

論文内容の要旨

論文題目 抗原受容体遺伝子の組換え部位多様化に於ける RAG タンパクの役割
(Junctional Diversification by the RAG Proteins in V(D)J Joining)

氏名 西原 忠

多様な抗原受容体遺伝子は、DNA レベルの再編成により V, (D), J コーディング遺伝子断片が繋ぎ合わされて創られる(図 1)。この V(D)J 組換えはまず、二つの recombination signal sequence (12-RSS と 23-RSS)が RAG1/RAG2 タンパク (recombination activating genes の産物) により持ち寄られたのち、コーディング遺伝子断片との境界で切断され、平滑末端の signal-ends (SEs)と、ヘアピン構造を持ったコーディング末端を生じることにより始まる。この後 RAG タンパクは、切り出された SE DNA との安定な複合体、SE complex を形成する。SE complex は、二つのコーディング末端同士を連結する過程に於いて、architectural な役割を果たすとされている。この V(D)J 組換え後半の過程には、catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs)を含む DNA 修復系酵素群も必要とされる。コーディング末端のヘアピン構造はまず、Artemis/DNA-PKcs 複合体により asymmetric に関環され、3'突出構造を生じる。この後コーディング末端は、組換え部位の多様化の為に、ヌクレオチドの欠失及び付加による修飾を受ける。ランダムなヌクレオチドの付加が terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) によることは知られている。しかし、V-(D)-J 連結部にヌク

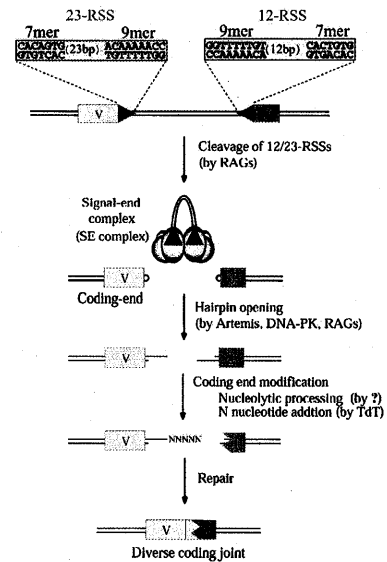


図 1. V(D)J 組換えの素過程。三角は RSS を、四角はコーディング遺伝子断片を、楕円は RAG タンパクをそれぞれ表す。

レオチド欠失を生じるメカニズムについてはほとんど分かっていない(図1)。

V(D)J 組換えの後半の過程に於ける SE complex の役割を探るために、12-SE 及び 23-SE オリゴ DNA と、HMG1、RAG1/RAG2 タンパクより SE complex を再構成し、5'末端を標識した二本鎖 DNA を加え、反応させた。その結果、SE complex は、 Mg^{2+} 存在下で 3' 突出構造の DNA 末端を削ることを見出した(図 2A)。主な切断は、二本鎖/一本鎖境界 (ds/ss junction)、もしくはその近くの一本鎖 DNA 領域で起きた。この反応は 12-SE、もしくは 23-SE を除くと効率が大きく落ち、また、SE 非存在下では反応は起きなかった(図 2B)。

二本鎖 DNA より切り取られた一本鎖 DNA がどうなるのかを調べるために、その 3'末端のヌクレオチドを標識し、反応させた(図 3A)。すると、泳動度の小さい分子種 ST、および泳動度の大きい分子種 X と Y の、3通りの反応産物が検出された。分子種 ST は最初に現れ、反応初期にピークを向かえ、その後ゆっくり減少したが、一方、分子種 X と Y は、ST に遅れて現れ、蓄積し続けた。それぞれ 3本のバンドからなる分子種 Y、及び X はそれぞれ、直鎖状、及び環状一本鎖 DNA の切断産物だった。また、それぞれ 3本のバンドからなる 12-ST、及び 23-ST は、strand-transfer 反応により切り取られた一本鎖 DNA が 12-SE、及び 23-SE の 3'末端に転移されて生じたものだった。

反応経路について詳しく調べるために SE complex を磁気ビーズ上に固定し、3'末端標識された基質二本鎖 DNA と反応さ

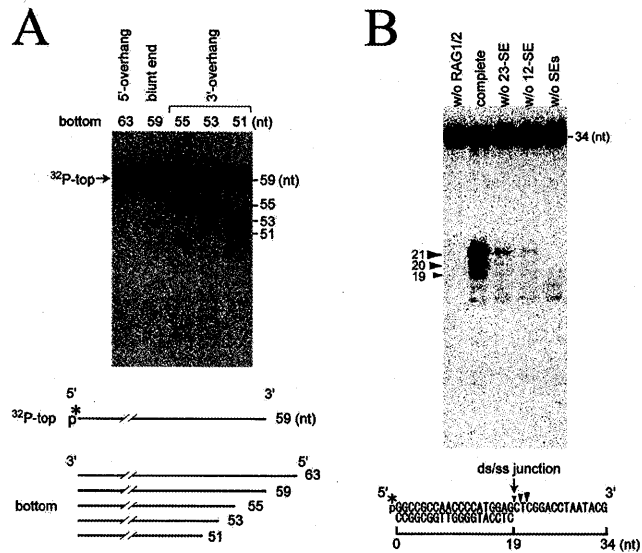


図 2. SE complex の 3'プロセッシング活性。(A) 様々な 3'末端構造の二本鎖 DNA を用意し、その top strand (59 nt) の 5'末端を放射性標識した。SE complex を、12-SE と 23-SE オリゴ DNA、HMG1、RAG1/RAG2 タンパクより再構成し、標識した基質 DNA と Mg^{2+} 存在下で反応させた。(B) 12-SE と、23-SE DNA、HMG1、RAG1/RAG2 タンパクを Mg^{2+} 存在下で混合し保温した後に、15 nt の長さの 3'突出を持つ、5'末端標識した基質 DNA を加え反応させた。

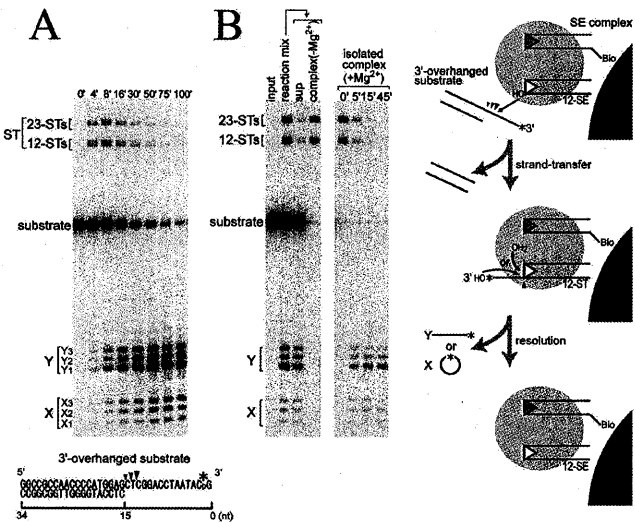


図 3. 二段階機構による 3'プロセッシング反応。(A) 基質 DNA の、15 nt の 3'突出部の末端ヌクレオチドを標識し、 Mg^{2+} 存在下で SE complex と 0-100 分反応させた。すると、泳動度の小さい分子種 ST、および泳動度の大きい分子種 X と Y の、3通りの反応産物が検出された。(B) SE complex を磁気ビーズ上に固定し、3'末端標識された基質二本鎖 DNA と反応させた後、反応液を除き、さらに Mg^{2+} を含まない溶液で洗った。この精製された SE complex を再び 10 mM Mg^{2+} 存在下で 0-45 分保温した。二本鎖 DNA より切り取られた一本鎖 DNA は、SE complex 中の 12-SE もしくは 23-SE に転移され、strand-transfer 中間体 (12- もしくは 23-ST) を生じた。次にこの一本鎖 DNA 領域は SE から切り取られ、直鎖状(Y)あるいは環状(X)の切断産物を生じた。この反応経路を右に図示した。

せた後、反応液を除き、さらに Mg^{2+} を含まない溶液で洗った(図 3B)。基質 DNA 及び分子種 X と Y はビーズから洗い流されたが、12-ST、及び 23-ST は SE complex 中に留まった。この精製された SE complex を再び Mg^{2+} を含む溶液中で反応させると 12-ST 及び 23-ST は消え、分子種 X と Y を生じた。以上の結果は、切断産物 X と Y は、strand-transfer 中間体である 12-ST と 23-ST を経由して、その resolution 反応により生じることを示している。

この resolution の過程をより直接的に示すために、12-SE の代わりに 12-ST を用いて SE complex を再構成した。12-ST DNA の bottom strand を 5'末端標識し、パートナーの 23-SE とともに、RAG1、RAG2、HMG1 タンパクと、 Mg^{2+} を含む溶液中で反応させた。すると 58 nt の 12-ST のバンド(bottom strand)は、48 nt の 12-SE へと変換された(図 4A)。12-ST DNA の 3'突出部の末端ヌクレオチドを標識し、同じように反応させると今度は二つの切断産物(X と Y)が生じた(図 4B)。バンド Y は、12-ST の ds/ss junction にニックが導入された場合に予想される直鎖状の切断産物(10 nt)と同じ泳動度を示した。もう一つの産物、バンド X、は、エキソヌクレアーゼ処理に耐性であることや、エンドヌクレアーゼで部分消化すると 10 nt の直鎖状 DNA 断片に変換されることなどから、Y と同じ長さ(10 nt)の環状の切断産物であることが明らかになった。同様の切断産物は、23-ST を標識した場合にも生じた。12-ST 切断反応は、12/23 ルールを満たさないパートナー、12-SE、を代わりに用いた場合には効率が大きく落ちる(図 4)。以上の結果は、SE の 3'末端に付加された一本鎖 DNA は、SE complex の中で正確に切り離されることを示している。

この 3'プロセッシング反応は、strand-transfer 及び resolution の 2 段階機構により起こることが明らかになった: まず SE の 3'-OH 基が、3'突出二本鎖 DNA の ds/ss junction 周辺を不正確に求核攻撃する。その結果、二本鎖 DNA の 3'末端から削り取られた一本鎖 DNA 領域が SE に付加されることになる。この転移された一本鎖 DNA 領域は次に、加水分解もしくは分子内エステル交換反応により正確に ds/ss junction で切断され、直鎖状もしくは環状の切断産物を生じる(図 3B)。この結果、SE は平滑末端構造に戻り、また、二本鎖 DNA の 3'端は様々な長さに削られる(図 2)。私は、*in vivo* に於いて SE complex のこの 3'プロセッシング活性が、ヘアピンの開環を受け 3'突出構造となったコーディング末端を不正確にプロセスすることにより、V-(D)-J 連結部の構造の多様化しているのではないかと予想している。

このような 2 段階機構による DNA 末端のプロセッシング反応は他に例を見ない。1 段

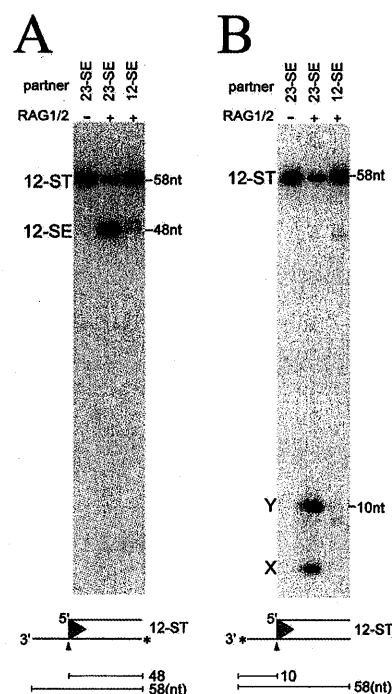


図 4. ST DNA の一本鎖 DNA 部分は正確に切り落とされる。(A) 12-ST DNA の bottom strand (58 nt) を 5'末端標識し、パートナーの 23-SE とともに、RAG1、RAG2、HMG1 タンパクと、 Mg^{2+} を含む溶液中で反応させた。すると、48 nt の 12-SE のバンドを生じた。(B) 12-ST DNA の 3'突出部の末端ヌクレオチドを標識し、同じように反応させると今度は二つの切断産物(X と Y)が生じた。

階目の strand-transfer は、ds/ss junction へのトランスポジションと見なせる点は、大変に興味深い。V(D)J 組換えは、トランスポジションのシステムから進化したと考えられている。RSS の切断は、トランスポゾン DNA の切り出し反応によく似る。さらに RAG タンパクは、切り出した SE DNA を他の二本鎖 DNA にトランスポーズさせることが *in vitro* で観察されている。このような strand-transfer がもし *in vivo* で起きると、ゲノム DNA への挿入変異や染色体転座の引金になるために大変に有害であり、また実際、*in vivo* ではほとんど起きないとされている。何故 RAG タンパクがこうした活性を保持しているのかは分かっていない。もし SE complex がその 3'プロセッシング活性によりコーディング末端を削るのであれば、RAG タンパクの strand-transfer 活性は、V-(D)-J 連結部の構造を多様化する為に利用されていることを意味する。その場合、RAG タンパクのコーディング末端プロセッシング活性を残しつつ有害なトランスポジショントランスポジション活性を抑えるメカニズムの存在が予想される。最近 RAG2 の C 末端領域がトランスポジション活性を抑制することが報告され、私の RAG preparation でも同じ結果が再現された(図 5A)。ところが、全長 RAG2 タンパクの 3'プロセッシング活性は、C 末端領域を欠く core RAG2 と大差ないことが明らかになった(図 5B)。以上の結果は、RAG2 の C 末端領域が有害なトランスポジションを抑制しつつ、3'プロセッシング活性をコーディング末端プロセッシングのために残していることを示唆している。

V(D)J 組換えは、生殖系列ゲノム (germline genome) で祖先受容体遺伝子のエキソンに事故で挿入されたトランスポゾンが、体細胞で切り出され復帰突然変異(revertant)を生じる過程に由来するとされる。しかしながら、トランスポゾン導入後の 4 億年以上に渡る獲得性免疫システムの進化は、RAG タンパクをほぼ完全に飼い慣らし、宿主(すなわち、我々)の目的に従わせるに至った。いまでは、切り出されたトランスポゾン DNA の再挿入により宿主ゲノムが危険にさらされることはない。もとはトランスポジション反応の為にあった筈の strand-transfer 活性はしかし、RAG タンパクから完全に損なわれたのではなく、全く別の目的——抗原受容体遺伝子の多様化の為に、コーディング DNA 末端をプロセスする活性へと進化したことを、本研究は示唆している。

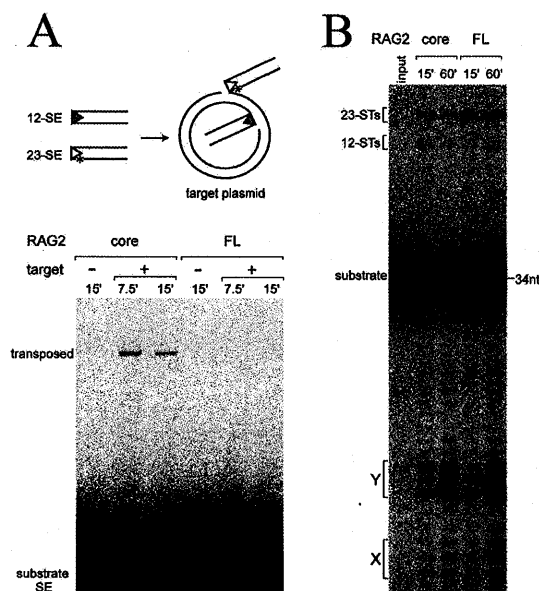


図 5. 全長 RAG2 も core RAG2 タンパクと同程度の 3'プロセッシング活性を持つ。(A) 標識した 23-SE を用いて SE complex を再構成し、ターゲットのプラスミド DNA にトランスポーズさせた。(B) 標識していない SE を用いて再構成した SE complex を、3'末端標識された基質二本鎖 DNA と反応させた。いずれのアッセイも、全長 RAG2 もしくは、C 末端領域を欠く core RAG2 タンパクを用いて、3 mM Mg²⁺、75 mM K⁺ 存在下で行った。