

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06598

研究課題名（和文）DNA脱メチル化酵素による抗体遺伝子再編成制御メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of the regulatory mechanism of immunoglobulin gene rearrangements by DNA demethyltransferases

研究代表者

瀬尾 秀宗（Seo, Hidetaka）

東京大学・大学院総合文化研究科・講師

研究者番号：00561531

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）：本研究では、DT40細胞を用いてTETタンパク質による抗体遺伝子再編成機構について解析した。その結果、TET3欠損株で抗体遺伝子多様化が最も低下していること、さらに偽遺伝子領域のDNAメチル化が亢進していることを見出した。また、TETタンパク質の転写制御についても解析し、3種のTETが異なる遺伝子発現制御を担うことを明らかにした。またTETの二重変異株を用いた解析ではAIDの発現量低下が見られ、TETによるAIDの発現制御が示唆された。これらの結果は、TETタンパク質が抗体遺伝子座のDNAメチル化や関連因子の転写を介して抗体遺伝子再編成を制御していることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体遺伝子の再編成は、病原体の排除など、動物の免疫系にとって極めて重要なプロセスであるが、その染色体レベルの制御機構は依然として不明点が多い。本研究は、DNA脱メチル化酵素TETタンパク質に注目し、これによる抗体遺伝子再編成制御機構という新たな知見を得た点で、その学術的意義は高い。また、ニワトリの抗体遺伝子再編成とヒトの抗体遺伝子再編成のメカニズムは一部をシェアしているものの、完全に同一ではない。TETによる抗体遺伝子再編成がニワトリとヒトに共通しているのかどうかを知ることは、抗体遺伝子の進化を理解する上でも重要である。この意味でも、本研究は新たなパラダイムを拓いたと言える。

研究成果の概要（英文）：In this project, we analyzed the mechanism of immunoglobulin gene rearrangements by TET proteins using DT40 cells. We found that immunoglobulin gene rearrangements were most reduced in the TET3-deficient cells, and that DNA methylation in the pseudogene region was enhanced. We also analyzed the transcriptional regulation of TET proteins and found that the three TETs are responsible for different regulation of gene expression. Analysis using a double mutant cell of TET showed decreased expression of AID, suggesting the regulation of AID expression by TET. These results suggest that TET proteins regulate immunoglobulin gene rearrangements through DNA methylation at immunoglobulin locus and the transcription of the related factors.

研究分野：分子生物学、細胞生物学、免疫学

キーワード：DNAメチル化 クロマチン構造 相同組換え TETファミリータンパク質 抗体遺伝子

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化は重要なエピジェネティクス修飾の一つであり、発生や分化などにおいて重要な役割を果たしている。特に転写制御への関与は数多くの報告があるが、その一方で抗体遺伝子再編成制御への DNA メチル化の関与は殆ど明らかになっていない。DT40 細胞は抗体遺伝子再編成は抗体遺伝子再編成研究のモデル細胞として一般的である。本研究では、DNA メチル化の役割を明らかにする目的で、申請者らは DNA 脱メチル化酵素 TET(Ten-Eleven-Translocation)ファミリーに属する TET1~3 のノックアウト細胞を DT40 細胞で作製し、抗体遺伝子再編成制御における TET の機能解析を行う。

2. 研究の目的

DNA メチル化は重要なエピジェネティクス修飾の一つであり、発生や分化などにおいて重要な役割を果たしている。特に転写制御への関与は数多くの報告があるが、その一方で抗体遺伝子再編成制御への DNA メチル化の関与は殆ど明らかになっていない。申請者はこれまでに、鳥類免疫系細胞である DT40 細胞を用いて染色体構造による抗体遺伝子再編成制御機構を研究してきた。DT40 細胞は抗体遺伝子再編成が継続的に起きていることで知られ、抗体遺伝子再編成研究のモデル細胞として一般的である。そこで DNA メチル化の役割を明らかにする目的で、申請者らは DNA 脱メチル化酵素 TET ファミリーに属する TET1~3 を DT40 細胞でノックアウトした結果、TET3 のノックアウトにより、抗体遺伝子再編成頻度が低下することを明らかにした。本研究では、抗体遺伝子再編成制御における TET3 の機能解析を通し、DNA メチル化の役割を明らかにする

3. 研究の方法

DT40 細胞を用いて作製した TET 欠損株において、抗体遺伝子可変領域の配列解析を行い、遺伝子再編成が起きているかどうかをサンガー法で解析した。得られた配列データから、DNA 解析ソフトウェアにより偽遺伝子の同定を行った。また、DNA のメチル化状態はバイサルファイト法により解析した。様々な遺伝子の転写量は、RT-qPCR で定量した。TET の二重変異株は、単独の変異株に対し、さらに2つ目の TET 遺伝子をノックアウトすることで作製した。

4. 研究成果

これまでの研究で、DNA 脱メチル化酵素 TET ファミリータンパク質に属する因子の一つである TET3 のノックアウト DT40 細胞で、抗体遺伝子座における相同組換えの頻度が低下することを示す結果を得ていた。本現象のメカニズムをより詳細に明らかにする目的で、まず TET3KO 株の抗体遺伝子座の配列解析を実施した。その結果、野生株と比較し、使用される偽遺伝子の数に顕著な減少が見られることが明らかになった (図 1。「ψ8」などは偽遺伝子の番号。)。このことは、TET3 のノックアウトは偽遺伝子の選択の過程にも関与している可能性を示唆している。また、TET3 は DNA 脱メチル化酵素であることから、TET3 ノックアウト株における抗体遺伝子座のメチル化状態の解析を行った。解析手法としては DNA メチル化の標準的解析法であるバイサルファイト法を用いた。抗体遺伝子座と、抗体遺伝子座の変異導入に必須であるとされるシス領域について調べたが、TET3 ノックアウト株においてメチル化レベルが有意に上昇しているものの、絶対的な DNA メチル化レベルは基底レベルであった。そこで、偽遺伝子領域の DNA メチル化パターンを解析したところ、偽遺伝子領域において顕著に DNA メチル化レベルが上昇していることが判明した (図 2)。興味深いことに、この DNA メチル化は非 CpG 配列中のシトシンに生じていることも示された。メチル化非 CpG シトシンは、MeCP2 (methyl-CpG binding protein 2) との結合能があり、ヘテロクロマチン状態を誘導する

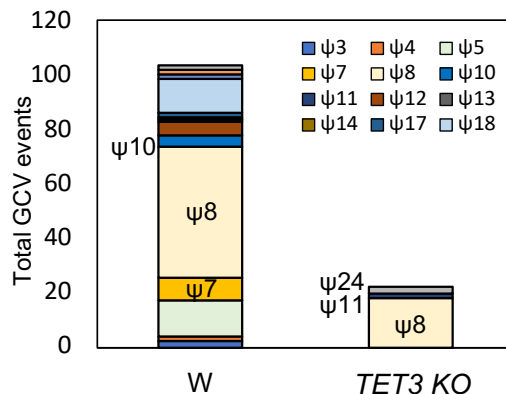


図 1: 偽遺伝子の使用パターン

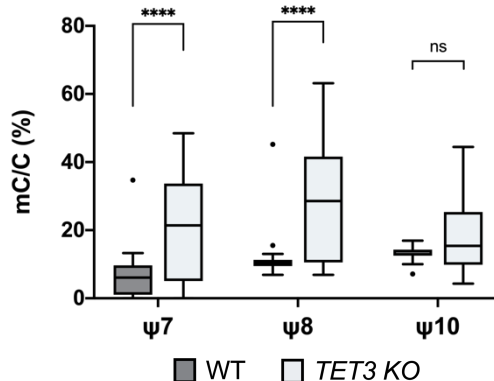


図 2: 偽遺伝子領域の DNA メチル化

可能性がある。以上から、DT40 細胞の抗体遺伝子多様化には TET3 が中心的に関与し、偽遺伝子領域のメチル化・脱メチル化を介して制御している可能性が示唆された。

TET ファミリーの抗体遺伝子多様化機構における機能をさらに明らかにする目的で、TET1・TET2 二重欠損株の解析を行った。その結果、TET1・TET2 二重欠損株では TET3 遺伝子の発現量が低下していることが明らかになった。次に、TET1・TET3 二重欠損株の解析も行い、TET1・TET3 二重欠損株においては TET2 遺伝子の発現量が低下していることが分かった。すなわちいずれの二重欠損株においても、残った TET 遺伝子の発現量が低下していた。こうした結果は、TET タンパク質同士がお互いに直接的あるいは間接的に転写制御を行っている可能性を示唆している。他に、これらの二重欠損株においては抗体遺伝子関連因子やクロマチン関連因子の発現量を解析したところ、一部の因子で顕著な発現低下が起きていることが明らかになった。これまでに得られた結果は、TET ファミリータンパク質が偽遺伝子領域の DNA メチル化を制御のみならず、トランス因子(さらには TET ファミリー自身も)の転写に関与することで、抗体遺伝子の多様化の制御を行っていることを示唆するものと言える。

二重欠損株における TET タンパク質の発現低下は、ゲノム中の 5hmC 量の低下を伴うもので、TET1・TET2 二重欠損株、TET1・TET3 の二重欠損株のいずれにおいても DNA の脱メチル化反応が阻害されていると考えられたが、TET1・TET2 二重欠損株、TET1・TET3 二重欠損株では抗体遺伝

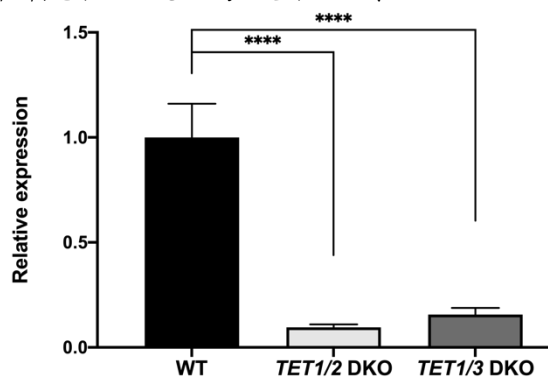


図 3: 二重欠損株における AID 発現

子座の転写量は減少しておらず、TET1・TET3 欠損株においては野生株と有意差がなかった。さらに、いずれの二重欠損株においても、ジーンコンバージョンや体細胞高頻度突然変異、さらにはクラススイッチ組換えのトリガーとなる因子として知られ、シチジンデアミナーゼの一種である AID (activation induced deaminase) の発現が低下していることが明らかになった (図 3)。AID のプロモーター領域の DNA メチル化状態を解析したが、野生株といずれの二重欠損株との間に顕著な変化は確認されなかった。近年、TET タンパク質がエンハンサー領域の DNA メチル化を制御している例が報告されている。本研究の結果は、TET タンパク質が AID のエン

ハンサー領域を制御している可能性を示唆していると考えられることから、今後はこうした点を解析していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Masuda Hitomi, Sawada Atsushi, Hashimoto Shu-ichi, Tamai Kanako, Lin Ke-Yi, Harigai Naoto, Kurosawa Kohei, Ohta Kunihiro, Seo Hidetaka, Itou Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Fast-tracking antibody maturation using a B cell-based display system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mAbs	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） 10.1080/19420862.2022.2122275	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 Takamura Natsuki, Seo Hidetaka, Ohta Kunihiro	4. 巻 26
2. 論文標題 TET3 dioxygenase modulates gene conversion at the avian immunoglobulin variable region via demethylation of non CpG sites in pseudogene templates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 121 ~ 135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12828	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 Seo Hidetaka, Masuda Hitomi, Asagoshi Kenjiro, Uchiki Tomoaki, Kawata Shigehisa, Sasaki Goh, Yabuki Takashi, Miyai Shunsuke, Takahashi Naoki, Hashimoto Shu-ichi, Sawada Atsushi, Takaiwa Aki, Koyama Chika, Tamai Kanako, Kurosawa Kohei, Lin Ke-Yi, Ohta Kunihiro, Nakazaki Yukoh	4. 巻 18
2. 論文標題 Streamlined human antibody generation and optimization by exploiting designed immunoglobulin loci in a B cell line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular & Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 1545 ~ 1561
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41423-020-0440-9	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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀬尾秀宗
2. 発表標題 抗試験管内ヒト抗体作製技術「ヒトADLibシステム」の開発
3. 学会等名 第1回日本抗体学会設立記念学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田瞳, 浅越健二郎, 橋本修一, 澤田篤志, 高岩亜希, 小山智加, 玉井加奈子, 黒澤恒平, 林克儀, 太田邦史, 瀬尾秀宗
2. 発表標題 「試験管内ヒト抗体作製技術「ヒトADLibシステム」の開発」
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田瞳、浅越健二郎、橋本修一、澤田篤志、高岩亜希、小山智加、玉井加奈子、黒澤恒平、林克儀、太田邦史、瀬尾秀宗
2. 発表標題 ヒト抗体作製技術「ヒトADLibシステム」の開発と次世代抗体医薬開発への展望
3. 学会等名 日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------	---------