

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05784

研究課題名(和文) AIDのRNA編集機構による抗体の多様化とゲノム不安定化の制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of immunoglobulin diversification and genome instability through 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) 156,500,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞内総RNA-seqを行い、AIDによるC to U編集候補を得た。AIDの共役因子hnRNP Kのモチーフ解析から抗体遺伝子多様化に必須のモチーフを同定した。トポイソメラーゼ1 (Top1) mRNAの3' UTRがAIDによるTop1翻訳抑制を媒介することを示した。Top1結合タンパク質としてSMARCA4を新たに発見、SMARCA4がTop1の抗体遺伝子へのリクルートに、FACTはTop1とH3K4me3に介在する機能を示した。SAMHD1は細胞内dNTPプールの制御を通じ、スプライシング因子Phf5aはクロマチン構造への影響により、DNA修復過程を効率化することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AIDは、ワクチンの有効性を保証する獲得免疫における抗体多様化とその記憶形成の中心酵素である。AIDはTop1を介して抗体遺伝子の体細胞突然異とクラススイッチを行う一方、ミスターゲットによるゲノム不安定性を誘発する。本研究の成果は、AIDによる感染防御のみならず、高親和性IgAの腸内細菌制御を通して代謝制御に関わる仕組み、Top1制御異常による遺伝子変異が様々な遺伝性神経疾患の原因になる仕組みの解明に寄与するものであり、今まで不明であった免疫異常による代謝制御や複製非依存性転写依存性ゲノム不安定化の背景を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：By intracellular total RNA sequencing for detection of RNA editing by AID, several C to U editing candidates were obtained. Motif analysis of hnRNP K, revealed GXXG and RGG motifs involved in antibody gene diversification which is useful for identifying C to U editing candidate. We showed that the 3' UTR of topoisomerase 1 (Top 1) mRNA mediates the repression of Top 1 translation by AID. In addition to FACT complex and H3K4, SMARCA4 was newly discovered as Top1 binding protein. We revealed that SMARCA4 is required for recruitment of Top1 to the antibody gene, and FACT functions as an adapter between Top1 and H3K4me3. While searching for factors that specifically accumulate in the S region, we analyzed the dNTPase, SAMHD1, and found for the first time the role that the intracellular dNTP pool plays in the DNA repair process of CSR. We also found that the splicing factor Phf5a is also a factor necessary for the DNA repair process.

研究分野：免疫ゲノム医学

キーワード：DNA切断 組換え 獲得免疫 免疫記憶

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1978年我々はクラススイッチ組換え(CSR)が遺伝子欠失を伴うDNA組換えによることを明らかにし、その後1982年までにその組換え機構をDNA構造変化として証明した。さらにクラススイッチ制御を行うサイトカインIL-4を発見し、IgAへ特異的にCSRを誘導できるCH12細胞株を確立した。これらの成果に基づき2000年にCSRと体細胞突然変異(SHM)を一元的に制御する酵素AIDを発見した。AIDはシチジン(C)脱アミノ活性を有し、RNA編集酵素APOBEC1との構造類似性からRNA編集酵素であろうと推測した。さらにAIDの機能にはCSRとSHMの両者に必要なDNA切断とCSRにのみ必要な組換えという2種類の活性が存在することをAID変異体を用いて明らかにした。AIDによるゲノム変異はG1期に起こり、DNA一本鎖切断から始まる。2009年にはAIDによるDNA切断はTop1による一本鎖切断から開始されること、またそのターゲット特異性には転写によるヘリックスの緩みから反復配列に起こるNon-B構造の形成、ならびに転写によって引き起こされるヒストン修飾が不可欠であることを明らかにした。すなわち、AIDはmiRNAのRNA編集によりTop1 mRNAの翻訳を抑制し、その結果Top1が低下するため転写が活発な反復配列領域でヘリックスの緩みによるNon-B構造形成が促進される。しかも、ヘリックスを修正しようとするTop1がDNAに結合したあとDNA構造の制約のため回転できず不可逆的に結合したままでDNA切断を生じることを提唱した。この間2002年にNeuberger等によってE.coli中やin vitroでのDNAのAIDによるC脱アミノ活性が検出されることからDNA脱アミノ酵素説が提唱された。この説ではAIDはDNA上のCを脱アミノしUを形成し、U/G mismatchesを生じるので、UNGとAPE1のBER酵素群でDNA切断が起こるとされた。現在もこの論争は続いているが、我々の最近の研究によりUNGとAPE1は、いずれもDNA切断に関わらずSHMには必須ではない。両者はDNA切断後の組換えに必要であることを証明した。一方、DNA切断モデルを支持する追加の証拠は得られていない。むしろ、E.coli中のDNA脱アミノ反応はRNA編集酵素APOBEC1によっても起こることが示され、生理的でないと考えられる。この分野の根幹的な発見はほとんど全て申請者らのグループによって行われており、独走的にリードしている。

2. 研究の目的

AIDは、ワクチンの有効性を保証する獲得免疫における抗体多様化とその記憶形成の中心酵素である。AIDはTop1を介して抗体遺伝子の体細胞突然変異とクラススイッチを行う一方、ミスターゲットによるゲノム不安定性を誘発する。本研究においてはAIDが共役因子hnRNP K依存的にmiRNAのRNA編集によりTop1の翻訳制御を行うメカニズムとTop1が抗体遺伝子特異的にDNA切断を行う仕組みを明らかにする。さらにAIDがcofactor hnRNP L依存的にmRNA編集を行い、産生されるタンパク質を同定し、その機能を解明する。AIDは高親和性IgAの腸内細菌制御を通して、代謝制御に関わると共にTop1制御異常による遺伝子変異が様々な遺伝性神経疾患の原因になる。従って本研究は獲得免疫の根幹メカニズムの解明に止まらず、免疫異常による代謝制御や複製非依存性転写依存性ゲノム不安定化の背景を明らかにする。

3. 研究の方法

1. AIDによるTop1 mRNA翻訳制御機構の解明

a) AIDとhnRNP K複合体に結合するmiRNA前駆体の同定

AIDによる抗体遺伝子DNA切断にはhnRNP Kが必要であることから、hnRNP K結合RNAの解析を行う。AIDの機能に重要なRNAを絞り込み、miRNAの前駆体にCからUへの変異を検出する。AID/hnRNP複合体に結合するmiRNA前駆体を基質としてin vitroでRNA編集反応を試みる。さらにその三者複合体によりAIDの安定化また結晶化を岩田想教授との共同研究で試みる。

b) Top1 mRNAに結合するmiRNAの同定

Ago 2 免疫沈降とRNA ligaseを用いるCLASH法またはTop1 mRNAに会合するビオチン化オリゴを用いてTop1 mRNA結合miRNAをトラップし次世代シーケンスにより同定する。

c) miRNA結合サイトの生理的な機能の解明

Top1 mRNA 3'UTRのAgo2結合部位がTop1 mRNAの翻訳抑制に関わることを確認するためにTop1 mRNA 3'UTR中のmiRNA結合部位周辺のCH12細胞欠損株や欠損マウスを作製し、AID依存性の抗体遺伝子組換えの変化をin vivoで検証、さらにB細胞にとどまらず、免疫能全体ひいては個体の高次機能に変化が出るか否かを検証する。

2. Top1 によるDNA 切断ターゲットの特異性決定機構の解明

a) Top1 結合タンパク質の同定と機能解析

Top1-GFP 融合タンパク質をTop1発現が極めて低いヒト細胞株(P388 / CPT45)に発現させ、GFPトラップ法によりTop1会合タンパク質を網羅的にプロテオミクスで解析する。これらタンパク質のTop1との直接結合および特異性決定におけるその機能を解析する。

b) S領域に結合するタンパク質やRNAの同定

CH12 細胞のS領域にLexA結合サイトを導入し、さらにLexAタンパク質を発現させる。ChIP法を用いてAID依存的にS領域周辺に集積するタンパク質のプロテオミクス解析を行い、S領域に集積するタンパク質の解析を行う。

c) AIDによる抗体遺伝子組換え特異性の解明

Top1のChIP-Seq法によるTop1の集積とビオチンme3-psoralenを用いたNon-Bのゲノムワイド分布と総合して抗体遺伝子特異性が決定されるという仮説を検証する。

3. DNA 切断後の修飾とゲノム不安定化の制御機構の解明

a) hnRNP L の役割の解明

hnRNP LはDNA切断に関与せず、CSR特異的に関わる。AIDとhnRNP Lの複合体の共沈を行い、結合したmRNAを次世代高速塩基配列決定法によって確定する。得られたmRNAの配列からゲノムと比較してCからUへの変異を確認する。

b) CSR における切断端プロセッシングと組換え機構の解明

Brd4やApe1の役割をsiRNA、ChIP法により明らかにする。

4. 研究成果

1. AIDによるTop 1 mRNA翻訳制御機構の解明

a) AIDとhnRNP K複合体に結合するRNA解析

まず、hnRNP K結合RNAの解析を行うに先立ち、hnRNP Kの中で特にAID依存的DNA切断に必須のモチーフを同定した。hnRNP Kに特徴的な3つのKHドメイン中のGXXGモチーフは特にCSRに必須であったが、一方、結合ドメイン中の5つのRGGモチーフはCSRにもSHMにも関与していた。他の組織でhnRNP Kに結合すると報告された候補因子のRNAについて免疫沈降法によりhnRNP Kとの結合を調べたところ、いくつかのDNA切断 / 修復タンパク質が同定できた。しかし、実際にそれら候補因子の細胞内タンパク質レベルがAIDの有無により変化するかを解析したが変化はなく、AIDの作用を説明するものは得られなかった。今後hnRNP Kの野生型と得られた変異体とで結合RNAを次世代シーケンス法により解析することが必要である。

AID / hnRNPK 2者複合体の結晶解析を試みたがタンパク質精製の段階で問題があり、結合RNAを介した複合体形成が必要であると考えられた。

b) Top1 mRNAに結合するmiRNAの同定

AIDの制御がTop1 mRNAの3'UTRであるか、あるいはコード領域であるかを確定するために、Top1 3'UTRのノックアウト細胞を作成し、そのCSRやSHMを解析した。両者とも低下しており、Top1 3'UTRはAIDによる制御を受ける領域と考えられた。候補miRNAとしてmiR-92aがCSRやSHMの効率に影響することを見出していたが、Top1 3'UTRノックアウト細胞にはmiR-92aノックダウンは影響を及ぼさず、AIDによるTop1 3'UTR制御はmiR-92a以外のものと考えられた。さらにビオチン化オリゴを用いてTop1 mRNA結合miRNAをトラップするRAP-RNA方法によりmiRNA同定を試みている。

C) RNA 編集の直接的証明

RNA 編集を直接証明する試みに挑んだ。AIDによる抗体遺伝子組換えを起こすB細胞の全RNAシーケンスを行い、AIDの有無により比較した。EspnをコードするRNAの特定のアイソフォームでRNA編集を発見した。EspnのノックダウンではCSRが上昇し、またC型アイソフォーム過剰発現がCSRを抑制、U型アイソフォーム過剰発現がCSRに影響しないことから、Espn RNAはAIDの機能を説明するものではないが、AIDを細胞内でトラップすること、低効率ながらも確かにAIDがEspn mRNAを編集すると考えられた。また、AIDの免疫沈降で得たAID結合RNAをシーケンスし、転写メディエーター複合体を構成する分子mRNAにRNA編集を認めた。当該分子はCSRに必要であり、そのRNA編集の機能を解析している。

AIDの免疫沈降を行い、結合したmRNAを次世代高速塩基配列決定法により解析したところ、転写メディエーター複合体関連因子のmRNA編集が検出された。転写メディエーター複合体は遠いエンハンサーとRNAP IIによるコード領域の転写を関連づける分子であるため、抗体遺伝子のシナプス形成と類似性があるのかもしれない。現在この候補分子について解析を進めている。

2. 抗体遺伝子非コードRNAの機能の解明

上述のごとく、3'UTR全てを他の遺伝子配列と置換しても低効率ながらDNA切断とCSRは起きていた。Top1のノックダウンを行ってもSHMが起きないことと合わせると、AIDはTop1の制御以外にも何らかの重要な作用によりDNA切断を起こしている。抗体遺伝子は非コードRNAが転写されない限りDNA切断が起きないため、非コードRNAの機能を探るためにノックダウンを行った。これによりAIDノックアウト細胞においてもDNA切断が起きたことから、AIDはCからUへの編集により非コードRNAを排除し、これが抗体遺伝子の特徴的なDNA配列に二次構造の変化をもたらす切断につながるという仮説を立てた。このDNA切断はTop1が切断酵素であること、この切断は配列特異的であること、マウス、ヒトによらず異なったS領域配列であっても同様にノックダウンにより抗体遺伝子DNA切断が惹起されることなど、抗体遺伝子の特異性を示す結果が得られた。今後抗体遺伝子非コードRNAは繰り返し配列に富むためRNA編集を証明するためには長鎖シーケンスを行う。

3. Top1 によるDNA 切断ターゲットの特異性決定機構の解明

a) Top1 結合タンパク質の同定と機能解析

Top1-GFP 融合タンパク質の免疫共沈法によりTop1に結合する多くの制御タンパク質を同定し、分類した結果、ヒストン修飾、mRNA プロセッシング、転写に關与するもの他にクロマチンリモデリング因子も同定された。以前に免疫グロブリン遺伝子のDNA切断に必要と同定されたFACT複合体、転写活性化マーカであるトリメチルH3K4及びATP依存性クロマチン変換酵素SMARCA4はすべて、機能的に重要なTop1との相互作用分子だった。すなわち、SMARCA4はTop1の免疫グロブリン遺伝子座へのリクルートを促進し、一方、FACT複合体はTop1をH3K4me3のヒストン修飾に引き寄せるアダプターとして働き、Top1によるDNA切断を可能にすることを発見した。

b) S領域に結合するタンパク質やRNAの同定

CH12 細胞の S 領域に LexA 結合サイトを挿入した細胞の ChIP 法を用いて S 領域に集積するタンパク質の解析を行なったところ、SAHMHD1 が検出された。詳細な解析の結果、SAHMHD1 は抗体遺伝子やクロマチン領域の特異性につながるものではなかったが、CSR 効率を左右するものであった。すなわち、ロックダウン法では CSR が下がったが、SAMHD1 ロックアウト細胞に種々の変異体でレスキューをかけることにより、dNTPase ドメインが重要であることが示された。dNTPase である SAMHD1 の欠損により細胞内 dNTP が過剰となり、DNA ポリメラーゼや DNA/RNA ヘリカーゼが阻害される結果、CSR における DNA 修復過程が特に障害されることを発見した。細胞内 dNTP プールの CSR への影響を初めて証明した。

4. DNA 切断後の修飾とゲノム不安定化の制御機構の解明

a) hnRNPL の役割の解明

hnRNPL について、AID 依存的な CSR に重要なドメインを同定したところ、hnRNPL は 4 つの RRM ドメインのうち第 2、第 3 ドメイン、特にベータシート構造を保つアミノ酸が CSR に重要であることを見出した。このドメインに結合する RNA に今後、解析対象を絞り込む。

b) CSR における切断端プロセッシングと組換え機構の解明

Phf5a または SF3b はスプライシング因子であるが、ロックダウンにより SHM に影響はないものの CSR が低下する。Phf5a は、ヒストン H2A パリアントの抗体遺伝子への集積を制御すること、この過程は別の因子 p400 にも依存し、Phf5a と p400 との協調作用により H2A パリアントの集積により非相同末端結合が促進されることを発見した。Phf5a が DNA 修復において重要な機能を持つ新たな発見であり、抗体遺伝子以外の非相同末端結合にも寄与すると考えられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Islam H., Kobayashi M. and Honjo T. Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) is dispensable for activation-induced cytidine deaminase (AID)-dependent somatic hypermutation in the immunoglobulin gene. *International Immunology*, dxz028 (2019)
2. Depletion of recombination specific co-factors by the C-terminal mutant of the activation-induced cytidine deaminase causes the dominant negative effect on class switch recombination. Ismail, A., Husain, A., Kobayashi, M., Honjo, T. and Begum, N. *International Immunology* 29 11 525-537 doi:10.1093/intimm/dxx061 (2017)
3. Accelerated Systemic Autoimmunity in the Absence of Somatic Hypermutation in 564Igi a Mouse Model of Systemic Lupus with Knocked-in Heavy and Light Chain Genes. McDonald, G., Medina, C., Pilichowska, M., Kearney, J., Shinkura, R., Selsing, E., Wortis, H., Honjo, T. and Imanishi-Kari, T. *Frontiers in Immunology*, September 2017, Volume 8, Article 1094
4. The novel activation-induced deoxycytidine deaminase (AID) mutants, AIDv and AIDvΔ15 are defective in SHM and CSR. Kobayashi, M., Takemoto, M. and Honjo, T. *DNA Repair* 53 (2017) 1-3
5. Functional requirements of AID's higher order structure and interaction with RNA-binding proteins. Mondal, S., Begum, N. A., Hu, W. and Honjo, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* E1545-E1554, Feb. 29, 2016 (2016)
6. Chromatin remodeler SMARCA4 recruits topoisomerase 1 and suppresses transcription associated genomic instability. Husain, A. Begum, N. A., Kobayashi, M. and Honjo, T. *Nature Communications* DOI: 10.1038/ncomms10549 (2016)

7. Identification of DNA cleavage- and recombination-specific hnRNP co-factors for Activation-induced cytidine deaminase. Hu, W., Begum, N. A., Mondal, S., Stanlie, A. and Honjo, T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112, 5791-5796 (2015)

〔学会発表〕(計 26 件、ここでは一部のみ記載した)

1. Ziwei Yin, Maki Kobayashi, Wenjun Hu, Nasim A. Begum, Tasuku Honjo. RNA-binding motifs of AID cofactor hnRNP K are necessary for inducing DNA breaks in IgH locus. The Keystone Symposia meeting on B Cells: Mechanisms in Immunity and Autoimmunity, 2018. June 20, 2018 Dresden, Germany.
2. Maki Kobayashi, Misao Takemoto, Nasim A. Begum and Tasuku Honjo. Function of S μ -germline transcripts in activation-induced cytidine deaminase (AID)-induced DNA breaks. The Keystone Symposia meeting on B Cells: Mechanisms in Immunity and Autoimmunity, 2018. June 19, 2018 Dresden, Germany.
3. Tasuku Honjo. Cancer immunotherapy by combination of small molecules with PD-1 blockade International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe 2017. 2017 年 1 月 26 日 神戸 (招待講演)
4. Maki Kobayashi and Tasuku Honjo. Topoisomerase 1 enrolls in diversification of Ig gene under the regulation of activation-induced cytidine deaminase (AID). International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe 2017. 2017 年 1 月 28 日 神戸 (招待講演)
5. Afzal Husain, Tasuku Honjo. Chromatin remodeler SMARCA4 recruits topoisomerase 1 and suppresses transcription associated genomic instability. 2017 年 1 月 28 日 神戸 (招待講演)
6. Maki Kobayashi and Tasuku Honjo. Activation-induced cytidine deaminase (AID) diversifies immunoglobulin gene by regulating topoisomerase 1 (Top1). 分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日 横浜 (招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2015/150421_1.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：ベガム ナシム

ローマ字氏名：Begam A. Nasim

研究協力者氏名：小林 牧

ローマ字氏名：Maki Kobayashi

研究協力者氏名：岩田 想

ローマ字氏名：So Iwata

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。