

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19005

研究課題名(和文) 生体内enChIP法を用いたシチジンデアミナーゼ遺伝子発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of cytidine deaminase gene regulation using enChIP

研究代表者

佐藤 克哉 (SATO, Katsuya)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60733508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Activation Induced cytidine deaminase(AID)は、抗体変化に必須の分子で、エピゲノム制御や細胞のがん化にも働くと考えられている。AID遺伝子(Aicda)の発現は、複数のシス調節領域及び転写因子によって複雑に制御されるが詳細な機構は不明な点が多い。本研究では、Aicda発現調節機構の解明を目指した。

転写因子Batfは、過去の報告と一致し、刺激に応じたAIDの発現に必須であった。また、Batf-IRF4が複合体を形成し、Aicda上の報告のある領域とは異なる領域に結合する事が示唆された。更にChIP解析等により、詳細な結合部位及び遺伝子座の構造解析を進めた。

研究成果の概要(英文)：Activation-induced cytidine deaminase (AID) is expressed in activated B cells and essential for class switch recombination and somatic hypermutation. In addition, it is reported that AID can be involved in tumor progression and epigenetic regulation even in the non-B cells. To date, at least 11 transcription factors and 6 cis-regulatory elements have been identified as regulators of Aicda, the gene of AID. However, the detailed mechanisms to limited the AID expression in activated B cells are not fully understood. In this study, we investigated the mechanism of Aicda regulation.

We revealed that Batf plays an essential role and the binding ability of BATF and IRF4 are important for AID expression. We established the cells that harboring deletion of each Aicda cis-regulatory element and found the Batf-IRF4 complex binds to a region different from the reported region on Aicda. Also, we examined the binding site of the complex and DNA structure-to-function relationship by ChIP and enChIP.

研究分野：生化学

キーワード：AID 遺伝子発現制御 転写因子 エンハンサー領域 CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

B リンパ球は、抗原や、ヘルパーT リンパ球などを介した外的刺激を受けて活性化し、Activation induced cytidine deaminase (AID) を発現することで体細胞超変異やクラススイッチ組み換えを起こす。これにより抗原に対し高親和性の種々のクラスの抗体を産生できるようになる。

AID 遺伝子 (*Aicda*) は、5つのエキソンと、プロモーターに加え、エンハンサーやサイレンサーとして働く領域が6つ、約50 kb に及びDNA領域に離れて存在することが知られている (図1)。これまで、STAT6, NF-κB, BATF, HoxC4 など、少なくとも11の転写調節因子がこれらの領域に作用することが報告されてきた。AID の発現は、これらの転写調節因子や周囲の環境からの刺激により、厳密な制御を経て調節されていると考えられている。

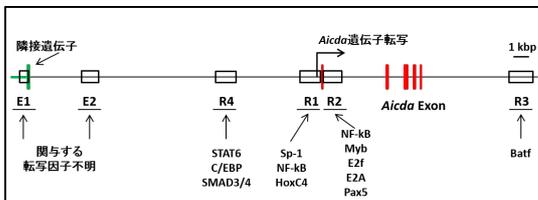


図1. *Aicda* 遺伝子転写調節領域と転写因子

しかしながら、近年、活性化したBリンパ球以外にも、ピロリ菌の感染等の病的刺激に伴い、胃上皮細胞にもAID発現が起こり、それが細胞の癌化に関わることが提唱されている。さらに、AIDは、DNA脱メチル化を行うことで、細胞リプログラミングに関与することが示唆されており、Bリンパ球特異的な発現を担う要因は不明な点が多い。

一方、近年、CRISPR/Cas9による遺伝子改変が可能となり、ゲノム上の任意の部位への欠失・変異導入や遺伝子挿入が細胞レベルで可能となった。また、Cas9に2箇所の点変異を導入することで、ヌクレアーゼ活性を欠損させたCas9 (dCas9) を作成することができる。dCas9は、Cas9同様、gRNAと協調して標的配列に結合できるが、二重鎖切断は誘導しない。dCas9を細胞内に導入し、dCas9近傍のDNA領域や、転写調節因子を免疫沈降することにより、ゲノム上の特定部位の単離することができる (enChIP法)。この方法を利用し、*Aicda* 遺伝子発現制御領域と相互作用するタンパク質やゲノム断片を得、産物を質量分析やシーケンスを用いて解析することで、*Aicda* 転写調節因子 DNA複合体の構造を解明できると考えられる。

これを明らかにすることができれば、抗体の多様性獲得の仕組みに加え、AIDの関与が指摘されている癌などの疾患解明や、効率的なiPS細胞作製方法の開発等の応用につながると考えられる。

2. 研究の目的

上に示した背景を踏まえ、本研究では、

活性化Bリンパ球、未熟Bリンパ球において、*Aicda* 制御配列に対する各種転写調節因子の重要度を明らかにする。

CRISPR/dCas9を用いたenChIP法を行い、*Aicda* 遺伝子周辺の転写調節因子-DNA複合体構造を解析し、発現調節機構を明らかにする。

Bリンパ球以外の様々な組織を用いて、enChIP解析を行うことにより各組織における*Aicda* 遺伝子周辺の遺伝子構造の差異を明らかにする。
ことを目的とした。

3. 研究の方法

各種胞外刺激時のAID発現に関わる転写調節因子及びAIDの発現の確認

Bリンパ球は、CD40リガンドおよびLPSの刺激を介して活性化する際、AIDが強く発現する。本研究では、Bリンパ球のモデル系となるCH12細胞を用い、CH12細胞に刺激を加えた時、HoxC4, BATFを含む各種転写調節因子およびAIDの発現に変化が生じるかをReal-time qPCRおよび、それぞれの転写調節因子特異的抗体を用いたイムノプロットにより確認した。また、それぞれの転写調節因子に対するCRISPR/Cas9コンストラクトを作成し、ノックアウト (KO) 細胞を作成後、刺激依存的なAIDの発現量をReal-time qPCRおよびイムノプロット法を用いて解析し、それぞれの転写因子がAIDの発現に与える影響度を比較した。

enChIP法による*Aicda* 転写調節因子 DNA複合体構造の解析

Aicda 制御領域にCRISPR/dCas9結合部位を設計・細胞内に導入し、免疫沈降後の沈降物のDNAの配列をRT-qPCRやシーケンスにより調べることで、活性化したCH12細胞内で*Aicda* が転写される際、形成するDNAの構造を調べた。

4. 研究成果

細胞外刺激依存的なAID発現誘導に関わる転写調節因子

CH12細胞に細胞外刺激を加え、各種転写因子の発現量及び、AIDの発現変化を調べた。その結果、AIDの発現を制御すると考えられている転写調節因子の1種であるBatfの発現量に変化が見られた。Batfの発現量は、LPSを含む刺激を加えた細胞において上昇がみられた一方、CD40リガンドを含む刺激を加えた細胞では上昇はみられなかった。さらに、BatfがAIDの細胞外刺激を介した発現誘導に重要であるかを検討する為、CRISPR/Cas9を用いてBatf KO細胞を作製し、解析した。その結果、Batf KO細胞では、CD40リガンド、LPSいずれの刺激によって誘導されるAIDの発現量も著しく低下することが明らかとなり、Batfは、細胞外刺激依存性のAID発現誘導に必須であると考えられた。(図2)。

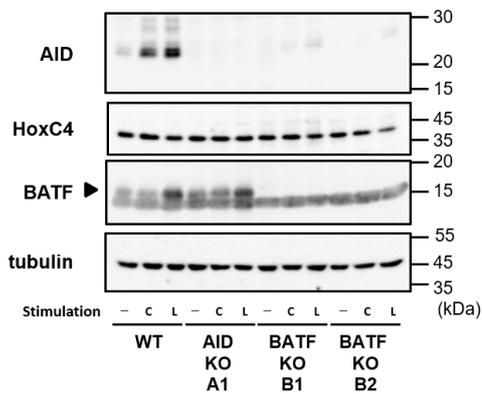


図2. BATF KO細胞におけるAID発現

Aicda 遺伝子上の遺伝子発現制御領域が細胞外刺激依存的なAID発現に与える影響

これまで、*Batf* が転写開始点下流 17 kb 付近に存在する R3 領域に結合することが示唆されている。そこで、*Batf* の *Aicda* 遺伝子上の相互作用領域を確認する為、CRISPR/Cas9 を用いて R3 領域を欠損させた細胞を作成した。しかしながら、この細胞において、AID 発現の低下は見られず、AID 発現誘導に重要な転写調節領域は、これまで示されてきた部位とは異なる部位に存在する可能性が示唆された。

このことから、CRISPR/Cas9 を用いて各種 *Aicda* 制御領域を欠損させた細胞を作成し、細胞外刺激に応じた AID 発現に必須の *Aicda* 制御領域の探索を行った。その結果、転写開始点上流 7.5-9 kb 付近の R4 と呼ばれる領域、及び第一イントロン内に存在する R2 領域を欠損させた細胞において、刺激に応じた AID の発現が見られなくなり、これらの領域が、AID 発現に重要な役割を担っていると考えられた (図3)。

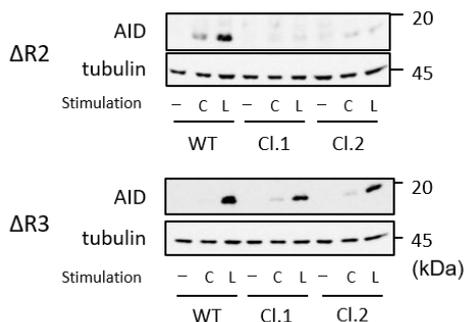


図3. 転写調節領域がAID発現に与える影響

転写調節因子の結合モチーフを基にした解析や、過去、他の様々な細胞種において実施・公開されている *Batf* のクロマチン免疫沈降 (ChIP) 情報データベースを調べたところ、これまで *Batf* が結合すると考えられてきた R3 領域以外にも E1, E2, R4 領域にも *Batf* が結合する可能性のある領域が存在する事が明らかとなった。

これらのことを合わせ考えると、*Batf* は、R3 ではなく、R4 領域に結合することで AID

発現に寄与する可能性が考えられた。

Batf と転写調節因子 IRF4 の相互作用

近年、BATF が転写調節因子 IRF4 と相互作用することで、DNA 上の AICE 配列に結合するという報告がある。そこで CRISPR/Cas9 システムを用いて BATF と同様の方法により IRF4 を欠損させた細胞を作成し、検討を行った。その結果、IRF4 KO 細胞においても細胞外刺激に応じた AID 発現の減少が見られた。また、BATF KO 細胞に IRF4 との相互作用に重要なアミノ酸に置換を入れた BATF 変異体を導入したが、AID 発現は野生型の *Batf* を発現する細胞と比較して、著しく低下していた。これらのことから、BATF と IRF4 が複合体を形成することで AID の発現に寄与することが考えられた。

CH12 細胞における *Batf*-IRF4 複合体の *Aicda* 転写開始点上の相互作用領域および DNA 構造の解析

以上より、*Batf*-IRF4 は複合体を形成し、*Aicda* 上の R4 領域と相互作用することで、刺激依存的な AID 発現に寄与するのではないかと仮説を立て、CH12 細胞を用いた *Batf* および IRF4 の ChIP 解析を行い、それぞれの転写因子の *Aicda* 上の詳細な結合領域の検討を行った。さらに、CRISPR/dCas9 を用いた enChIP 解析により、*Aicda* 遺伝子発現における転写開始点上流領域の寄与について検討を行った。

今回我々は、転写因子 *Batf* が、これまで報告のある R3 以外の領域において AID の発現に重要な役割を果たしている可能性を見いだした。R3 領域以外の AID 発現に必須の転写調節領域の探索に当初の予定以上の時間を要したため、ChIP 解析及び enChIP 解析については、本研究課題終了後も継続して検討を続けていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Masashi Nishikawa, Katsuya Sato, Shun Nakano, Hisashi Yamakawa, Takahiro Nagase, and Hiroshi Ueda, Specific activation of PLEKHG2-induced serum response element-dependent gene transcription by four-and-a-half LIM domains (FHL) 1, but not FHL2 or FHL3, *Small GTPases*, (査読有) 2017 in press DOI: 10.1080/21541248.2017.1327838
Toshimitsu Ohashi, Mitsuhiro Aoki, Hiroyuki Tomita, Takashi Akazawa, Katsuya Sato, Bunya Kuze, Keisuke Mizuta, Akira Hara, Hitoshi Nagaoka, Norimitsu Inoue and Yatsuji Ito, M2-like macrophage polarization in

high lactic acid-producing head and neck cancer, *Cancer Science*, (査読有) 108, 1128-1134, 2017
DOI: 10.1111/cas.13244
Kazue Sugiyama, Kenji Tago, Sayumi Matsushita, Masashi Nishikawa, Katsuya Sato, Yoshinori Muto, Takahiro Nagase, Hiroshi Ueda, Heterotrimeric G protein Gas subunit attenuates PLEKHG2, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, by direct interaction, *Cellular Signaling*, (査読有) 32, 115-123, 2017
DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.01.022
Katsuya Sato, Masashi Kimura, Kazue Sugiyama, Masashi Nishikawa, Yukio Okano, Hitoshi Nagaoka, Takahiro Nagase, Yukio Kitade, Hiroshi Ueda, Four-and-a-Half LIM Domains 1 (FHL1) Protein Interacts with the Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor PLEKHG2/FLJ00018 and Regulates Cell Morphogenesis, *Journal of Biological Chemistry*, (査読有) 291, 25227-25238, 2016
DOI: 10.1074/jbc.M116.759571

[学会発表](計 12件)

Katsuya Sato, Hitoshi Nagaoka, Analysis of cis-regulatory elements involved in the regulation of expression of *Aicda*, 第46回日本免疫学会総会・学術集会, 2017年12月(仙台)
中野 駿、西川 将司、浅岡 里奈、田代 圭、石川 奈津子、大脇 千智、佐藤 克哉、山川 央、長瀬 隆弘、上田 浩、EPHB2/SRCシグナルを介した Rho 活性化因子 DBS のチロシンリン酸化、生命科学系合同年次大会・第40回日本分子生物学会/第90回日本生化学会合同大会, 2017年12月(神戸)
西川 将司、中野 駿、中尾 拓、佐藤 克哉、山川 央、長瀬 隆弘、上田 浩、非受容体型チロシンキナーゼ ABL1 による Rho 活性化因子 PLEKHG2 の活性制御と核内移行、生命科学系合同年次大会・第40回日本分子生物学会/第90回日本生化学会合同大会, 2017年12月(神戸)
佐藤 克哉、安田 一、金山 佳史、堀 賢一郎、長岡 仁、CRISPR/Cas9 によるシス調節エレメントの編集を用いた抗体遺伝子改変酵素 AID の発現調節機構の解析、生命科学系合同年次大会・第40回日本分子生物学会/第90回日本生化学会合同大会, 2017年12月(神戸)
安田 一、佐藤 克哉、金山 佳史、堀 賢一郎、長岡 仁、抗体遺伝子改変酵素 AID の遺伝子発現調節におけるシス調節エレメントの解析、第49回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 2017年9月(岐阜)

佐藤 克哉、金山 佳史、堀 賢一郎、安田 一、長岡 仁、抗体遺伝子改変酵素 AID の発現制御に関わる転写調節領域の解析、第81回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム, 2017年5月(名古屋)
西川 将司、杉山 和恵、佐藤 克哉、山川 央、長瀬 隆弘、上田 浩、三量体 G 蛋白質による Rho 活性化因子 PLEKHG1 の活性制御、第39回日本分子生物学会年会, 2016年12月(横浜)
西川 将司、杉山 和恵、佐藤 克哉、長瀬 隆弘、上田 浩、三量体 G 蛋白質による Rho 活性化因子 PLEKHG1 の活性制御、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2016, 2016年10月(岐阜)
佐藤 克哉、木村 正志、杉山 和恵、岡野 幸雄、長岡 仁、長瀬 隆弘、北出 幸夫、上田 浩、Rho 活性化因子 PLEKHG2 の Four and a half LIM ドメイン含有蛋白質との相互作用による活性制御、第80回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム, 2016年5月(三重)
堀 賢一郎、佐藤 克哉、金山 佳史、安田 一、長屋 州宣、長岡 仁、CRISPR/Cas9 を用いた抗体遺伝子改変酵素 AID の発現調節機構の解析、第38回日本分子生物学会/第88回日本生化学会合同大会, 2015年12月(神戸)
Katsuya Sato、Hitoshi Nagaoka, Evaluation and Function of transcription factors, Batf and HoxC4, in *Aicda* gene regulation, 第44回日本免疫学会総会・学術集会, 2015年11月(札幌)
金山 佳史、佐藤 克哉、堀 賢一郎、長岡 仁、抗体遺伝子改変酵素 AID の発現制御機構の解析、第79回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム, 2015年5月(信州)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 克哉 (SATO, Katsuya)
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 6073350