関連因子の接近を直接的に阻害する、（2）当該部位にヘテロクロマチン状態を誘導する、ということが考えられる（両者は排他的ではない）。前者の可能性については、遺伝子変換が相同組換えと同様の機構を利用していることから、相同組換えにおける DNA メチル化の役割を参照することで検討できるかもしれない。現在まで、そのような研究は脊椎動物では限られているが、スライ

カビやシロイヌナズナなどの植物においては DNA メチル化が相同組換えを抑制することが明らかにされている (Colot and Rossignol, 1999; Melamed-Bessudo and Levy, 2012; Mirouze et al., 2012; Yelina et al., 2015)。一方、後者については、複数の経路が報告されている。例えば、メチル化 DNA 部位には複製時に非アセチル化ヒストンが導入される、メチルシトシン結合タンパク質である MeCP2 や MBD2 の結合によりヒストン脱アセチル化酵素がリクルートされる、等である (Cedar and Bergman, 2009)。これらの可能性を実証するには、関連因子の偽遺伝子の局在を確かめることが求められる。

加えて今後、偽遺伝子の DNA メチル化による遺伝子変換への効果をより正確に検証するためには、例えば *de novo* DNMTs と融合した dCas9 などを用いて偽遺伝子領域に選択的に DNA メチル化を導入し (Pflueger et al., 2018; Stepper et al., 2017)、その結果としての遺伝子変換パターンの変化を解析することなどが考えられるかもしれない。しかしその場合には、本研究においても考慮した、野生株に内在的に存在する偽遺伝子の選好性や、抗体遺伝子座や偽遺伝子間の高い相同性によるオフターゲットの可能性などを、慎重に評価する必要があるだろう。

(2) 非 CpG シトシンのメチル化

本研究で示された偽遺伝子の DNA メチル化は、非 CpG のシトシン残基に生じていることが確認された。非 CpG シトシンのメチル化は、ES 細胞や iPS 細胞、また神経細胞やグリア細胞などに存在することが報告されてきたものの (Jang et al., 2017; Lister et al., 2009; Ziller et al., 2011)、長らくその生理的機能に関する研究は、メチル化 CpG シトシンの研究に比してごく限られてきた。しかしながら近年、例えば神経細胞の分化に伴い非 CpG シトシンのメチル化が亢進すること (Guo et al., 2014; Lister et al., 2013) や、2 型糖尿病患者の *PGC-1 α* プロモーター領域にて非 CpG シトシンのメチル化が亢進し、転写の低下を引き起こすこと (Barrès et al., 2009)、さらに MeCP2 がメチル化 CpG よりもメチル化非 CpG シトシンに選択的に結合し、遺伝子発現制御を介して Rett 症候群に関与することが報告されるに連れ (Chen et al., 2015; Gabel et al., 2015)、徐々にその機能に注目が集まっている (He and Ecker, 2015; Jang et al., 2017; Lucarelli et al., 2019)。なお、これらの研究により示された非 CpG シトシンへの MeCP2 の結合は、上に述べた、偽遺伝子領域の DNA メチル化を介してヘテロクロマチンが導入されるというモデルとも両立する。

非 CpG シトシンのメチル化と TET タンパク質の関係を考える上で留意しなければならないのは、序論でも述べたように、TET タンパク質が CpG シトシンに選好性を持つ点である (Hu et al., 2013)。この特性を踏まえると、TET3 欠損により導入された非 CpG シトシンが、TET3 存在下で直接 TET3 により脱メチル化される可能性は一見少ない様に思える。一方で、TET タンパク質とは対照的に、*de novo* DNMT である DNMT3A/B は、非 CpG シトシンをメチル化することが報告されている (Aoki et al., 2001; Gowher and Jeltsch, 2001; Ramsahoye et al., 2000)。特に、DNMT3A が DNA 鎖から離れつつ、反応部位では協働的にメチル化を行うことから、TET タンパク質と DNMT3A は標的領域において、TET が CpG を好んで結合しメチル化から保護する一方で、その TET が不在になると DNMT3A がその CpG や非 CpG 部位を含め近傍のシトシンを包括的にメチル化していくというモデルが提唱されている (Ravichandran et al., 2018)。なお、TET タンパク質と DNMTs が同じ領域にリクルートされ得ることは、序論で述べた先行研究の報告の通りである (Charlton et al., 2020; Gu et al., 2018)。

一方、TET タンパク質が CpG の保護を担い、その不在により非 CpG も含むシトシンのメチル化が促進する仮説については、TET3 欠損株における $\psi 7$ と $\psi 8$ 内 CpG 配列で DNA メチル化レベルが野生株とほぼ同等だった事実があり ($\psi 10$ に至ってはメチル化レベルが低下している)、整合性に欠けるように見える (図 3-18 (c))。しかし、ヒト ES 細胞の体細胞系列のエンハンサーでは、DNMT3A/B を二重欠損して初めて TET タンパク質による DNA 脱メチル化が観察されることが示されている。つまり、DNMT3A/B 存在化では DNA 脱メチル化が観察されないにも関わらず、当該領域に TET タンパク質が相互作用していることが示された (Charlton et al., 2020)。そのような機構が存在する理由として、急速で効率的な修飾状況の変化を可能にするためではと推察されているものの、詳細は明らかにされていない。本研究において確認された TET3 欠損株の偽遺伝子領域に特異的にメチル化が導入される機構については、TET3 や DNMT3A などの偽遺伝子座における局在様式を始め、今後さらなる検証が必要である。

5-3 TET タンパク質の機能分業とファミリータンパク質としての役割

単一種の TET タンパク質に関する欠損株や、二重欠損株の増殖速度測定から、単一種および任意の二種の組み合わせの TET タンパク質は、生存にとくに不可欠で

はないことが明らかとなった（図 3-2、図 4-1）。これは Tet1 欠損マウス B 細胞、Tet2 欠損マウス B 細胞、Tet2/3 欠損マウス B 細胞が、それぞれに障害を示しながらも生存可能であるという先行研究と一致する (Cimmino et al., 2015; Lio et al., 2016; Zhao et al., 2015)。

一方、抗体遺伝子多様化においては、TET1、TET2、TET3 がそれぞれに異なる機能を担うことが明らかになった。上述の表現型の表にまとめたように、TET1、TET2、TET3 のいずれの欠損によっても抗体遺伝子多様化頻度の減少が確認されたが（図 3-4）、その背景として、TET1 は AID の発現制御に（図 3-19 (b)）、TET2 はわずかに抗体遺伝子の転写制御に（図 3-19 (a)）、そして TET3 は上述の偽遺伝子の DNA メチル化パターン形成に加え、抗体遺伝子（図 3-19 (a)）および AID の転写（図 3-19 (b)）にも関与することが示唆された。これらのうち TET3 による抗体遺伝子座の転写制御に関しては、TET3 欠損株の DIVAC 配列 F2 core（抗体遺伝子のエンハンサー内部に位置する）が野生株と同様に低 DNA メチル化状態であったことから（図 3-15）、少なくともエンハンサーの DNA メチル化・脱メチル化を介したものでないことが示唆される。なおこれは Tet2/3 欠損マウス pro-B 細胞において、Ig κ 鎖のエンハンサーの高メチル化と共に抗体遺伝子の転写の低下が見られたことと異なる知見であり (Lio et al., 2016)、マウスとニワトリの B 細胞間で TET タンパク質が担う役割が異なることが示唆された。

TET1、TET2、TET3 の中で、DT40 細胞ではとくに TET3 が主要な 5mC の酸化作用を持つことが示された（図 3-7）。しかしながら、偽遺伝子領域で見られた DNA 高メチル化が非 CpG シトシン部位を中心（TET タンパク質が結合しないと考えられている）に観察されたことから、DT40 細胞における TET3 を介した酸化反応の直接的標的領域についてはまだ未解明の部分が多い。将来的には、TET3 欠損株のトランスクリプトーム解析に加え、TET3 の ChIP-seq などのゲノムワイド解析の結果を組み合わせる議論を行う必要がある。

今回の解析結果から、二種以上の TET タンパク質が DT40 細胞において担う機能は、単一種の TET タンパク質が担う機能と比べてより複雑であることが示唆された。例えば、二重欠損株では残存 *TET* 遺伝子の発現も低下しているにも関わらず（図 4-2）、TET1/2 二重欠損では、TET2 単独欠損と同等あるいはより軽度の抗体遺伝子転写量の減少しか見られず、TET1/3 二重欠損でも単独欠損と有意な差が確認されなかった（図 4-5）。これは、TET タンパク質と DNA 脱メチル化、ひいて

はそれを介した転写活性化という単純なモデルでは説明が困難である。近年ではこれを支持する報告が出てきており、例えば Tet2 と Dnmt3A の二重欠損によって、Tet2 あるいは Dnmt3A の単独欠損よりもさらに DNA 脱メチル化が昂進することが示された (López-Moyado et al., 2019)。また、同報告では、TET1 が DNMT3A の局在を制御することも確認されている (López-Moyado et al., 2019)。このような先行報告や、TET1/3 欠損株では DNMT3A の発現が減少していることも踏まえると (図 4-7 (b))、TET1、TET2、TET3 は直接抗体遺伝子座の転写制御を行なっているのではなく、DNMTs などのその他のタンパクと協調しながら制御を行っている可能性が示唆される。

また、TET1/2 欠損株および TET1/3 欠損株の表現型において、AID の顕著な発現低下が認められることは注目に値する (図 4-5 (b))。いずれの二重欠損株においても 5mC 酸化作用が大きく低下していることから (図 4-3)、DNA メチル化を介した発現制御が考えられたが、少なくとも AID のプロモーター領域を介した制御でないことが明らかとなった (図 4-8)。近年、TET タンパク質の DNA 脱メチル化がエンハンサー領域を対象としているとする報告 (Ginno et al., 2020; Hon et al., 2014; Lu et al., 2014) が増えつつある。また昨年、Tet2/3 欠損マウス B 細胞では、抗原曝露後の B 細胞の活性化時に AID の発現が誘導されず、それは AID のエンハンサー領域の DNA 高メチル化を伴うことが報告された (Lio et al., 2019)。ニワトリにおいては AID の発現制御エレメントがヒトやマウスと保存されておらず、また上述のように抗体遺伝子発現の制御が異なっていたことから、マウスにおける機構が単純に保存されているとは考えにくい。今後はエンハンサーと推定される領域も含めて分析の対象領域を拡大し、TET タンパク質による AID 発現制御機構を検討していきたい。

参考文献

- Abdel-Wahab, O., Mullally, A., Hedvat, C., Garcia-Manero, G., Patel, J., Wadleigh, M., Malinge, S., Yao, J.J., Kilpivaara, O., Bhat, R., et al. (2009). Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood* 114, 144–147.
- Abe, T., Branzei, D., and Hirota, K. (2018a). DNA damage tolerance mechanisms revealed from the analysis of immunoglobulin v gene diversification in avian DT40 cells. *Genes (Basel)*. 9.
- Abe, T., Ooka, M., Kawasumi, R., Miyata, K., Takata, M., Hirota, K., and Branzei, D. (2018b). Warsaw breakage syndrome DDX11 helicase acts jointly with RAD17 in the repair of bulky lesions and replication through abasic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 8412–8417.
- Aoki, A., Suetake, I., Miyagawa, J., Fujio, T., Chijiwa, T., Sasaki, H., and Tajima, S. (2001). Enzymatic properties of the de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 29, 3506–3512.
- Arakawa, H., and Buerstedde, J.M. (2004). Immunoglobulin Gene Conversion: Insights from Bursal B Cells and the DT40 Cell Line. *Dev. Dyn.* 229, 458–464.
- Arakawa, H., Hauschild, J., and Buerstedde, J.M. (2002). Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. *Science (80-.)*. 295, 1301–1306.
- Arakawa, H., Saribasak, H., and Buerstedde, J.M. (2004). Activation-induced cytidine deaminase initiates immunoglobulin gene conversion and hypermutation by a common intermediate. *PLoS Biol.* 2.
- Arand, J., Spieler, D., Karius, T., Branco, M.R., Meilinger, D., Meissner, A., Jenuwein, T., Xu, G., Leonhardt, H., Wolf, V., et al. (2012). In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. *PLoS Genet.* 8.
- Asmar, F., Punj, V., Christensen, J., Pedersen, M.T., Pedersen, A., Nielsen, A.B., Hother, C., Ralfkiaer, U., Brown, P., Ralfkiaer, E., et al. (2013). Genome-wide profiling identifies a DNA methylation signature that

- associates with TET2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 98, 1912–1920.
- Baba, T.W., Giroir, B.P., and Humphries, E.H. (1985). Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes. *Virology* 144, 139–151.
- Bachl, J., Carlson, C., Gray-Schopfer, V., Dessing, M., and Olsson, C. (2001). Increased Transcription Levels Induce Higher Mutation Rates in a Hypermutating Cell Line. *J. Immunol.* 166, 5051–5057.
- Barrès, R., Osler, M.E., Yan, J., Rune, A., Fritz, T., Caidahl, K., Krook, A., and Zierath, J.R. (2009). Non-CpG Methylation of the PGC-1 α Promoter through DNMT3B Controls Mitochondrial Density. *Cell Metab.* 10, 189–198.
- Bezzubova, O., Silbergleit, A., Yamaguchi-Iwai, Y., Takeda, S., and Buerstedde, J.M. (1997). Reduced X-ray resistance and homologous recombination frequencies in a RAD54(-/-) mutant of the chicken DT40 cell line. *Cell* 89, 185–193.
- Bhutani, N., Brady, J.J., Damian, M., Sacco, A., Corbel, S.Y., and Blau, H.M. (2010). Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* 463, 1042–1047.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6–21.
- Blagodatski, A., Batrak, V., Schmidl, S., Schoetz, U., Caldwell, R.B., Arakawa, H., and Buerstedde, J.M. (2009). A cis-acting diversification activator both necessary and sufficient for AID-mediated hypermutation. *PLoS Genet.* 5, 1–11.
- Bochtler, M., Kolano, A., and Xu, G.L. (2017). DNA demethylation pathways: Additional players and regulators. *BioEssays* 39, 1–13.
- Bransteitter, R., Pham, P., Scharfft, M.D., and Goodman, M.F. (2003). Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4102–4107.

- Budzyńska, P.M., Kyläniemi, M.K., Kallonen, T., Soikkeli, A.I., Nera, K.P., Lassila, O., and Alinikula, J. (2017). Bach2 regulates AID-mediated immunoglobulin gene conversion and somatic hypermutation in DT40 B cells. *Eur. J. Immunol.* *47*, 993–1001.
- Buerstedde, J.M., and Takeda, S. (1991). Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* *67*, 179–188.
- Buerstedde, J.M., Reynaud, C.A., Humphries, E.H., Olson, W., Ewert, D.L., and Weill, J.C. (1990). Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line. *EMBO J.* *9*, 921–927.
- Butler, J.E. (1998). Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals. *OIE Rev. Sci. Tech.* *17*, 43–70.
- Casellas, R., Basu, U., Yewdell, W.T., Chaudhuri, J., Robbiani, D.F., and Di Noia, J.M. (2016). Mutations, kataegis and translocations in B cells: Understanding AID promiscuous activity. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 164–176.
- Ceccaldi, R., Sarangi, P., and D’Andrea, A.D. (2016). The Fanconi anaemia pathway: New players and new functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 337–349.
- Cedar, H., and Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: Patterns and paradigms. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 295–304.
- Chandra, V., Bortnick, A., and Murre, C. (2015). AID targeting: Old mysteries and new challenges. *Trends Immunol.* *36*, 527–535.
- Charlton, J., Jung, E.J., Mattei, A.L., Bailly, N., Liao, J., Martin, E.J., Giesselmann, P., Brändl, B., Stamenova, E.K., Müller, F.J., et al. (2020). TETs compete with DNMT3 activity in pluripotent cells at thousands of methylated somatic enhancers. *Nat. Genet.* *52*, 819–827.
- Chen, L., Chen, K., Lavery, L.A., Baker, S.A., Shaw, C.A., Li, W., and Zoghbi, H.Y. (2015). Correction:

MeCP2 binds to non-CG methylated DNA as neurons mature, influencing transcription and the timing of onset for Rett syndrome (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2015) 112, 17 (5509-5514) DOI: 10.1073. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, E2982.

Cimmino, L., Dawlaty, M.M., Ndiaye-Lobry, D., Yap, Y.S., Bakogianni, S., Yu, Y., Bhattacharyya, S., Shaknovich, R., Geng, H., Lobry, C., et al. (2015). TET1 is a tumor suppressor of hematopoietic malignancy. *Nat. Immunol.* 16, 653–662.

Colot, V., and Rossignol, J.L. (1999). Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *BioEssays* 21, 402–411.

Conticello, S.G., Ganesh, K., Xue, K., Lu, M., Rada, C., and Neuberger, M.S. (2008). Interaction between Antibody-Diversification Enzyme AID and Spliceosome-Associated Factor CTNNB1. *Mol. Cell* 31, 474–484.

Cousineau, I., Abaji, C., and Belmaaza, A. (2005). BRCA1 regulates RAD51 function in response to DNA damage and suppresses spontaneous sister chromatid replication slippage: Implications for sister chromatid cohesion, genome stability, and carcinogenesis. *Cancer Res.* 65, 11384–11391.

Cummings, W.J., Yabuki, M., Ordinario, E.C., Bednarski, D.W., Quay, S., and Maizels, N. (2007). Chromatin structure regulates gene conversion. *PLoS Biol.* 5, 2145–2155.

Cummings, W.J., Bednarski, D.W., and Maizels, N. (2008). Genetic variation stimulated by epigenetic modification. *PLoS One* 3.

Dawlaty, M.M., Breiling, A., Le, T., Raddatz, G., Barrasa, M.I., Cheng, A.W., Gao, Q., Powell, B.E., Li, Z., Xu, M., et al. (2013). Combined Deficiency of Tet1 and Tet2 Causes Epigenetic Abnormalities but Is Compatible with Postnatal Development. *Dev. Cell* 24, 310–323.

Dawlaty, M.M., Breiling, A., Le, T., Barrasa, M.I., Raddatz, G., Gao, Q., Powell, B.E., Cheng, A.W., Faull, K.F., Lyko, F., et al. (2014). Loss of tet enzymes compromises proper differentiation of embryonic stem cells.

Dev. Cell 29, 102–111.

Deaton, A.M., and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 25, 1010–1022.

Delhommeau, F., Dupont, S., Valle, V. Della, James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.-P., Robert, F., Alberdi, A., et al. (2009). Mutation in TET2 in Myeloid Cancers. *N. Engl. J. Med.* 360, 2289–2301.

Diaz, M., and Flajnik, M.F. (1998). Evolution of somatic hypermutation and gene conversion in adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 162, 13–24.

Dominguez, P.M., Teater, M., Chambwe, N., Kormaksson, M., Redmond, D., Ishii, J., Vuong, B., Chaudhuri, J., Melnick, A., Vasanthakumar, A., et al. (2015). DNA Methylation Dynamics of Germinal Center B Cells Are Mediated by AID. *Cell Rep.* 12, 2086–2098.

Dominguez, P.M., Ghamlouch, H., Rosikiewicz, W., Kumar, P., Béguelin, W., Fontán, L., Rivas, M.A., Pawlikowska, P., Armand, M., Mouly, E., et al. (2018). TET2 deficiency causes germinal center hyperplasia, impairs plasma cell differentiation, and promotes b-cell lymphomagenesis. *Cancer Discov.* 8, 1633–1653.

Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H., and Alt, F.W. (2005). Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: Similarities and differences. *Adv. Immunol.* 86, 43–112.

Frauer, C., Rottach, A., Meilinger, D., Bultmann, S., Fellingner, K., Hasenöder, S., Wang, M., Qin, W., Söding, J., Spada, F., et al. (2011). Different binding properties and function of CXXC zinc finger domains in Dnmt1 and Tet1. *PLoS One* 6.

Fritz, E.L., Rosenberg, B.R., Lay, K., Mihailović, A., Tuschl, T., and Papavasiliou, F.N. (2013). A comprehensive analysis of the effects of the deaminase AID on the transcriptome and methylome of activated B cells. *Nat. Immunol.* 14, 749–755.

Fugmann, S.D., Lee, A.I., Shockett, P.E., Villey, I.J., and Schatz, D.G. (2000). The RAG proteins and V(D)J recombination: Complexes, ends, and transposition. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 495–527.

Fukita, Y., Jacobs, H., and Rajewsky, K. (1998). Somatic Hypermutation in the Heavy Chain Locus Correlates with Transcription. *Immunity* 9, 105–114.

Gabel, H.W., Kinde, B., Stroud, H., Gilbert, C.S., Harmin, D.A., Kastan, N.R., Hemberg, M., Ebert, D.H., and Greenberg, M.E. (2015). Disruption of DNA-methylation-dependent long gene repression in Rett syndrome. *Nature* 522, 89–93.

Ginno, P.A., Gaidatzis, D., Feldmann, A., Hoerner, L., Imanci, D., Burger, L., Zilbermann, F., Peters, A.H.F.M., Edenhofer, F., Smallwood, S.A., et al. (2020). A genome-scale map of DNA methylation turnover identifies site-specific dependencies of DNMT and TET activity. *Nat. Commun.* 11.

Goll, M.G., and Bestor, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 481–514.

Gowher, H., and Jeltsch, A. (2001). Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: The enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpA sites. *J. Mol. Biol.* 309, 1201–1208.

Gu, T., Lin, X., Cullen, S.M., Luo, M., Jeong, M., Estecio, M., Shen, J., Hardikar, S., Sun, D., Su, J., et al. (2018). DNMT3A and TET1 cooperate to regulate promoter epigenetic landscapes in mouse embryonic stem cells. *Genome Biol.* 19, 1–15.

Guo, J.U., Su, Y., Shin, J.H., Shin, J., Li, H., Xie, B., Zhong, C., Hu, S., Le, T., Fan, G., et al. (2014). Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nat. Neurosci.* 17, 215–222.

Hashimoto, H., Liu, Y., Upadhyay, A.K., Chang, Y., Howerton, S.B., Vertino, P.M., Zhang, X., and Cheng, X. (2012). Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation.

Nucleic Acids Res. 40, 4841–4849.

Hashimoto, K., Kurosawa, K., Murayama, A., Seo, H., and Ohta, K. (2016). B cell-based seamless engineering of antibody Fc domains. *PLoS One* 11, 1–22.

Hatanaka, A., Yamazoe, M., Sale, J.E., Takata, M., Yamamoto, K., Kitao, H., Sonoda, E., Kikuchi, K., Yonetani, Y., and Takeda, S. (2005). Similar Effects of Brca2 Truncation and Rad51 Paralog Deficiency on Immunoglobulin V Gene Diversification in DT40 Cells Support an Early Role for Rad51 Paralogs in Homologous Recombination. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1124–1134.

He, Y., and Ecker, J.R. (2015). Non-CG Methylation in the Human Genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 16, 55–77.

He, Y.F., Li, B.Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, N., et al. (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* (80-.). 333, 1303–1307.

Hirota, K., Sonoda, E., Kawamoto, T., Motegi, A., Masutani, C., Hanaoka, F., Szüts, D., Iwai, S., Sale, J.E., Lehmann, A., et al. (2010). Simultaneous disruption of two DNA polymerases, Polη and Polζ, in avian DT40 cells unmasks the role of Polη in cellular response to various DNA lesions. *PLoS Genet.* 6, 1–13.

Hochegger, H., Dejsuphong, D., Fukushima, T., Morrison, C., Sonoda, E., Schreiber, V., Guang, Y.Z., Saberi, A., Masutani, M., Adachi, N., et al. (2006). Parp-1 protects homologous recombination from interference by Ku and Ligase IV in vertebrate cells. *EMBO J.* 25, 1305–1314.

Hon, G.C., Song, C.X., Du, T., Jin, F., Selvaraj, S., Lee, A.Y., Yen, C.A., Ye, Z., Mao, S.Q., Wang, B.A., et al. (2014). 5mC oxidation by Tet2 modulates enhancer activity and timing of transcriptome reprogramming during differentiation. *Mol. Cell* 56, 286–297.

Hu, L., Li, Z., Cheng, J., Rao, Q., Gong, W., Liu, M., Shi, Y.G., Zhu, J., Wang, P., and Xu, Y. (2013). Crystal Structure of TET2-DNA Complex: Insight into TET-Mediated 5mC Oxidation. *Cell* 155, 1545–1555.

- Inoue, A., and Zhang, Y. (2011). Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science* (80-.). 334, 194.
- Ito, S., Dalessio, A.C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L.C., and Zhang, Y. (2010). Role of tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466, 1129–1133.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., and Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* (80-.). 333, 1300–1303.
- Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 33, 245–254.
- Jang, H.S., Shin, W.J., Lee, J.E., and Do, J.T. (2017). CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function. *Genes* (Basel). 8, 2–20.
- Jin, S.G., Zhang, Z.M., Dunwell, T.L., Harter, M.R., Wu, X., Johnson, J., Li, Z., Liu, J., Szabó, P.E., Lu, Q., et al. (2016). Tet3 Reads 5-Carboxylcytosine through Its CXXC Domain and Is a Potential Guardian against Neurodegeneration. *Cell Rep.* 14, 493–505.
- Kawamoto, T., Araki, K., Sonoda, E., Yamashita, Y.M., Harada, K., Kikuchi, K., Masutani, C., Hanaoka, F., Nozaki, K., Hashimoto, N., et al. (2005). Dual roles for DNA polymerase η in homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis. *Mol. Cell* 20, 793–799.
- Kitao, H., Kimura, M., Yamamoto, K., Seo, H., Namikoshi, K., Agata, Y., Ohta, K., and Takata, M. (2008). Regulation of histone H4 acetylation by transcription factor E2A in Ig gene conversion. *Int. Immunol.* 20, 277–284.
- Koh, K.P., Yabuuchi, A., Rao, S., Huang, Y., Cunniff, K., Nardone, J., Laiho, A., Tahiliani, M., Sommer, C.A., Mostoslavsky, G., et al. (2011). Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 200–213.

Kohler, K.M., McDonald, J.J., Duke, J.L., Arakawa, H., Tan, S., Kleinstein, S.H., Buerstedde, J.-M., and Schatz, D.G. (2012). Identification of Core DNA Elements That Target Somatic Hypermutation. *J. Immunol.* *189*, 5314–5326.

Kohli, R.M., and Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* *502*, 472–479.

Kulis, M., Heath, S., Bibikova, M., Queirós, A.C., Navarro, A., Clot, G., Martínez-Trillos, A., Castellano, G., Brun-Heath, I., Pinyol, M., et al. (2012). Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* *44*, 1236–1242.

Kulis, M., Merkel, A., Heath, S., Queirós, A.C., Schuyler, R.P., Castellano, G., Beekman, R., Raineri, E., Esteve, A., Clot, G., et al. (2015). Whole-genome fingerprint of the DNA methylome during human B cell differentiation. *Nat. Genet.* *47*, 746–756.

Kurosawa, K., Lin, W., and Ohta, K. (2010). Distinct roles of HDAC1 and HDAC2 in transcription and recombination at the immunoglobulin loci in the chicken B cell line DT40. *J. Biochem.* *148*, 201–207.

Larijani, M., and Martin, A. (2012). Seminars in Immunology The biochemistry of activation-induced deaminase and its physiological functions. *Semin. Immunol.* *24*, 255–263.

Larijani, M., Frieder, D., Sonbuchner, T.M., Bransteitter, R., Goodman, M.F., Bouhassira, E.E., Scharff, M.D., and Martin, A. (2005). Methylation protects cytidines from AID-mediated deamination. *Mol. Immunol.* *42*, 599–604.

Law, J.A., and Jacobsen, S.E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 204–220.

Liao, J., Karnik, R., Gu, H., Ziller, M.J., Clement, K., Tsankov, A.M., Akopian, V., Gifford, C.A., Donaghey, J., Galonska, C., et al. (2015). Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic

stem cells. *Nat. Genet.* 47, 469–478.

Lin, W., Hashimoto, S.I., Seo, H., Shibata, T., and Ohta, K. (2008). Modulation of immunoglobulin gene conversion frequency and distribution by the histone deacetylase HDAC2 in chicken DT40. *Genes to Cells* 13, 255–268.

Lio, C.W., Zhang, J., González-Avalos, E., Hogan, P.G., Chang, X., and Rao, A. (2016). Tet2 and Tet3 cooperate with B-lineage transcription factors to regulate DNA modification and chromatin accessibility. *Elife* 5, 1–26.

Lio, C.W.J., Shukla, V., Samaniego-Castruita, D., González-Avalos, E., Chakraborty, A., Yue, X., Schatz, D.G., Ay, F., and Rao, A. (2019). TET enzymes augment activation-induced deaminase (AID) expression via 5-hydroxymethylcytosine modifications at the Aicda superenhancer. *Sci. Immunol.* 4, 1–15.

Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.M., et al. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315–322.

Lister, R., Mukamel, E.A., Nery, J.R., Urich, M., Puddifoot, C.A., Johnson, N.D., Lucero, J., Huang, Y., Dwork, A.J., Matthew, D., et al. (2013). Epigenetic reconfiguration in Mammalian Brain Development. *Science* (80-.). 341, 1–21.

Liu, M., Duke, J.L., Richter, D.J., Vinuesa, C.G., Goodnow, C.C., Kleinstein, S.H., and Schatz, D.G. (2008). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451, 841–845.

López-Moyado, I.F., Tsagaratou, A., Yuita, H., Seo, H., Delatte, B., Heinz, S., Benner, C., and Rao, A. (2019). Paradoxical association of TET loss of function with genome-wide DNA hypomethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 16933–16942.

Lorsback, R.B., Moore, J., Mathew, S., Raimondi, S.C., Mukatira, S.T., and Downing, J.R. (2003). TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;23)

[3]. *Leukemia* 17, 637–641.

Lu, F., Liu, Y., Jiang, L., Yamaguchi, S., and Zhang, Y. (2014). Role of Tet proteins in enhancer activity and telomere elongation. *Genes Dev.* 28, 2103–2119.

Lucarelli, M., Ferraguti, G., and Fuso, A. (2019). Active demethylation of Non-CpG moieties in animals: A neglected research area. *Int. J. Mol. Sci.* 20.

Maiti, A., and Drohat, A.C. (2011). Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: Potential implications for active demethylation of CpG sites. *J. Biol. Chem.* 286, 35334–35338.

Maizels, N. (2005). Immunoglobulin gene diversification. *Annu. Rev. Genet.* 39, 23–46.

McCormack, W.T., and Thompson, C.B. (1990). Chicken IgL variable region gene conversions display pseudogene donor preference and 5' to 3' polarity. *Genes Dev.* 4, 548–558.

Mellwraith, M.J., Vaisman, A., Liu, Y., Fanning, E., Woodgate, R., and West, S.C. (2005). Human DNA polymerase η promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Mol. Cell* 20, 783–792.

Melamed-Bessudo, C., and Levy, A.A. (2012). Deficiency in DNA methylation increases meiotic crossover rates in euchromatic but not in heterochromatic regions in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109.

Mirouze, M., Lieberman-Lazarovich, M., Aversano, R., Bucher, E., Nicolet, J., Reinders, J., and Paszkowski, J. (2012). Loss of DNA methylation affects the recombination landscape in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5880–5885.

Mohiuddin, Kobayashi, S., Keka, I.S., Guilbaud, G., Sale, J., Narita, T., Abdel-Aziz, H.I., Wang, X., Ogawa, S., Sasanuma, H., et al. (2016). The role of HERC2 and RNF8 ubiquitin E3 ligases in the promotion of translesion DNA synthesis in the chicken DT40 cell line. *DNA Repair (Amst.)* 40, 67–76.

- Morgan, H.D., Dean, W., Coker, H.A., Reik, W., and Petersen-Mahrt, S.K. (2004). Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: Implications for epigenetic reprogramming. *J. Biol. Chem.* 279, 52353–52360.
- Mostoslavsky, R., Singh, N., Kirillov, A., Pelanda, R., Cedar, H., Chess, A., and Bergman, Y. (1998). kappa chain monoallelic demethylation and the establishment of allelic exclusion. *Genes Dev.* 12, 1801–1811.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18470–18476.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553–563.
- Muto, A., Tashiro, S., Nakajima, O., Hoshino, H., Takahashi, S., Sakoda, E., Ikebe, D., Yamamoto, M., and Igarashi, K. (2004). The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature* 429, 566–571.
- Nabel, C.S., Jia, H., Ye, Y., Shen, L., Goldschmidt, H.L., Stivers, J.T., Zhang, Y., and Kohli, R.M. (2012). AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation. *Nat. Chem. Biol.* 8, 751–758.
- Nakase, H., Takahama, Y., and Akamatsu, Y. (2003). Effect of CpG methylation on RAG1/RAG2 reactivity: Implications of direct and indirect mechanisms for controlling V (D) J cleavage. *EMBO Rep.* 4, 774–780.
- Di Noia, J.M., and Neuberger, M.S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 1–22.
- Ochiai, K., Katoh, Y., Ikura, T., Hoshikawa, Y., Noda, T., Karasuyama, H., Tashiro, S., Muto, A., and

Igarashi, K. (2006). Plasmacytic transcription factor Blimp-1 is repressed by Bach2 in B cells. *J. Biol. Chem.* 281, 38226–38234.

Odegard, V.H., and Schatz, D.G. (2006). Targeting of somatic hypermutation. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 573–583.

Oestergaard, V.H., Pentzold, C., Pedersen, R.T., Iosif, S., Alpi, A., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., and Lisby, M. (2012). RNF8 and RNF168 but not HERC2 are required for DNA damage-induced ubiquitylation in chicken DT40 cells. *DNA Repair (Amst)*. 11, 892–905.

Orlanski, S., Labi, V., Reizel, Y., Spiro, A., Lichtenstein, M., Levin-Klein, R., Koralov, S.B., Skversky, Y., Rajewsky, K., Cedar, H., et al. (2016). Tissue-specific DNA demethylation is required for proper B-cell differentiation and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 5018–5023.

Paddock, M.N., Buelow, B.D., Takeda, S., and Scharenberg, A.M. (2010). The BRCT domain of PARP-1 is required for immunoglobulin gene conversion. *PLoS Biol.* 8.

Pastor, W.A., Aravind, L., and Rao, A. (2013). TETonic shift: Biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 341–356.

Peters, A., and Storb, U. (1996). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity* 4, 57–65.

Petersen-Mahrt, S.K., Harris, R.S., and Neuberger, M.S. (2002). AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* 418, 99–103.

Pflueger, C., Tan, D., Swain, T., Nguyen, T., Pflueger, J., Nefzger, C., Polo, J.M., Ford, E., and Lister, R. (2018). A modular dCas9-SunTag DNMT3A epigenome editing system overcomes pervasive off-target activity of direct fusion dCas9-DNMT3A constructs. *BioRxiv* 1193–1206.

Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J., and Goodman, M.F. (2003). Processive AID-catalysed cytosine

deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* 424, 103–107.

Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S.J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., and Reik, W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463, 1101–1105.

Quivoron, C., Couronné, L., Della Valle, V., Lopez, C.K., Plo, I., Wagner-Ballon, O., Do Cruzeiro, M., Delhommeau, F., Arnulf, B., Stern, M.H., et al. (2011). TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis. *Cancer Cell* 20, 25–38.

Rai, K., Huggins, I.J., James, S.R., Karpf, A.R., Jones, D.A., and Cairns, B.R. (2008). DNA Demethylation in Zebrafish Involves the Coupling of a Deaminase, a Glycosylase, and Gadd45. *Cell* 135, 1201–1212.

Rajewsky, N. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system-Rajewsky-Nature-1996.pdf. *Nature* 381, 751–757.

Ramsahoye, B.H., Biniszkiewicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A.P., and Jaenisch, R. (2000). Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5237–5242.

Rangam, G., Schmitz, K.M., Cobb, A.J.A., and Petersen-Mahrt, S.K. (2012). Aid enzymatic activity is inversely proportional to the size of cytosine c5 orbital cloud. *PLoS One* 7, 3–8.

Ravichandran, M., Jurkowska, R.Z., and Jurkowski, T.P. (2018). Target specificity of mammalian DNA methylation and demethylation machinery. *Org. Biomol. Chem.* 16, 1419–1435.

Renkawitz, J., Lademann, C.A., and Jentsch, S. (2014). Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 369–383.

Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-

Lagelouse, R., Gennery, A., et al. (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102, 565–575.

Reynaud, C.A., Anquez, V., Dahan, A., and Weill, J.C. (1985). A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. *Cell* 40, 283–291.

Reynaud, C.A., Anquez, V., Grimal, H., and Weill, J.C. (1987). A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell* 48, 379–388.

Reynaud, C.A., Dahan, A., Anquez, V., and Weill, J.C. (1989). Somatic hyperconversion diversifies the single VH gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell* 59, 171–183.

Robertson, K.D., and Wolffe, A.P. (2000). DNA methylation in Health and Disease. *Nat. Rev. Genet.* 1, 11–19.

Rush, J.S., Fugmann, S.D., and Schatz, D.G. (2004). Staggered AID-dependent DNA double strand breaks are the predominant DNA lesions targeted to S μ in Ig class switch recombination. *Int. Immunol.* 16, 549–557.

Saberi, A., Hohegger, H., Szuts, D., Lan, L., Yasui, A., Sale, J.E., Taniguchi, Y., Murakawa, Y., Zeng, W., Yokomori, K., et al. (2007). RAD18 and Poly(ADP-Ribose) Polymerase Independently Suppress the Access of Nonhomologous End Joining to Double-Strand Breaks and Facilitate Homologous Recombination-Mediated Repair. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2562–2571.

Sale, J.E., Calandrini, D.M., Takata, M., Takeda, S., and Neuberger, M.S. (2001). Ablation of XRCC2/3 transforms immunoglobulin V gene conversion into somatic hypermutation. *Nature* 77, 921–926.

Saxonov, S., Berg, P., and Brutlag, D.L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1412–1417.

Schatz, D.G. (2004). V(D)J recombination. *Immunol. Rev.* 200, 5–11.

Schrader, C.E., Linehan, E.K., Mochegova, S.N., Woodland, R.T., and Stavnezer, J. (2005). Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG. *J. Exp. Med.* 202, 561–568.

Sebesta, M., Burkovics, P., Juhasz, S., Zhang, S., Szabo, J.E., Lee, M.Y.W.T., Haracska, L., and Krejci, L. (2013). Role of PCNA and TLS polymerases in D-loop extension during homologous recombination in humans. *DNA Repair (Amst)*. 12, 691–698.

Seo, H., Masuoka, M., Murofushi, H., Takeda, S., Shibata, T., and Ohta, K. (2005). Rapid generation of specific antibodies by enhanced homologous recombination. *Nat. Biotechnol.* 23, 731–735.

Seo, H., Masuda, H., Asagoshi, K., Uchiki, T., Kawata, S., Sasaki, G., Yabuki, T., Miyai, S., Takahashi, N., Hashimoto, S. ichi, et al. (2020). Streamlined human antibody generation and optimization by exploiting designed immunoglobulin loci in a B cell line. *Cell. Mol. Immunol.*

Smith, Z.D., and Meissner, A. (2013). DNA methylation: Roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 14, 204–220.

Stadler, M.B., Murr, R., Burger, L., Ivanek, R., Lienert, F., Schöler, A., Wirbelauer, C., Oakeley, E.J., Gaidatzis, D., Tiwari, V.K., et al. (2011). DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions. *Nature* 480, 490–495.

Stavnezer, J., Guikema, J.E.J., and Schrader, C.E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 261–292.

Stepper, P., Kungulovski, G., Jurkowska, R.Z., Chandra, T., Krueger, F., Reinhardt, R., Reik, W., Jeltsch, A., and Jurkowski, T.P. (2017). Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 45, 1703–1713.

Su, J., Shao, X., Liu, H., Liu, S., Wu, Q., and Zhang, Y. (2012). Genome-wide dynamic changes of DNA methylation of repetitive elements in human embryonic stem cells and fetal fibroblasts. *Genomics* 99, 10–17.

- Suzuki, M.M., and Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: Provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.* 9, 465–476.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., et al. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* (80-.). 324, 930–935.
- Tang, E.S., and Martin, A. (2007). Immunoglobulin gene conversion: Synthesizing antibody diversification and DNA repair. *DNA Repair (Amst)*. 6, 1557–1571.
- Teater, M., Dominguez, P.M., Redmond, D., Chen, Z., Ennishi, D., Scott, D.W., Cimmino, L., Ghione, P., Chaudhuri, J., Gascoyne, R.D., et al. (2018). AICDA drives epigenetic heterogeneity and accelerates germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat. Commun.* 9, 1–10.
- Teng, G., and Papavasiliou, F.N. (2007). Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu. Rev. Genet.* 41, 107–120.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575–581.
- Varley, K.E., Gertz, J., Bowling, K.M., Parker, S.L., Reddy, T.E., Pauli-Behn, F., Cross, M.K., Williams, B.A., Stamatoyannopoulos, J.A., Crawford, G.E., et al. (2013). Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res.* 23, 555–567.
- Verma, N., Pan, H., Doré, L.C., Shukla, A., Li, Q. V., Pelham-Webb, B., Teijeiro, V., González, F., Krivtsov, A., Chang, C.J., et al. (2018). TET proteins safeguard bivalent promoters from de novo methylation in human embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 50, 83–95.
- Vettermann, C., and Schlissel, M.S. (2010). Allelic exclusion of immunoglobulin genes: Models and mechanisms. *Immunol. Rev.* 237, 22–42.
- Weber, A.R., Krawczyk, C., Robertson, A.B., Kusnierczyk, A., Vågbø, C.B., Schuermann, D., Klungland, A.,

and Schar, P. (2016). Biochemical reconstitution of TET1-TDG-BER-dependent active DNA demethylation reveals a highly coordinated mechanism. *Nat. Commun.* 7.

Weissmann, S., Alpermann, T., Grossmann, V., Kowarsch, A., Nadarajah, N., Eder, C., Dicker, F., Fasan, A., Haferlach, C., Haferlach, T., et al. (2012). Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 26, 934–942.

Winding, P., and Berchtold, M.W. (2001). The chicken B cell line DT40: A novel tool for gene disruption experiments. *J. Immunol. Methods* 249, 1–16.

Wu, X., and Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 18, 517–534.

Xu, Y., Wu, F., Tan, L., Kong, L., Xiong, L., Deng, J., Barbera, A.J., Zheng, L., Zhang, H., Huang, S., et al. (2011). Genome-wide Regulation of 5hmC, 5mC, and Gene Expression by Tet1 Hydroxylase in Mouse Embryonic Stem Cells. *Mol. Cell* 42, 451–464.

Xu, Y., Xu, C., Kato, A., Tempel, W., Abreu, J.G., Bian, C., Hu, Y., Hu, D., Zhao, B., Cerovina, T., et al. (2012). Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for xenopus eye and neural development. *Cell* 151, 1200–1213.

Yamaguchi, S., Shen, L., Liu, Y., Sandler, D., and Zhang, Y. (2013). Role of Tet1 in erasure of genomic imprinting. *Nature* 504, 460–464.

Yamamoto, K., Hirano, S., Ishiai, M., Morishima, K., Kitao, H., Namikoshi, K., Kimura, M., Matsushita, N., Arakawa, H., Buerstedde, J.-M., et al. (2005). Fanconi Anemia Protein FANCD2 Promotes Immunoglobulin Gene Conversion and DNA Repair through a Mechanism Related to Homologous Recombination. *Mol. Cell. Biol.* 25, 34–43.

Yang, X., Han, H., DeCarvalho, D.D., Lay, F.D., Jones, P.A., and Liang, G. (2014). Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell* 26, 577–590.

Yelina, N.E., Lambing, C., Hardcastle, T.J., Zhao, X., Santos, B., and Henderson, I.R. (2015). DNA methylation epigenetically silences crossover hot spots and controls chromosomal domains of meiotic recombination in Arabidopsis. *Genes Dev.* 29, 2183–2202.

Zhao, Z., Chen, L., Dawlaty, M.M., Pan, F., Weeks, O., Zhou, Y., Cao, Z., Shi, H., Wang, J., Lin, L., et al. (2015). Combined Loss of Tet1 and Tet2 Promotes B Cell, but Not Myeloid Malignancies, in Mice. *Cell Rep.* 13, 1692–1704.

Ziller, M.J., Müller, F., Liao, J., Zhang, Y., Gu, H., Bock, C., Boyle, P., Epstein, C.B., Bernstein, B.E., Lengauer, T., et al. (2011). Genomic distribution and Inter-Sample variation of Non-CpG methylation across human cell types. *PLoS Genet.* 7.

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導くださいました東京大学大学院総合文化研究科の太田邦史教授に厚く御礼申し上げます。学部における卒業研究配属から、修士課程を経て現在に至るまで、太田先生には多大なるご支援をいただき、恵まれた実験環境のもと、充実した学生生活を送ることができました。重ねて御礼申し上げます。

また、本博士論文に先行する学術論文の執筆指導をしてくださいました太田研究室の瀬尾秀宗博士、卒業研究配属時から実験のご指導をくださいました前太田研究室の槁本講司博士、実験指導をはじめ研究室生活のあらゆる面をサポートしてくださいました村山晃歩技術員に感謝申し上げます。

最後に、2014 年度より現在に至るまで太田研に在籍された方々には、様々な面で大変お世話になりました。この場を借りて御礼申し上げます。