

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460580

研究課題名(和文) B細胞最終分化系譜における非コードRNA発現制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of non-coding RNA regulatory mechanism in B cell terminal differentiation

研究代表者

前田 和彦 (Maeda, Kazuhiko)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：20332869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：獲得免疫を担う抗体は、多様な抗原に対してレパートリーを備えている。抗体産生B細胞は、胚中心B細胞を起点に記憶B細胞あるいはプラズマ細胞へと分化するが、どのような仕組みで抗体産生能を長期維持しているのかは明らかではない。この過程では、成熟B細胞で特異的発現する活性型シチジン脱アミノ化酵素(AID)を介した分子制御機構が必須である。研究では、AIDのcofactorとしてタンパク質、DNA、RNAレベルで関連するGANPに着目し、GANPのアクセスゲノム領域と結合RNA群を明らかにすることができた。本研究の成果より、GANPによって制御を受ける細胞内RNAに関する分子基盤を開示することができた。

研究成果の概要(英文)：Antibodies responsible for adaptive immunity have a variety of repertoires against diverse antigens. Although antibody-producing B cells differentiate into either memory B cells or plasma cells from germinal center B cells, however, it is not clear what kind of mechanism maintains antibody production ability for a long time period. In this process, a molecular regulation mechanism via activation-induced cytidine deaminase (AID), which is specifically expressed in mature B cells, is essential. In this research, we focused on GANP molecule, which is relevant to the protein, DNA and RNA level as a cofactor of AID, and it was possible to clarify the access genomic region and the GANP binding various mRNA/miRNA. From the results of this research, we could disclose the molecular basis of intracellular RNA controlled by GANP.

研究分野：免疫学

キーワード：抗体 体細胞突然変異 RNA代謝 非コードRNA

1. 研究開始当初の背景

抗原刺激を受けた B 細胞は、末梢リンパ組織の胚中心において、免疫グロブリン(Ig)の V 領域に体細胞突然変異 (somatic hypermutation; SHM) の誘導、S 領域を介して IgM から IgG などの他のクラスへとスイッチ (class switch recombination; CSR) をする。SHM/CSR には活性型シチジン脱アミノ化酵素 AID による C U 変異導入が必須である。AID の B 細胞特異的発現調節機構の解析から、マイクロ RNA (miRNA) の役割が明らかとされつつある。miRNA の生合成過程では、一次転写産物 pri-miRNA から Drosha の作用によってヘアピン型構造の miRNA 前駆体 pre-miRNA が切り出され、核輸送因子 Exportin5 によって核外輸送される。Dicer は pre-miRNA のヘアピンを切断して成熟型二本鎖 miRNA にする。2010 年、Ramiro らによる成熟 B 細胞で発現する CD21-Cre 特異的 Dicer 欠損マウスの解析では、脾臓の辺縁帯 B 細胞の増加と濾胞 B 細胞の減少を示し、自己反応性抗体の増加が認められた。すなわち Dicer 依存性による miRNA 制御機構が後期 B 細胞分化に重要な役割があることが示された。さらに AID の発現ステージ特異的 Dicer 欠損マウスでは、胚中心 B 細胞ができない。miR-125b は胚中心 B 細胞の増殖細胞であるセントロプラストと休止 B 細胞であるセントロサイトにおける制御に関与する。AID mRNA の直接標的 miRNA として既に miR-155 や miR-181b が明らかとされている。B 細胞最終分化過程では、濾胞 T ヘルパー細胞の活性化に関わる制御、短期/長期生存プラズマ細胞への制御、記憶 B 細胞に関わる固有の miRNAs が存在すると考えられている。AID の発現を規定する機構及び B 細胞最終分化系譜には複数の miRNA による均衡的調節の存在が指摘されているが、その分子機構については明らかではない。

胚中心 B 細胞で高発現する GANP 分子は、高親和性抗体産生において重要な役割を担っている。申請者は GANP が AID と細胞質内で結合し標的 IgV 領域ゲノムへアクセスすることによって変異導入を増強することを報告した。B 細胞で GANP が AID の cofactor として機能することを見出した。

2. 研究の目的

獲得免疫を担う抗体は、多様な抗原に対してレパートリーを備えている。抗体産生 B 細胞は、胚中心 B 細胞を起点に記憶 B 細胞あるいはプラズマ細胞へと分化するが、どのような仕組みで抗体産生能を長期維持しているのかは明らかではない。この過程では、成熟 B 細胞で特異的発現する活性型シチジン脱アミノ化酵素 (AID) を介した分子制御機構が必須である。AID の cofactor として機能する GANP は、タンパク質、DNA、RNA レベルで AID を起点とした分子機構に関与することが示唆される。この研究の目的は、GANP の RNA 認

識に着目して、どのような仕組みで B 細胞最終分化系譜において miRNA/mRNA の発現変化を引き起こすのか、なぜ選択的 miRNA/mRNA の発現と核外輸送が行なわれているのかという分子基盤の解明を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 内在性 GANP 分子を検出する抗体の検証
- (2) 抗 GANP 抗体を用いたクロマチン免疫沈降シーケンス (Chromatin-immunoprecipitation sequence; ChIP-seq) 法による GANP アクセス領域の検出
- (3) 抗 GANP 抗体を用いた RNA 免疫沈降シーケンス (RNA-immunoprecipitation sequence; RIP-seq) 法による GANP 結合 RNA の検出
- (4) 抗 GANP 抗体を用いた miRNA 免疫沈降 (miRNA-immunoprecipitation; miRIP) 法による GANP 結合 miRNA の検出
- (5) 抗 GANP 抗体を用いた HITS-CLIP (high-throughput sequencing together with UV-crosslinking and immunoprecipitation) 法による GANP 結合 RNA の同定

4. 研究成果

- (1) GANP の N 末および C 末を認識する抗体を用いて、GANP siRNA によって内在性 GANP 分子の発現を抑制した細胞抽出液において、特異的バンドの消失を確認した。さらに、免疫沈降法によって分子量 210kDa の予測サイズのバンドを検出した。
- (2) ヒト Ramos B 細胞を用いた ChIP-seq 法を N 末と C 末に対する GANP 抗体でおこなった。それぞれの抗体は、78%及び 10%のカバレッジを示した。特に、C 末抗体には、異なる 4 つの染色体の上に有意に、GANP と結合性を示す配列が enrichment していることが認められたことから、何らかの選択性があることが示唆された。
- (3) RIP-seq の解析からは、約 1%のユニークヒット RNA を示した。RPKM 値 50 以上では、N 末抗体で約 45 遺伝子、C 末抗体で約 65 遺伝子であり、ほぼ共通に遺伝子がヒットしていた。その多くは非コード RNA や miRNA であった。
- (4) GANP 抗体およびコントロール IgG 抗体を用いて行なった miRIP 解析の結果から、約 80 の miRNA のうち、特定のクラスターを形成する miRNA が濃縮されている結果を得た。このクラスターが位置するゲノム領域は、ChIP-seq によって得られた領域と一部一致することを確認した。
- (5) RNA 認識モチーフ (RRM) を有する GANP は、RNA と直接結合することが考えられる。HITS-CLIP 法を構築して、結合 RNA を次世代シーケンサーで解析したとこと、これまでに得られた配列情報以上に、複雑多岐に及びる RNA 代謝制御機構の一端を見出すことができた。

得られた配列情報の生物学的意義と有意性について、更なる検証を進めている。

また、AID/APOEC および RNA 結合関連分子に関連する多くの知見を得られることができた。

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9件)

(1) Eid MMA, Shimoda M, Singh SK, Almofty SA, Pham P, Goodman MF, Maeda K, and Sakaguchi* N. (*corresponding author) Integrity of immunoglobulin variable region is supported by GANP during AID-induced somatic hypermutation in germinal center B cells. *Int. Immunol.* 査読有, in press, 2017.

DOI: 10.1093/intimm/dxx032

(2) Maeda K and Akira S. Regulation of mRNA stability by CCCH-type zinc finger proteins in immune cells. *Int. Immunol.* 査読有, in press, 2017.

DOI: 10.1093/intimm/dxx015

(3) Ikeda* T, Shimoda M, Ebrahimi D, VandeBerg J, Harris RS, Koito A, and Maeda* K. (*corresponding author). Opossum APOBEC1 is a DNA mutator with retrovirus and retroelements restriction activity. *Sci. Reports* 査読有, 7:46719, 2017.

DOI: 10.1038/srep46719

(4) Pham P, Afif SA, Shimoda M, Maeda K, Sakaguchi N, Pedersen LC, and Goodman MF. Activation-induced deoxycytidine deaminase: structural basis favoring WRC hot motif specificities unique among APOBEC family members. *DNA Repair (Amst)* 査読有, 54:8-12 2017.

DOI: 10.1016/j.dnarep.2017.03.007

(5) Maeda K and Akira S. TLR7 structure: Cut in Z-loop. *Immunity* 査読有, 45:705-707, 2016.

DOI: 10.1016/j.immuni.2016.10.003

(6) Pham P, Afif SA, Shimoda M, Maeda K, Sakaguchi N, Pedersen LC, and Goodman MF. Structural analysis of the activation-induced deoxycytidine deaminase required in immunoglobulin diversification. *DNA Repair (Amst)* 査読有, 43:48-56, 2016.

DOI: 10.1016/j.dnarep.2016.05.029

(7) Sakaguchi N and Maeda K. Germinal center B-cell-associated nuclear protein (GANP) involved in RNA metabolism for B cell maturation. *Adv. Immunol.* 査読

有, 131:135-186, 2016.

DOI: 10.1016/bs.ai.2016.02.003

(8) Ikeda* T, Ong EBB, Watanabe N, Sakaguchi N, Maeda* K, and Koito A. (*corresponding author) Creation of chimeric human/rabbit APOBEC1 with HIV-1 restriction and DNA mutation activities. *Sci. Reports* 査読有, 6:19035, 2016.

DOI: 10.1038/srep19035

(9) Eid* MMA, Maeda* K (*co-first author), Almofty SA, Singh SK, Shimoda M, and Sakaguchi N. GANP regulates the choice of DNA repair pathway by DNA-PKcs interaction in AID-dependent IgV region diversification. *J. Immunol.* 査読有, 192:5529-5539, 2014.

DOI: 10.4049/jimmunol.1400021

[学会発表](計21件)

(1) Maeda K, Singh SK, Shimoda M, Akira S, Sakaguchi N.、Role of selective regulation of noncoding RNA by mammalian RNA export factor GANP、Keystone Symposia Conference、Noncoding RNAs: From Disease to Targeted Therapeutics、2017年2月5日、Fairmont Banff Springs, Banff, Alberta, Canada

(2) Shimoda M, Maeda K, Akira S, Sakaguchi N.、Regulation of HIV-1 mRNA export by a host TREX-2 component GANP、第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月5日、沖縄、沖縄コンベンションセンター・ラグナガーデンホテル

(3) Shimoda M, Maeda K, Singh SK, Sakaguchi N, Akira S.、Impact of RNA export component GANP on nuclear transport in viral infection、The 16th International Congress of Immunology、2016年8月21日、Melbourne Convention and Exhibition Centre、Australia

(4) Maeda K, Singh SK, Shimoda M, Akira S., Sakaguchi N.、Selective regulation of noncoding RNA by mediating AID-interacting molecule GANP、The 16th International Congress of Immunology、2016年8月21日、Melbourne Convention and Exhibition Centre、Australia

(5) Singh SK, Shimoda M, Maeda K, Sakaguchi N.、GANP interacts c-myc gene and translation initiation factor 4E associated with Burkitt's lymphomagenesis、第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月18日、北海道、札幌コンベンションセンター

(6) 前田和彦, 下田真唯子, Singh SK, 阪口薫雄.、RNA 輸送複合体構成因子 GANP による RNA 制御. 2015 ゲノム支援拡大班会議、2015

年 8 月 27 日、京都、国立京都国際会館

(7) Shimoda M, Maeda K, Almofty SA, Singh SK, Sakaguchi N., GANP, a component of RNA export TREX-2 complex, is involved in the retrotransposition regulation, 第 9 回日本エビジェネティクス研究会年会、2015 年 5 月 25 日、東京、学術総合センター橋講堂

(8) Maeda K, Shimoda M, Singh SK, Almofty SA, Eid MMA, Sakaguchi N., Regulation of selective non-coding RNA species involved in B-cell maturation by AID-interacting molecule GANP. Keystone Symposia Conference, The Golden Anniversary of B Cell Discovery, 2015 年 3 月 22 日、Fairmont Banff Springs, Banff, Alberta, Canada

(9) Shimoda M, Maeda K, Almofty SA, Singh SK, Eid MMA, Sakaguchi N., Mechanism of activation of LINE-1 retrotransposition in somatic cells, 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 10 日、京都、国立京都国際会館

(10) Almofty SA, Maeda K, Shimoda M, Singh SK, Eid MMA, Sakaguchi N., APOBEC3G-associated GANP in HIV-1 virion initially interacts with the viral integration complex and might regulate viral integration into the host genome, 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 10 日、京都、国立京都国際会館

(11) Eid MMA, Maeda K, Singh SK, Almofty SA, Shimoda M, Sakaguchi N., GANP plays a critical role in the final stage of immunoglobulin V-region somatic hypermutation for generation of high-affinity antigen-specific antibody, 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 10 日、京都、国立京都国際会館

(12) Maeda K, Almofty SA, Singh SK, Shimoda M, Eid MMA, Sakaguchi N., GANP takes part of the function of TREX-2 complex for exporting non-coding RNAs in B-cells. 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 10 日、京都、国立京都国際会館

(13) 前田和彦, Almofty SA, 下田真唯子, Singh SK, Eid MMA, 池田輝政, 小糸厚, 阪口薫雄., ヒト RNA 輸送 TREX-2 因子 GANP の HIV-1 抵抗性の分子機序, 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会、2014 年 12 月 3 日、大阪、大阪国際会議場

(14) Maeda K, Almofty SA, Shimoda M, Singh SK, Eid MMA, Sakaguchi N., HIV-1 virus causes disassembly of TREX-2 component GANP from nuclear pores to be taken with integrase in the virus entry process, The 10th China-Japan Joint Laboratory Workshop Pathogenesis, Gene Regulation

and Signal Transduction, 2014 年 11 月 15 日、Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

(15) Shimoda M, Maeda K, Almofty SA, Singh SK, Eid MMA, Koito A, Sakaguchi N., GANP that interacts with HIV-1 integrase inherently enhances retrotransposition, The 15th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2014 年 10 月 1 日、Hotel Nikko Kumamoto, Aso Resort Grandvrio Hotel, Japan

(16) Almofty SA, Maeda K, Shimoda M, Singh SK, Eid MMA, Koito A, Sakaguchi N., A TREX-2 component GANP is dispersed from the nuclear envelope during HIV-1 virus entry and associated with integrase in the host cell nucleus, The 15th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2014 年 10 月 1 日、Hotel Nikko Kumamoto, Aso Resort Grandvrio Hotel, Japan

(17) Maeda K, Almofty SA, Shimoda M, Singh SK, Eid MMA, Sakaguchi N., GANP-mediated APOBEC3G targeting in generation of non-infectious HIV-1viruses The 2nd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum, 2014 年 8 月 25 日、San Diego, La Jolla Institute for Allergy & Immunology, USA

(18) Sakaguchi N, Eid MMA, Singh SK, Almofty SA, Shimoda M, Maeda K., Role of GANP in the DNA repair for AID-induced somatic hypermutation generating high affinity antibodies, The 2nd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum, 2014 年 8 月 25 日、San Diego, La Jolla Institute for Allergy & Immunology, USA

(19) Maeda K, Singh SK, Shimoda M, Almofty SA, Eid MMA, Sakaguchi N. (2014) The specific role of TREX-2 component GANP in RNA metabolism, 2014 ゲノム支援拡大班会議, 2014 年 8 月 20 日、兵庫、神戸ポートピアホテル

(20) Shimoda M, Maeda K, Almofty SA, Singh SK, Eid MMA, Sakaguchi N., GANP plays a role in the LINE-1 life cycle in somatic cells, 第 8 回日本エビジェネティクス研究会年会、2014 年 5 月 25 日、東京、伊藤国際学術研究センター（東京大学構内）

(21) Singh SK, Maeda K, Eid MMA, Almofty SA, Shimoda M, Kawabata T, Sakaguchi N., Molecular mechanism of transcription and epigenetic alteration at immunoglobulin variable gene heavy chain locus induced by GANP, Immunology 2014 The American Association of Immunologists Annual

Meeting, 2014年5月2日、 Pennsylvania,
David L. Lawrence Convention Center、 USA

〔図書〕(計3件)

(1) 阪口薫雄、前田和彦、獲得免疫における
B細胞の研究、B細胞分化・活性化、そして
抗体親和性の分子機構、感染・炎症・免疫(羊
土社)6:36-44, 2016

(2)前田和彦、阪口薫雄、第6章「B細胞の分
化」、エッセンシャル免疫学 第3版(メデ
ィカル・サイエンス・インターナショナル,
147-172, 2016

(3)下田真唯子、前田和彦、阪口薫雄、免疫
グロブリンの体細胞高頻度突然変異誘導と
GANP、臨床免疫・アレルギー科(科学評論社)
61:472-479, 2014

〔その他〕

[http://hostdefense.ifrec.osaka-u.ac.jp/
ja/index.html](http://hostdefense.ifrec.osaka-u.ac.jp/ja/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 和彦 (MAEDA KAZUHIKO)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：20332869