

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440007

研究課題名(和文) AID依存性RNA編集により誘導される、トポイソメラーゼ1を介したゲノム不安定性

研究課題名(英文) Genomic instability by Topoisomerase 1 induced by AID-dependent RNA editing

## 研究代表者

小林 牧 (Kobayashi, Maki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20400690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：AIDによるトポイソメラーゼ1 (Top1)翻訳の制御を証明するため、miRNAの変化とTop1 mRNAの制御受容部位を解析した。Top1 3'UTRをノックアウトした細胞を作成したが予想に反し、免疫グロブリン遺伝子組換えは消失せず、コード領域がターゲットされていると考えられた。

一方、AID活性化後の免疫グロブリン(Ig)遺伝子切断の責任酵素であることを、プロテアソーム阻害剤(発表済)や新規Top1阻害剤(発表準備中)を用いて確証を増やした。また、Top1とGFPの融合タンパク質のトラッピング法からBRG1存在下にTop1がFACTを介しIg遺伝子のH3K4me3に集積することを発見した。

研究成果の概要(英文)：In order to identify the responsive site in Topoisomerase 1 (Top1) mRNA to AID, Top1 3'UTR knockout cells were generated from CH12 B lymphoma cells. Unexpectedly class switch recombination in these knockout cells was not abolished supposing that coding region of Top1 mRNA is the target of AID's regulation.

On the other hand, Top1's involvement in DNA cleavages in immunoglobulin (Ig) gene was further clarified by the proteasome inhibitor and the novel Top1 inhibitors. Additionally by Top1-GFP fusion protein and trapping by GFP, it is elucidated that FACT enrolls as an adopter molecule between Top1 and H3K4me3, modified histone with help of BRG1.

研究分野：分子生物学

キーワード：トポイソメラーゼ1 AID ゲノム不安定性

1. 研究開始当初の背景

miRNA は個体発生過程やがんなどの疾患発症などに関与する。一方、Activation-induced cytidine deaminase (AID) (1) は染色体転座や遺伝子突然変異を誘発し、遺伝子不安定性を導く潜在的発がん因子であるが、我々はB細胞中の免疫グロブリン遺伝子が再構成される過程において、AID 依存的に Topoisomerase I (Top1) のタンパク質翻訳が減少するために DNA の二次構造が複雑化することを突き止めた。

2. 研究の目的

この Top1 の減少は AID 依存的な miRNA の Top1 mRNA へのリクルートによると考えられる知見を得たため、AID による量的・質的な miRNA の変化を実証することを目的とした。

3. 研究の方法

PAR-CLIP 法により Top1 mRNA と Ago2 との相互作用領域を決定し、さらに、BrU ラベル RNA プローブを合成し、Ago2-miRNA trap 法を行い、10 塩基以下の精度で miRNA が結合しうる Top1 mRNA 配列を決定する。このターゲット配列から候補となる miRNA を予測し、miRNA 阻害や過剰発現を用いてクラススイッチ効率への影響を評価する。AID を活性化した脾 B リンパ球からの核 RNA 分画を材料に、それらの primary RNA 領域をシークエンス解析し、AID による editing を同定する。

4. 研究成果

AID による DNA 切断にはタンパク質合成が明確に必要ではないことをシクロヘキシミドを用いて示した。

Top1 mRNA への AID の制御を明らかにするために、Top1 mRNA と Ago2 相互作用領域を PAR-CLIP 法、ルシフェラーゼ法、In vitro の Ago2-miRNA トラップ法を行い検索した。PAR-CLIP 法は AID 非依存的な Ago2 結合領域も示したが、明らかに AID 依存性の Ago2 結合領域が 3' UTR 領域の 5' 末端から 150bp 以内に 2 箇所認められた。ルシフェラーゼ法では、新たに CRISPR/CAS9 法により作成した AID ノックアウト CH12 細胞を用い、また、Top1 の転写制御領域を用いることにより、3' UTR 領域のやはり 150bp 以内に AID による制御に重要な領域を同定した。一方、In vitro 法である Ago2-miRNA トラップ法は、coding 領域の 3' 側 100 塩基が AID の制御に必要なものと推測され、全ての結果が一致したわけではなかった。

Top1 3' UTR 領域が AID による制御には最も重要と考えられたため、Top1 の 3' UTR ノックアウト細胞を作成した。全般的に Top1 3' UTR のノックアウト細胞では、Top1 mRNA が野生型細胞と比較して 10 倍以上増えており、分解が遅くなっていると考えられた。翻訳の増加を明らかにするために、ポリソーム分画法を用いてシヨ糖密度勾配中の Top1 mRNA の分布を解析した。Top1 mRNA

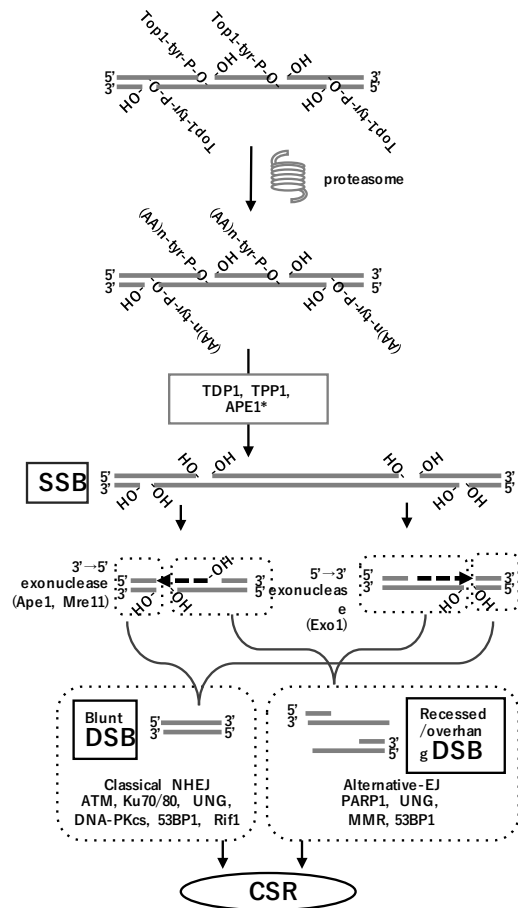
の 3' UTR ノックアウト細胞中での分布は野生型と比較すると特に重い分画（翻訳が高度の分画）で高度に増加していた（コントロールとして b2 ミクログロブリン mRNA の分布と比較）。

ところが予想に反し、ノックアウト細胞のクラススイッチ組換えは消失しなかった。このことから、AID の制御は Top1 mRNA の 3' UTR ではなく、coding 領域にあると考え、さらに coding 領域の解析を継続している。

また、Top1 の特定リジン残基の Sumo 化が、Top1 の分布に影響をあたえることが他のグループから報告され、RNA すなわち転写領域への Top1 の分布のみが AID により制御されている可能性が出てきた。これを検証するために、Top1 の発現量が低い P388/CPT45 細胞株へ sumo 化変異体を導入する実験を追加している。

種々の miRNA 解析(次世代シーケンシング、Ago2 結合 miRNA の解析、miRNA アレイ) から AID により制御された miRNA の候補と考えられる miR-92a は AID の存在下で CSR や SHM の効率を高めることを確認した。さらに AID の非存在下で AID に取って代わる機能を持つか否かを検討した。SHM の頻度は低いものの、AID ノックアウト細胞でも免疫グロブリン遺伝子の S 領域に SHM を起こした。これを更に検証するために cMyc-IgH 遺伝子間の転座への miR-92a の効果について検討中である。

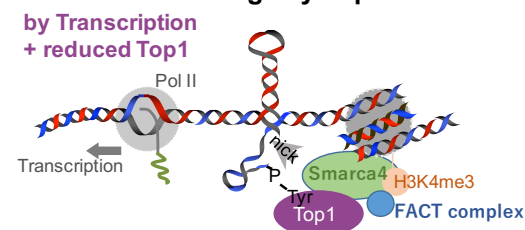
DNA cleavage by Top1



一方、AID 活性化後の免疫グロブリン (Ig) 遺伝子切断の責任酵素であることを、トポイソメラーゼ分解阻害剤であるプロテアソーム阻害剤 (発表済) や新規トポイソメラーゼ 1 阻害剤 (発表準備中) を用いて確証を増やした。Top1 の分解機構プロテアソームの阻害剤もクラススイッチを抑制することから、Top1 の分解過程が DNA break のプロセッシングに必要であることを示した。APE1 は DNA 脱アミノ化では DNA 切断を創出するのに必須の**はず**であるが、APE1 ノックアウト細胞においては AID 作用後に DNA 切断が起きており、APE1 は DNA 切断後の DNA 断端のプロセッシングに働くことを示した (上図参照)

また、トポイソメラーゼ 1 と GFP の融合タンパク質のトラッピング法から BRG1 存在下にトポイソメラーゼ 1 が FACT を介して Ig 遺伝子のヒストン修飾 H3K4me3 に集積することを明らかにした (下図参照)。

### Irreversible cleavage by Top1-cc



### 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 7 件)

(1) Husain A, Begum NA, Taniguchi T, Taniguchi H, Kobayashi M and Honjo T. Chromatin remodeler SMARCA4 recruits topoisomerase 1 and suppresses transcription associated genomic instability. *Nat. Comm.* 7, 2016, Article number 10549.

(2) Takeuchi M, Fuse Y, Watanabe M, Andrea C-S, Takeuchi M, Nakajima H, Ohashi K, Kaneko H, Kobayashi-Osaki M, Yamamoto M, Kobayashi, M. LSD1/KDM1A promotes hematopoietic commitment of hemangioblast through downregulation of Etv2. *PNAS USA*, 112:13922-7. 2015

(3) Xu J, Husain A, Hu W, Honjo T and Kobayashi M. APE1 is dispensable for S region cleavage but required for its repair in class switch recombination. *PNAS USA*. 111:17242-7, 2014. doi: 10.1073/pnas.1420221111

(4) Nguyen T, Xu J, Chikuma S, Hiai H, Kinoshita K, Moriya K, Koike K, Marcuzzi GP, Pfister H, Honjo T, and Kobayashi M. Activation-induced cytidine deaminase is dispensable for virus-mediated liver and skin tumor development in mouse models. *Int Immunol*. 26:397-406, 2014. doi:10.1093/intimm/dxu040

(5) Sabouri S, Kobayashi M, Begum NA, Xu J, Hirota K, Honjo T. C-terminal region of activation-induced cytidine deaminase (AID) is required for efficient class switch recombination and gene conversion. *PNAS USA*. 2014. 111:2253-2258. doi:10.1073/pnas.1324057111

(6) Suzuki M, Kobayashi-Osaki M, Tsutsumi S, Pan X, Ohmori S, Takai J, Moriguchi T, Ohneda O, Ohneda K, Shimizu R, Kanki Y, Kodama T, Aburatani H, Yamamoto M. GATA factor switching from GATA2 to GATA1 contributes to erythroid differentiation. *Genes to Cells*. 2013. 18:921-933.

(7) Huong LT, Kobayashi M, Nakata M, Shioi G, Miyachi H, Honjo T, and Nagaoka H. In vivo analysis of Aicda gene regulation: a critical balance between upstream enhancers and intronic silencers governs appropriate expression. *PLoS ONE*. 2013, 8(4): e61433. doi:10.1371/journal.pone.0061433

[学会発表] (計 7 件)

(1) Kobayashi M, Wakaguri H, Shimizu M, Higasa K-I, Matsuda F and Honjo T. Immunoglobulin gene diversification by activation-induced cytidine deaminase (AID) through Topoisomerase 1 (Top1). *BMB2015*. (口頭発表とポスター発表) 2015. 12. 1-4. 神戸ポートアイランド

(2) Kobayashi M, Wakaguri H, Shimizu M, Higasa K-I, Matsuda F and Honjo T. Immunoglobulin gene diversification by activation-induced cytidine deaminase (AID) through Topoisomerase 1 (Top1). The 2nd IFOM-Kyoto University Joint Symposium. 2015. 10. 6-7. 京都大学芝蘭会館

(3) 小林 牧、本庶 佑、トポイソメラーゼ 1 を介した AID による免疫グロブリン遺伝子の多様化. 第 17 回 RNA meeting 2015. 7. 15-17. 札幌パークホテル

(4) Maki Kobayashi, Jianliang Xu, Tasuku Honjo. **Immunoglobulin gene diversification by activation-induced cytidine deaminase (AID) through Topoisomerase 1 (Top1)**. The Golden Anniversary of B Cells Discovery. Keystone Symposia, Fairmont Banff Springs, Banff, Canada

(5) (招待講演) Maki Kobayashi. **AID-regulated Topoisomerase 1 is the DNA cleaving enzyme during immunoglobulin diversification**. Kyoto University & National Taiwan University Symposium, Parallel Session in Medicine. 2014. Kyoto

(6) Maki Kobayashi, Masayuki Shimizu, Koichiro Higasa, Fumihiko Matsuda and Tasuku Honjo. **AID regulates Top1 translation by changing miRNA loading to Top1 mRNA.** Frontiers in Immunology 2014, Novel Forum, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

(7) Maki Kobayashi, Masayuki Shimizu, Koichiro Higasa, Fumihiko Matsuda and Tasuku Honjo. **Activation-induced cytidine deaminase regulates Topoisomerase1 protein by miRNA during immunoglobulin gene recombination.** Poster # HGM2013-ICG-1590 Joint Conference of HGM 2013 and 21st International Congress of Genetics. Singapore

[図書] (計 1 件)

Nasim A. Begum, Hithoshi Nagaoka, Maki Kobayashi and Tasuku Honjo. Molecular Mechanism of AID Function. Chapter 18 in *Molecular Biology of B cells*, Edited by F. Alt, T. Honjo, A. Radbruch and M. Reth. Academic Press, London, UK. 2015

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 牧 (KOBAYASHI, Maki)  
京都大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：20400690

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：