

論文の内容の要旨

論文題目

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

氏名 高村 夏生

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、現在では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、定常部位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 のメチル化と連関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 ファミリー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 ファミリータンパク質による 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 ファミリー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 ファミリー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 タンパク質によるメチルシトシンの酸化産物であり、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 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がある程度上昇はしているものの、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有意に 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。非 CpG シトシンは、MeCP2 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 というシトシン脱アミノ化酵素による C>U 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の結果、すなわち 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) 2つあるいは3つの 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 (TET1/2 欠損株) および TET1・TET3 二重欠損株 (TET1/3 欠損株) の解析から、TET ファミリー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 DNMT3A の発現が顕著に低下していたこと、TET タンパク質と 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 エンハンサーと推定される領域も含めて分析対象を拡大し、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。