

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06485

研究課題名(和文) RNA干渉による転写依存的な抗体遺伝子の不安定化機構

研究課題名(英文) Transcription-dependent IgH gene instability by RNA interference

研究代表者

小林 牧 (Kobayashi, Maki)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：20400690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：DNA切断に必須の核内環境として、レトロトランスポゾン由来RNAが重要であることを新たに発見した。抗体遺伝子noncoding RNAに対するプローブを用いたRNA-FISH法により、全く新しい抗体遺伝子の組換え動態評価法を試みた。Alu配列由来RNAは核内構造の制御に必須であるが、それが抗体遺伝子組換え部位のRNA濃縮体形成に重要であること、DNA切断に必須のhnRNP Kが抗体遺伝子の核内転写活性化領域への局在を制御することを発見した。また新たに、反復配列に結合するRNA結合タンパク質が、AID依存的な抗体遺伝子組換え現象のDNA切断段階に必須であることも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体遺伝子noncoding RNAが濃縮体を形成し、DNA切断や修復の場を与える可能性を見出した。これらの独自の高い発見が、さらに抗体遺伝子が組換え時に特別な核内環境を要求する条件を特定する契機になると期待される。

研究成果の概要(英文)：We have newly discovered that retrotransposon-derived RNA is important as the nuclear environment essential for DNA cleavage. An entirely new method for evaluating the recombination kinetics of an antibody gene was attempted by the RNA-FISH method using a probe for antibody gene noncoding RNA. RNA derived from the Alu sequence is essential for the regulation of nuclear structure, but it is important for the formation of RNA concentrate at the antibody gene recombination site. hnRNP K, which is essential for DNA cleavage, controls the localization of the antibody gene in the transcription-active region in the nucleus. We also newly found that an RNA-binding protein that bind to the repetitive RNA are essential for the DNA cleavage stage of AID-dependent antibody gene recombination.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：RNA干渉 抗体遺伝子組換え アンチセンスオリゴ ゲノム不安定化 AID

1. 研究開始当初の背景

抗体産生性 B リンパ球では病原体感染やワクチン接種などの抗原刺激により抗体遺伝子が組換えにより多様化し、記憶 B 細胞となり体内に残るために終生、抗原刺激が記憶される。Activation-induced cytidine deaminase (AID)の発現により抗体遺伝子可変領域では抗原への親和性を高める点変異(体細胞突然変異、SHM)と、機能の異なる定常領域を入替えるための遺伝子組換え(クラススイッチ組換え、CSR)とが転写に依存して起きる。また、AID は慢性炎症により異所性に発現し、がん化させるため、その DNA 組換え分子機構の理解が求められる。ところが、AID 発現後、なぜ抗体遺伝子だけが効率よく組換えられるのか、という疑問は、未解決の課題である。AID 解析からは切断 DNA をどのように選択するか説明は未だできず、切断される DNA (遺伝子)側が AID の作用を受けやすい要因を決定する可能性がある。

抗体遺伝子組換えは転写依存性の DNA 切断と修復という2つの段階に分けられる。抗体遺伝子の転写構造は複雑で、抗体 mRNA 以外に小さな ncRNA を生む複数の転写単位が DNA 切断部位に一致して散在し、あたかも DNA 切断のために転写が備わるように見えるが、その機能的意義は長らく不明であった。

一般的に、神経変性疾患の原因となるトリプレットリピート配列や酵母の 2-5 塩基の繰返し配列は転写依存的に拡大/縮小を起こし、抗体遺伝子組換えとの共通性が予想されていた。実際、抗体遺伝子切断部位の ncRNA も高度のリPEAT配列を含む。また申請者らは抗体遺伝子 DNA がトポイソメラーゼ 1(Top1)により切断されることを発見したが、他のリPEAT配列不安定化も Top1 によることが追って明らかになり、繰返し DNA 配列の組換え機構は基本メカニズムを共有すると考えられる。

本研究は、抗体遺伝子の ncRNA に着目し、同領域の DNA・クロマチン構造や ncRNA への結合分子を明らかにし、DNA 切断時の局所的 DNA 構造の変化を捉え、抗体遺伝子の組換え感受性がどのような分子的特異性により決まるか、という問いに取り組む。これは他の潜在的な転写依存性ゲノム不安定化領域を明らかにし、細胞の老化やがん化メカニズム解明にも役立つ。

2. 研究の目的

本申請課題では申請者の発見した抗体遺伝子 ncRNA に対する RNAi である antisense oligo (ASO) が誘導する DNA 切断分子機構を解析し、ncRNA 群が AID の集積と抗体遺伝子の転写依存的脆弱性に果たす機能を明らかにし、なぜ抗体遺伝子が効率よく DNA 切断を受けるのか、という疑問に答え、本来の抗体遺伝子多様化の分子メカニズムを解明することを目的とする。

RNAi 依存的 DNA 切断現象は未だ報告されておらず、本研究の独創性・新規性は高い。本研究で取り組む転写によるゲノム不安定化の仕組みは、RNA 干渉に起因しながらも、最終的に DNA 切断を誘導する初めての系であり、RNA 干渉の先に起きうる DNA に対する作用機構を初めて明らかにする挑戦的なものである。

申請者はこの RNAi 依存的 DNA 切断現象から引き起こされる細胞死を種々の細胞を用いて検討し、標的配列のノックアウト細胞では起きないことから配列依存性を、さらに抗体遺伝子 ncRNA が転写されていない大腸がん細胞や線維芽細胞では起きないことから転写依存性を証明した。また、ヒト細胞とマウス細胞とでは抗体遺伝子 ncRNA の配列が異なるため RNAi は異なる配列を使用した。それぞれにおいて同等に細胞死を誘導した。一つの ncRNA に対して ASO

配列は異なる配列を複数作成したが、ncRNA の減少程度に応じて細胞死を誘導した。構成的に発現する GAPDH や、B 細胞で高発現する ncRNA の malat1 に対する ASO はこのような DNA 切断を誘導しない。抗体遺伝子は、B リンパ球特異的なクロマチン構造か、または DNA 切断部位に一致する ncRNA 転写単位の配列に起因する、転写依存的脆弱性につながる未知の特徴が賦与された特異な領域であると考えられる。

このような転写依存的なゲノムの脆弱領域の特徴の解明は学術的に意義深いだけでない。ゲノム不安定化から細胞死を引き起こす ASO は B リンパ球増殖制御を通じて B 細胞リンパ腫や自己免疫疾患の治療薬創製に結びつく可能性が高く、将来の波及効果が期待される。

3 . 研究の方法

これまでに B 細胞リンパ腫 CH12 細胞などを用いて ASO が DNA 切断頻度を上げること、CSR と SHM が増加、ヒストン修飾が変化、R-loop 構造頻度が減少、Top1 により DNA が切断されることを同定した。AID ノックアウト細胞でも転写依存性に DNA 切断が起きることも証明し、これら予備的な知見から、ASO による RNA 分解が Top1 による DNA 切断を誘導するとの仮説を立てた (右図)。

本研究では、ASO を利用するトラップ法、ChIP 法、定量 PCR 法、次世代シーケンス法、質量分析を組み合わせ、転写依存的 DNA 切断の分子構造的特徴を明らかにする。さらに、原子間力顕微鏡により RNAi 依存的 DNA 切断現象を可視化して時空間的に解析し、Top1 による DNA 切断メカニズムを解明する。

[平成 31 年度] (1) 切断 DNA 領域のクロマチン構造

ヒストン修飾変化の ChIP による解析：複数のヒストン修飾を通して DNA 領域の機能特定を試みる。申請者らは、RNAi による変化が転写抑制的な H3K9me2 だけでなく転写活性化的な H3K4me3 の蓄積もあることを予め検出した。今後さらに多様な修飾体について詳細に検討し、抗体遺伝子の複数のヒストン修飾組み合わせの特色を明らかにする。

(2) 切断 DNA 領域に集積するタンパク質・RNA の解析

切断 DNA 領域に形成されるタンパク質・RNA 複合体の単離：抗体遺伝子に特異的なクロマチン構成因子を同定するために行う。DNA 切断活性を欠くが結合能を持つ Cas9 酵素 (3xFLAG タグ付き) と guideRNA とを用いて ChIP を行う enChIP 法により、ASO による切断 DNA 領域に特異的なタンパク質・RNA 複合体を分離する (Fujita et al., Gene Cell 21,370, 2016)。タンパク質は質量分析により同定する。RNA は次世代シーケンス法により解析する。

候補タンパク質・RNA の確認と機能検証:得られた候補タンパク質に対する抗体を用いた ChIP 解析で再現性を確認し、さらに当該タンパク質のノックダウンや過剰発現により抗体遺伝子組換えにおける機能を検証する。候補 RNA についても同様に機能を検証する。

[平成 32 年度以後] (3) 抗体遺伝子 non-coding RNA に結合するタンパク質の解析

抗体遺伝子 noncoding RNA を出発点に結合するタンパク質を単離する手法により DNA 切断に対して促進的または阻害的に機能する NonB DNA 構造の安定化・不安定化因子を探索する。

相互作用タンパク質の単離：noncoding RNA に結合するタンパク質をホルムアルデヒドで固定、noncoding RNA をビオチン化プローブで濃縮、得られたタンパク質分画を質量解析する ChIRP-MS 法により、抗体遺伝子 noncoding RNA に特異的に集積するタンパク質を単離する (Chu et al., Cell 161:404, 2015)。(2)- と同様に候補因子の機能を検証する。

(4) DNA 二次構造の Non-B 化解析

繰り返しを含む DNA 配列に転写が起きるだけで典型的な DNA 二重らせん構造(B 構造)が変化し Non-B 構造となることは必然であり、ASO による二次構造のさらなる変化は DNA 切断の分子メカニズムにつながる可能性が高い。

非変性 Bisulfite 法による Non-B 構造解析: 未変性 DNA を用いた bisulfite 法で DNA の一本鎖への変化を検出する。

Psoralen 法による Non-B 構造解析: ピオチン化ソラレンはらせん状態のゆりみ変化に応じて DNA に入り込み長波長 UV 照射によりクロスリンクされる。精製・破碎した DNA をストレプトアビジンビーズで濃縮し、遺伝子領域ごとに DNA 量を比較することで領域特異的な二次構造の変化を捉えうる (Naughton et al., Nat Struct Mol Biol 20:387, 2013)。

(5) Top 1 と LNA-ASO による DNA 切断の原子間力顕微鏡観察

通常の RNAi では誘導され得ない抗体遺伝子の DNA 切断のメカニズムについて、時空間的作用機序を明らかにする。R-loop が減少するにも関わらず DNA 切断頻度が上がる分子機序はこれまでの知見に反しており、分子動態の推測が不可能である。DNA・RNA の三次元構造とその切断酵素との立体関係の時間的変化を画像として観察することによって解明できる。時空間的分解能をもつ原子間力顕微鏡で DNA 二本鎖の巻き戻し状態と RNA、切断酵素との三次元的位置関係、経時的なこれら分子の相互作用変化や構造変換を観察する。

4. 研究成果

上記5項目のうち、切断 DNA 領域のクロマチン構造、切断 DNA 領域に集積するタンパク質・RNA の解析、抗体遺伝子 non-coding RNA に結合するタンパク質の解析について成果を上げることができた。

抗体遺伝子組換えはクラススイッチ組換えにおいて DNA 切断段階と、DNA シナプス形成を経て修復に至る2段階に別れるが、その DNA 切断の段階に必須の核内環境として、レトロトランスポゾン由来 RNA が重要であることを新たに発見した。まずは抗体遺伝子 noncoding RNA の機能を解析するため、これに対するプローブを用いた RNA-FISH 法を行ったところ、IgM に対応するスイッチ領域 Sm に一致するように抗体遺伝子周辺の比較的大きな RNA 濃縮体が核膜や核仁からやや離れた転写活性化領域に分布することを発見した。IgA に対応するスイッチ領域 Sa に一致する RNA 濃縮体は AID の活性化前は1箇所であるが刺激後に2箇所になり、AID の刺激依存的に転写が上がると考えられた。さらに AID のノックアウトマウス由来脾臓 B 細胞では Sm と Sa 領域は近い場所にあるものの決して融合しないが、野生型マウス B 細胞では融合が認められ、抗体遺伝子の組換えを反映した動態を示し、手法的に全く新しい抗体遺伝子の動態評価法を確立することができた。染色体 DNA は核内で転写活性化レベルに応じて分布すると考えられ、霊長類 Alu 反復配列は転写活性化領域に広く局在し、しかも Alu 配列由来 RNA は核仁の形態維持に必要である。そこで Alu 配列のような核内構造の制御に必須の DNA 由来 RNA が同様に個々の遺伝子の転写活性化に影響する可能性を考え、Alu と相同性の高いげっ歯類 B1 反復配列のノックダウンを試みた。RNA-FISH 法で通常認められる抗体遺伝子周辺の比較的大きな non-coding RNA 濃縮体が観察されなくなり、一方、核内の転写活性化領域リピート配列レトロトランスポゾン由来の RNA 分子が切断 DNA 領域に集積する RNA として機能している可能性がある。さらに、hnRNP K は DNA 切断に重要な分子であるが、また Alu 配列を含む各種 RNA 配列に結合し、それら RNA の核内局在を制御することが報告されている。hnRNP K のノックダ

ウンにより、抗体遺伝子 noncoding RNA に対するプローブを用いた RNA-FISH 法で解析した抗体遺伝子の局在が核内転写活性化領域から非活性化領域に偏在してしまうことを発見した。抗体遺伝子 noncodingRNA に対するアンチセンスオリゴにより DNA 切断は増強するが、細胞の生存率を保つレベルでの使用では RNA 濃縮体のレベルには影響がなく、今後さらに条件を変えて検討する。さらに、hnRNP K とともに複合体を形成し、リピート RNA に好んで結合する一つの RNA 結合タンパク質が、AID 依存的な抗体遺伝子組換え現象の DNA 切断段階に必須であることも新たに発見した。この新たなタンパク質は hnRNP K とは独立に DNA 切断に必須であることから、hnRNP K とは別個の機能を持つと予想される。これらの独自性の高い発見が、さらに抗体遺伝子が組換え時に特別な核内環境を要求する条件を特定する契機になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yin, Z., Maki Kobayashi, Hu, W., Higashi, K., Begum, NA., Kurokawa, K. and Honjo, T.	4. 巻 117
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 USA	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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Husain, A., Xu, J., Fujii, H., Nakata, M., Maki Kobayashi, Wang, JY, Rehwinkel, J., Honjo, T. and Begum, NA	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 The EMBO Journal	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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0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 小林 牧
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 Special Seminar in Zhejiang University Medical Center（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------