

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

平成26年6月1日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局・研究科 医学研究科 (現所属カリフォルニア大学サンディエゴ校)

職 名・学 年 特定研究員 (現職Visiting Assistant Project Scientist)

氏 名 相 田 将 俊

助 成 の 種 類	平成25年度 ・ 若手研究者在外研究支援 ・ 在外研究長期助成		
研 究 課 題 名	抗体多様性を誘導するクロマチン高次構造制御機構の解明		
受 入 機 関	カリフォルニア大学サンディエゴ校		
渡 航 期 間	平成25年 5月11日 ~ 平成27年 5月10日 (現在渡航継続中) 財団助成対象期間当初1年		
成 果 の 概 要	タイトルは「成果の概要／報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有()		
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	2,500,000円	
	使用した助成金額	2,500,000円	
	返納すべき助成金額	0円	
	助成金の使途内訳	渡航費(NRT-SAN片道航空券)	203,510円
		査証発行経費	40,000円
		アパートメント賃料・12ヶ月	1,545,300円
日当・12ヶ月		711,190円	
当財団の助成について	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 米国での研究生生活をスムーズにスタートするために十分な金額の助成を受けることができました。また、英文での証明書の発行にも柔軟に対応していただき、大変助かりました。深くお礼申し上げます。		

免疫系が多種多様な抗原に対応する抗体を産生できるのは、B リンパ球で発現する免疫グロブリン遺伝子の DNA が、クラススイッチ組換え、体細胞超突然変異、および V(D)J 組換えといった編集を受けて多様化するためである。しかし、こうした DNA 編集がなぜ抗体遺伝子に限定して発生するのかは、抗体遺伝子ゲノム特異的な DNA 三次元構造の制御が関与していると考えられているものの、いまだに完全には解明されていない。筆者は最近、成熟 B 細胞において抗体遺伝子中の DNA 編集を受ける領域 (V(D)J および 5' 側 S μ 領域) に特異的に強く蓄積し、体細胞超突然変異およびクラススイッチを促進する因子として FACT およびヒストン・バリエーション H3.3 (以下 H3.3) を発見した(1)。これら因子は真核生物のゲノム DNA を巻き取るヌクレオソーム構造の DNA 複製非依存的な交換に関与しており、その蓄積は、当該領域でのヌクレオソームの交換速度が比較的速いことを強く示唆している。近年の研究により、H3.3 は多様な遺伝子のエンハンサー領域に蓄積することが明らかになってきている。エンハンサーは DNA の折り畳み構造を変換して、遠く離れた遺伝子を活性化させ、細胞の分化を制御する。抗体遺伝子は巨大な遺伝子であり、その折り畳み構造が厳密に制御されていることが知られている。したがって、H3.3 の非常に強い蓄積は、このような抗体遺伝子特異的なゲノム DNA 三次元構造の制御に深く関連すること示唆された。以上から、筆者は H3.3 と抗体遺伝子のゲノム三次元構造制御との関わりについて明らかにする研究を、2013 年 5 月よりカリフォルニア大学サンディエゴ校において本助成の支援を受けて開始した。

受け入れ先の Murre 研究室は、主に B リンパ球の分化過程におけるゲノム三次元構造制御のメカニズムを明らかにする研究をおこなっているため、最初の解析対象として、V(D)J 組換えの一部がおこなわれる pre-B 細胞を選択した。まず同細胞における H3.3 の分布を把握するために、pre-B 細胞株 IM3 を用いて H3.3 と FACT に対する ChIP-Seq 解析をおこなった。すると、両因子は抗体遺伝子の特定の部位および、ある特異的なグループに属する遺伝子群に蓄積することが観察された。ただ、H3.3 の ChIP-Seq に関しては、抗体の反応性があまり良好でなく、シグナル強度が充分ではなかった。このため、flag タグが付加された H3.3A タンパク質を発現する細胞株をレトロウイルスベクターで樹立し、抗 flag 抗体で ChIP-Seq をおこなって H3.3 の詳細な分布を解析する実験を進めている。

pre-B 細胞の抗体遺伝子における H3.3 の役割を解析するには、H3.3 が欠失した細胞での抗体遺伝子の状態を調べる必要がある。これを観察するために、最近開発された CRISPR/Cas9 法による培養細胞レベルでの H3.3 のノックアウトを計画した。この方法では、Cas9 という原核生物由来のヌクレアーゼと、標的に相補的な 20 塩基ほどの配列を含む sgRNA とよばれる RNA を共発現するだけで、標的の DNA 配列に変異を入れることができる。しかし、リンパ球は通常の方法でプラスミド DNA を導入することが難しいタイプの細胞である。また、ウイルスベクターによる Cas9 と sgRNA の安定的な発現はゲノム DNA に多くのオフターゲット変異を入れる可能性が高いため望ましくない。この問

題を克服するために、筆者はまず Cas9 たんぱく質のみを安定的に発現する細胞株を樹立し、その後、合成された sgRNA 分子を電気穿孔法によって導入して変異の誘導を試みた。その結果、この方法で最大 20%程度の効率で標的配列に変異を導入することに成功した。H3.3 たんぱく質を欠失させるためには、同一のタンパク質をコードする H3.3A と H3.3B の両遺伝子をノックアウトする必要がある。筆者は現在、H3.3B 遺伝子のノックアウト・クローンの単離を完了したところである。

助成期間における研究成果は以上であるが、筆者は今後数年かけて Murre 研究室において本研究に取り組む予定である。H3.3A&B ダブルノックアウト pre-B 細胞株を単離後は、ゲノムの三次元折り畳み構造をゲノムワイドで明らかにする Hi-C 解析をおこない、H3.3 の抗体遺伝子の三次元構造の制御における役割を明らかにしてゆく予定である。

最後に、京都大学教育研究振興財団のご支援により、米国での充実した環境において本研究を立ち上げることができたことに深く感謝申し上げます。

1. Aida M, Hamad N, Stanlie A, Begum NA, Honjo T. “Accumulation of the FACT complex, as well as histone H3.3, serves as a target marker for somatic hypermutation.” *Proc Natl Acad Sci.* 2013 May 7;110(19):7784-7789.