

(様式6-A) A. 雑誌発表論文による学位申請の場合

武井 寿史 氏から学位申請のため提出された論文の審査要旨

題目 Alternative splicing of APOBEC3D generates functional diversity and its role as a DNA mutator

(選択的スプライシングにより生じたAPOBEC3Dの機能的多様性とDNAミューテーターとしての役割)

International Journal of Hematology, 112, pages 395-408 (2020)

Hisashi Takei, Hirofumi Fukuda, Gilbert Pan, Hiroyuki Yamazaki, Tadahiko Matsumoto, Yasuhiro Kazuma, Masanori Fujii, Sohei Nakayama, Ikei S. Kobayashi, Keisuke Shindo, Riu Yamashita, Kotaro Shirakawa, Akifumi Takaori-Kondo, Susumu S. Kobayashi

論文の要旨及び判定理由

Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like (以下; APOBEC) タンパク質ファミリーは核酸のシチジンをウラシルに変換するシチジンデアミナーゼ活性をもつタンパク質群であり、11種類 (APOBEC1、APOBEC2、APOBEC3; 7種、APOBEC4、activation-induced cytidine deaminase) のタンパク質から構成される。APOBECは、ヒト免疫不全ウイルス (以下; HIV) などのウイルスの核酸に変異を誘導することや、免疫グロブリンの多様性に必要な体細胞超突然変異やクラススイッチに関わることで、免疫機構の一端を担っている。また近年、APOBECタンパク質ファミリーの一部が体細胞変異を誘発し、がんの発生や治療薬に対する耐性を誘導することが報告されている。APOBECタンパク質ファミリーの1つであるAPOBEC3D (以下; A3D) もHIVに対する変異誘導活性を持つことが知られている。しかし、A3Dが体細胞変異を誘導し、がんの発生への関与については不明な点が多い。我々は、A3Dが体細胞変異を誘導することで、白血病などのがんの発生に関わる、という仮説を立て実験を行った。

正常人の末梢血単核球 (Mononuclear cell; 以下MNC) と5種類の白血病細胞株におけるAPOBEC3遺伝子の発現を、リアルタイムPCRを用いて解析した。A3B、A3C、A3D、A3F、A3GがMNCおよび白血病細胞株に発現していた。次に、A3Dをクローニングするために白血病細胞株、肺癌細胞株のDNAを用いてPCRを行ったところ複数のバンドが検出された。各バンドの塩基配列解析を行い、6つのA3Dバリエント (A3Dv1, v2, v3, v4, v5, v6) を認めた。また、Ensemblに報告されていたバリエント (A3D-203) をA3Dv7として、A3Dは7つのバリエントを有していることが確認された。A3Dv3, v4, v5の塩基配列はシチジンデアミナーゼ活性ドメインの5'側に終始コドンを含んでおり、酵素活性を有すると考えられたA3Dv1, v2, v6, v7に注目した。

続いて、A3Dv1, v2, v6, v7がRNAウイルスであるHIVに与える影響を確認するため、HEK293T細胞にA3Dを強制発現させ、その後HIVを感染させた。コントロールと比較して、A3Dv1, v2, v6, v7の全てのバリエントで80-90%程度のHIV感染能の低下を認めた。HIVのgag遺伝子配列を解析したところ、コントロールと比較して全てのバリエントで変異頻度の増加が確認された。また、シチジンデアミナーゼ活性ドメインに変異を持つA3Dv1-E80/264QおよびA3Dv6-E264Qを用いてHIV感染能を確認したところ、A3Dv1, v6と比較してHIV感染能の回復が見られた。

次に、A3DがDNAに与える影響を確認するため、外来DNA編集アッセイを行った。HEK293T細胞にA3D発現ベクターとEGFP発現ベクターを同時に導入し、EGFP発現やEGFP遺伝子の変異頻度を評価した。陰性コントロールと比較して全てのA3DバリエントでEGFP陽性細胞率の減少と、EGFP遺伝

子の変異頻度の増加が認められた。A3Dv1-E80/264QおよびA3Dv6-E264Qを用いたところ、陰性コントロールと同等のEGFP陽性細胞率であった。

続いて、A3Dが体細胞DNAに与える影響を確認するためゲノムDNA編集アッセイを行った。HEK293T細胞にA3D発現ベクターを導入し、HEK293T細胞の*TP53*遺伝子における変異頻度を評価した。陰性コントロールと比較して、A3v1, v2, v6を強制発現した群で変異頻度の増加が見られた。

外来DNA編集アッセイ及びゲノムDNA編集アッセイで、A3Dや陽性コントロールとして用いたA3Bを強制発現させた群において、点変異だけでなく遺伝子欠失が確認された。*EGFP*遺伝子では47-415 bpsの欠失と1-9 bpsの短い相同配列、*TP53*遺伝子では1-340 bpsの欠失と1-3 bpsの短い相同配列が見られた。*EGFP*遺伝子や*TP53*遺伝子の遺伝子欠損部位に見られた短い相同配列（マイクロホモロジー）は、A3DやA3Bによって誘導された点変異が、DNA修復メカニズムの1つであるマイクロホモロジー媒介末端結合によって遺伝子欠失が発生した可能性を示唆していた。

本研究は、A3Dが白血病細胞株に発現していること、A3Dは7つのバリエントが存在していることを示した。そのうち4つのバリエント（A3Dv1, v2, v6, v7）は変異誘導活性を有し、HIVの*gag*遺伝子、*EGFP*遺伝子、*TP53*遺伝子に変異を誘導することを確認した。新規性があると認められ、博士（医学）の学位に値するものと判定した。

（試験年月日）令和3年1月14日

審査委員

主査	群馬大学教授（医学系研究科） 小児科学分野担任	石崎 泰樹	印
副査	群馬大学教授（医学系研究科） 循環器内科学分野担任	倉林 正彦	印
副査	群馬大学教授（医学系研究科） 腎臓・リウマチ内科学分野担任	廣村 桂樹	印

参考論文

なし

（様式6，2頁目）

最終試験の結果の要旨

「造血器腫瘍における遺伝子変異の意義」についておよび「APOBEC3Dの細胞内の局在調節機構」について試問し満足すべき解答を得た。

（試験年月日）令和3年1月14日

試験委員

群馬大学准教授（医学系研究科）
血液内科学分野担任

半田 寛 印

群馬大学教授（医学系研究科）
小児科学分野担任

石崎 泰樹 印

試験科目

主専攻分野 血液内科学 A

副専攻分野 小児科学 A