

学位論文

Doctor's Thesis

抗体遺伝子の V 領域における DNA 二重鎖切断は
抗体の親和性成熟に障害をもつ GANP 欠損マウスで低下している
(Double-Stranded DNA Breaks in the IgV Region Gene Were Detected
at Lower Frequency in Affinity-Maturation Impeded GANP^{-/-} Mice)

川谷 洋右

Yousuke Kawatani

熊本大学大学院医学研究科博士課程整形外科学分野

指導：高木 克公 前教授

阪口 薫雄 教授

2005年度

- 目次 -

1. 要旨	3
2. 発表論文リスト	4
3. 謝辞	5
4. 略語一覧	6
5. 研究の背景と目的	
5-1). 獲得免疫応答における抗体の親和性成熟	7
5-2). B 細胞分化過程でイムノグロブリン遺伝子に起こる遺伝子変換と DSB の関連	7
5-3). somatic hypermutation と DSB の関連	9
5-4). somatic hypermutation に必須の分子 activation-induced cytidine deaminase(AID)	9
5-5). 胚中心で発現が増加する分子 GANP	10
5-6). 本研究の目的	12
6. 実験方法	
6-1) マウス	13
6-2) 脾臓細胞の採取	13
6-3) 脾臓 B 細胞の分離と Flow cytometry 解析	13
6-4) セルソーティング	14
6-5) DNA 精製	14
6-6) Ligation mediated PCR 法と Hybridization	14
6-7) Real-time PCR 法	15

7. 実験結果	
7-1) IgV 領域の DSB は RAG1 陰性の成熟 B 細胞に起こる	16
7-2) IgV 領域の DSB は GL7 陽性 Fas 陽性の胚中心 B 細胞で 認められる	16
7-3) T細胞依存性抗原刺激で DSB は誘導される	16
7-4) B-GANP ^{-/-} マウスの胚中心 B 細胞で DSB は減少する	17
7-5) B-GANP ^{-/-} マウスで DSB 修復系分子と AID の発現が 上昇している	17
7-6) GANP ^{Tg} マウスの胚中心 B 細胞で DSB は増加する	17
8. 考察	18
9. 参考図および結果の図とその説明	
図 1 獲得免疫応答における抗体の親和性成熟	21
図 2 B 細胞分化、成熟時にイムノグロブリン遺伝子に誘導される 遺伝子変換と DSB の関連	22
図 3 胚中心 B 細胞における Ig V 領域 DSB の誘導	23
図 4 activation-induced cytidine deaminase (AID) 欠損マウスの 胚中心 B 細胞における IgV 領域 DSB の発生頻度	24
図 5 実験方法	25
図 6 IgV 領域の DSB は RAG1 陰性の成熟 B 細胞に起こる	26
図 7 IgV 領域の DSB は GL7 ⁺ Fas ⁺ の胚中心 B 細胞で 検出される	27
図 8 B-GANP ^{-/-} マウスの胚中心 B 細胞で DSB は減少する	28
図 9 B-GANP ^{-/-} マウスでの apoptosis 解析	29
図 10 Real-time RT PCR 解析	30
図 11 GANP ^{Tg} マウスの胚中心 B 細胞で DSB は増加する	31
図 12 DSB の修復経路	32
10. 結語	33
11. 参考文献	34

1. 要旨

獲得免疫応答において、末梢のリンパ組織の胚中心でB細胞が高親和性抗体産生細胞に分化する。その際免疫グロブリン遺伝子のV領域(IgV領域)に体細胞突然変異somatic hypermutationが導入されることが必須である。somatic hypermutation誘導にはIgV領域のDNA double strand break (DSB)が関与するといわれているがまだ確定していない。本研究では胚中心における抗体の親和性成熟に必要なgerminal center-associated nuclear protein (GANP)の機能がIgV領域のDSBに及ぼす影響を解析した。

T細胞依存性抗原である nitrophenyl-chicken γ -globulin の腹腔内投与にてマウスを免疫後、脾臓を摘出、胚中心 B 細胞を精製・単離した。精製 B 細胞からゲノム DNA を抽出し、ligation-mediated PCR 法で DSB を検出した。また、RNA を精製し DSB 修復系分子の発現を real-time PCR 法で定量した。

野生型マウスでは IgV 領域の DSB は抗原依存性に GL7 陽性 CD95/Fas 陽性の表現型を有する胚中心 B 細胞で認められた。そこで、胚中心で選択的に発現が上昇する核内因子 GANP を B 細胞特異的に欠損させたマウス (B-GANP^{-/-})の胚中心 B 細胞では、抗体遺伝子の somatic hypermutation の頻度が低下し、抗体の親和性成熟が障害されるが、GANP トランスジェニック (GANP^{tg}) マウスでは抗体の親和性が著明に亢進していることから、これらのマウスにおける DSB の頻度を検定した。IgV 領域の DSB は B-GANP^{-/-} の胚中心 B 細胞で著しく減少していた。一方、抗体の親和性の亢進する GANP^{tg} マウスでは逆に DSB は増加していた。また、B-GANP^{-/-} の胚中心 B 細胞では DSB 修復系分子の発現が上昇していることから、GANP が DSB 後の遺伝子修復機能にも影響を与えていることが示唆された。

IgV 領域 somatic hypermutation 導入に必須な AID を欠損したマウスでは IgV 領域の DSB に著しい変化はみられないことから DSB 誘導と抗体の親和性成熟の関連性は疑われていた。本研究で胚中心 B 細胞で起こる IgV 領域の DSB が、(1) RAG 分子による遺伝子再構成と無関係に起こること、(2) 抗原で刺激された GL7⁺CD95/Fas⁺ の成熟 B 細胞でみられること、(3) B-GANP^{-/-} と GANP^{tg} の両方で IgV 領域の DSB が変化を示すことを明かにした。

GANP が somatic hypermutation 時の DSB 誘導あるいは DSB 後の修復に関与している可能性が示唆され、この機能が somatic hypermutation、親和性成熟に必要なであることを示した。

2. 発表論文リスト

Kawatani Y., Igarashi H., Matsui T., Kuwahara K., Fujimura S., Okamoto N., Takagi K., Sakaguchi N.

Double-Stranded DNA Breaks in the IgV Region Gene Were Detected at Lower Frequency in Affinity-Maturation Impeded GANP^{-/-} Mice.

J.Immunol. 175: 5615-8, 2005.

3. 謝辞

本研究を行うにあたり、全面的に御指導下さいました熊本大学大学院医学研究科免疫学分野 阪口薫雄教授、同整形外科学分野 高木克公前教授（現名誉教授）に深く感謝致します。

論文作成にあたりましては、熊本大学大学院医学研究科免疫学分野 五十嵐英哉助手、並びに熊本大学大学院医学研究科免疫学分野の皆様深く感謝致しますと同時に厚く御礼申し上げます。

4. 略語一覽

AID:	activation-induced cytidine deaminase
DSB:	DNA double stranded break
GANP:	germinal center-associated nuclear protein
HR:	homologous recombination
Ig:	immunoglobulin
LM-PCR:	ligation-mediated PCR
NHEJ:	nonhomologous end joining
NP-CG:	nitrophenyl-chicken γ -globulin
RAG:	recombination activating gene
RSS:	recombination signal sequence
TdT:	terminal deoxynucleotidyl transferase

5. 研究の背景と目的

5-1). 獲得免疫応答における抗体の親和性成熟

獲得免疫応答では、末梢リンパ組織でナイーブ B 細胞が外来抗原と出会うと抗原に反応する特異的な B 細胞クローンが動脈周囲リンパ鞘(PALS)で、Th 細胞に発現する CD40 リガンドの結合による CD40 を介したシグナルで刺激を受け、リンパ濾胞内で分裂、増殖を繰り返し、短期間に数十万個の細胞の集団となり胚中心(germinal center)を形成する。

ここでイムノグロブリン遺伝子 V 領域に高頻度に somatic hypermutation が導入され、抗原への親和性が増加した免疫グロブリンを発現するようになる。その後、より親和性の高い B 細胞が選択され、さらに活性化されて抗体産生細胞へと分化し、最終的に高親和性抗体が産生される。この現象は抗体の親和性成熟 affinity maturation と呼ばれている(Li et al., 2004)。(図 1)

5-2). B 細胞分化過程でイムノグロブリン遺伝子に起こる遺伝子変換と DSB の関連

B 細胞はその分化成熟過程において、まず骨髄中の初期分化でリンパ球系幹細胞から ProB 細胞、大型 PreB 細胞、小型 PreB 細胞、未熟 B 細胞へと分化していく。この段階でイムノグロブリン遺伝子の重鎖 (H 鎖) と軽鎖 (L 鎖) に遺伝子再構成が起こり、多様性が生み出される(Tonegawa, 1983)。イムノグロブリン遺伝子再構成は骨髄中の前駆 B 細胞で recombination activating gene (RAG) 蛋白が組み換えシグナル配列(recombination signal sequence, RSS)を認識し、ここに DNA double strand DNA break (DSB)が起こった後に起こる組み換え反応である(Schatz et al., 1989; Oettinger et al., 1990; Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992)。再構成に成功した細胞は B cell receptor を細胞表面に発現する未熟 B 細胞へと分化する。

その後末梢リンパ器官へ移動し、ここで外来抗原と出会い反応したクローンは急速に分裂・増殖し胚中心を形成、イムノグロブリン遺伝子は somatic hypermutation と class switch recombination という独立した遺伝子変換を受け、

更に多様性を獲得する(Li et al., 2004)。これらの過程においてイムノグロブリン遺伝子に DSB が導入される。class switch recombination は何らかのエンドヌクレアーゼがスイッチ配列(switch sequence, S-sequence)を認識し、ここに DSB が起こった後に起こる組み換え反応であり、その結果、細胞は異なるエフェクター効果を有する他のクラスの抗体を産生するようになる。somatic hypermutation はイムノグロブリン再構成後の VDJ 遺伝子に入る点突然変異であり、その頻度は自然発生より、数万倍高率に起こり、その結果、抗体遺伝子は抗原への親和性上昇 affinity maturation を獲得する。

イムノグロブリン遺伝子再構成と class switch recombination は DSB 後の組み換え反応であることは上述の通りであるが、somatic hypermutation の詳細なメカニズムは不明で、DSB の関連性は明らかではなかった。(図 2)

胚中心 B 細胞由来のヒトバーキットリンパ腫細胞株 Ramos は、分裂増殖の際に高率に somatic hypermutation を起こす。この細胞株に terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) を過剰発現させると V 領域に鋳型をもたない塩基 (N ヌクレオチド) の付加が認められることから、この領域に DSB が起こっていることが示唆された(Sale and Neuberger, 1998)。次いで、2000 年に遺伝子変換マウスを用いた実験で somatic hypermutation と DSB の関連性が報告され、DSB の導入後に修復を受ける過程で変異が導入されるというモデルが提唱された(Papavasiliou and Schatz, 2000)。図 3 に示したように再構成後のイムノグロブリン H 鎖の遺伝子座 (プロモータの下流に再構成後の VDJ 遺伝子がありイントロンエンハンサーを挟んで C 領域遺伝子、そのさらに下流に 3'エンハンサーが位置している) を模したコンストラクト、つまり、VDJ の代わりにストップコドンが組み込まれた neoGFP 遺伝子、C 領域の代わりに puroYFP 遺伝子を組み込んだものをトランスジーンしたマウスを作製し、実験を行っている。VDJ に突然変異が導入される状況になれば、GFP 遺伝子に変異が入りストップコドンが解除され、GFP が発現するというシステムである。このマウスを免疫後脾臓を摘出、脾細胞のフローサイトメーター分析を行うと、B 細胞マーカー B220 陽性、胚中心マーカー GL7 陽性細胞群において GFP 陽性細胞が 15% 出現しており、確かに突然変異が導入されたことが確認された。次いでその細胞群よりゲノム DNA を抽出し ligation-mediated PCR 法で GFP 遺伝子の DSB が検出された。結果は突然変異が観察された B220 陽性 GL7 陽性の細胞群にのみ GFP 遺伝

子に DSB が導入されており、somatic hypermutation と DSB の関連性が示唆された(Papavasiliou and Schatz, 2000) (図 3)。

5 – 3). somatic hypermutation と DSB の関連

DSB は生体内ストレス、放射線、化学物質などにより発生する最も重篤な DNA 損傷であり、適切に修復されなければ、アポトーシスによる細胞死、突然変異導入や染色体転座による癌化の原因となりうる非常な危険な DNA 損傷である(Khanna and Jackson, 2001)。一方、免疫系細胞は DSB とその修復の過程を利用して分化成熟し、多様性を獲得していくことが知られている(Li et al., 2004)。

現在までに複数のグループがマウス胚中心 B 細胞や Ramos を用いて ligation-mediated PCR(LM-PCR)法により DSB を検出することにより、somatic hypermutation が起こる V(D)J 再構成後の免疫グロブリン V 領域に DSB が観察されるが C 領域では認められないことを報告している(Papavasiliou and Schatz, 2000; Bross et al., 2000)。加えてこの IgV 領域 DSB は、somatic hypermutation と同様に hot spot である RGY(W)/WRC(Y)配列(Spencer and Dunn-Walters, 2005)に高頻度に誘導され、転写とカップルしており、enhancer 依存的であった。なお、これらの実験系においては recombination signal sequence(RSS)や S-sequence に DSB が入らないことから、イムノグロブリン遺伝子再構成や class switch recombination とは異なるメカニズムで起こる可能性が考えられた(Papavasiliou and Schatz, 2000; Bross et al., 2000)。

ただし、免疫後のマウス胚中心 B 細胞の IgV 領域 DSB は、B220 陽性 GL7 陽性で規定される細胞群で観察される現象であり、この分画には骨髄から移入したばかりの RAG 陽性細胞も存在している(Nagaoka et al., 2000)。これらの細胞において RAG の再誘導はみられないが(Igarashi et al., 2001)、残存した RAG による DSB を検出している恐れがある。

5 – 4). somatic hypermutation に必須の脱アミノ化酵素 activation-induced cytidine deaminase(AID)

胚中心で強く発現しており、somatic hypermutation, class switch

recombination に必須の分子である AID (Muramatsu et al., 1999; 2000)は、シトシンを脱アミノ化してウリジンに変換する酵素活性を有しており、RNA editing(Doi et al., 2003)あるいは DNA cleavage(Martin et al., 2002; Yoshikawa et al., 2002; Bransteitter et al., 2002; Chandrhuri et al., 2002; Dickerson et al., 2003; Pham et al., 2003; Sohail et al., 2003; Yu et al., 2004)に関与していると考えられている。しかし、その欠損マウスの胚中心 B 細胞において IgV 領域の DSB の発生頻度は野生型マウスと変わらないこと(Bross et al., 2002) (図 4)、また Ramos に AID dominant negative を過剰発現させると somatic hypermutation は障害されるが、DSB には変化がないこと (Papavasiliou and Schatz, 2002) から、AID の下流における DSB の誘導は否定的であり、DSB と somatic hypermutation や抗体の親和性成熟との関連性には疑念が持たれていた。

5-5). 胚中心で発現が増加する分子 GANP

当教室では、T 細胞依存性抗原で免疫後に形成される胚中心 B 細胞で発現が増加する分子として、germinal center-associated nuclear protein (GANP) を同定した。その方法はマウス B 細胞株 WEHI231 から可溶化したタンパク質を免疫して、リンパ細胞内分子に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立し、それらの培養上清を用いてマウスの腸管パイエル板を免疫染色し、胚中心で発現が増強する分子を認識する抗体をスクリーニングした。これによって、29-15mAb と名付けた抗体が胚中心を認識することが見い出された。また抗 CR1 抗体との二重染色の結果、29-15mAb 陽性細胞は follicular dendritic cell に取り囲まれるように存在することがわかり、セントロサイトで発現が選択的に増加していることが強く示唆された。続いて、29-15mAb が認識する分子をコードする遺伝子の単離が行われ、 λ gt11WEHI231 cDNA ライブラリーを用いた抗体スクリーニングにより、最終的に 6.4kb の新規遺伝子が得られた。この遺伝子は 1971 アミノ酸をコードし、2ヶ所の核移行シグナルと2ヶ所のコイルドコイル領域を認め、さらに核内コアクチベーターによくみられる LXXLL モチーフが4ヶ所に認められた。以上のことからこの遺伝子産物は核内分子であることが示唆され、ganp(germinal center-associated nuclear protein)と名付けられた。実際に ganp mRNA が胚中心で強く発現していることは、in situ RNA ハイブリ

ダイゼーションで確認された。

ganp の中央部分約 600 アミノ酸には、出芽酵母の細胞周期関連分子 SAC3 とアミノ酸レベルで 23%の有意な相同性が認められた。SAC3 はもともとアクチンの変異を相補する遺伝子としてクローニングされた 1301 アミノ酸からなる核内分子であり、SAC3 を欠損させた出芽酵母は細胞分裂が特に M 期において遅延し、細胞周期との関連が示唆されている。GANP のこの領域に相同性を示す分子は他に認められず、GANP は SAC3 の哺乳動物における相同分子であると考えられた(Kuwahara et al., 2000)。

また GANP のカルボキシル基末端側 700 アミノ酸は、ヒト Map80/MCM3AP 分子とアミノ酸レベルで 76%と高い相同性を有することがわかった。Map80/MCM3AP は 721 アミノ酸からなる分子で、細胞複製に必須の分子としてしられる MCM3 を bait にした酵母 two hybrid 法を用いて同定された(Takei and Tsujimoto, 1998)。Map80/MCM3AP は MCM3 の核移行シグナルに結合し、MCM3 の核内移行を促進する因子と考えられ、またその後の報告で Map80/MCM3AP はアセチル化酵素活性を有しており、MCM3 をアセチル化することにより細胞周期に対して負に働いていることが示されている(Takei et al., 2001)。当教室においてマウス ganp cDNA をプローブとしてヒト ganp 遺伝子を単離したところ、カルボキシル基末端側 721 アミノ酸は、ヒト Map80/MCM3AP と完全に一致しており、同一遺伝子由来の分子であることがわかった(Abe et al., 2000)。Map80/MCM3AP が MCM3 と結合することから、GANP も MCM3 と結合する可能性が考えられた。共沈実験が行われた結果、B 細胞株を用いた実験で GANP と MCM3 の物理的会合が確認された(Kuwahara et al., 2000)。

さらに GANP の 414 番目から 550 番目のアミノ酸の領域は、DNA ポリメラーゼ α (pol α)と結合する RNA プライマーゼ p49 と相同性が認められた。p49 はこれまでに知られている唯一の RNA プライマーゼで、p49、p58、p180 からなる pol α 複合体は、DNA 複製の際にラギング鎖の合成に関与していることが知られている。そこで GANP が RNA プライマーゼ活性を有しているのかどうかを調べるため、GANP の p49 相同性領域 (プライマーゼドメイン)のリコンビナント蛋白を用いてプライマーゼアッセイが行われた。結果、GANP のプライマーゼドメインが実際に RNA プライマーを合成することが確認された(Kuwahara et al., 2001)。

その後、さらに GANP 分子の変異マウスの解析が行われた。まず、GANP を B 細胞特異的に欠損させたマウス(B-GANP^{-/-})の胚中心 B 細胞では、抗体の親和性成熟が障害された (Kuwahara et al., 2004)、逆に GANP を過剰発現したトランスジェニック (GANP^{Tg}) マウスでは高親和性抗体の産生増加が認められた(Sakaguchi et al., 2005)。この結果により、GANP の発現が抗体の親和性成熟に必要な不可欠と考えている。

5-6). 本研究の目的

T細胞依存性抗原に対する免疫応答において、胚中心B細胞のB220陽性GL7陽性で規定される細胞群でIg V領域にDSBの誘導が報告されている (Papavasiliou and Schatz, 2000)。しかし、この分画には、骨髄で新しく誕生して、移動してきたばかりのRAG陽性細胞も含まれている(Gartner et al., 2000; Nagaoka et al., 2000)。したがって、上記の方法では成熟B細胞のIgV DSBを検出するのみならず、IgのRAG依存性の再構成を検出する可能性がある。

そこで、本研究は胚中心B細胞を純化してIgV DSBが観察されるのか、抗原で活性化された成熟B細胞にもDSBが発生するのか否かについて明らかにすることを目的とする。さらに、GANP遺伝子変異B細胞を用いて、GANPの発現がIgV DSBの誘導や修復に及ぼす影響を明らかにし、IgV DSBの抗体親和性獲得における生理学的機能を解明することを目的とした。

6. 実験方法 (図 5)

6-1) マウス

8~12 週齢の RAG1/GFP ノックインマウス、野生型 C57BL/6 J マウス、B 細胞特異的 GANP 欠損 (B-GANP^{-/-}) マウスあるいは GANP トランスジェニック (GANP^{Tg}) マウスを使用した。これらに 100 μ gNP-CG を alum と混和したものを腹腔内注射で免疫した。コントロールとして alum 単独のみを腹腔内に投与したマウスも作製した。

6-2) 脾臓細胞の採取

マウスから脾臓を摘出し、スライドガラスの水切放フロストの部分で少しずつ擦り潰して RPMI 1640 培地中に細胞浮遊液を作製した。遠心回収後、ペレットを RBC lysis solution に浮遊させ赤血球を溶解し、washing buffer (2%FCS 入り 1 \times PBS) を加えた後、再び遠心回収した。細胞を washing buffer に浮遊させ氷冷で保存した。

6-3) 脾臓 B 細胞の分離と Flow cytometry 解析

調整した脾臓細胞を MACS mouse B Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) でラベルして、autoMACS (Miltenyi Biotec) で B 細胞を分離回収した。96 穴プレート (Falcon 3911, Becton Dickinson) に 1 穴あたり 5×10^5 の細胞を入れ、各抗体を 50 μ l ずつ加え、氷上で 20 分間反応させた。反応後、100 μ l の washing buffer を加え 1500rpm, 1 分間遠心して上清を吸引した。この操作を 2 回繰り返し細胞洗浄を行った。

抗体は

PE 標識抗 B220 抗体 (RA3-6B2, Phamingen)、
FITC 標識 GL7 (Phamingen)、
PE 標識抗 Fas 抗体 (Jo2, Phamingen)、
GL7(無標識) (Phamingen)、
Biotin-抗ラット IgM 抗体 (G53-238, Phamingen)、
Streptavidine-Cy-Chrome (Phamingen)、
Streptavidine-PerCP-Cy5.5 (Phamingen)
を使用した。

flow cytometry 解析は FACS Calibur (Becton Dickinson) と Cell Quest software (Becton Dickinson)で行った。

6-4). セルソーティング

autoMACS 分離後に得られた B cell を 15ml チューブ中で上記抗体と反応させ、FACS Vantage SE (Becton Dickinson)または JSAN (Bay bioscience) で目的の細胞群をソーティングした。まず、RAG1/GFP ノックインマウスの B220 陽性 GL7 陽性細胞を GFP 陽性と陰性分画を分離した。GFP 陰性分画で IgV 領域の DSB が観察されかつ別の胚中心マーカーCD95/Fas の発現が多くみられた。従って、次に野生型マウスの B220 陽性 GL7 陽性細胞を CD95/Fas 陽性と陰性で分離した。CD95/Fas 陽性分画で IgV 領域の DSB が観察された。以上より、最終的に B-GANP^{+/+}あるいは GANP^{Tg} マウスの B220 陽性 GL7 陽性 CD95/Fas 陽性細胞で IgV 領域の DSB を比較した。

6-5) DNA 精製

ソーティングした細胞を遠心で回収し、そのペレットに 100 μ l の digestion buffer(100mM NaCl, 10mM Tris-Cl, pH8.0, 25mM EDTA, pH8.0, 0.5% SDS, 0.1 mg/ml proteinase K)を加えて 55 $^{\circ}$ C で 12 時間インキュベートした。次いで、RnaseA を加え 37 $^{\circ}$ C 1 時間処理後、フェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈澱を行い DNA を精製した。

6-6) ligation mediated PCR 法と hybridization

ligation mediated PCR 法の原理を示す。もし、ある細胞中のある遺伝子座に DSB が入っていれば、この細胞より抽出した DNA を linker ligation した後に、その遺伝子特異的なプライマーと linker 特異的なプライマーで PCR を行い、その PCR 産物をゲルに展開し、より内側に設定したプローブで DSB を検出することが可能である。実験に用いたマウスはすべて C57BL/6 バックグラウンドであるが、C57BL/6 マウスをハプテン NP で免疫すると、VH186.2 V λ を持つクローンが増殖することが以前よりわかっているため (Jacob et al., 1993)、VH186.2 遺伝子座にプライマー、プローブを設定し DSB を検出、比較した。

BW リンカーの作製法であるが、まずオリゴヌクレオチド BW-1 5'-

GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC-3' , BW-2 5'- GAATTCAGATC-3' をそれぞれ最終濃度 20 μ M となるように 250mM Tris-Cl, pH7.7 100 μ l 中に混和し、サーマルサイクラーで 90 $^{\circ}$ C 5 分間、60 $^{\circ}$ C 5 分間反応させ、その後 1 時間かけて 20 $^{\circ}$ C に下降させて作製した。

ソートした 5 X10⁴ 個の細胞より精製した DNA を 10 μ l 中で 40nM の BW リンカー、50 単位の T4 DNA リガーゼ、1 X バッファーとともに 16 $^{\circ}$ C で 16 時間反応させた。(Schlissel, M. et al., 1993)次に同量(10 μ l)のバッファーを加えて、95 $^{\circ}$ C で 15 分間加熱し、酵素を失活させた。ライゲーション後の DNA 2 μ l を 鋳型 に して 0.5 μ M プライマー BW-1H 5'-GACCCGGGAGATCTGAATTC-3' , プライマー VH186.2 L1 5'-TTCTTGGCAGCAACAGCTACAGGTAAGG-3' を用いて 20ml 中で PCR を行った。反応条件は第一段階 (1 サイクル) 95 $^{\circ}$ C/5 分、第二段階 (10 サイクル) 94 $^{\circ}$ C/1 分-50 $^{\circ}$ C/1 分-72 $^{\circ}$ C/1 分 30 秒、第三段階 (1 サイクル) 72 $^{\circ}$ C /10分-4 $^{\circ}$ Cで行った。次に反応液 1 μ l を鋳型にして、0.5 μ M プライマー-BW-1H, プライマー-VH186.2 L2 5'- GCAGGCTTGAGGTCTGGACATATACATG-3' を用いて第二段階 (28 サイクル) 94 $^{\circ}$ C/1 分-62 $^{\circ}$ C/1 分-72 $^{\circ}$ C/1 分で PCR 反応を行った。反応後のサンプルを 2%アガロースゲルで電気泳動で展開し、Hybond-N+にトランスファーした。³²P ラベルしたオリゴヌクレオチド VH186.2 probe 5'-GACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTG-3' をプローブに用いて hybridization を行い目的の locus の DNA 二重鎖切断を検出した。なお、loading control として C μ 領域の PCR を行った。

6-7) real-time PCR 法

ソーティングした細胞から RNeasy (Quiagen) を用いて RNA を回収した。TaqMan Universal Master Mix、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System、Sequence Detector version 1.6.3 software (Applied Biosystems) で目的の RNA を定量した。胚中心で発現が高くかつ HR 系修復分子 Rad51、NHEJ 系修復分子 Ku80、somatic hypermutation に必須の分子 AID の発現を比較した。

7. 実験結果

7-1) IgV領域のDSBはRAG1陰性の成熟B細胞に起こる (図6)

RAG1/GFP ノックインマウスに 100 μ g NP-CG をアジュヴァントと混和したものを腹腔内投与で免疫し、16 日後脾臓を摘出し、flow cytometer 解析を行った。B220 陽性 GL7 陽性細胞のうち GFP 陰性(R2)と陽性分画 (R3)の胚中心マーカーFas の陽性率はR2 34.8%、R3 13.0%であり、GFP 陰性分画が胚中心 B 細胞と考えられた。それぞれの分画をソーティングし、LM-PCR 法で VH186.2 領域の DSB を比較した。Ig V 領域の DSB は GFP 陰性 (RAG1 陰性) のより成熟した胚中心 B 細胞で起こっていることが明らかとなった。その発生メカニズムに RAG の関与は否定的である。

7-2) DSBはGL7陽性CD95/Fas陽性の胚中心B細胞で認められる (図7)

次に野生型C57BL/6J マウスにアジュヴァント加100 μ g NP-CG腹腔内投与と同様に免疫し、10日後脾臓を摘出した。Flow cytometer でGL7 陽性細胞のうちCD95/Fas陽性(R2)と陰性分画 (R3)をそれぞれソーティングした。LM-PCR法でVH186.2領域のDNA二重鎖切断をCD95/Fas陽性と陰性群で比較したところ、GL7陽性CD95/Fas陽性の胚中心B細胞にのみ起こっていた。

7-3) T細胞依存性抗原刺激でDSBは誘導される (図7)

アジュヴァント単独投与でもB220 陽性GL7陽性分画が誘導されるという報告があるため、Ig V領域のDSBが抗原依存性に起こるのかを調べた。C57BL/6J マウスにアジュヴァント加100 μ g NP-CG、またはアジュヴァント単独を腹腔内投与、9日後脾臓を摘出した。Flow cytometerで各マウスのB220 陽性GL7陽性分画をソーティングし、LM-PCR法でB220陽性GL7陽性細胞でのVH186.2領域のDSBの発生を比較した。adjuvant単独ではGL7陽性CD95/Fas陽性細胞は誘導されなかった。

7-4) B-GANP^{-/-}マウスの胚中心B細胞でDSBは減少する (図8)

B-GANP^{-/-}マウスまたはコントロール(B-GANP^{+/+})を 100 μ g NP-CG 免疫 9 日後脾臓を摘出した。各マウスの B220 陽性 GL7 陽性 CD95/Fas 陽性分画をソーティングし、LM-PCR 法で VH186.2 領域の DSB を比較した。B-GANP^{-/-}マウスでは VH186.2 領域の DSB が著しく減少していた。ソーティングした B220 陽性 GL7 陽性 CD95/Fas 陽性分画を 7AAD で染色して apoptosis を比較した。B-GANP^{-/-}マウスで apoptosis が増加していた。(図 9)

7-5) B-GANP^{-/-}マウスで DSB 修復系分子と AID の発現が上昇している (図 10)

B-GANP^{-/-}または B-GANP^{+/+} マウス各々を 100 μ g NP-CGG で免疫を行い、9 日後の脾臓より B220 陽性 GL7 陽性 CD95/Fas 陽性分画をソーティングし、RT-PCR 法で homologous recombination (HR) 系修復分子 Rad51、nonhomologous end joining (NHEJ)系修復分子 Ku80、AID の発現を調べた。B-GANP^{-/-}マウスの胚中心 B 細胞ではコントロールと比較して Rad51 が 3 倍以上多く発現していた。Ku80 も B-GANP^{-/-}マウスでより高い発現がみられた。AID は B-GANP^{-/-}マウスの胚中心 B 細胞で有意に多く発現していた。

7-6) GANP^{Ts}マウスの胚中心B細胞でDSBは増加する (図 11)

GANP^{Ts}マウスまたはコントロール(野生型)を 100 μ g NP-CG 免疫 9 日後脾臓を摘出した。各マウスの B220 陽性 GL7 陽性 CD95/Fas 陽性分画をソーティングし、LM-PCR 法で VH186.2 領域の DSB を比較した。GANP^{Ts}マウスでは VH186.2 領域の DSB が増加していた。

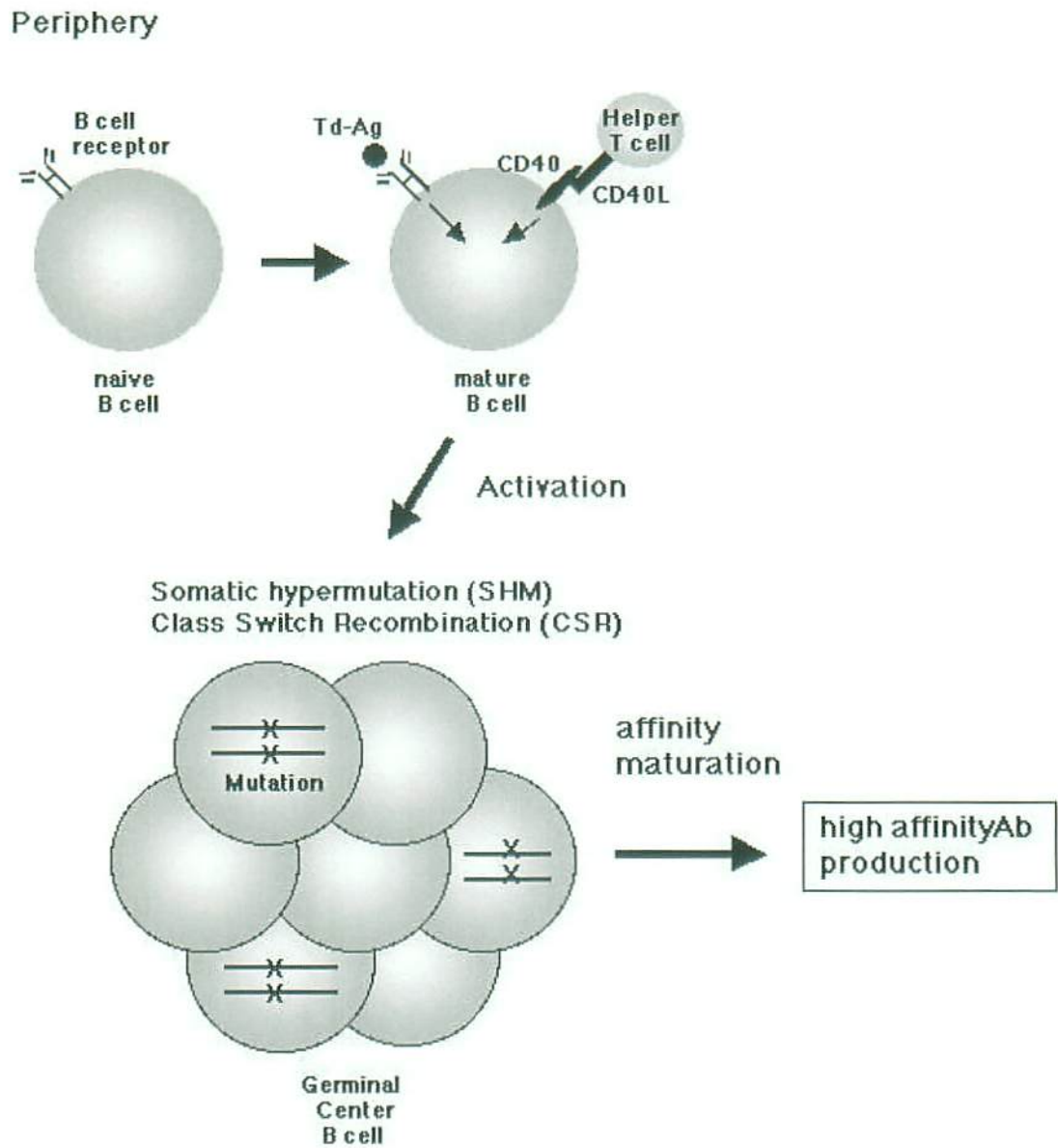


図1 獲得免疫応答における抗体の親和性成熟

獲得免疫応答では末梢リンパ組織でナイーブ B 細胞が外来抗原と出会うと分裂、増殖を繰り返し、胚中心(germinal center)を形成する。ここでイムノグロブリン遺伝子 V 領域に somatic hypermutation が起こり、最終的に高親和性抗体が産生される。この現象は抗体の親和性成熟 affinity maturation と呼ばれている。

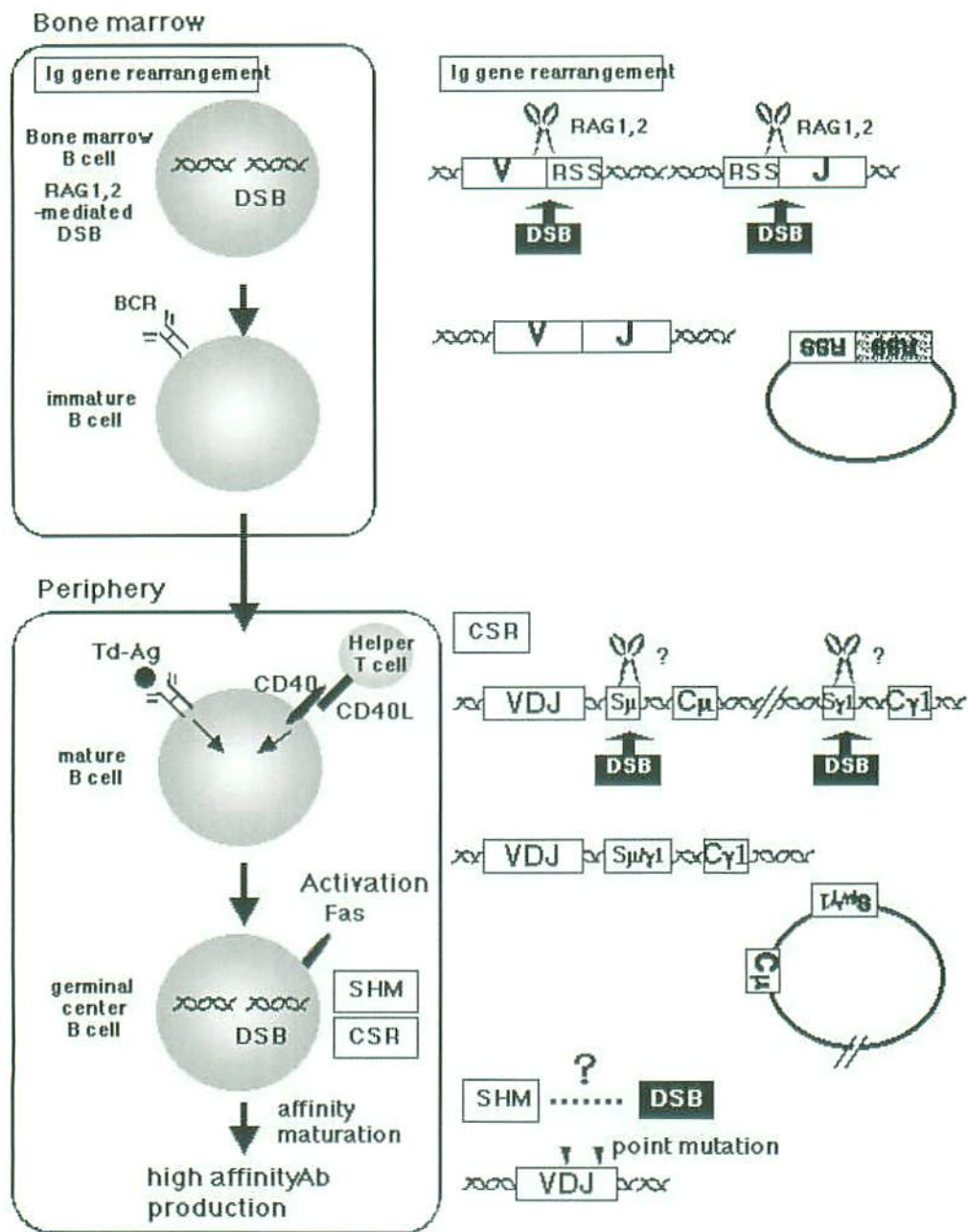
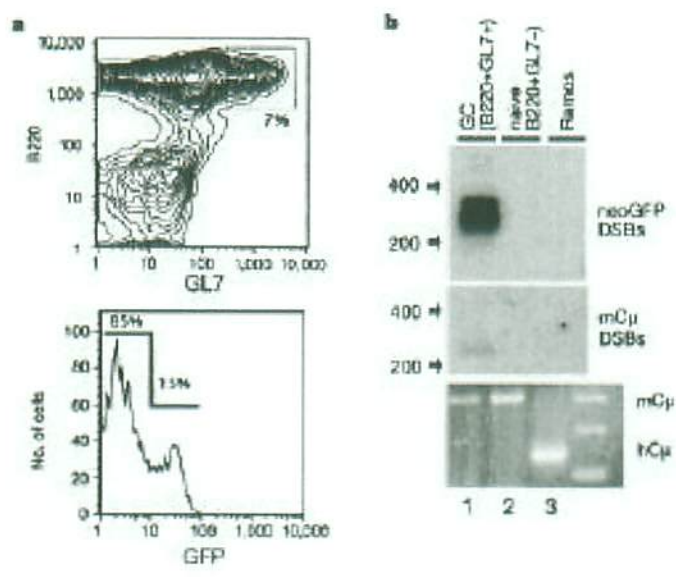
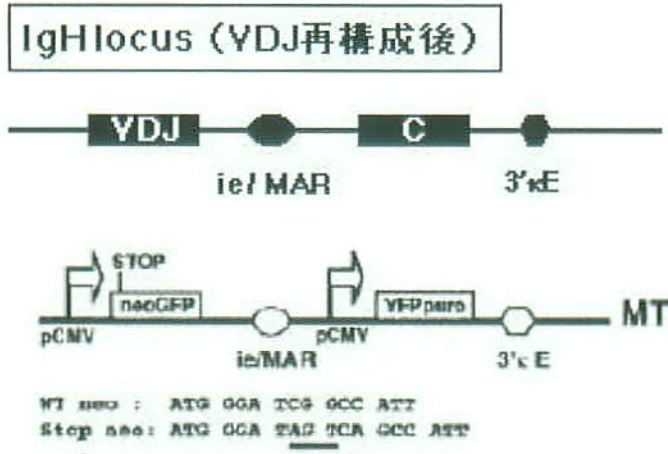


図2 B細胞分化、成熟時にイムノグロブリン遺伝子に誘導される遺伝子変換とDSBの関連

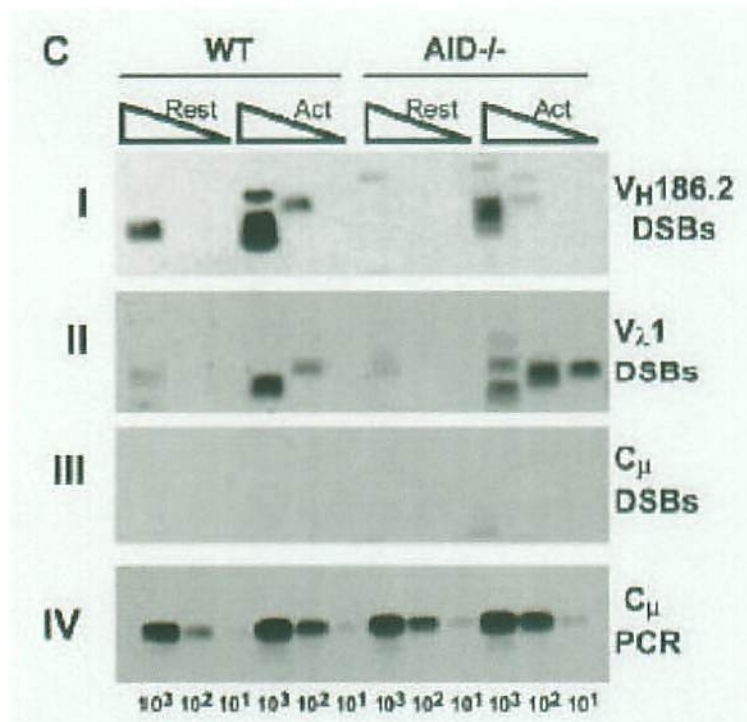
イムノグロブリン遺伝子再構成と class switch recombination は DSB 後の組換え反応である。somatic hypermutation の詳細なメカニズムは不明で、DSB との関連性は解明されていない。



[Papavasiliou FN and Schatz DG, 2000]

図3 胚中心 B 細胞における Ig V 領域 DSB の誘導

Papavasiliou と Schatz は再構成後のイムノグロブリン H 鎖の遺伝子座を模したコンストラクトをトランスジーンしたマウスを作製した。このマウスを免疫すると脾臓 B220 陽性 GL7 陽性胚中心 B 細胞群において GFP 陽性細胞が出現し、突然変異が導入されていた。ligation-mediated PCR 法により解析したところ、B220 陽性 GL7 陽性の細胞群にのみ GFP 遺伝子に DSB が導入されていた。

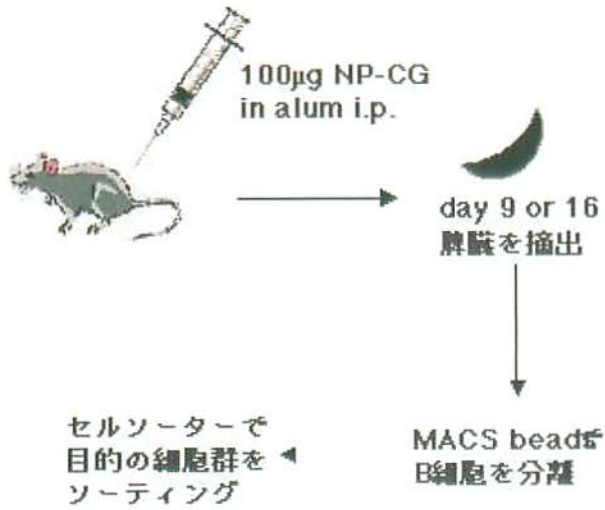


(Papavasiliou FN and Schatz DG, 2002)

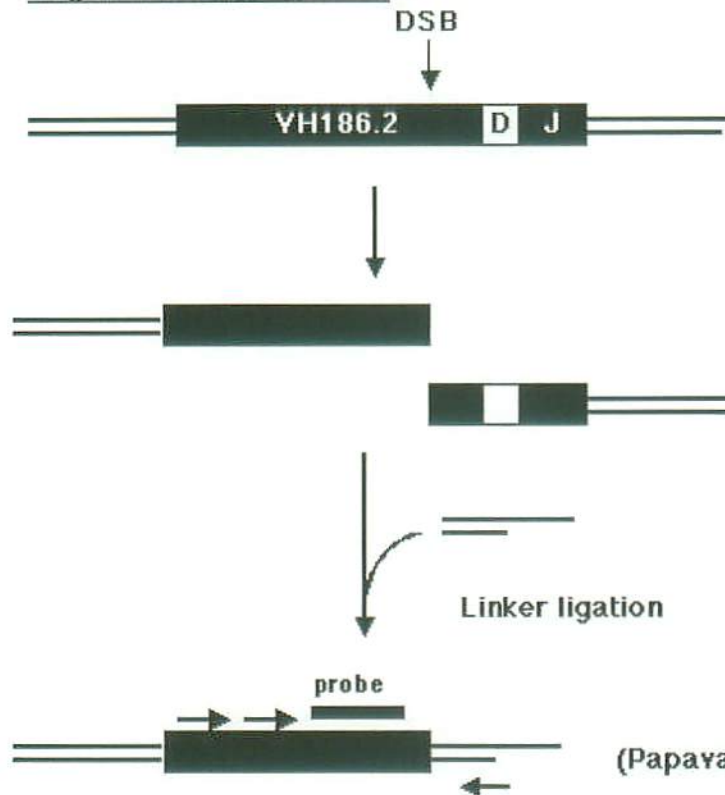
図4 activation-induced cytidine deaminase (AID) 欠損マウスの胚中心 B 細胞における IgV 領域 DSB の発生頻度

Papavasiliou と Schatz は somatic hypermutation, class switch recombination に必須の分子である AID 欠損マウスの胚中心 B 細胞において V_H186.2, V_λ1 領域の DSB を比較したが、その発生頻度は野生型マウスと変わらなかった。したがって、AID の下流における DSB の誘導は否定的であり、DSB と somatic hypermutation や抗体の親和性成熟との関連性に疑問が持たれた。

免疫と細胞分離



Ligation-mediated PCR



(Schlisse et al., 1993)
(Papavasiliou and Schatz 2000)

図5 実験方法

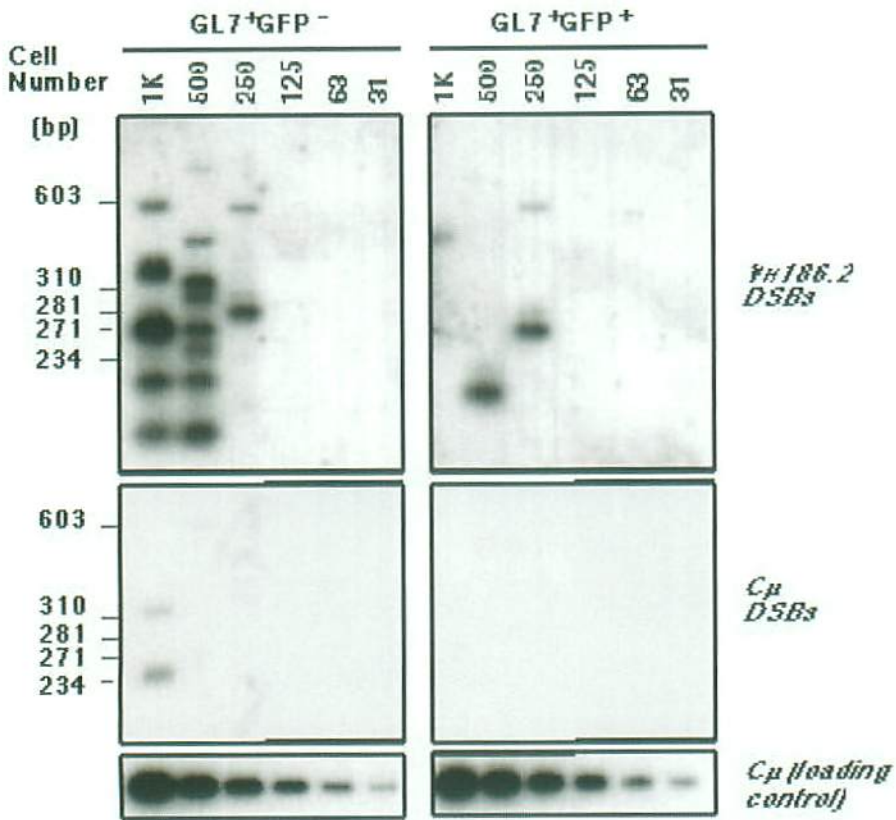
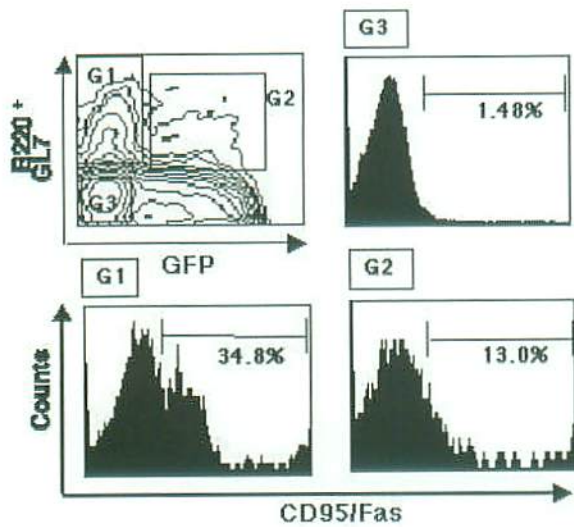
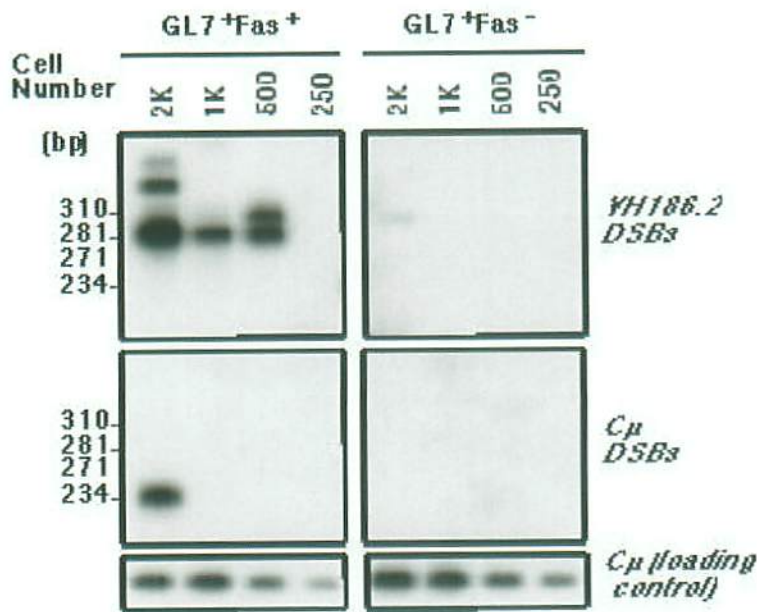


図6 IgV 領域のDSBはRAG1陰性の成熟B細胞に起こる

RAG1/GFP ノックインマウスを 100 μ g NP-CG 腹腔内投与で免疫し、16 日後脾臓を摘出した。脾臓 B 細胞を GL7 及び GFP(RAG1)にて sort し、LM-PCR 法にて GFP 陰性と陽性群で VH186.2 領域の DSB を比較した。GFP 陰性群で DSB が高頻度に起こっていた。また、GFP 陰性群で CD95/Fas の発現増加を認めた。

A



B

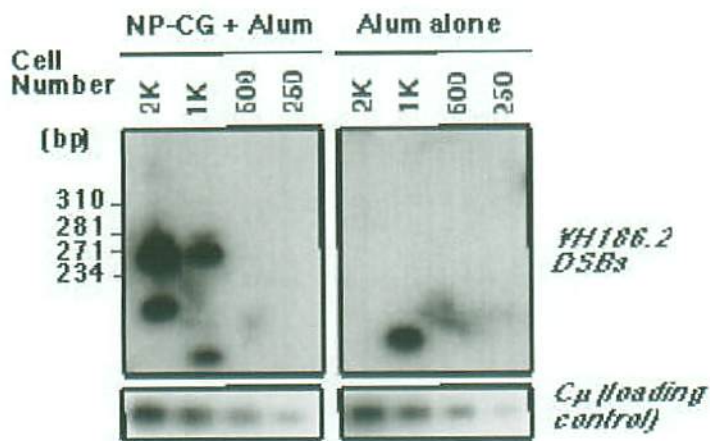


図7 IgV領域のDSBはGL7⁺ Fas⁺の胚中心B細胞で検出される

A: DSBはGL7陽性Fas陽性の胚中心B細胞で認められる。

C57BL/6J マウスを100μg NP-CG腹腔内投与で免疫し、10日後脾臓を摘出した。

LM-PCRにて脾臓B細胞GL7陽性のFas陽性と陰性群でVH186.2領域のDSBを比較した。

B: T細胞依存性抗原刺激でDSBは誘導される。

C57BL/6J マウスを100μg NP-CG (a)、またはadjuvant単独 (b)で免疫、9日後脾臓を摘出。

B220陽性GL7陽性細胞でのVH186.2領域のDSB発生を比較した。

adjuvant単独ではFas陽性細胞は誘導されなかった。

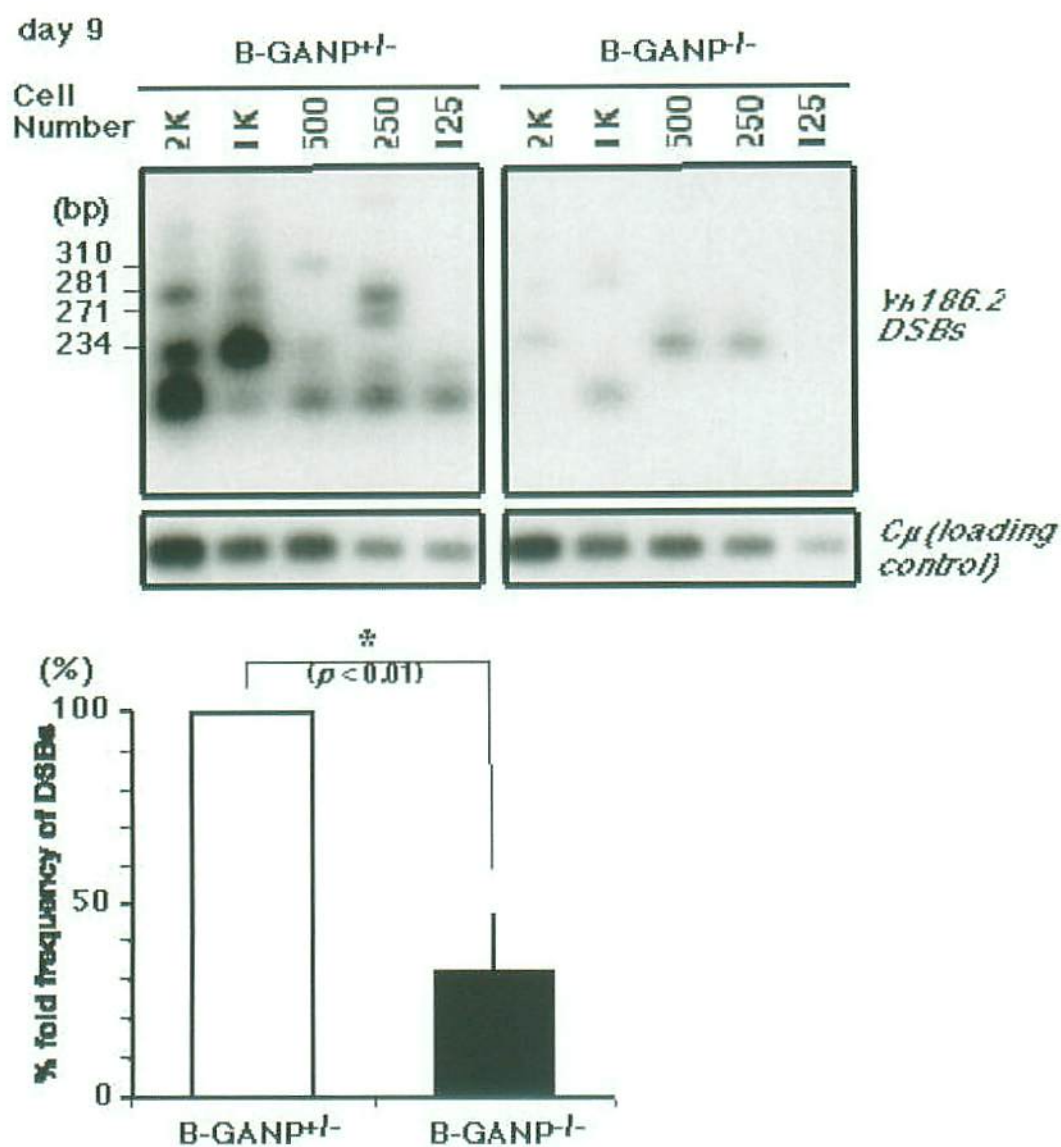


図8 B-GANP^{+/-}マウスの胚中心B細胞でDSBは減少する

B-GANP^{+/-}マウスまたはコントロール(flox^{-/-})を100μg NP-CG 免疫9日後の脾臓を摘出した。
各マウスのB220⁺ GL7⁺ Fas⁺分画をソーティングした。
LM-PCR法でVH186.2領域のDSBを比較した。

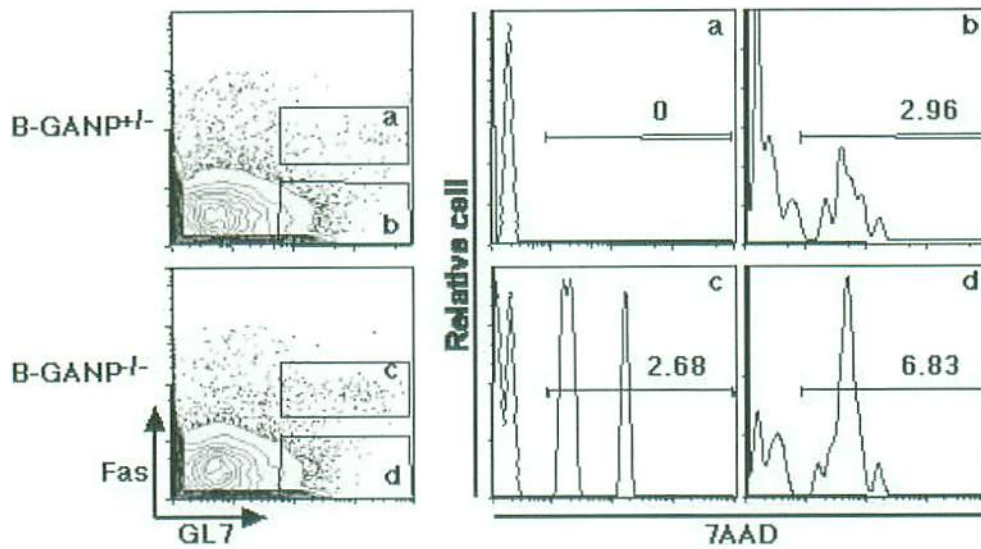
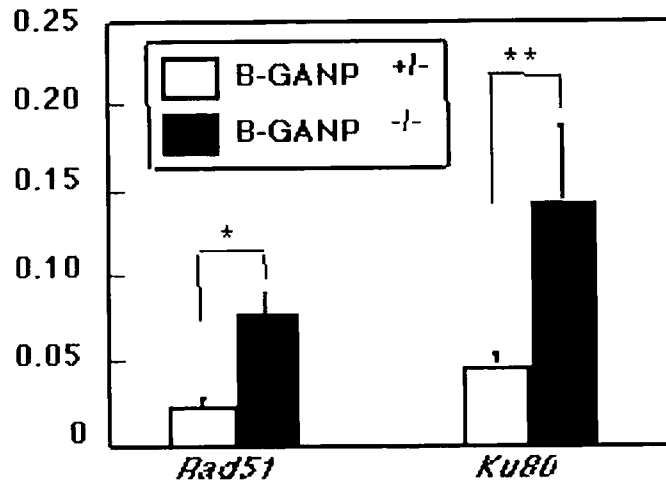
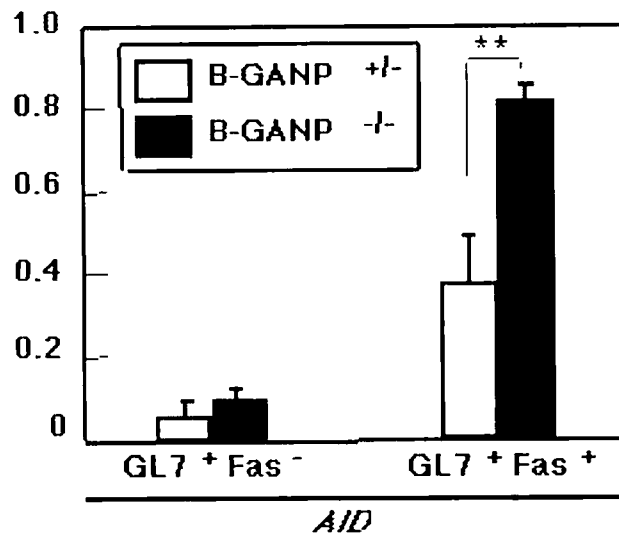


図9 B-GANP^{-/-} マウスでのapoptosis解析

B-GANP^{-/-}マウスまたはコントロールマウスのB220陽性GL7陽性、Fas陽性またはFas陰性分画をsortし、7AADにてアポトーシスの細胞を比較した。

B-GANPノックアウトマウスの胚中心B細胞ではapoptosisが増加する。

ARelative
fold**B**Relative
fold**図 10 Real-time RT PCR 解析**

B-GANP *-/-* マウスまたはコントロールマウスの B220 陽性 GL7 陽性、Fas 陽性または Fas 陰性分画を sort し、Real-time PCR にて mRNA の発現を解析し比較した。B-GANP ノックアウトマウスの胚中心 B 細胞では修復関連タンパク (A)、AID (B) の発現が増加する。

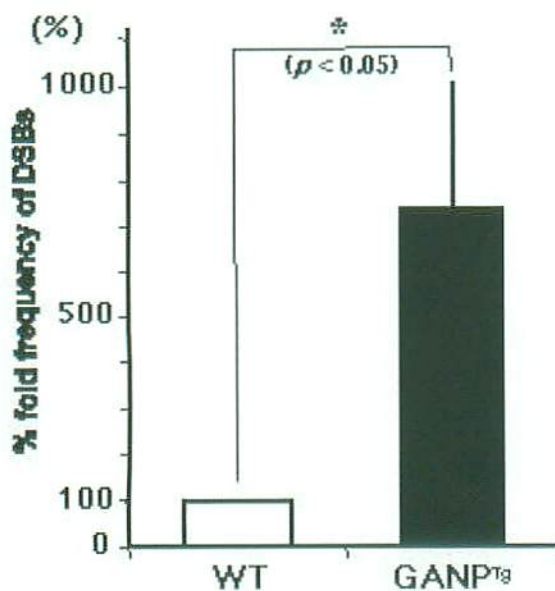
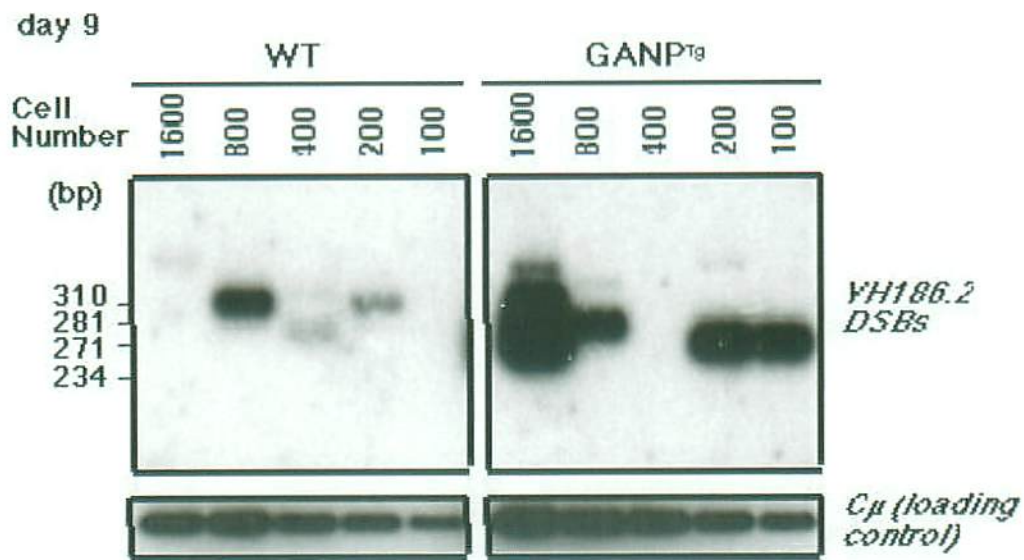


図 1 1 GANP^{Tg} マウスの胚中心B細胞でDSBは増加する

GANP^{Tg}マウスまたは野生型コントロール(WT)を100mg NP-CG 免疫9日後の脾臓を摘出、各マウスのB220⁺ GL7⁺ Fas⁺分画をソーティングした。LM-PCR法でVh186.2領域のDSBを比較した。GANP^{Tg}マウスの胚中心B細胞でDSBは増加する。

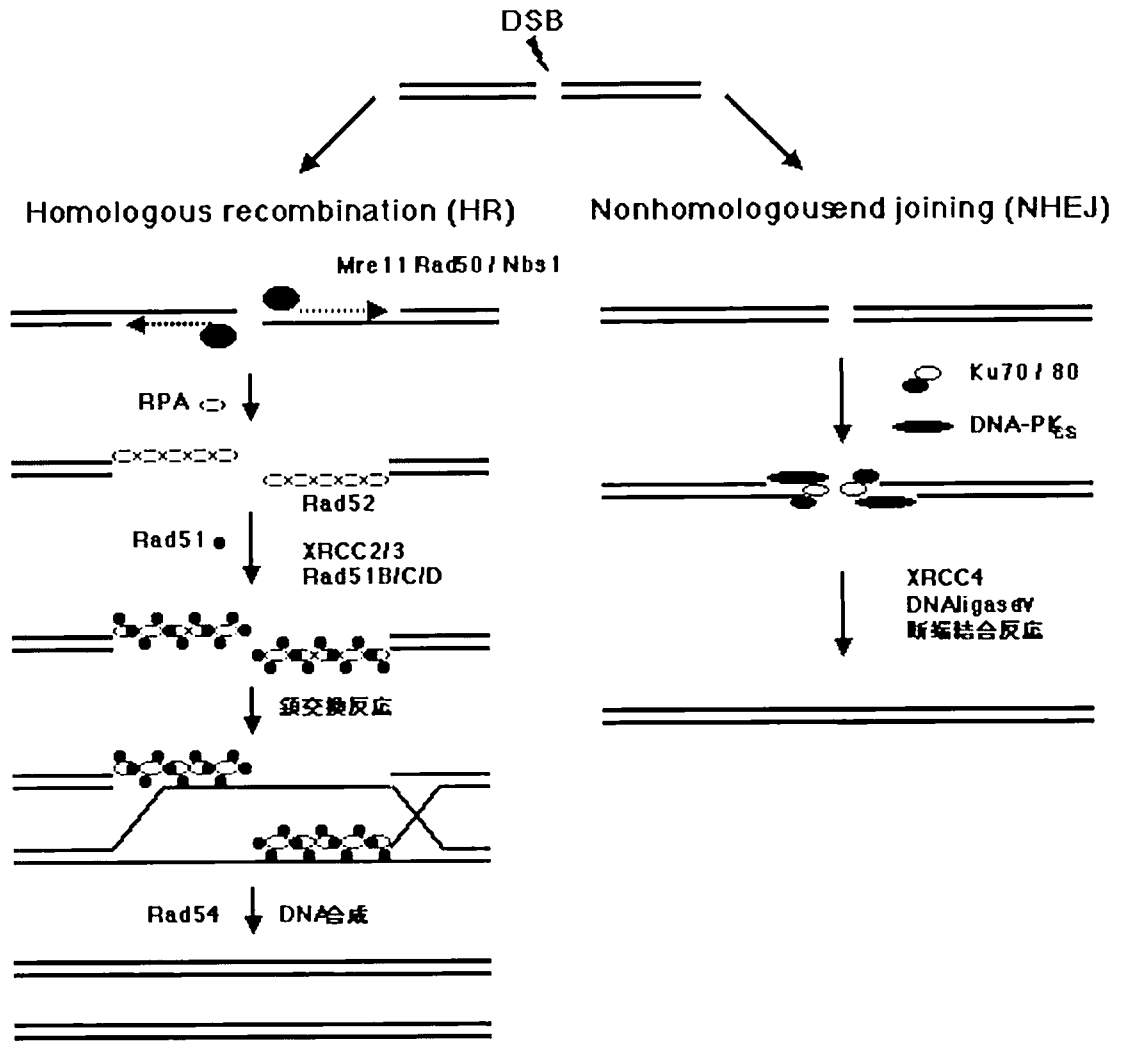


図 1 2 DSB の修復経路

脊椎動物の DNA 二重鎖切断の修復は nonhomologous end joining (NHEJ) と homologous recombination (HR) という主に二つの経路で行われる。

11. 参考文献

Abe E, Kuwahara K, Yoshida M, Suzuki M, Terasaki H, Matsuo Y, Takahashi EI, Sakaguchi N. (2000). Structure, expression, and chromosomal localization of the human gene encoding a germinal center-associated nuclear protein (GANP) that associates with MCM3 involved in the initiation of DNA replication. *Gene*. 255: 219-27.

Bransteitter, R., P. Pham, M. D. Scharff, and M. F. Goodman. (2003). Activation induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4102–4107.

Bross, L., Y. Fukita, F. McBlane, C. Demolliere, K. Rajewsky, and H. Jacobs. (2000). DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation. *Immunity* 13: 589–597.

Bross, L., M. Muramatsu, K. Kinoshita, T. Honjo, and H. Jacobs. (2002). DNA double-strand breaks: prior to but not sufficient in targeting hypermutation. *J. Exp. Med.* 195: 1187–1192.

Bross L, Wesoly J, Buerstedde JM, Kanaar R, Jacobs H. (2003). Somatic hypermutation does not require Rad54 and Rad54B-mediated homologous recombination. *Eur J Immunol*. 33(2): 352-357.

Chaudhuri, J., M. Tian, C. Khuong, K. Chua, E. Pinaud, and F. W. Alt. (2003). Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 422: 726–730.

Daboussi, F., A. Dumay, F. Delacote, and B. S. Lopez. (2002). DNA double-strand break repair signalling: the case of RAD51 post-translational regulation. *Cell. Signal.* 14: 969–975.

Dickerson, S. K., E. Market, E. Besmer, and F. N. Papavasiliou. (2003). AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J. Exp. Med.* 197: 1291–1296.

Doi, T., K. Kinoshita, M. Ikegawa, M. Muramatsu, and T. Honjo. (2003). De novo protein synthesis is required for the activation-induced cytidine deaminase function in class-switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 2634–2638.

Faili A, Aoufouchi S, Weller S, Vuillier F, Stary A, Sarasin A, Reynaud CA, Weill JC. (2004). DNA polymerase eta is involved in hypermutation occurring during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med.* 199(2): 265-270.

Igarashi H, Kuwata N, Kiyota K, Sumita K, Suda T, Ono S, Bauer SR, Sakaguchi N. (2001). Localization of recombination activating gene 1/green fluorescent protein (RAG1/GFP) expression in secondary lymphoid organs after immunization with T-dependent antigens in rag1/gfp knockin mice. *Blood.* 97(9): 2680-2687.

Jacob J, Przylepa J, Miller C, Kelsoe G. (1993). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. III. The kinetics of V region mutation and selection in germinal center B cells. *J Exp Med.* 178(4): 1293-1307.

Jeggo, P. A. (1998). Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat. Res.* 150: S80–S91.

Khanna KK, Jackson SP. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 27(3): 247-254.

Kuwahara, K., M. Yoshida, E. Kondo, A. Sakata, Y. Watanabe, E. Abe, Y. Kouno, S. Tomiyasu, S. Fujimura, T. Tokuhisa, H. Kimura, T. Ezaki, and N. Sakaguchi. (2000). A novel nuclear phosphoprotein, GANP, is up-regulated in centrocytes of

the germinal center and associated with MCM3, a protein essential for DNA replication. *Blood* 95: 2321–2328.

Kuwahara, K., S. Tomiyasu, S. Fujimura, K. Nomura, Y. Xing, N. Nishiyama, M. Ogawa, S. Imajoh-Ohmi, S. Izuta, and N. Sakaguchi. (2001). Germinal center-associated nuclear protein (GANP) has a phosphorylation-dependent DNA-primase activity that is up-regulated in germinal center regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10279–10283.

Kuwahara, K., S. Fujimura, Y. Takahashi, N. Nakagata, T. Takemori, S. Aizawa, and N. Sakaguchi. (2004). Germinal center-associated nuclear protein contributes to affinity maturation of B cell antigen receptor in T cell-dependent responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 1010–1015.

Kuwata, N., H. Igarashi, T. Ohmura, S. Aizawa, and N. Sakaguchi. (1999). Cutting edge: absence of expression of RAG1 in peritoneal B-1 cells detected by knocking into RAG1 locus with green fluorescent protein gene. *J. Immunol.* 163: 6355–6359.

Li MJ, Peakman MC, Golub EI, Reddy G, Ward DC, Radding CM, Maizels N. (1996). Rad51 expression and localization in B cells carrying out class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(19): 10222-10227.

Li Z, Woo CJ, Iglesias-Ussel MD, Ronai D, Scharff MD. (2004). The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes Dev.* 18(1): 1-11.

Martin, A., P. D. Bardwell, C. J. Woo, M. Fan, M. J. Shulman, and M. D. Scharff. (2002). Activation-induced cytidine deaminase turns on somatic hypermutation in hybridomas. *Nature* 415: 802–806.

Min IM, Selsing E. (2005). Antibody class switch recombination: roles for switch sequences and mismatch repair proteins. *Adv Immunol.* 87: 297-328.

Miyazaki T, Bressan DA, Shinohara M, Haber JE, Shinohara A. (2004). In vivo assembly and disassembly of Rad51 and Rad52 complexes during double-strand break repair. *EMBO J.* 23(4): 939-949.

Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68: 869-877.

Motoyama N, Miwa T, Suzuki Y, Okada H, Azuma T. (1994). Comparison of somatic mutation frequency among immunoglobulin genes. *J Exp Med.* 179(2): 395-403.

Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, Sugai M, Kinoshita K, Davidson NO, 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(26): 18470-18476.

Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102(5): 553-563.

Nagaoka, H., G. Gonzalez-Aseguinolaza, M. Tsuji, and M. C. Nussenzweig. (2000). Immunization and infection change the number of recombination activating gene (RAG)-expressing B cells in the periphery by altering immature lymphocyte production. *J. Exp. Med.* 191: 2113-2120.

Neuberger MS, Scott J. (2000). Immunology. RNA editing AIDs antibody diversification? *Science* 289(5485): 1705-1706.

Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. (1990). RAG-1 and RAG-2,

adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248: 1517-1523.

Okazaki, I. M., K. Kinoshita, M. Muramatsu, K. Yoshikawa, and T. Honjo. (2002). The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts. *Nature* 416: 340-345.

Papavasiliou, F. N., and D. G. Schatz. (2000). Cell-cycle-regulated DNA doublestranded breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Nature* 408: 216-221.

Papavasiliou, F. N., and D. G. Schatz. (2002). The activation-induced deaminase functions in a postcleavage step of the somatic hypermutation process. *J. Exp. Med.* 195: 1193-1198.

Peakman MC, Maizels N. (1998). Localization of splenic B cells activated for switch recombination by in situ hybridization with Iggamma1 switch transcript and Rad51 probes. *J Immunol.* 161(8): 4008-4015.

Pham, P., R. Bransteitter, J. Petruska, and M. F. Goodman. (2003). Processive AIDcatalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* 424: 103-107-107.

Sakaguchi, N., Kimura, T., Matsushita, S., Fujimura, S., Shibata, J., Araki, M., Sakamoto, T., Minoda, C., and K. Kuwahara. (2005). Generation of high-affinity antibody against T cell-dependent antigen in the Ganp gene-transgenic mouse. *J. Immunol.* 174: 4485- 4494.

Sale JE, Neuberger MS. (1998). TdT-accessible breaks are scattered over the immunoglobulin V domain in a constitutively hypermutating B cell line. *Immunity* 9(6): 859-869.

Sale JE, Calandrini DM, Takata M, Takeda S, Neuberger MS. (2001). Ablation of

XRCC2/3 transforms immunoglobulin V gene conversion into somatic hypermutation. *Nature* 412(6850): 921-926.

Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell*. 59: 1035-48.

Schlissel, M., A. Constantinescu, T. Morrow, M. Baxter, and A. Peng. (1993). Double strand signal sequence breaks in V(D)J recombination are blunt, 5' - phosphorylated, RAG-dependent, and cell cycle regulated. *Genes Dev*. 7: 2520-2532.

Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, et al. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68: 855-867.

Sohail, A., J. Klapacz, M. Samaranayake, A. Ullah, and A. S. Bhagwat. (2003). Human activation-induced cytidine deaminase causes transcription-dependent, strand-biased C to U deaminations. *Nucleic Acids Res*. 31: 2990-2994.

Spencer J, Dunn-Walters DK. (2005). Hypermutation at A-T base pairs: the A nucleotide replacement spectrum is affected by adjacent nucleotides and there is no reverse complementarity of sequences flanking mutated A and T nucleotides. *J Immunol*. 175(8): 5170-5177.

Takata M, Sasaki MS, Tachiiri S, Fukushima T, Sonoda E, Schild D, Thompson LH,

Takeda S. (2001). Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol*. 21(8):2858-2866.

Takei Y, Tsujimoto G. (1998). Identification of a novel MCM3-associated protein that facilitates MCM3 nuclear localization. *J Biol Chem*. 273(35): 22177-80.

Takei Y, Swietlik M, Tanoue A, Tsujimoto G, Kouzarides T, Laskey R. (2001).

MCM3AP, a novel acetyltransferase that acetylates replication protein MCM3. *EMBO Rep.* 2(2): 119-23.

Tonegawa S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302: 575-581.

Valerie K. Povirk LF. (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 22(37): 5792-5812.

van Veelen LR, Cervelli T, van de Rakt MW, Theil AF, Essers J, Kanaar R. (2005). Analysis of ionizing radiation-induced foci of DNA damage repair proteins. *Mutat Res.* 574(1-2): 22-33.

Wu, X., J. Feng, A. Komori, E. C. Kim, H. Zan, and P. Casali. (2003). Immunoglobulin somatic hypermutation: double-strand DNA breaks, AID and error-prone DNA repair. *J. Clin. Immunol.* 23: 235–246.

Xu Z, Fulop Z, Zhong Y, Evinger AJ 3rd, Zan H, Casali P. (2005). DNA lesions and repair in immunoglobulin class switch recombination and somatic hypermutation. *Ann N Y Acad Sci.* 1050: 146-62.

Yamamoto A, Taki T, Yagi H, Habu T, Yoshida K, Yoshimura Y, Yamamoto K, Matsushiro A, Nishimune Y, Morita T. (1996). Cell cycle-dependent expression of the mouse Rad51 gene in proliferating cells. *Mol Gen Genet.* 251(1): 1-12.

Yoshikawa, K., I. M. Okazaki, T. Eto, K. Kinoshita, M. Muramatsu, H. Nagaoka, and T. Honjo. (2002). AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts. *Science* 296: 2033–2036.

Yu, K., F. T. Huang, and M. R. Lieber. (2004). DNA substrate length and

surrounding sequence affect the activation-induced deaminase activity at cytidine.

J. Biol. Chem.

279: 6496–6500.