

別紙 2

審 査 の 結 果 の 要 旨

論文提出者氏名 高村 夏生

抗体は、獲得免疫における主要分子であり、その抗原認識部位を自ら多様化させることで、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機構は、長らくその詳細について研究がなされ、現在では可変領域の多様化機構として、V(D)J 組換え、体細胞高頻度突然変異、遺伝子変換が知られている。

論文著者の所属研究室では、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いる。この技術開発と並行して、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 のメチル化と連動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 (TET1、TET2、TET3 から成る) (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活発に研究が行われている。本研究では、抗体遺伝子多様化のエピゲノム制御機構の理解を目的に、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した。本論文では、DT40 細胞を用いて作製した TET タンパク質の単一欠損株及び二重欠損株の抗体遺伝子多様化表現型と、TET タンパク質の機能について、2 部構成 (第 1 部:「単一 TET タンパク質の機能について」、第 2 部:「2 種類の TET タンパク質の機能について」) で報告を行った。

本論文の序論では、本研究の背景として、抗体遺伝子多様化機構、多様化機構の重要因子である AID (Activation-induced cytidine deaminase)、DNA のメチル化、そして TET タンパク質の先行研究がまとめられた。序論最終部では、それらの知見を踏まえ、DNA のメチル化動態の抗体遺伝子多様化機構における役割がこれまで十分検討されてこなかったことを指摘した。次いで、TET タンパク質の機能解析を通じて、DNA メチル化を介した抗体遺伝子多様化機構機構を検証する意義について述べた。

第 1 部「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」では、単一 TET タンパク質欠損株における抗体遺伝子再編成に関する表現型の解析結果が示された。いずれの単一欠損株においても抗体遺伝子の多様化レベルが低下すること、とくに TET3 欠損株にてその影響が顕著である

ことを報告した。また、TET タンパク質によって生じるメチルシトシンの酸化産物（ヒドロキシメチルシトシン）を定量的に分析した結果から、TET3 欠損株において最も顕著に脱メチル化能が減少することを明らかにした。そして各 TET タンパク質の抗体遺伝子多様化機構における役割として、TET1 が AID の発現維持に寄与すること、TET2 が限定的ながら抗体遺伝子及び AID の発現制御に関与することを報告した。これにより、転写制御を介した TET1 及び TET2 の抗体遺伝子多様化への関与を示した。

より重要な点として、TET3 が偽遺伝子領域の非 CpG 配列中のシトシンの脱メチル化に関与することを見出した点である。この非 CpG 配列中の DNA メチル化レベルは遺伝子変換頻度が相関しており、遺伝子変換へ DNA メチル化が寄与することをはじめて示唆する証拠となった。

第 2 部「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」では、抗体遺伝子多様化において、2 種類の TET タンパク質の組み合わせが担う役割について検討した。TET タンパク質の先行研究においては、2 種類以上の TET タンパク質の協調的な作用が報告されているが、DT40 細胞においても、特に転写制御において 2 種の TET タンパク質が重要な役割を担うことを示した。中でも TET1・TET2 二重欠損株、TET1・TET3 二重欠損株において AID の発現が顕著に減少することを見出した。したがって、TET1 を含む 2 種の TET タンパク質が AID の正常な発現に寄与することをはじめて示した。いっぽう、この発現制御がプロモーター領域の DNA メチル化と関係しないことも示した。

本論文の最終部では、これら研究結果を踏まえて総合考察を行った。TET3 欠損株の解析より、偽遺伝子領域のメチル化により遺伝子変換が抑制されることを示したが、その仕組みとして、1) 偽遺伝子領域の遺伝子変換関連因子の接近を直接阻害する、2) 当該部位にヘテロクロマチン状態を誘導する、というモデルを検討した。加えて、TET タンパク質が CpG 配列中のシトシンを標的とすることから、偽遺伝子領域のメチル化動態の包括的な理解のためには、非 CpG 配列中のシトシンをメチル化する DNA メチル化酵素 DNMT3A の寄与も考慮に入れたモデルを検討する必要があることも指摘した。また、TET タンパク質の機能分業について総括すると共に、その発現制御機能については、先述の DNMT3A も含むその他のタンパク質の協調的な作用があること、またマウスの先行研究とも比較して、種特異的な制御様式がある可能性を議論した。

以上より、本論文は、鳥類 B 細胞の抗体遺伝子多様化における DNA メチル化・脱メチル化の意義を明らかにし、その制御因子としての TET タンパク質の機能をあらたに報告した。この成果は学術的にも新規性が高く、この分野への貢献が大きいと考えられる。よって本論文は博士（学術）の学位請求論文として合格と認められる。