

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H01027

研究課題名(和文) AIDのRNA編集による抗体遺伝子多様化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism of IgH gene diversification depending on RNA-editing by AID

研究代表者

本庶 佑 (HONJO, TASUKU)

京都大学・高等研究院・特別教授

研究者番号：80090504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗体遺伝子の多様化を支えるAIDの分子機能を解析した。DNAの二次構造を不安定化させるためのDNAトポイソメラーゼ1 (Top1)の翻訳抑制機構を解析したところ、AID活性化がTop1 mRNA (特に3'UTR)へのmiRNA-Ago2複合体結合を促進するためであることを明らかにし、DNA切断段階におけるAIDの機能がmiRNA複合体の制御を通して行われることを証明した。

さらに、AIDのC末端ドメインに依存するクラススイッチ組換えの修復段階についてRNA編集の可能性を探索したところ、AIDのC末端ドメインに結合するタンパク質を中心に修復段階を制御する新しい分子メカニズムを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AIDの発見以来、20余年間、AIDの標的RNA分子を探索し、初めてmiRNAを通じたmRNAの制御がDNA切断を促進するという新しい分子メカニズムを明らかにした。抗体遺伝子組換えはワクチンを始めとする感染性制御の根幹を成す生命システムであり、その謎について新発見を得た。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the molecular function of AID, which supports the diversification of antibody genes. Analysis of the translational repression mechanism of DNA topoisomerase 1 (Top1) which alters the secondary structure of DNA revealed that AID activation promotes miRNA-Ago2 complex binding to Top1 mRNA (particularly to 3'UTR). We have demonstrated that the function of AID during the DNA cleavage step is through the control of miRNA complex. Furthermore, when we explored the possibility of RNA editing for the repair stage of class switch recombination that depends on the C-terminal domain of AID, we discovered a new molecular mechanism of the repair stage which depends on the protein binding to the C-terminal domain of AID.

研究分野：分子免疫学

キーワード：AID RNA編集 免疫グロブリン遺伝子 トポイソメラーゼ1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

病原体感染やワクチン接種などの抗原刺激は「同じ病気に二度かかることがない」と言われる「免疫記憶」を形成する。これは個々のBリンパ球の中で、抗原刺激に応じて抗体遺伝子(IgHとIgL)が遺伝子変異を起こす結果である。この変異は、H鎖とL鎖の可変領域の点変異である体細胞変異(SHM)、機能の異なるH鎖定常領域が入替るクラススイッチ組換え(CSR)から構成される。我々は2000年にCSRとSHMを司るAIDを発見して以来、この酵素の作用機作について研究を続けてきた。これまでにAIDがRNA中のCを脱アミノ化することを示唆する数多くの証拠を得てきたが、まだ完全なる証明にいたっていない。「体細胞DNAの変異と組換えがRNA編集で制御され得るか否か」は全く前例のない学問的問いである。AIDはCSRの過程ではS領域DNA切断と、切断した2つの異なるS領域を再結合(修復)の2つの機能を持ち、一方、SHMの過程ではV領域の切断を行うのみで、DNA変異は修復の際に過誤修復酵素によって導入されるものである。ところが、AID自身はC脱アミノ活性を持つのみで、直接DNAの切断や修復を行う活性は持たない。そこで、「AIDがDNA中のdCを脱アミノ化しdUへ変換し、続く塩基除去修復複合体やミスマッチ修復複合体がDNAを切断する」とのDNA編集仮説、「AIDがRNA中のCを脱アミノ化し、変換されたRNAがなんらかの分子機構によりDNAを切断する」とのRNA編集仮説の2つが唱えられてきた。申請者はAIDがRNA中のCを脱アミノ化すると考えて研究を進め、これまでに①DNAを直接切断する酵素はTop1であり、AIDがTop1の翻訳制御を通じて抗体遺伝子部位のDNA構造を変化させること(応募者の研究能力欄に示したリスト1、2、以下カッコ内に数字で示す)②細胞内ではAID依存的RNA編集が起こること(3及び未発表データ)。③AIDのN端変異では、DNA切断活性が低下するが修復機能は正常である一方、逆にC端変異では、DNA切断活性は正常でも修復機能が失われることを証明した(4-6)。④さらにAIDが持つDNA切断と修復の二種類の活性には各々、別個の特異的RNA結合タンパク質が共役因子として必須であり、それらはRNA依存的にAIDと結合する。即ち切断ではhnRNPK、修復ではhnRNPL、UおよびSERBP1が共役因子である(7,8)。⑤新しいタンパク質の合成がCSRのDNA修復には必要であるが、DNA切断には不必要である(9、未発表データ)。このような背景の中で現在最も重要な残された課題は、具体的にAIDによってどのRNA中のどのCが特異的に脱アミノ化されるのか、その結果として編集されたRNAがDNA切断とDNA修復のどのステップにどのようなしくみで関与をするかということが、獲得免疫による抗体の多様化の最後に残された革新的課題である。

## 2. 研究の目的

本研究は、AIDによるRNA編集仮説を実証し、どのようなRNAがAIDによる特異的な脱

アミノ化反応を受け、その結果作られた新しいRNA がSHM およびCSR でどのような役割をするかを明らかにするものである。AID の作用機構については、申請者らが2000年に発見して以来18年になるが、未だにRNA 編集学説を支持する研究者は少数派であり、大部分の研究者は極めて単純なDNA 脱アミノ化によるDNA 切断に固執してきた。多くの教科書や総説にもこの考え方が中心に書かれている。しかしながら、AID にはN 末端ドメインに依存したDNA 切断活性とC 末端ドメインに依存したDNA 修復機能活性があり、単にAID によりDNA が脱アミノ化されるだけではSHM とCSR の2つの反応を説明することは極めて困難である。また、AID が抗体遺伝子などごく限られた遺伝子に変異をもたらす分子機構も説明できない。近年、この問題に気づく研究者が徐々に増え、RNA 結合タンパク質の関与を認める論文も発表されるようになってきた。今回提案するプロジェクトはAID の発見から、そのあらゆる側面に渡りこの分野の研究をリードしてきた申請者の独壇場と言っても差し支えない。AID のRNA 脱アミノ化説はAID 発見当初、申請者らのグループが提唱し数々の証拠を重ねて来たが、最後に残された課題はどのRNA がAID によって検出され、検出されたプロダクトがSHM とCSR と何をやるかという課題に集約されつつある。この問題の解決は、獲得免疫の中心課題である抗体記憶の分子機構の全容の解明につながり、ひいては抗体の多様化に関連する多くの生体内制御、近年腸内細菌の多様性の保持、それに伴うがん免疫の活性化、自己免疫病の抗原認識、老化などあらゆる生体機能に関わる生命科学の最も重要な課題のひとつと言っても過言ではない。

### 3. 研究の方法

#### (1) AID による抗体遺伝子ncRNA 編集の検討 (分担者小林が担当)

- ① デオキシグアニン(dG):U ミスマッチの構造安定性 : miRNA-RNA はG とU のミスマッチであっても塩基対を形成すると言われる。モデルとなる核酸配列にIgH 遺伝子のncRNA 配列を用いて、AID によるC to U 編集がIgH 遺伝子に起きる結果、実際にDNA/RNA 二本鎖が構造的に不安定になり解離を招くか否かを電気泳動移動度や熱力学的観測により検証する。
- ② 抗体遺伝子ncRNA のAID による変異検出 : 核内RNA のみを分画法により抽出し、高速シーケンスによりC to U 編集の有無を検討する。IgH 遺伝子のncRNA は特に繰り返し配列を多く含むためショートリード法では配列決定に限界があり、ロングリード法を用いる。
- ③ PTBP3 結合性RNA、hnRNP K 結合性RNA の検討 : DNA 切断に関わる新しい共役因子PTBP3 に結合するRNA をPTBP3 の免疫沈降法により回収し、抗体遺伝子ncRNAが含まれるか否かを検討する。hnRNP K に結合するRNA も同様に検討する。

#### (2) Top1 翻訳制御に働くmiRNA 同定 (分担者小林が担当)

- ① AID 結合性miRNA の探索 : 抗AID 抗体を用いた免疫沈降により回収された小分子RNA を高速シーケンスし、C to U が高頻度の変換RNA 候補を得る。そのmiRNA のTop1

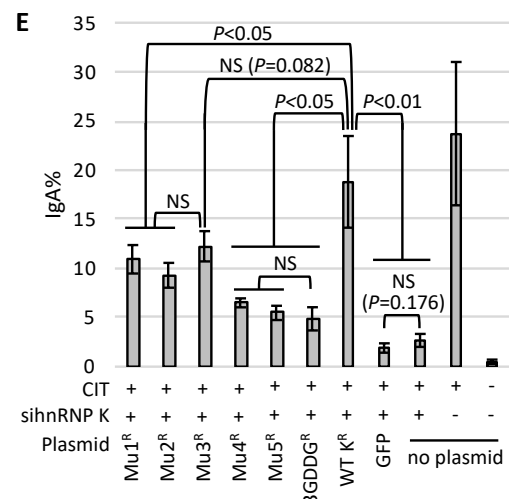
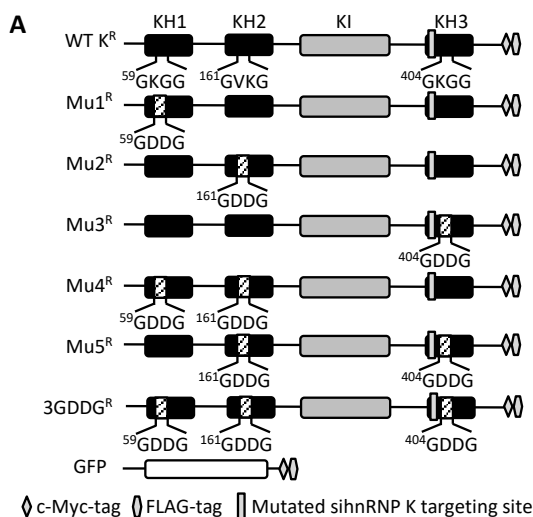
mRNA、Ago2 タンパク質との結合を検証、また、高発現によりTop1 タンパク質の翻訳低下を検証する。

② Top1 mRNA 結合性miRNA の同定 : Top1 に結合するmiRNA を抗Ago2 抗体を用いた免疫沈降やTop1 mRNA に対するビオチン化オリゴを用いて回収し、RNA ligase を用いてTop1 mRNA とmiRNA が結合したライブラリを作成、高速シーケンスを行い、in vivo におけるTop1 に結合するmiRNA を検出し、そのmiRNA または前駆体の編集の有無を検証する。

#### 4. 研究成果

Top1 翻訳制御に働く miRNA をついに同定した。抗 Ago2 抗体を用いた免疫沈降と RNA ligase を用いる手法を用いて Top1 に結合する miRNA 同定を試みたが、miRNA や long noncoding RNA の同定には至らなかった。しかし、293T 細胞から得られた Ago2 binding miRNA の候補の中から見つかった miR-92a-3p のノックダウンは IgA へのスイッチング効率を下げている、この miRNA がクラススイッチを促進することを発見した。Ago2 が Top1 3'UTR に結合したことから、Top1 3'UTR ノックアウト細胞を作成し、解析したところ、AID 依存性の IgH 遺伝子組換え現象の効率が下がっていることが見出された。また、野生型の細胞では通常、AID 誘導により PBS-TritonX100 可溶性分画中の Top1 タンパク質量が低下したが、このノックアウト細胞では低下せず、3'UTR にこの miRNA が作用している可能性が示された。実際、この Top1 3'UTR ノックアウト細胞では miR-92a-3p の作用は解除されており、Top1 3'UTR に結合することが示唆された。miR-92a-3p のノックダウン細胞では Top1 量の低下が解除されており、この miRNA による Top1 量を制御も証明できた。LM-PCR において、miR-92a-3p のノックダウンで DNA 切断が下がること、同じく体細胞突然変異率もそのノックダウンで下がり、DNA シナプスではなく切断のレベルで作用することが確認できた。この新しい AID の機能は、RNA 編集を介している可能性があり、さらに解析を継続している（投稿準備中）。

また、RNA 結合タンパク質 hnRNP K は DNA 切断に必須の分子であることを我々は



報告しており、AID による RNA 編集の際に、何らかの RNA 分子を AID に提示する分子と考えられていた。その hnRNP K において、3つの RNA 結合モチーフと中央部に位置する RNA/タンパク質結合ドメインの全てが AID の機能にとって必須であることを明らかにした(研究成果、論文 Yin et al., PNAS USA, 2020、下図左、RNA 結合モチーフ変異体、下図右、各種変異体によりクラススイッチが抑制されている)。いずれかの RNA 分子と hnRNPK が結合することが AID 機能に必須であることを証明した。

IgH 遺伝子のクラススイッチ組換え過程の DNA シナプス形成段階は、特に AID の C 末端に依存する。IgH 遺伝子の組換え部分に結合するタンパク質を網羅的に探索することにより、RNA 編集に関わる分子を同定することを目的に解析を進めたところ、2つの興味深い分子の新たな機能を明らかにすることに成功した。1つは SAMHD1 であり、これは dNTP 分解酵素活性を持つ。SAMHD1 は組換え DNA 部分に局在し、細胞内の dNTP プール量を抑えることにより、効率的な DNA シナプス修復を可能にすることを明らかにし(研究成果、論文、Husain et al., EMBO J, 2020)、予想外に DNA シナプス修復の局所環境の必要条件を新たに同定することができた。

もう一つの分子については論文未発表であるが、通常は核仁において rRNA や tRNA の制御に関わる分子が、AID の C 末端にも結合すること、DNA シナプス形成に関与することを発見した。これはさらにメディエーター複合体に含まれる分子とも結合し、DNA シナプス形成が巨大複合体の中で進行するという新たな仮説につながった。この巨大複合体が RNA 編集の場を形成する可能性もあり、本基盤研究期間は終了したが、解析が継続される予定である。

以前、クラススイッチ組換えが起きる IgH 遺伝子領域のクロマチン修飾として H3K4me3 が重要であることを報告したが、H3K4me3 に結合する PHD フィンガータンパク質の Phf5a が非相溶性末端結合の DNA 修復に必須であることを発見し報告した(研究成果、論文、Begum et al., EMBO J, 2021)。

AID による RNA 編集を探索するため、ターゲットを狭く絞らず、細胞内のすべての RNA について、AID 依存性の RNA 編集検出を試みた。ヒトバーキットリンパ腫由来 BL2 細胞を用い、AID の活性化の有無で検出される C to U 編集をショートリードの次世代シーケンス法で解析した。同時に採取した DNA と RNA とを比較し AID による C to U 編集の候補 RNA を得た。そのうちマウスにおいても保存されている long noncoding RNA 4 種類をノックダウンしたが、マウス培養細胞でのクラススイッチ効率に変化はなく、DNA 切断に直結する C to U 編集を見出すことはできなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yin, Z., Kobayashi, M., Hu, W., Higashi, K., Begum, N.A., Kurokawa, K., and Honjo, T.	4. 巻 117(21)
2. 論文標題 RNA-binding motifs of hnRNP K are critical for induction of antibody diversification by activation-induced cytidine deaminase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 11624-11635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1921115117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Afzal Husain, Jiangliang Xu, Hodaka Fujii, Mikiyo Nakata, Maki Kobayashi, Ji-Yang Wang, Tasuku Honjo, & Nasim A Begum	4. 巻 39
2. 論文標題 SAMHD1-mediated dNTP degradation is required for efficient DNA repair during antibody class switch recombination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO J.	6. 最初と最後の頁 e102931
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2019102931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Afzal Husain, Jiangling Xu, Hodaka Fuji, Mikiyo Nakata, Kobayashi Maki, Ji- Yang Wang, Jan Rehwinkel, Tasuku Honjo, Nasim A. Begum	4. 巻 e102931
2. 論文標題 SAMHD1-mediated dNTP degradation is required for efficient DNA repair during antibody class switch recombination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO J.	6. 最初と最後の頁 --
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2019102931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Islam, H., Kobayashi and Honjo, T.	4. 巻 31
2. 論文標題 Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) is dispensable for activation-induced cytidine deaminase (AID)-dependent somatic hypermutation in the immunoglobulin gene	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 543-554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小林 牧、本庶 佑
2. 発表標題 DNAトポイソメラーゼ1は免疫グロブリン遺伝子組換え（多様化）に際してAIDに制御されDNA切断に働く
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tasuku Honjo
2. 発表標題 Serendipities of acquired immunity
3. 学会等名 IUIS 2019 (17th International Conference of Immunology) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本庶 佑
2. 発表標題 獲得免疫の驚くべき幸運
3. 学会等名 第52回日本薬剤師会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本庶 佑
2. 発表標題 獲得免疫の驚くべき幸運 (Serendipities of acquired immunity)
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会コアシンポジウム講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本庶 佑
2. 発表標題 Serendipities of acquired immunity
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会 特別講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maki Kobayashi
2. 発表標題 DNA topoisomerase 1 (Top1) contributes to DNA breaks under the regulation of activation-induced cytidine deaminase (AID) in immunoglobulin gene diversification.
3. 学会等名 浙江大学（中国）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学大学院医学研究科 免疫ゲノム医学  <a href="http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/">http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/</a>          京都大学大学院医学研究科 免疫ゲノムj医学  <a href="http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/">http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/</a></p>
--

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小林 牧  (Kobayashi Maki)  (20400690)	京都大学・医学研究科・特定准教授    (14301)	



6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	B e g u m N a s i m A r a  (Begum Nasim Ara)  (80362507)	京都大学・医学研究科・特定准教授         (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関