

## 熊本大学学術リポジトリ

### Kumamoto University Repository System

Title	AID遺伝子転写制御領域のDNA脱メチル化は胚中心B細胞で誘導される
Author(s)	松井, 健
Citation	
Issue date	2008-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2298/11095">http://hdl.handle.net/2298/11095</a>
Right	

# 学位論文

Doctor's Thesis

*AID* 遺伝子転写制御領域の DNA 脱メチル化は  
胚中心 B 細胞で誘導される  
(Germinal center B-cell-associated DNA hypomethylation  
at transcriptional regulatory regions of the *AID* gene)

松井 健

Takeshi Matsui

熊本大学大学院医学教育部博士課程生体医科学専攻免疫学

指導教員

阪口 薫雄 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程生体医科学専攻免疫学

2008 年 3 月

# 学位論文

## Doctor's Thesis

論文題名 : *AID* 遺伝子転写制御領域の DNA 脱メチル化は  
胚中心 B 細胞で誘導される

(Germinal center B-cell-associated DNA hypomethylation at  
transcriptional regulatory regions of the *AID* gene)

著者名 : 松井 健  
Takeshi Matsui

指導教員名 : 免疫学担当教授

阪口 薫雄

審査委員名 : 器官制御学担当教授 中尾 光善

免疫識別学担当教授 西村 泰治

予防開発学担当教授 岡田 誠治

転写制御学担当教授 田賀 哲也

2008 年 3 月

・目次・

1. 要旨.....	4
2. 発表論文リスト.....	5
3. 謝辞.....	6
4. 略語一覧.....	7
5. 研究の背景と目的 .....	8
5-1).生体内における獲得免疫応答.....	8
5-2).骨髄内での B 細胞分化.....	9
5-3).胚中心での B 細胞活性化.....	9
5-4).AID の構造 .....	11
5-5).SHM 及び CSR における AID の作用 .....	12
5-6).AID と疾病の関連性.....	12
5-7).AID の転写制御 .....	13
5-8).DNA のメチル化による転写制御 .....	14
5-9).本研究の目的 .....	16
6. 実験方法.....	17
6-1).実験動物 .....	17
6-2).免疫 .....	17
6-3).マウス脾臓細胞の回収と B 細胞の分離 .....	17
6-4).セルソーティング .....	17
6-5).細胞株と細胞培養.....	18
6-6).DNA 精製 .....	18
6-7).メチル化 DNA の検出 .....	18
6-8).全 RNA の抽出.....	19
6-9).RT-PCR.....	19
6-10).Real-time RT-PCR.....	20

7. 実験結果.....	21
7-1).マウス <i>AID</i> 遺伝子転写制御領域中の CpG 部位の検索.....	21
7-2).胚中心 B 細胞株中の <i>AID</i> 遺伝子領域では CpG のメチル化の頻度が低下している .....	23
7-3).LPS 及び IL-4 による共刺激は転写制御領域の脱メチル化を促進するとともに <i>AID</i> の発現を誘導する .....	27
7-4). <i>AID</i> 遺伝子の転写領域は胚中心 B 細胞分化段階で脱メチル化する .....	29
7-5). <i>CG-7</i> の高頻度のメチル化が形質細胞段階で見られる .....	29
8. 考察.....	32
9. 結語.....	35
10. 参考文献.....	36

## 1. 要旨

〔目的〕 抗原特異的抗体の多様性、高親和性の獲得には体細胞突然変異またはクラススイッチなどの遺伝子再構成の変化の事象が必須であり、それらの起こる場としての胚中心は免疫応答に非常に重要な役割を果たしている。胚中心 B 細胞特異的に発現が見られる activation induced cytidine deaminase (AID) 分子は体細胞突然変異、クラススイッチに必須な変異誘導因子である。そのため AID 遺伝子の発現は B 細胞分化段階において厳密に制御されていると考えられる。現在まで多くの転写制御機構が報告されているが、本研究では新たに DNA メチル化の観点から AID の転写制御機構を解明することを目的とした。

〔方法〕 B 細胞各分化段階を反映する B 細胞株、*in vitro* で LPS 及び IL-4 の共刺激により AID 発現を誘導したマウス脾臓 B 細胞、T 細胞依存性抗原免疫マウスの胚中心 B 細胞を実験に用いた。ゲノム DNA を抽出し、AID の転写を制御している可能性がある転写開始点周辺領域中の CpG ジヌクレオチドのメチル化を、亜硫酸水素ナトリウム処理法で解析した。さらに様々な分化段階の B 細胞での AID 発現を real-time PCR にて測定し、AID 転写制御領域中の DNA メチル化を検討し AID の発現制御機構との関連を解析した。

〔結果〕 未熟 B 細胞株では AID 転写制御領域が高頻度でメチル化されていることが示された。一方、胚中心 B 細胞株では AID 転写制御領域は低メチル化を示し、AID 転写活性化に分化段階特異的な DNA メチル化の関与が示唆された。一方、*in vitro* で刺激した B 細胞では刺激依存的な脱メチル化が誘導された。細胞株と比較すると、刺激 B 細胞での脱メチル化は部位特異的であった。また、マウスの成熟胚中心 B 細胞では未感作 B 細胞と比較して、AID プロモーター領域中の Pax5 結合モチーフの脱メチル化が顕著に亢進していた。形質細胞では転じてメチル化が再び誘導されることが明らかになった。

〔考察及び結論〕 AID の転写活性化には Pax5 結合モチーフ中の DNA メチル化が主要な役割を果たしていると考えられる。AID 遺伝子領域中の脱メチル化及びメチル化が B 細胞分化に伴って特異的に起こり、AID の転写の制御と密接に関連していることが明らかになった。一方、刺激 B 細胞で部位特異的な脱メチル化が見られたことは、AID 転写制御領域での脱メチル化が単一の機構ではなく、複数の因子によって誘導される複合的な機構で起こっている可能性を示唆している。近年 DNA メチル化が B 細胞分化において重要な役割を果たしていることが報告されており、本研究は更に詳細な B 細胞における DNA メチル化機構を解明することに貢献すると考えられる。

## 2. 発表論文リスト

### 1. 関連論文

Satoru Fujimura\*, Takeshi Matsui\*, Kazuhiko Kuwahara, Kazuhiko Maeda, and Nobuo Sakaguchi. 2008. Germinal center B-cell-associated DNA hypomethylation at transcriptional region of the *AID* gene.

*Molecular Immunology*. 45, 1712-1719.

(\*equal contribution)

### 2. その他の論文

Yosuke Kawatani, Hideya Igarashi, Takeshi Matsui, Kazuhiko Kuwahara, Satoru Fujimura, Nobukazu Okamoto, Katsumasa Takagi, and Nobuo Sakaguchi, 2005. Double-stranded DNA breaks in the IgV region gene were detected at lower frequency in affinity-maturation impeded GANP<sup>-/-</sup> mice. *J.Immunol.* 175, 5615-5618.

### 3. 謝辞

本研究を行うにあたり、全面的に御指導くださいました熊本大学大学院医学教育部免疫学分野 阪口薫雄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教育部免疫学分野 桑原一彦准教授、前田和彦助教、北畠正大助教、元研究生の藤村睦博士、並びに熊本大学大学院医学研究科免疫学分野の皆様にご指導いただき、深く感謝致しますと同時に厚く御礼申し上げます。



#### 4. 略語一覧

AID: activation induced cytidine deaminase

AML-1: acute myeloid leukemia-1

AP2: apetala-2

APE: apurinic/apyrimidinic endonuclease

APOBEC-1: apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-1

BCR: B cell receptor

Blimp-1: B-lymphocyte-induced maturation protein-1

cMyc/n/b: myelocytomatosis oncogene /n/b

CREB: Cyclic-AMP response element binding protein B

CSR: class switch recombination

DNMT1: maintenance DNA methyltransferase-1

DNMT3a/b: *de novo* methyltransferase-3a/b

FDC: follicular dendritic cell

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Ig: immunoglobulin

IL-4: interleukin-4

LPS: lipopolysaccharide

MBD: methyl-CpG binding domain protein

NES: nuclear exporting signal

NF- $\kappa$ B: nuclear factor- $\kappa$ B

NHEJ: non-homologous end joining

NLS: nuclear localization signal

Pax5: Paired box gene 5

PBS: phosphate-buffered saline

RPA: replication protein A

RSS: recombination signal sequence

RT-PCR: reverse transcriptase-PCR

SHM: somatic hypermutation

SRBC: sheep red blood cells

ssDNA: single-stranded DNA

STAT: signal transducer and activator of transcription

TGF- $\beta$ : transforming growth factor- $\beta$

UNG: uracil DNA glycosylase

VDJ: variable diversity joining

## 5. 研究の背景と目的

### 5-1). 生体内における獲得免疫応答

我々ヒトやマウスは外来からの異物（抗原）に対して抗原特異的免疫応答を起こす。その際に最初に起こる事象は成熟 B 細胞表面上の抗体分子による抗原認識である。抗体の機能は細胞外で病原微生物そのものや、病原微生物由来の毒素、すなわち抗原に結合することである。抗体は抗原に結合することで病原体を不活性化すると共に、その病原体を他の免疫系によって破壊しやすくする。個々の抗体は抗原に対して特異的であり、それぞれ 1 つまたはごく少数の抗原としか反応できない。しかしヒトやマウスはその生涯で多種多様な抗原に遭遇し、免疫系はこれらの異なった多くの抗原に対する多様な抗体を産生することができる。この様な個々の個体が産生できる特異性の異なる抗体の集団は抗体レパートリーと呼ばれる。抗体の本体は分泌型の免疫グロブリン (immunoglobulin; Ig) 分子である。成熟 B 細胞は膜型の Ig を抗原受容体として発現しており、抗原が抗原受容体に結合すると B 細胞は増殖し、形質細胞 (plasma cell) に分化して抗原受容体と同じ抗原特異性を持つ抗体を産生する。Burnet のクローン選択説で提唱されているように、Ig 分子は  $10^9$  種以上にも及ぶ外来抗原に反応できるような多様性を備えており、この多様性は Ig 遺伝子の可変領域中での VDJ 再構成及び体細胞突然変異 (somatic hypermutation ; SHM) が B 細胞の分化段階において起こることで獲得される (Tonegawa, 1983)。血液幹細胞から未熟 B 細胞までの B 細胞の分化は骨髄中で抗原非依存的に行われる。末梢リンパ組織に移動した B 細胞は抗原との遭遇により、クローン増殖を起こした後、抗原に高い親和性を持つものが選択され分化していくと考えられている。その成熟 B 細胞の増殖や選択の場として重要な役割を担っているのが胚中心 (germinal center; GC) である (MacLennan, 1994; Rajewsky, 1996; Cozine *et al.*, 2005)。胚中心は形態学的な名称で、T 細胞の補助が必要な可溶性抗原 (T 細胞依存性抗原) を免疫した際に見られる脾臓、パイエル板などの末梢リンパ組織の二次濾胞内に形成される領域を指す。一次応答の場合、抗原の刺激後約 7 日目で胚中心の構造が確認されるが、二次免疫の場合は免疫後 2、3 日という短期間で明らかな胚中心形成が認められる。

## 5-2). 骨髄内での B 細胞分化

B 細胞は骨髄の多機能性幹細胞に由来する。B 細胞系統で最も初期に識別できる細胞はプロ B 細胞 (pro-B cell)である。プロ B 細胞の段階で Ig 重 (H)鎖可変領域遺伝子の VDJ 再構成が起こり、 $\mu$  H 鎖を産生する。 $\mu$  H 鎖を発現するとプレ B 細胞 (pre-B cell)と呼ばれる段階へと分化が進行する。プレ B 細胞はプレ B 細胞受容体 (pre-BCR ; pre-B cell receptor)を発現している。Pre-BCR は $\mu$  H 鎖、pre-B 細胞で作られる代替 L 鎖、Ig  $\alpha$  と Ig  $\beta$  のポリペプチドにより構成される。その後、Ig 軽 (L)鎖の再構成が進行する。L 鎖が形成されると、L 鎖は $\mu$  H 鎖と結合し IgM 分子を形成する。その後 IgM 分子は細胞表面に移動し、機能的な BCR を形成する (Rolink *et al.*, 1999; Melcher *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004)。IgM のみを発現する B 細胞の段階は未熟 B 細胞 (immature B cell)と定義されている。未熟 B 細胞までの B 細胞分化は骨髄で起こり、特異的抗原の作用は必要ではないと考えられている。ここでの遺伝子再構成は無作為に行われるため、体内の構成要素に対し反応する BCR が生じる可能性がある。自己反応性の BCR を保持した B 細胞はクローン選択と呼ばれる過程を経て除去される (Rajewsky, 1996)。未熟 B 細胞は骨髄を出て、脾臓などの二次リンパ組織に到達し、さらに分化していく。

## 5-3). 胚中心での B 細胞活性化

二次リンパ組織の中で未熟 B 細胞は、H 鎖遺伝子の選択的 RNA スプライシングによって膜結合型の IgM と IgD を産生する成熟 B 細胞 (mature B cell)になる。また成熟 B 細胞は抗原に対して未感作であるために未感作 (ナイーブ)B 細胞 (naïve B cell)とも呼ばれる。二次リンパ組織では B 細胞は集合して、一次リンパ濾胞と呼ばれる組織的構造をとる。ここで成熟 B 細胞は特異的抗原に接触し、さらに抗原特異的 CD4 ヘルパー T 細胞によって活性化される (MacLennan *et al.*, 1997; Garside *et al.*, 1998)。活性化した B 細胞は増殖し、さらに分化していく。B 細胞はここで二通りの分化経路に分かれると考えられている (Jacob *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1991)。一部の B 細胞は抗原受容体の再編成を受けないままに抗体を産生する形質細胞に分化し、この形質細胞では分泌される抗体のクラスは主に IgM で抗原に対する親和性は低い場合が多い。一方、T 細胞依存性抗原の刺激で B 細胞は活性化され大きくなり、この B 細胞は胚中心を有する二次リンパ濾胞を形成する。ここで活性化 B 細胞は活発な増殖を示すセントロブラスト (centroblast)と呼ばれる細胞に分化して暗帯と呼ばれる領域を形成する。その後セントロサイト (centrocyte)と呼ばれる増殖しない細胞に分化し、明帯と呼ばれる領域を形成する。セントロサイトでは Ig 分子可

変部領域に SHM が高頻度にかかる。また、セントロサイトはクラススイッチ (class switch recombination ; CSR)を受け、抗体分子のエフェクター機能を変化させると言われている。このような過程で高親和性の Ig 分子を獲得した B 細胞は濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell ; FDC)上の免疫複合体を認識し、抗原特異性が低いものや自己反応性を有するものは除去され、抗原に親和性の高い Ig 分子を表面に持つ細胞のみが選択される (親和性成熟)と考えられている。近年 AID (activation induced cytidine deaminase)が、SHM や CSR の機構に必須であることが明らかになっている (Muramatsu *et al.*, 1999, 2000; Revy *et al.*, 2000; Honjo *et al.*, 2005)。AID は胚中心で抗原刺激を受けた B 細胞に特異的に発現することが示されており、胚中心における獲得免疫反応に重要な分子であることが強く示唆されている。SHM、CSR における AID の分子メカニズムについては後述する。

親和性成熟の選択から生き残った B 細胞はさらに増殖し、形質細胞や記憶 B 細胞 (memory B cell)に分化すると考えられている (MacLennan., 1994; Tarlinton and smith, 2000; Bink *et al.*, 2005) (図 1)。

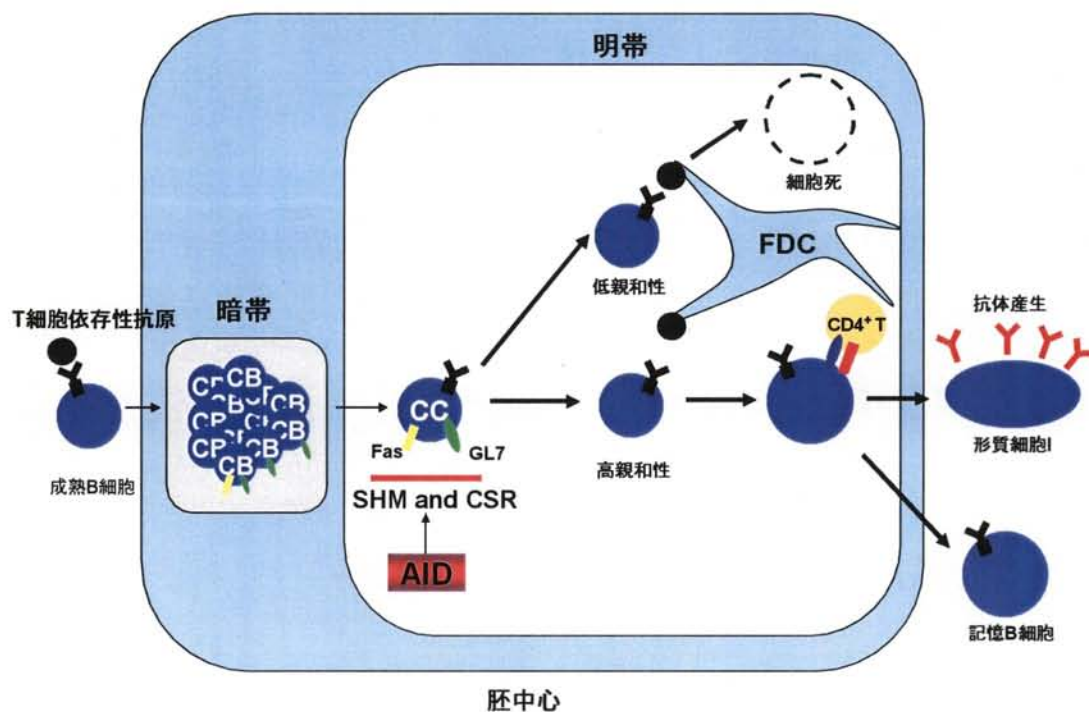


図.1 胚中心における B 細胞分化

抗原特異的 B 細胞は抗原にて活性化され、セントロプラスト (CB)になり暗帯で活発な細胞分裂を繰り返す。その後セントロサイト (CC)に分化し明帯を形成し、SHM 及び CSR を受けることで抗体分子のエフェクター機能を変化させる。FDC や CD4 陽性 T 細胞からの刺激を受け、高親和性の Ig 分子を獲得した細胞のみが選択される。一方、抗原特異性が低いものや自己反応性を有するものは除去される。最終的に形質細胞や記憶 B 細胞に分化する。

#### 5-4).AID の構造

AID は Honjo らのグループによって発見された 198 アミノ酸からなるタンパク質である (図 2A)。AID は APOBEC-1 (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide) と 34 % の相同性を有し、その遺伝子は APOBEC-1 遺伝子の近傍にあることから、遺伝子重複によって生じたものと考えられている。AID の発見当初は APOBEC-1 との相同性から RNA を標的とした脱アミノ化酵素としての機能が予測されていたが、現在は DNA 脱アミノ化酵素としての機能が中心であると考えられている (図 2B)。AID は APOBEC-1 と同様に N 末端側に核移行シグナル (nuclear localization signal ; NLS) と C 末端側に核外移行シグナル (nuclear exporting signal ; NES) の配列をもつシャトリング分子である (Ito *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2004) (図 2A)。

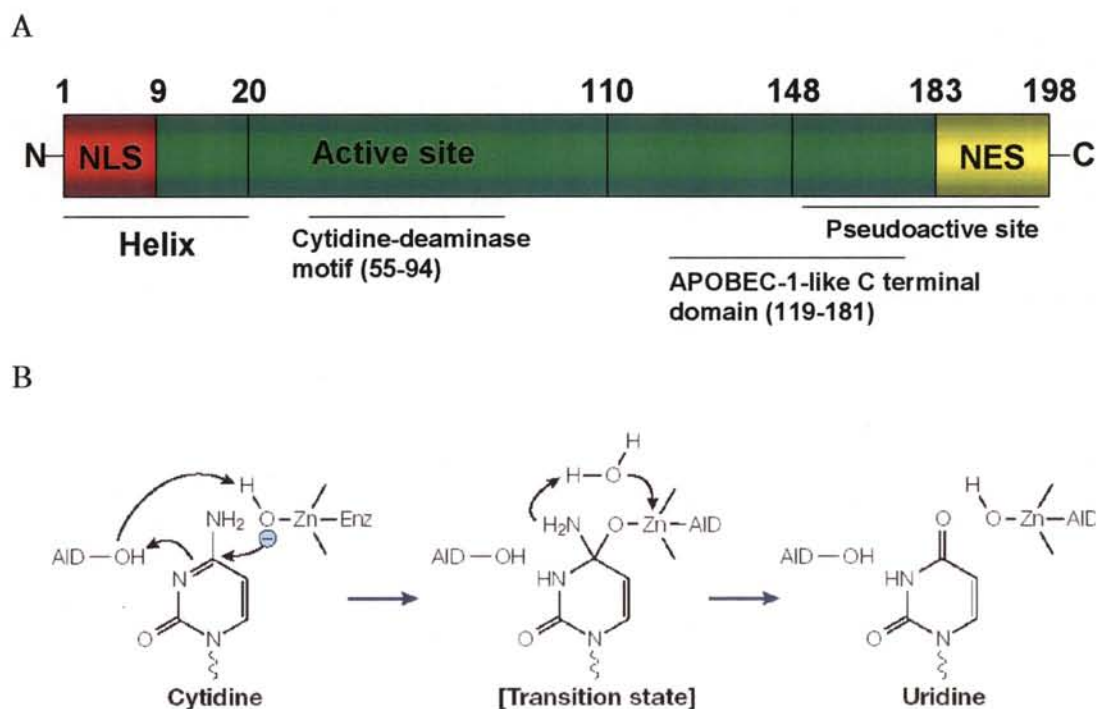


図 2. AID の構造及びシチジンの脱アミノ化

A: AID の構造. N 末端側に核移行シグナル (NLS) と C 末端側に核外移行シグナル (NES) の配列を保持している。中応部にはシチジン脱アミノ化活性の活性中心を保持している。B: AID はシチジンを脱アミノ化しウリジンに変換する。

#### 5-5). SHM 及び CSR における AID の作用

AID は SHM では Ig 遺伝子の可変 (V) 領域、CSR では定常領域中のスイッチ (S) 領域中のシチジンに優先的に作用すると考えられている。SHM、CSR 共に、AID の作用には Ig 遺伝子の転写に伴う一本鎖 (ss)DNA の形成が必要である。CSR においては Ig の転写の際に形成される R ループ中の ssDNA に作用する。一方で SHM では ssDNA 会合タンパク質である複製タンパク質 A (replication protein A; RPA) を介して AID が ssDNA に作用すると考えられている。AID が作用した後に、DNA ウラシルグリコシラーゼ (uracil DNA glycosylase; UNG) が作用し、その後続く修復機構によって、SHM や CSR が完了すると考えられている (Honjo *et al.*, 2004; Di Noia and Neuberger, 2007; Chaudhuri *et al.*, 2007) (図 3)。

#### 5-6). AID と疾病の関連性

AID の疾病との関連については、細胞のがん化との関連性が近年の研究で多数報告されている。B リンパ腫ではその多くで、Ig 遺伝子とがん原遺伝子との遺伝子転座が見られるが、胚中心 B 細胞腫瘍ではこのような転座とは別に、がん原遺伝子への高頻度の変異の発生がみとめられている。B 細胞系において、AID の発現異常はこのような変異を引き起こし、直接がん化などにつながるものとして考えられており、AID トランスジェニックマウスや AID 欠損マウスを用いた実験により、がん原遺伝子などの遺伝子変異に AID が関与することが明らかとなっている (Unniraman and Schatz, 2006; Ruccia *et al.*, 2006)。従って、AID の発現量や部位、細胞特異性を厳密に制御する機構が存在し、AID の発現を調節しているものと考えられる。



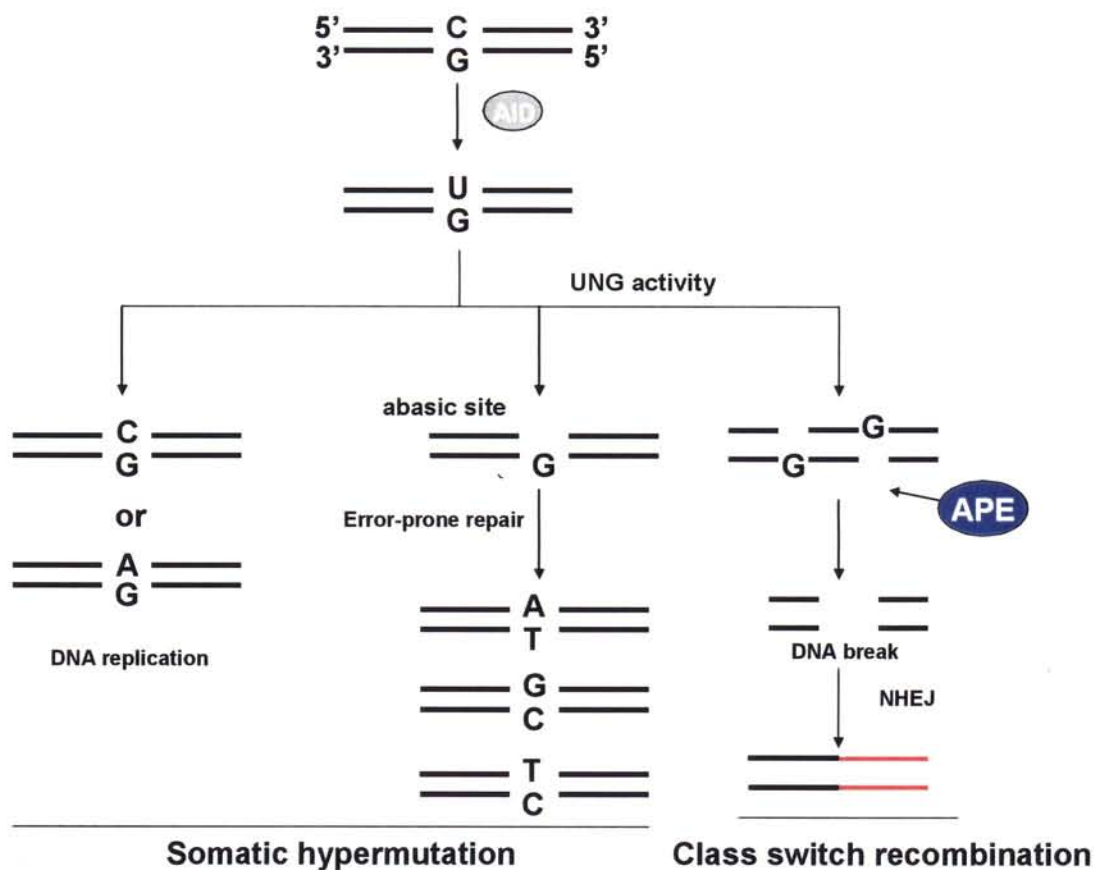


図 3. SHM と CSR における AID の分子メカニズム

AID が介する CSR、SHM の機構を簡略的に示した。

CSR では UNG により形成された脱塩基部位に APE (AP endonuclease) が働き DNA 切断が起こる。その後非相同性末端結合 (NHEJ) により CSR が完了する。SHM では脱アミノ化によって形成されたウラシル塩基が、DNA 複製の際に他の塩基に変換することで変異が起こることと、DNA 切断後の誤りがち修復 (Error prone repair) により変異が導入されることから成り立っていると考えられる。

#### 5-7). AID の転写制御

上記したように AID の発現を適正に制御することは獲得免疫応答において重要であると考えられる。B 細胞分化において必須な転写因子である Pax5 は AID プロモーター領域に結合することで AID の発現を誘導することが報告されている (Gonda *et al.*, 2003)。さらに、形質細胞において発現が上昇する Blimp-1 は Pax5 の発現を抑制することで、形質細胞における AID の発現を制御し、BCR の高親和性を維持し

ていると考えられる (Knodel *et al.*, 2001)。B 細胞系では他には STAT6、NF- $\kappa$ B、E2A などが *AID* の転写を促進する可能性があることが知られている (Sayegh *et al.*, 2003; Dedeoglu *et al.*, 2004)。Gonda らの報告では *AID* 遺伝子の転写開始点上流 250 bp のプロモーター領域及び、下流 400 bp のイントロン領域が *AID* の転写において重要な役割を果たしていることが示唆されている。またこれらの領域中には Pax-5、NF- $\kappa$ B、STAT、AML-1a、Blimp-1 の結合モチーフが含まれている (Kuo and Calame, 2004)。

転写因子による転写制御とは別に、エピジェネティックな *AID* 遺伝子の転写制御機構が存在することも現在明らかになっている。エピジェネティックな遺伝子発現の調節は、DNA のメチル化、ヒストン・クロマチン構造変化、タンパク質の翻訳後修飾が相互に連携し行われている。DNA の高メチル化、ヒストンの低アセチル化、不活性クロマチンは遺伝子の転写を抑制している。一方、DNA の低メチル化、ヒストンの高アセチル化、活性クロマチンの形成は活発な転写を促すことが知られている (Nakao, 2001; Richards and Elgin, 2002)。 *AID* の転写制御に関しては、活性化 B 細胞の *AID* 遺伝子上において、ヒストン H3 の高アセチル化が起こることで *AID* の転写が促進することが報告されている (Crouch *et al.*, 2007)。しかし、B 細胞分化段階での *AID* 遺伝子の転写制御が DNA のメチル化によって行われているか否かは明らかにはなっていない。

#### 5-8). DNA のメチル化による転写制御

DNA のメチル化は原核生物、真核生物双方において自然発生的に起こる事象である。原核生物においては、宿主の DNA が特異的にメチル化されることで、外来の DNA に対する除去機構から、宿主の DNA を保護している。一方高等真核生物においては、メチル化酵素 (methyltransferase) による DNA メチル化が遺伝子の発現制御に関与していると考えられており (Bird and Wolffe, 1999; Costello *et al.*, 2001)、DNA メチル化の異常は細胞のがん化に重大な影響を与えることが知られている (Greger *et al.*, 1989; Herman *et al.*, 1994; Merlo *et al.*, 1995; Yoshiura *et al.*, 1995; Stirzaker *et al.*, 1997)。また DNA のメチル化は刷り込み遺伝子、胎児発達、遺伝子不活性化、そして細胞周期の制御等にも主要な役割を果たしている。脊椎動物の染色体上では 60~90% の 5'-CpG-3' (C: シチジン G: グアノシン p: ホスホジエステル結合) 塩基配列上の C の 5 位炭素原子がメチル化の修飾を受けている。残りの非メチル化 CpG 配列は CpG アイランドと呼ばれ、主に遺伝子のプロモーター領域中に存在し、遺伝子の転写制御に関与する (Wade, 2001)。DNA のメチル化はメチル化感受性転写因子群 (E2F、CREB、AP2、cMyc/Myn、NF- $\kappa$ B、cMyb、ETS) の DNA 結合を



直接的に阻害すること、またはメチル化結合タンパク質を介して間接的に遺伝子の転写を抑制することが明らかになっている (図 4)。

B 細胞分化段階において DNA のメチル化の役割については、B 細胞の分化に必須な転写因子である PU.1、Pax5 や、B 細胞の分化段階特異的に発現する分子である CD21、Ig  $\alpha$  /mb-1 などの転写を制御していることが明らかとなっている (Amaravadi and Klemsz, 1999; Schwab and Illges, 2001; Danbara *et al.*, 2001; Maier *et al.*, 2004)。

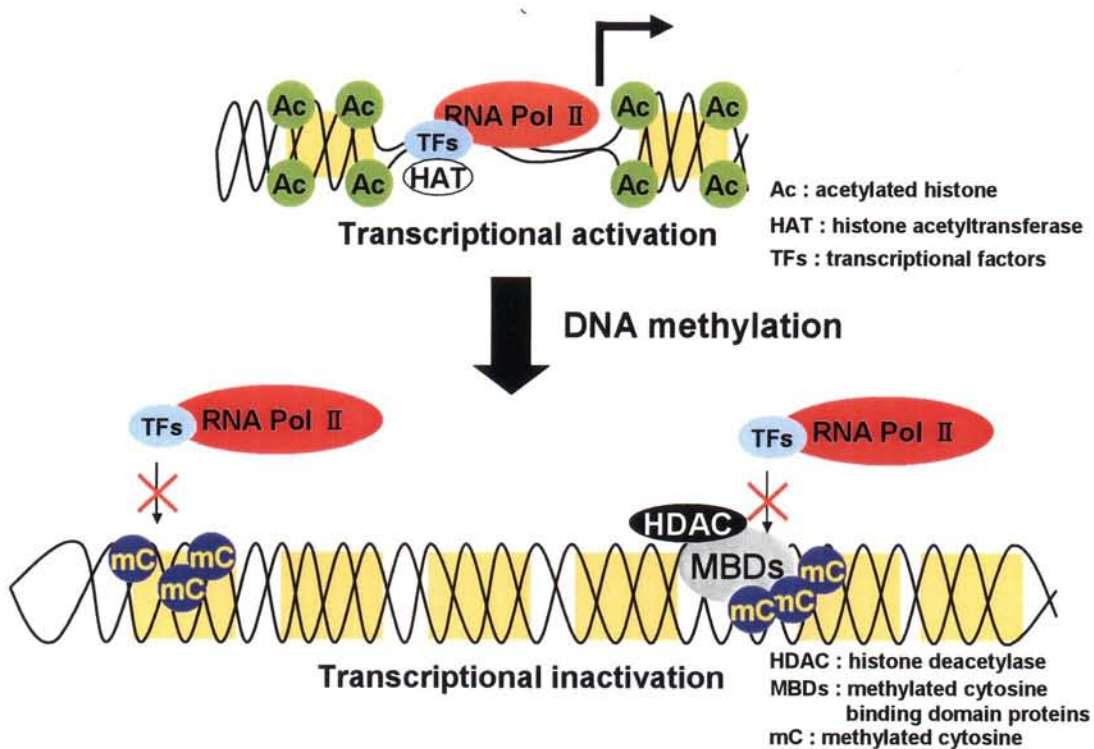


図.4 DNA メチル化による転写抑制機構のモデル

DNA のメチル化修飾はメチル化感受性転写因子の遺伝子プロモーター領域への近接性を直接阻害し遺伝子転写を抑制している。また一方で、メチル化非感受性転写因子の阻害にはメチル化 CpG 結合タンパク質 (MBDs) を介した転写抑制及び、MBDs 結合性のヒストン脱アセチル化酵素群の働きにより転写を抑制しているものと考えられる。

#### 5-9). 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、AID が関与する SHM、CSR は、抗体の親和性成熟に必須のメカニズムである。また、AID の発現異常は細胞のがん化などを示すことが報告されており、AID の発現を適正に制御するメカニズムを解明することは重要である。本研究では B 細胞分化段階に対応する B 細胞株及びマウス胚中心 B 細胞を用いて、*AID* 遺伝子領域中の DNA メチル化の頻度が B 細胞分化段階において変化し、*AID* 遺伝子の発現を制御しているか否かを明らかにすることを目的とした。

## 6. 実験方法

### 6-1). 実験動物

本実験に用いた C57BL/6 マウスは日本チャールズリバー社より購入した。マウスは熊本大学動物資源開発センター (CARD) の実験動物と動物実験に関連する規則に沿って取り扱い、マウスの飼育は CARD にて行った。

### 6-2). 免疫

T 細胞依存性抗原としてヒツジ赤血球細胞 (sheep red blood cells; SRBC, Nippon Bio-Test Laboratories) を用いた。SRBC を等量の PBS で 2 回洗浄したあと、マウス一匹あたり 200  $\mu$ l の SRBC を腹腔内投与 (i.p.) し免疫を行なった。免疫後 10 日目にマウスを解剖し、回収した脾臓を実験に用いた。

### 6-3). マウス脾臓細胞の回収と B 細胞の分離

C57BL/6 マウスから無菌的に脾臓を取り出し、滅菌した 2 枚のスライドガラスの磨ガラス部分で脾臓をすりつぶした。RPMI-1640 培地に懸濁し細胞浮遊液を作成した。遠心分離回収後、赤血球溶解液 (0.15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  200 mM Tris-HCl [pH 7.5]) で溶血し、洗浄バッファ (2% 熱不活性化ウシ胎児血清含有 PBS) を加えた後に再び遠心回収した。その後 35  $\mu$ m ナイロンメッシュに通し単細胞化し氷冷で保存した。調整した脾臓細胞を MACS B Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) でラベルして、autoMACS separator (Miltenyi Biotec) を用いて B 細胞を分離回収した。

### 6-4). セルソーティング

autoMACS 分離後に得られた脾臓 B 細胞を 15 ml チューブ中で下記抗体とそれぞれ反応させ、JSAN セルソーター (Bay Bioscience) にて目的の細胞分画をソーティングした。まず、SRBC 免疫 10 日後のマウス脾臓 B 細胞より GL7 陽性 Fas 陽性細胞及び、GL7 陽性 Fas 陰性細胞を分離し、続いて免疫 14 日後のマウスより、B220 陰性 Syndecan-1 陽性の形質細胞を分離した。分離した細胞より、ゲノム DNA 及び全 RNA を回収した。

抗体は

APC 標識 B220 モノクローナル抗体 (RA3-6B2, Pharmingen)

FITC 標識 GL7 (Ly-77, Pharmingen)

PE 標識抗 Fas モノクローナル抗体 (Jo2, Pharmingen)

Biotin 標識抗 Syndecan-1 モノクローナル抗体 (281-2, Pharmingen)

Streptoavidin-PE-Cy7 (Pharmingen)

を用いた。

#### 6-5). 細胞株と細胞培養

本研究では Pre-B 細胞株として 70Z/3 細胞、未熟 B 細胞株として WEHI-231 細胞、成熟 B 細胞株として BAL17 細胞、胚中心 B 細胞株として A20 細胞、M12 細胞、形質細胞株として X63 細胞、J558L 細胞、T 細胞株として K62 細胞を用いた (Christoph *et al.*, 1994; Ambrose and Wagner, 2004)。

それぞれの細胞株は 5% CO<sub>2</sub>、37 °C の環境下で 10% 熱不活性化ウシ胎児血清 (Biosource International)、2 mM L-グルタミン (Cambrex)、100 μg/ml ストレプトマイシン (Wako CO)、100 u/ml ペニシリン (Wako CO)、5 x 10<sup>-5</sup> M 2-メルカプトエタノール (2-ME) (Wako CO) を加えた RPMI-1640 完全培地 (Invitrogen) で培養した。回収した脾臓細胞は 1 × 10<sup>6</sup> cells/ml の細胞数で、LPS (Lipopolysaccharide *Escherichia coli* O55:B5 serotype; Sigma-Aldrich) 及び rIL-4 (BD Pharmingen) を含む RPMI-1640 完全培地にて刺激を行った。ネガティブコントロールとして、無刺激の B 細胞を用いた。各刺激時間後の細胞を回収し、それぞれの細胞からゲノム DNA 及び全 RNA を回収した。

#### 6-6). DNA 精製

ソーティングした細胞及び各種細胞株を遠心で回収し、そのペレットに 100 μl の細胞溶解液 (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 25 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.1 mg/ml proteinase K) を加えて 55 °C で 12 時間インキュベートした。その後 RNaseA を加え 37 °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、エタノール沈殿により DNA を精製した。

#### 6-7). メチル化 DNA の検出

精製したゲノム DNA を EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) を用いて亜硫酸水素ナトリウム処理した。亜硫酸処理によって、DNA 配列上の非メチル化シチジンはウリジンに変換され、一方メチル化修飾を受けているシチジンは影響されない。亜硫酸処理後の DNA を用いて *AID* 遺伝子上のプロモーター領域、イントロン領域をそれぞれ semi-nested PCR にて増幅した。*AID* のプロモーター領域では第一段階の PCR は mAID-pro-U-F プライマーと mAID-pro-U-R-1st プライマーを用いた。反応は 98 °C/5 秒・58 °C/10 秒・72 °C/4 秒を 35 サイクル繰り返したあと 4 °C で反応を終了した。第二段階 PCR では第一段階の反応液 1 μl を鋳型にして、mAID-pro-U-F プライマーと mAID-pro-U-R-2nd プライマーを用いて 98 °C/5 秒・59 °C/10 秒・72 °C/4 秒で 35 サイクル反応を行い 4 °C で終了した。*AID* のイントロン領域では第一段階 PCR は mAID-int-U-F-1st プライマーと mAID-int-U-R プライマーを用いた。反応は 98 °C/5 秒・54 °C/10 秒・72 °C/4 秒を 35 サイクル繰り返した後 4 °C で反応を終了した。第二段階の PCR では第一段階の反応液 1 μl を鋳型に

して、mAID-int-U-F-2nd プライマーと mAID-pro-U-R プライマーを用いて 98 °C/5 秒-59 °C/10 秒-72 °C/4 秒で 35 サイクル反応を行い 4 °Cで終了した。PCR 反応には Z-Taq DNA ポリメラーゼ (Takara Bio)を用いた。反応後のサンプルをアガロースゲルにて展開し、目的のバンドを切り出し、DNA 抽出の後 pGEM-T-easy ligation kit (Promega)を用いて pGEM-T ベクターに挿入した。プラスミドは BigDye Terminator Ver.2.0 (ABI PRISM; Applied Biosystems)を用いてシークエンス反応を行い、Sequence Scanner (Applied Biosystems)で解析した。

実験には以下のプライマーを用いた。

mAID-pro-U-F: 5'-GGTATTTGGGTTGGTTTTTAGAGG-3'

mAID-pro-U-R-1st: 5'-CCTCAATCCAAACAAACAACCAACAC-3'

mAID-pro-U-R-2nd: 5'-CTTTCTTAACCTCCCTCAAAATCTTAAACC-3'

mAID-int-U-F-1st: 5'-GTTTAGATTTGAATGTTAGGGG-3'

mAID-int-U-F-2nd: 5'-GGTTTAAGATTTTGAGGGAGTTAAGAAAG-3'

mAID-int-U-R: 5'-CTAAATAATTCCTATAAAAACTCCCC-3'

#### 6-8). 全 RNA の抽出

種々の細胞株またはソーティングしたそれぞれの B 細胞からの全 RNA はトリゾル LS 試薬(TRIZOL LS Reagent) (GIBCO BRL / Life Technologies) を用いた酸性条件下グアニジンチオシアネート・フェノール・クロロホルム法 (acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform 法 ; AGPC 法)または RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いた方法で抽出した。回収した全 RNA は 260 nm の吸光度から、 $1 \text{ OD}_{260}=40 \mu\text{g RNA/ml}$  で定量した。

#### 6-9). RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR)

抽出した全 RNA を鋳型として、Oligo-dT プライマーと Superscript III (Invitrogen)を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。また、Real-time PCR に用いる cDNA は、High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems)を用いて合成した。合成した cDNA を鋳型として Z-Taq DNA polymerase (Takara Bio)で PCR 増幅した。プライマーの配列は AID 転写検出用は、mAID-F と mAID-R を用いた。RNA のコントロールとして  $\beta$ -アクチン ( $\beta$ -actin) 転写検出用には、 $\beta$ -actin-F と  $\beta$ -actin-R を用いた。

実験には以下のプライマーを用いた。

mAID-F: 5'-ACATCTCAGACTGGGACCTG-3'

mAID-R: 5'-TCAAAATCCCAACATACGAAATG-3'

$\beta$ -actin-F: 5'-CCTAAGGCCAACCGTGAAAA-3'

$\beta$ -actin-R: 5'-TCTTCATGGTGCTAGGAGCCA-3'

#### 6-10). Real-time RT-PCR

*AID* 遺伝子の発現量を特異的プローブ (Mm01184115 Applied Biosystems)を用いた ABI PRIZM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)にて解析した。Real-time PCR 反応は Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いて、50 °Cで2分、95 °Cで10分の加熱の後、95 °C 15秒、60 °C 1分を50 サイクル繰り返し、1 サイクル毎の蛍光を測定した。解析のコントロールとしては mouse *GAPDH* (Mm99999915) (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)を用いた。

## 7. 実験結果

### 7-1). マウス *AID* 遺伝子転写制御領域中の CpG 部位の検索

一般的に CpG アイランドは染色体上に存在する遺伝子のエキソン I 周辺の領域に集中して存在し、様々な遺伝子の転写を制御している。本研究を始めるにあたり、マウス *AID* 遺伝子のエキソン I 近傍である転写開始点の上流 250 bp 及び下流 500 bp、全体で 750 bp の領域中の CpG 部位の存在を検索した。この領域中には、プロモーター領域 (-250 bp~+1 bp) 中に 5、エキソン I 領域(1 bp~101 bp)中に 2、イントロン領域中に 11 (102 bp~500 bp)、全体で 18 の CpG 部位を含んでおり、これらの CpG 部位がメチル化による転写制御に関わる可能性があると考えられる。この領域には STAT、AML-1a、Pax5、NF- $\kappa$ B などの転写活性化因子の結合モチーフを含んでいることが報告されている (図 5)。今回の実験で解析を行った CpG 部位について *CG-1~18* として規定した。プロモーター領域及びエキソン I 前半部分を含む領域を *SP* とエキソン I 後半部分およびイントロン領域を含む *S1* 領域 (*SP*: *CG-1~5*, *S1*: *CG-6~18*) に分割した (図 5)。非メチル化シチジンの検出は、ゲノム DNA を亜硫酸処理することにより、非メチル化シチジンが特異的にウリジンに変換されることを利用して、シーケンスにて行った。

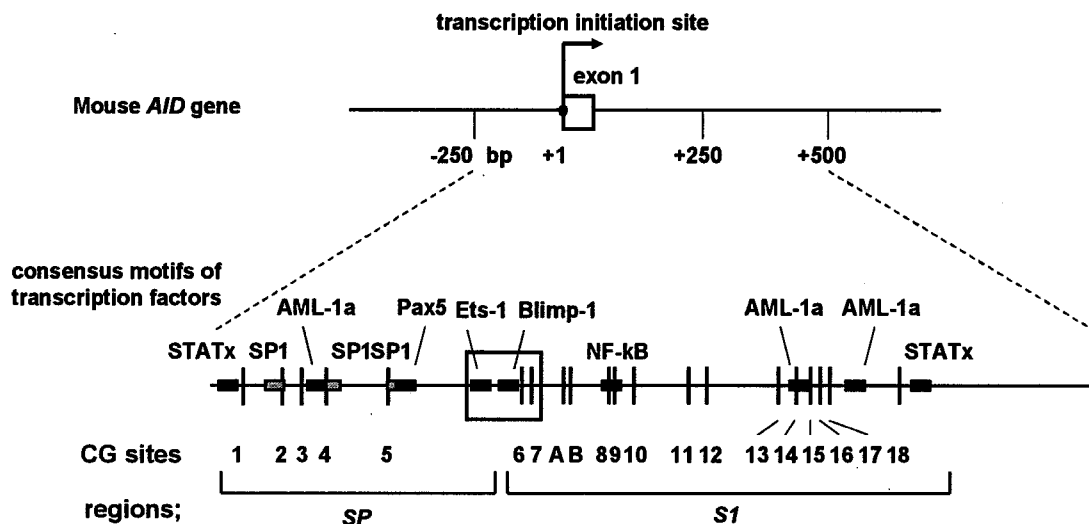


図 5. *AID* 遺伝子転写制御領域中の CpG 部位の検索

図中上部には Gonda らにより報告された *AID* 遺伝子転写制御領域を示した。本研究では図中下部に黒色縦線で示した *AID* 転写制御領域中に存在する CpG 部位のメチル化の解析を行った。図中下部には各転写因子結合領域を黒色、灰色で示した。四角で囲まれた部分にはエキソン I 部分を示した。細胞株中の変異により導入された CG 部位をそれぞれ CG-A、CG-B とし図中に示した。

今回の実験に用いた8種類の細胞株の *AID* 遺伝子領域について予めシーケンスを行いその配列を確認した。一部の細胞株で次に示す変異が認められた (表 1)。*AID* 遺伝子領域中の転写開始点の上流 180 bp の位置での G から T の変異 (G-180T)、下流 110 bp での T から G の変異 (T110G)、下流 116 bp での A から G の変異 (A116G) の3ヶ所であった。G-180T の変異により、*SP* 領域中の *CG-2* 部位が消失し、また、T110G と A116G の変異により、*S1* 領域中の *CG-7* と *CG-8* の間に新たな2ヶ所の CpG 部位が出現した。これらの CpG 部位についてはそれぞれ *CG-A*、*CG-B* と規定した。これらの変異は A20 及び BAL17 細胞において3ヶ所すべてが確認され、また、70Z/3 細胞ではこれらの変異は存在しなかった (表 1)。

表 1. 各種細胞株中の *AID* 転写制御領域の変異

Cell line	Cell type	G-180T	T110G	A116G
<b>70Z/3</b>	<b>Pre-B</b>	-	-	-
<b>BAL17</b>	<b>Immature B</b>	-	+/-	+/-
<b>WEHI-231</b>	<b>Mature B (IgM+)</b>	+	+	+
<b>A20</b>	<b>GC B (IgG+)</b>	+	+	+
<b>M12</b>	<b>GC B (IgG+)</b>	-	+	+
<b>X63</b>	<b>Plasmacytoma</b>	+	+	+
<b>J558L</b>	<b>Plasmacytoma</b>	+	+	+
<b>K62</b>	<b>T cell</b>	-	+/-	+/-

本実験で用いた細胞株中に見られた *AID* 遺伝子変異について示す。変異においては+で示したものはすべてで変異が見られたもの、-で示したものは変異が認められなかったもの、+/-で示したものは変異の存在が認められるものと認められないものが混在していることを示している。



7-2). 胚中心 B 細胞株中の *AID* 遺伝子領域では CpG のメチル化の頻度が低下している

各 B 細胞分化段階での *AID* の発現を、細胞株より RNA を抽出し RT-PCR 及び real-time PCR にて解析した (図 6)。本研究ではプレ B 細胞株として 70Z/3 細胞、未熟 B 細胞株として WEHI-231 細胞、IgM 陽性成熟 B 細胞株として BAL17 細胞、IgG 陽性胚中心成熟 B 細胞株として A20 細胞及び M12 細胞、形質細胞株として J558L 細胞及び X63 細胞を用いた。また T 細胞株である K62 細胞を用いた。胚中心細胞株である A20 及び M12 細胞では他の細胞株と比較して非常に高い *AID* の発現が見られた。70Z/3 細胞、J558L 細胞及び K62 細胞では *AID* の発現は検出限界以下であった (図.6)。

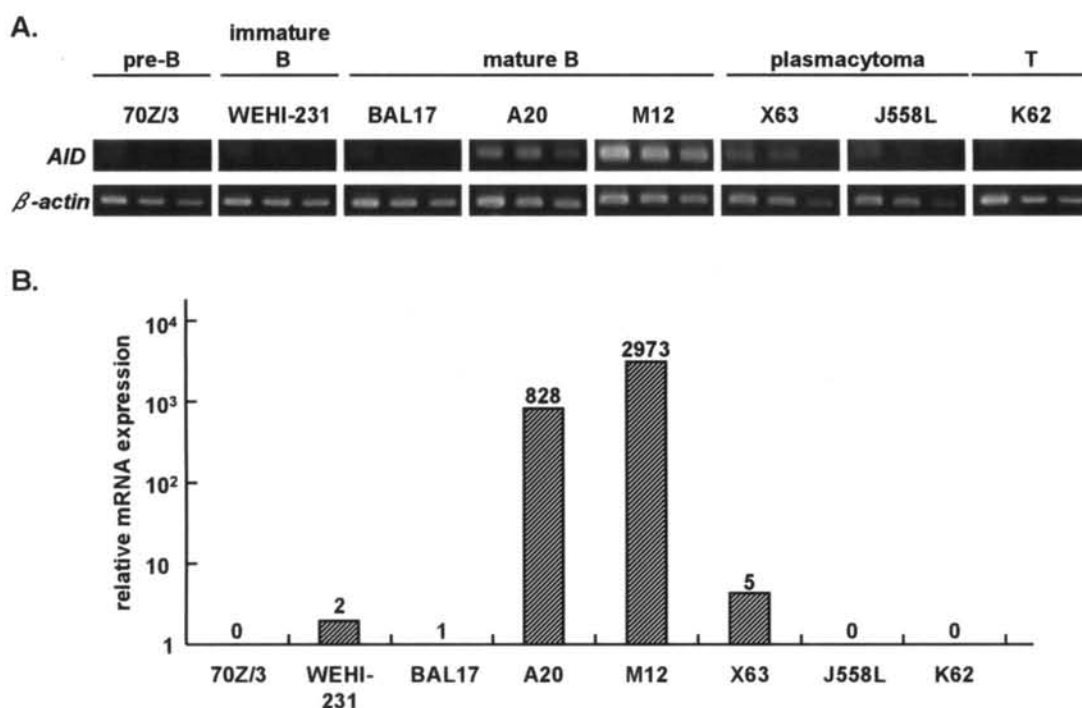


図 6. 各細胞株における *AID* の発現

(A) RT-PCR にて *AID* 遺伝子の発現を半定量的に検出した。コントロールには  $\beta$ -actin 遺伝子を用いた。A20 細胞、M12 細胞に *AID* 遺伝子の発現が高いレベルで確認された。(B) Real-time PCR にて *AID* の発現を検出した。コントロールには *GAPDH* 遺伝子を用いた。BAL17 細胞中での *AID* 遺伝子発現を基準とし、他の細胞での発現量を示した。胚中心 B 細胞株である A20 細胞及び M12 細胞で *AID* 遺伝子の高い発現が見られる。

次に *AID* 遺伝子領域のメチル化が、B 細胞分化段階により変化しているかどうかを検討するために、各 B 細胞分化段階に対応している B 細胞株からゲノム DNA を抽出し、亜硫酸処理を行い *AID* 遺伝子領域上の CpG 部位の非メチル化シチジンについて解析をおこなった (図 7A, 8A)。*AID* の高発現が見られた胚中心細胞株である A20 細胞及び M12 細胞の非メチル化 CpG の頻度は、*SP* 領域ではそれぞれ 95%、100%であり、*S1* 領域ではそれぞれ 96.7%、100%であった。一方 *AID* の発現が胚中心細胞株と比較して低い 70Z/3 細胞、WEHI-231 細胞、BAL17 細胞中での *SP*、*S1* 双方の領域中の非メチル化 CpG の頻度は、胚中心細胞株と比較して低く (*SP*, *S1*: 7.5%, 14.1% [70Z/3], 33.3%, 25.9% [WEHI-231], 25.0%, 15% [BAL17])、これらの細胞株では高頻度にメチル化していることが明らかとなった。また、同じく *AID* の発現が見られない T 細胞株である K62 細胞でも同様に *SP*、*S1* 領域の非メチル化頻度はそれぞれ 40%、24.4%であり高頻度にメチル化されていた (図 7A, 8A)。以上の結果からこれらの細胞株での *SP*、*S1* 領域での非メチル化状態は *AID* の発現レベルと相関していることが示された (図 7B, 8B)。一方、形質細胞株である X63 細胞及び J558L 細胞の DNA メチル化の解析では、*SP*、*S1* 領域それぞれ、81.3%、63.5% (X63)、64.3%、37.5% (J558L) の非メチル化頻度を示した。X63 細胞では *AID* の発現が見られない細胞株と比較して高い非メチル化頻度を示しており (図 7A, 図 8A)、また *AID* の発現も認められる (図 7B, 8B)。さらに X63 細胞では *CG-11* から *CG-18* の領域ではほとんどメチル化が見られず (図 8A)、また *SP* 領域では他の細胞株と比較して低いメチル化の頻度を示していた (図 7A)。一方 J558L 細胞では X63 細胞で見られたようなメチル化は見られず、*AID* の発現も real-time PCR では見られなかった。今回解析を行った *AID* の発現が認められない細胞株のすべてで、*CG-5* と *CG-7* は非常に高い頻度でメチル化されており (図 7A, 8A)、この部位でのメチル化が *AID* の発現制御に関係する可能性が示された。

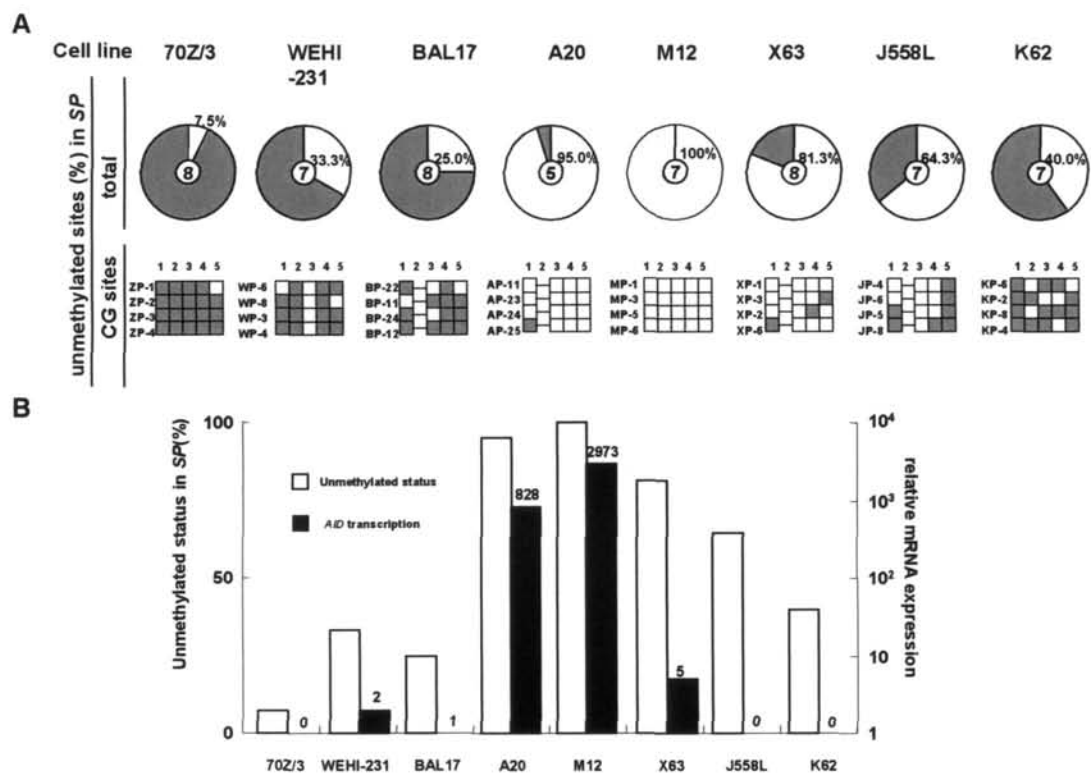


図 7. 各 B 細胞株における *SP* 領域の CpG メチル化

(A) 各種細胞株における *SP* 領域の CpG 部位のメチル化を亜硫酸処理法にて検出した。円グラフ及び下部の図の白で示した部分が非メチル化 CpG を示している。70Z/3 細胞、WEHI-231 細胞、BAL17 細胞では *SP* 領域中では非メチル化の頻度が低く、また A20 細胞、及び M12 細胞において非メチル化頻度が最も高かった。(B) *SP* 領域でのメチル化及び *AID* の発現を示した。*AID* の発現する細胞株では高い非メチル化頻度が見られ、*AID* の発現レベルと相関していることが示唆された。

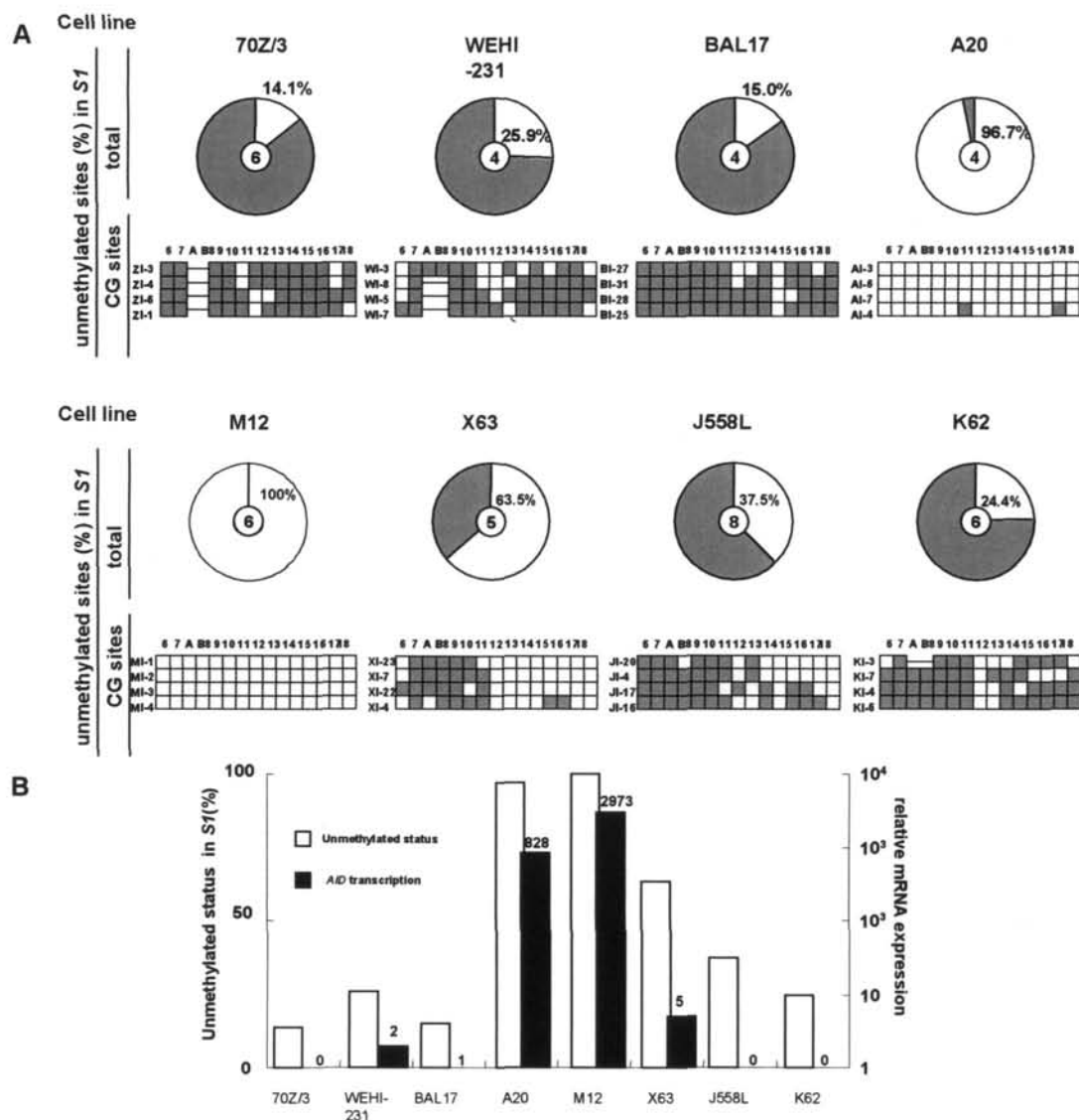


図 8. 各 B 細胞株における *S1* 領域の CpG メチル化

(A) 各種細胞株、*S1* の CpG 部位のメチル化を亜硫酸処理法にて検出した。円グラフおよび図下部の白で示した部分が非メチル化 CpG を示している。70Z/3 細胞、WEHI-231 細胞、BAL17 細胞では *S1* 領域中では非メチル化の頻度が低く、また A20、及び M12 細胞株において非メチル化頻度が最も高かった。(B) *S1* 領域でのメチル化及び *AID* の発現を示した。*SP* 領域と同様に *AID* の発現が高い細胞で高い非メチル化頻度が見られた。

### 7-3). LPS 及び IL-4 による共刺激は転写制御領域の脱メチル化を促進するとともに *AID* の発現を誘導する

*AID* 発現は LPS、IL-4 で共刺激したマウス脾臓 B 細胞で誘導される (Muramatsu *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2002)。マウスの B 細胞で *AID* の発現が誘導される際、DNA のメチル化に変化があるか否かを調べるために、C57BL/6 マウスより脾臓 B 細胞を分離し、*in vitro* で LPS 及び IL-4 にて共刺激を行い、*AID* 遺伝子領域の DNA のメチル化について経時的に解析を行った (図 9A)。コントロールとして未刺激の B 細胞を用いた。コントロールの脾臓 B 細胞では *SP*、*S1* 領域中の非メチル化 CpG の頻度はそれぞれ 35%、28%であり、70Z/3 細胞や WEHI-231 細胞と比較して、低いメチル化頻度を示した。刺激後 12 時間では *SP* 領域の非メチル化 CpG は 38%、*S1* 領域では 31%であり、刺激後 24 時間では *SP* 領域は 39%、*S1* 領域では 34%であった。Real-time PCR による *AID* の発現の定量的解析では、刺激後 24 時間までは *AID* の発現は誘導されていなかった (図 9B)。*AID* の発現誘導が見られた刺激後 48 時間では *SP* 領域では非メチル化 CpG は 40%であり、未刺激の B 細胞と比較して有意な差は認められなかった。しかし、CG 部位それぞれのメチル化を解析すると *CG-5* において非メチル化 CpG が増加していた。一方、*S1* 領域において非メチル化 CpG は 43%であり、未刺激の細胞と比較して有意に上昇していた ( $p<0.02$ )。結果から LPS 及び IL-4 刺激によって誘導される *CG-5* または *S1* 領域特異的な脱メチル化が、*AID* 転写と関連することが示唆された。

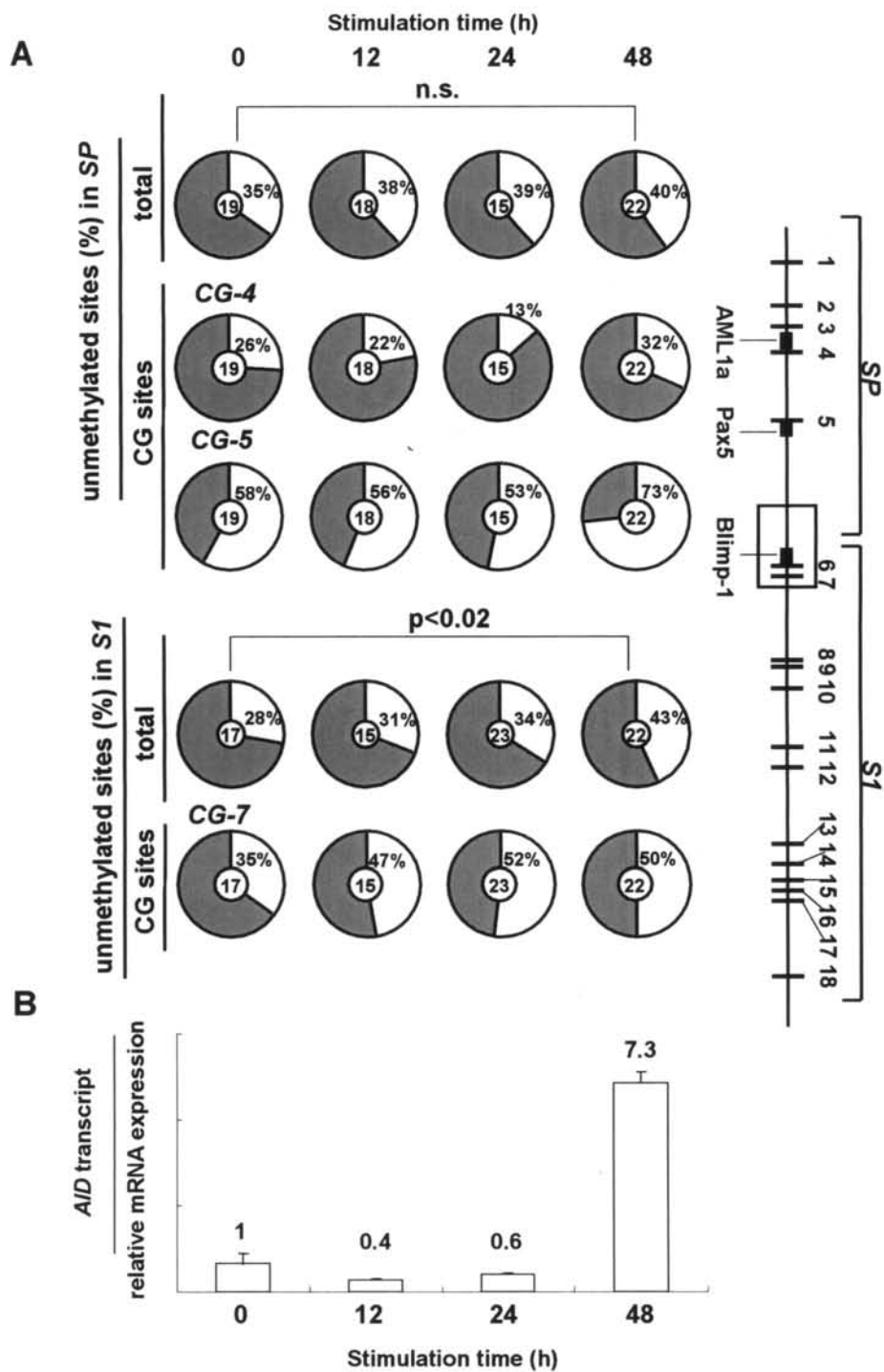


図9. 刺激による *AID* の発現誘導の脱メチル化における影響

(A) LPS、IL-4 で共刺激を行った B 細胞の *AID* 転写制御領域中のメチル化 CpG を解析した。*AID* の発現誘導が見られる刺激後 48 時間の B 細胞中で、*S1* 領域の脱メチル化が見られた。

(B) Real-time PCR C57BL/6 マウス脾臓から採取した B 細胞に LPS、IL-4 で共刺激を行った。未刺激の細胞を基準として発現量を示した。刺激後 48 時間で *AID* の発現が誘導された。

#### 7-4).AID 遺伝子の転写領域は胚中心 B 細胞分化段階で脱メチル化する

AID の発現は正常の個体では胚中心 B 細胞にのみ見られることが報告されている (Muramatsu *et al.*, 1999)。AID 遺伝子領域のメチル化が、T 細胞依存性免疫応答によって誘導される胚中心 B 細胞において変化するか否かについて解析を行った。C57BL/6 マウスに T 細胞依存性抗原である SRBC を腹腔内投与し、免疫応答を惹起した。免疫後 10 日目のマウスを解剖し脾臓 B 細胞から B220 陽性 GL7 陽性 Fas 陽性の成熟胚中心 B 細胞 (Smith *et al.*, 1995; Cervenak *et al.*, 2001)、B220 陽性 GL7 陽性 Fas 陰性の未熟胚中心 B 細胞及び B220 陽性 GL7 陰性 Fas 陰性の未感作 B 細胞の 3 つの分画を JSAN セルソーターにより分取した (図 10A)。それぞれの細胞よりゲノム DNA を抽出し、亜硫酸処理を行い、DNA のメチル化について解析を行った (図 11A)。また各細胞分画での AID の転写を Real-time PCR にて解析を行った (図 11B)。ナイーブ B 細胞の AID 遺伝子領域の非メチル化 CpG は SP 領域中で 38%、SI 領域中で 35%であり、*in vitro* の実験に用いた未刺激 B 細胞と同様に、比較的メチル化の頻度が低いことが明らかとなった。未熟胚中心 B 細胞では CpG の非メチル化頻度は SP 領域では 41%、SI 領域では 41%であり、ナイーブ B 細胞のメチル化の頻度と比較して有意な差は認められなかった。一方、成熟胚中心 B 細胞では CpG の非メチル化頻度は SP 領域では 76%、SI 領域では 64%であり、未感作 B 細胞と比較して有意に上昇しており ( $p<0.01$ )、成熟胚中心 B 細胞では AID 遺伝子領域の CpG 部位の脱メチル化が進行していることが示唆された。CG 部位のメチル化を個別に解析すると、CG-5 が成熟胚中心 B 細胞において完全に脱メチル化されていることが明らかとなった。

#### 7-5). CG-7の高頻度のメチル化が形質細胞段階で見られる

次に B 細胞分化の最終段階である形質細胞での AID 遺伝子の DNA メチル化について解析するために、SRBC 免疫 14 日後のマウス脾臓 B 細胞から、B220 陰性 Syndecan-1 陽性の形質細胞分画を分取した (図 10B)。胚中心 B 細胞と同様にゲノム DNA を抽出し、亜硫酸処理を行い、DNA のメチル化を検出した (図 11A)。また AID 遺伝子の発現についても解析を行った (図 11B)。形質細胞での非メチル化 CpG の頻度は SP 領域で 54%、SI 領域で 48%であり、それぞれの非メチル化頻度は、胚中心 B 細胞より低く、ナイーブ B 細胞よりも高い頻度を示していたが、AID の発現はほとんど見られなかった (図 11A,B)。CG 部位個別のメチル化の解析では、X63 細胞及び J558L 細胞と同様に CG-7が完全にメチル化されていた。この結果から、AID 遺伝子転写制御領域中の脱メチル化は B 細胞分化段階に相関して起こるが、形質細胞への最終分化の際には逆にメチル化を受けていることが明らかとなった。

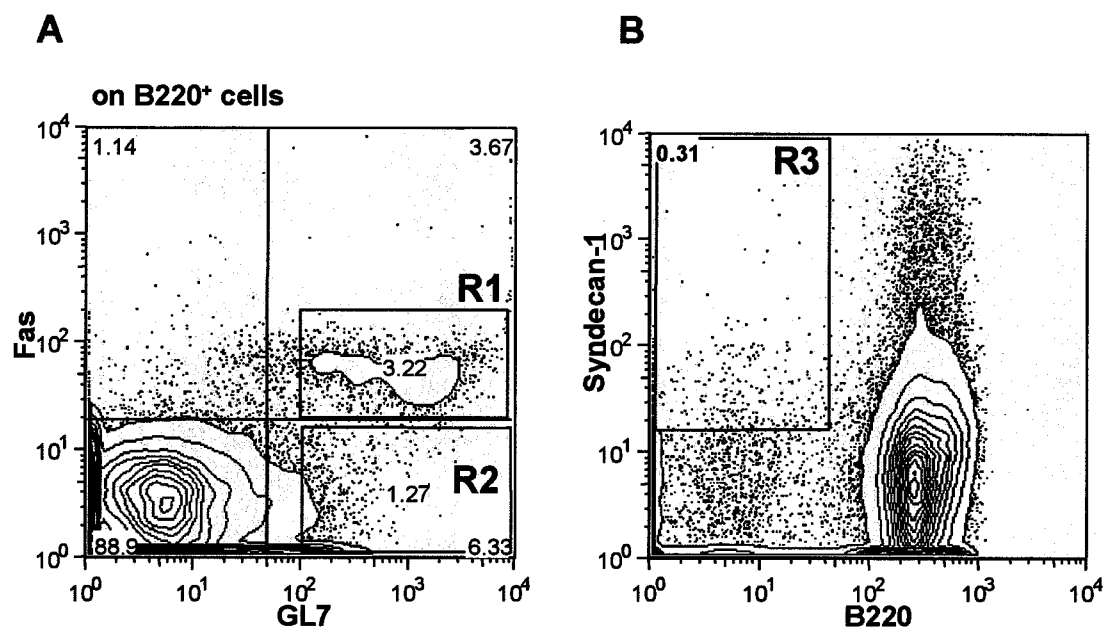


図 10. 胚中心 B 細胞及び形質細胞の分離

(A) SRBC で免疫を行った C57BL/6 マウス脾臓 B 細胞より、B220 陽性 Fas 陽性細胞 (R1)、B220 陽性 Fas 陰性細胞 (R2)をそれぞれ分取した。(B) SRBC で免疫を行った C57BL/6 脾臓 B 細胞より、B220 陰性 Syndecan-1 陽性細胞 (R3)を分取した。



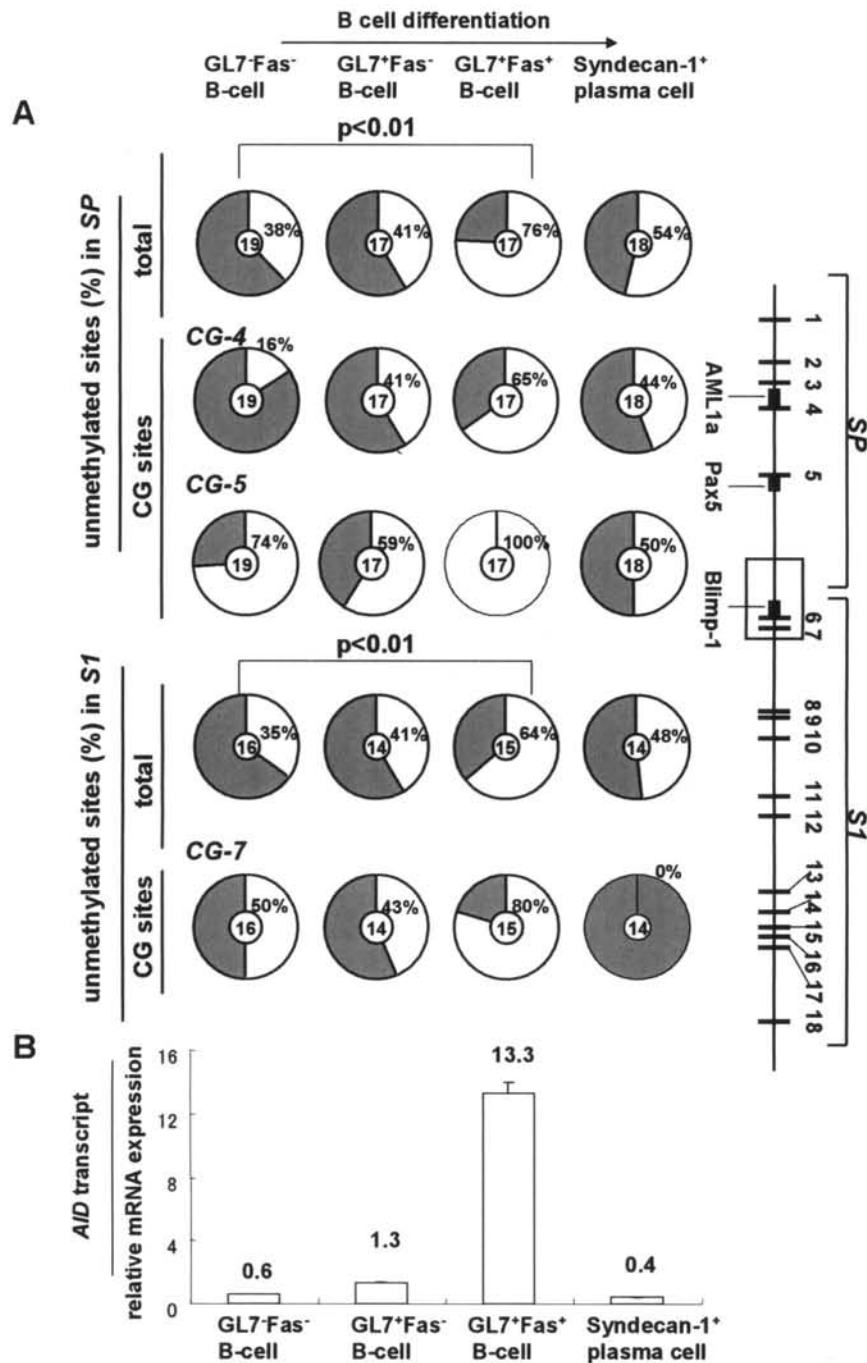


図 11. 免疫応答による脱メチル化の誘導

A) 未感作 B 細胞、胚中心 B 細胞、形質細胞の *AID* の転写制御領域の CpG のメチル化の解析を行った。胚中心 B 細胞分画において *AID* 転写制御領域の脱メチル化の誘導が見られた。分化の最終段階である形質細胞においては、脱メチル化は軽度であり、分化の進行でメチル化を受けていることが示唆された。

(B) Real-time PCR にて SRBC 免疫を行った C57BL/6 マウス脾臓から、未感作 B 細胞、胚中心 B 細胞、形質細胞を分取しそれぞれの *AID* の発現を検出した。解析には未刺激の細胞 (図 9) を基準として用いた。

## 8. 考察

成熟 B 細胞は胚中心で SHM、CSR によって親和性成熟を受け、抗体を産生する形質細胞や記憶 B 細胞へと最終分化する。AID は SHM、CSR に必須な分子であり、胚中心 B 細胞で特異的に発現が見られる。本研究では DNA のメチル化修飾による転写制御機構が、AID の発現制御に関与するか否かについての知見を得るために、また、B 細胞分化段階特異的に起こるか否かを調査する目的で、各分化段階の B 細胞の AID 遺伝子上の DNA メチル化の解析を行った。

本研究では胚中心 B 細胞において AID 転写制御領域中に B 細胞分化段階特異的なメチル化、及び脱メチル化が起こることが明らかとなった。このことは、B 細胞分化段階特異的に発現が誘導されるメチル化酵素、または脱メチル化酵素が存在している可能性を示唆している。現在哺乳類にて活性が確認されているメチル化酵素はすべての細胞に恒常的に発現する維持型メチル化酵素 (maintenance DNA methyltransferase) DNMT1 及び、胚発生の初期段階で発現する新規型メチル化酵素 (*de novo* methyltransferase) DNMT3a、DNMT3b の3つである。近年の報告で、DNMT3a 及び、DNMT3b が B 細胞分化に必須の転写因子である PU.1 の転写活性を抑えることが報告されている (Suzuki *et al.*, 2006)。また DNMT3a が脾臓の濾胞 B 細胞にて強く発現することが報告されている (Wang *et al.*, 2006)。現在のところ、胚中心 B 細胞でのこれらのメチル化酵素の発現については不明であるが、これらのメチル化酵素群が胚中心 B 細胞を含む B 細胞分化段階特異的に働き、AID のみならず、Pax5 などの B 細胞分化に必須な因子の転写を制御している可能性が考えられる。一方で、脱メチル化の機構については MBD2 やグリコシラーゼの関与が報告されているが (Di Giaimo *et al.*, 2005)、B 細胞分化における関与については不明である。

B 細胞において DNA のメチル化、脱メチル化が分化に関与することは他のグループでも報告されている。Feeney らにより、VDJ 再構成が起こる際に、V 遺伝子中の RSS (recombination signal sequence) 領域近傍の CpG 部位に脱メチル化が誘導され、再構成を促進することが示された (Espinoza and Feeney, 2007)。本研究では B 細胞骨髄内分化段階特異的な DNA メチルに関しての詳細な知見は得られなかったが、B 細胞分化全体に渡って、DNA のメチル化による転写制御機構が働いていることが強く示唆される。B 細胞分化段階に伴う DNA のメチル化は VDJ 再構成、AID、Pax5 などを制御していることが示された。

活性化 B 細胞を用いた実験から AID 遺伝子転写制御領域中の脱メチル化が部位特異的に起こっていることが示唆された。この結果は今回の実験に用いた LPS 及び IL-4 の共刺激が *CG-5* または *S1* 領域の脱メチル化を起こす機構を選択的に誘導することを示している。B 細胞では LPS 及び IL-4 の共刺激の他に、TGF- $\beta$  の刺激が AID の発現を誘導することが報告されている (Muramatsu *et al.*, 1999)。また、胚中心

では B 細胞はヘルパー T 細胞からの CD40 を介した刺激や FDC からの刺激を受けており、これらの刺激が *CG-5* 以外の *SP* 領域の脱メチル化、または *S1* 領域のさらなる脱メチル化を誘導する可能性が考えられる。

胚中心 B 細胞では、*AID* 遺伝子転写制御領域中の *CG-5*、*CG-7* に顕著な DNA の脱メチル化が起こっていた。LPS 及び IL-4 共刺激活性化 B 細胞においても、*CG-5* の脱メチル化が、胚中心 B 細胞と比べて低い頻度ではあるが、誘導されていた。これらのことから、*CG-5* の脱メチル化は *AID* の転写活性化に重要な働きを示す部位であると考えられる。*CG-5* は Pax5 結合モチーフ中に含まれており、胚中心 B 細胞でこの部分が脱メチル化を受けることによって、*AID* 遺伝子転写制御領域と転写因子 Pax5 との近接を促進すると考えられる。一方で *CG-7* は胚中心 B 細胞から形質細胞へと分化が進行する段階で、*CG-5* と比較してより顕著なメチル化を受けていた。また *AID* を発現しないすべての細胞株においてもメチル化されていた。これらのことから *CG-7* は B 細胞の転写活性化よりも、*AID* 遺伝子の転写抑制に重要な働きを示していると考えられる。*AID* 遺伝子転写領域中のプロモーター側では脱メチル化機構が、イントロン側ではメチル化機構が、胚中心 B 細胞分化段階特異的に、または部位特異的に機能している可能性が示唆された。

本研究では DNA 脱メチル化機構を介した *AID* の転写制御についての解析を行ったが、一方で *AID* 遺伝子のヒストンアセチル化による転写制御機構の存在も報告されている。Crouch らの報告では、*AID* の発現誘導において、ヒストンタンパク H3 の高アセチル化がプロモーター領域において起こり、*AID* の転写を促進していることが示されている (Crouch *et al.*, 2007)。今回の結果とあわせて、*AID* の転写制御は *AID* 転写調節領域のクロマチン構造の変化をもたらす複合的な機構で起こっているものと考えられる。

B 細胞の最終分化にある形質細胞では *CG-7* はメチル化されていたものの、*SP*、*S1* 領域全体では、胚中心 B 細胞や未感作 B 細胞と比較して、低い頻度ではあるが脱メチル化傾向を示していた。形質細胞では *AID* の転写は、Blimp-1 や Bcl6 などの転写抑制因子の作用で低いレベルに抑えられており、このことで SHM や CSR などの機構から、産生抗体の親和性またはエフェクター機能を保護していると考えられている。しかし、形質細胞において IL-6 及び TGF- $\beta$  の刺激が *AID* の発現を低いながらも誘導することが報告されている。また、ヒトでの研究で、前駆形質細胞または形質細胞で Ig V 領域での SHM が起こり、その結果新たな IgV 領域のレパートリーが生成され、自己免疫疾患を引き起こす異常な抗体を産生する可能性があることが報告されている (Yavuz *et al.*, 2001; Haubold *et al.*, 2004; Ghosh *et al.*, 2005) が、その原因となる機構についてはいまだ明らかにはされていない。本研究で認められた形質細胞での *AID* 遺伝子転写制御領域の DNA 脱メチル化は、これらの研究で認められた形質細胞での SHM の発生と密接に関与している可能性が考えられる。*AID*

転写制御領域における DNA のメチル化の研究は自己免疫疾患における、抗体産生のメカニズムの解明の一助となると考えられる。

## 9. 結語

B 細胞において AID の適正な発現制御が B 細胞分化、成熟において重要である。これまで様々な機構で B 細胞内での AID の転写が制御されていることが明らかになっていたが、本研究では新たに DNA のメチル化による AID 転写制御機構が存在することを示した。AID 遺伝子領域中の脱メチル化及びメチル化が B 細胞分化段階特異的に起こり、AID の転写を制御していることを *in vitro* の B 細胞株、正常 B 細胞の *in vitro* における刺激、及び T 細胞依存性抗原刺激による *in vivo* での変化ごとに明らかにした。本研究で得られた結果は B 細胞における新たな AID 転写制御機構を提唱したのみならず、B 細胞分化における DNA メチル化機構の解明に大きな一助となることが期待される。

## 10. 参考文献

Amaravadi L., and Klemsz MJ., 1999. DNA methylation and chromatin structure regulate PU.1 expression. *DNA Cell Biol.* 18, 875-884.

Ambrose, HE., and Wagner SD., 2004. Alpha6-integrin is expressed on germinal center B cells and modifies growth of a B-cell line. *Immunology* 111, 400-406.

Bird AP., and Wolffe AP., 1999. Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin. *Cell* 99, 451-454.

Blink EJ., Light A., Kallies A., Nutt SL., Hodgkin PD., and Tarlinton DM., 2005. Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *J. Exp. Med.* 201, 545-554.

Cernenak L., Magyer A., Boja R., and Laszlo G., 2001. Differential expression of GL7 activation antigen on bone marrow B cell subpopulations and peripheral B cells. *Immunol.Lett.* 78, 89-96.

Chaudhuri J., Basu U., Zarrin A., Yan C., Franco., Perlot T., Vuong B., Wang J., Phan RT., Datta A., Manis J., and Alt FW., 2007. Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv Immunol.* 94, 157-214.

Christoph T., Rickert R., and Rajewsky, K., 1994. M17: a novel gene expressed in germinal centers. *Int. Immunol.* 6, 1203-1211.

Costello JF., and Plass C., 2001. Methylation matters: a new spin on maspin. *J. Med. Genet.* 38, 285-303.

Cozine CL., Wolniak KL., and Waldschmidt TJ., 2005. The primary germinal center response in mice. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 298-302.

Crouch EE., Li Z., Takizawa M., Fichtner-Feigl S., Gourzi P., Montano C., Feigenbaum L., Wilson P., Janz S., Papavasiliou FN., and Casellas R., 2007. Regulation of AID expression in the immune response. *J. Exp. Med.* 204,

1145-1156.

Danbara M., Kameyama K., Higashihara M., and Takagaki Y., 2001. DNA methylation dominates transcriptional silencing of Pax5 in terminally differentiated B cell lines. *Mol. Immunol.* 38, 1161-1166.

Dedeoglu F., Horwitz B., Chaudhuri J., Alt FW., and Geha RS., 2004. Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *Int. Immunol.* 16, 395-404.

Di Giaimo R., Russo GM., Bevilacqua MA., Iovine B., Del Gaudio R., Geraci G., and Russo T., 2005 The expression of de novo DNA methylase DNMT3b, of the methyl-CpG binding protein MBD2b and of 5-MCDG glycosylase shows two waves of induction during CaCO-2 cell differentiation. *Gene* 351, 73-81.

Di Noia J.M., and Neuberger M.S., 2007. Molecular mechanism of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 1-22.

Espinoza CR., and Feeney AJ., 2007. Chromatin accessibility and epigenetic modifications differ between frequently and infrequently rearranging VH genes *Mol. Immunol.* 44, 2675-2685.

Garside P., Igulli E., Merica R., Johnson JG., Noelle RJ, and Jenkins, M.K., 1998. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node, *Science* 281, 96-99.

Ghosh S., Steere AC., Stollar BD., and Huber BT., 2005. In situ diversification of the antibody repertoire in chronic Lyme arthritis synovium. *J. Immunol.* 174, 2860-2869.

Gonda H., Sugai M., Nambu Y., Katakai T., Agata Y., Mori KJ., Yokota Y., and Shimizu A., 2003. The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J. Exp. Med.* 198, 1427-1437.

Greger V., Passarge E., Hopping W., Messmer E., and Horsthemke B., 1989. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression

of retinoblastoma. *Hum. Genet.* 83, 155-158.

Haubold K., Owens GP., Kaur P., Ritchie AM., Gilden DH., and Bennett JL., 2004. B-lymphocyte and plasma cell clonal expansion in monosymptomatic optic neuritis cerebrospinal fluid. *Ann. Neurol.* 56, 97-107.

Herman JG., Latif F., Weng Y., Lerman MI., Zbar B., Liu S., Samid D., Duan DS., Gnarr JR., Linehan WM., and *et al.*, 1994. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 9700-9704.

Honjo T., Muramatsu M., and Fagarasan S., 2004. AID: how does it aid antibody diversity? *Immunity* 20, 659-668.

Honjo T., Nagaoka H., Shinkura R., and Muramatsu M., 2005. AID to overcome the limitations of genomic information. *Nat. Immunol.* 6, 655-661.

Ito S., Nagaoka H., Shinkura R., Begum N., Muramatsu M., Nakata M., and Honjo T., 2004. Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 1975-1980.

Jacob J., Kassir R., and Kelsoe G., 1991. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J. Exp. Med.* 173, 1165-1175

Knodel M., Kuss A.W., Berberich I., and Schimpl A., 2001. Blimp-1 over-expression abrogates IL-4- and CD40-mediated suppression of terminal B cell differentiation but arrests isotype switching. *Eur. J. Immunol.* 31, 1972-1980.

Kuo TC., and Calame KL., 2004. B lymphocyte-induced maturation protein (Blimp)-1, IFN regulatory factor (IRF)-1, and IRF-2 can bind to the same regulatory sites. *J. Immunol.* 173, 5556-5563.

Liu YJ., Zhang J., Lane PJ., Chan EY., and MacLennan IC., 1991. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T



cell-independent antigens. *Eur. J. Immunol.* 21, 2951–2962.

Luo Z., Ronai D., and Scharff MD., 2004. The role of activation-induced cytidine deaminase in antibody diversification, immunodeficiency, and B-cell malignancies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 726–35.

Ma L., Wortis HH., and Kenter AL., 2002. Two new isotype-specific switching activities detected for Ig class switching. *J. Immunol.* 168, 2835–2846.

MacLennan IC., 1994. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 117–139.

MacLennan IC., Gulbranson-Judge A., Toellner KM., Casamayor-Palleja M., Chan E., Sze DM., Luther SA., and Orbea HA., 1997. The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop. *Immunol. Rev.* 156, 53–66.

Maier H., Ostraat R., Gao H., Fields S., Shinton SA., Medina KL., Ikawa T., Murre C., Singh H., Hardy RR., and Hagman J., 2004. Early B cell factor cooperates with Runx1 and mediates epigenetic changes associated with mb-1 transcription. *Nat. Immunol.* 5, 1069–1077.

Melchers F., ten Boekel E., Seidl T., Kong XC., Yamagami T., Onishi K., Shimizu T., Rolink AG., and Andersson J., 2000 Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunol. Rev.* 175, 33–46.

Merlo A., Herman JG., Mao L., Lee DJ., Gabrielson E., Burger PC., Baylin SB., and Sidransky D., 1995. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat. Med.* 1, 686–692.

Muramatsu M., Sankaranand VS., Anant S., Sugai M., Kinoshita K., Davidson NO., and Honjo T., 1999. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18470–18476.

Muramatsu M., Kinoshita K., Fagarasan S., Yamada S., Shinkai M., Kinoshita K.

Davidson NO., and Honjo T., 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase. *Cell* 102, 553-563.

Nakao M 2001. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 278, 25-31.

Rajewsky K., 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-758.

Revy P., Muto T., Levy Y., Geissmann F., Plebani A., Sanal O., Catalan N., Forveille M., Dufourcq-Labeuze R., Gennery A., Tezcan I., Ersoy F., Kayserili H., Ugazio AG., Brousse N., Muramatsu M., Notarangelo LD., Kinoshita K., Honjo T., Fischer A., and Durandy A., 2000. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102, 565-575.

Richards EJ., and Elgin SC., 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108, 489-500.

Rolink AG., ten Boekel E., Yamagami T., Ceredig R., Andersson J., and Melchers F., 1999. B cell development in the mouse from early progenitors to mature B cells. *Immunol. Lett.* 68, 89-93.

Ruccia F., Cattaneo L., Marrellaa V., Saccoa MG., Sobacchia C., Lucchinib F., Nicolac S., Bellac SD., Luisa M., Imbertid VL., Gentile F., Montagnaf C., Tiverong C., Tatangelog L., Facchettie F., Vezzonia P., and Villaa A., 2006. Tissue-specific sensitivity to AID expression in transgenic mouse models. *Gene* 377, 150-158.

Sayegh CE., Quong MW., Agata Y., and Murre C., 2003. E-proteins directly regulate expression of activation-induced deaminase in mature B cell. *Nat. Immunol.* 4, 586-593.

Schwab J. and Illges H., 2001. Regulation of CD21 expression by DNA methylation and histone deacetylation. *Int. Immunol.* 13, 705-710.

Suzuki M., Yamada T., Kihara-Negishi F., Sakurai T., Hara E., Tenen DG., Hozumi N., and Oikawa T., 2006. Site-specific DNA methylation by a complex of PU.1 and Dnmt3a/b. *Oncogene* 25, 2477-88.

Smith KG., Nossal GJ., and Tarlinton DM., 1995. FAS is highly expressed in the germinal center but is not required for regulation of the B-cell response to antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 11628-11632.

Stirzaker C., Millar DS., Paul CL., Warnecke PM., Harrison J., Vincent PC., Frommer M., and Clark SJ., 1997. Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors. *Cancer Res.* 57, 2229-2237.

Tarlinton EJ., and Smith KG., 2000. Dissecting affinity maturation: A model explaining selection of antibody-forming cells and memory B cells in the germinal centre. *Immunol. Today* 21, 436-441.

Tonegawa S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.

Unniraman S., and Schatz DG., 2006. AID and *Igh* switch region *Myc* chromosomal translocations. *DNA repair* 5, 1259-1264.

Wade PA., 2001. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays.* 23, 1131-1137.

Wang Y., Zhang P., Li W., Hou L., Wang J., Liang Y., and Han H., 2006. Mouse follicular and marginal zone B cell show differential expression of Dnmt3a and sensitivity to 5'-azacytidine. *Immunol. Lett.* 105, 174-179.

Yavuz S., Grammer AC., Yavuz AS., Nanki T., and Lipsky P.E., 2001. Comparative characteristics of mu chain and alpha chain transcripts expressed by individual tonsil plasma cells. *Mol. Immunol.* 38, 19-34.

Yoshiura K., Kanai Y., Ochiai A., Shimoyama Y., Sugimura T., and Hirohashi S., 1995. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 7416-7419.

Zhang M., Srivastava G., and Lu L., 2004. The pre-B cell receptor and its function during B cell development. *Cell. Mol. Immunol.* 1. 89-94.