

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月30日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657092

研究課題名（和文）

抗体遺伝子への選択的変異導入におけるASF/SF2の新規機能の解明

研究課題名（英文） Novel functions of ASF/SF2 in somatic hypermutation on the immunoglobulin gene.

研究代表者

金山 直樹 (KANAYAMA NAOKI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：70304334

研究成果の概要（和文）：抗原に対する抗体の親和性は、抗体遺伝子に起こる体細胞高頻度突然変異により向上する。本研究では、突然変異能を有するニワトリ B 細胞株 DT40 を用いて、選択的スプライシング因子 ASF/SF2 のアイソフォーム (ASF3) が、抗体遺伝子への変異導入に必須であることを見いだした。また、ASF3 が抗体遺伝子の転写後プロセッシングを制御することによって、変異導入装置の活性化と抗体遺伝子への標的化において重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The affinity of antibodies for antigens is improved by somatic hypermutation (SHM) occurred on the immunoglobulin (Ig) gene. In this study, using the hypermutating chicken B cell line DT40, we found that an isoform of the alternative-splicing factor ASF/SF2, ASF3 is essential for SHM on the Ig gene. The results also suggest that ASF3 might have a role in the activation and targeting of the mutation machinery through the regulation of post-transcriptional processing on the Ig gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・機能生物化学

キーワード：抗体、親和性成熟、体細胞高頻度突然変異、スプライシング因子

1. 研究開始当初の背景

抗原に対して高親和性の抗体を産生する機構は、重要な生体防御機構の 1 つである。この過程では、抗体を産生する B 細胞の抗体可変部遺伝子に、自然界の 100 万倍の頻度で突然変異が導入され（体細胞高頻度突然変異）、抗原に対して高親和性を獲得した変異抗体を産生する B 細胞クローンが選択される。一方、変異導入装置の活性化や抗体遺伝子への選択的変異導入を制御する機構が破綻すると、染色体転座などが起こりガン細胞発生の一因となる。Acitivation-induced cytidine

deaminase (AID) は、高頻度突然変異に必要な因子であるが、AID 発現だけでは抗体遺伝子への選択的な変異導入には十分ではないことが示されている。抗体遺伝子への選択性変異導入機構の解明は、高親和性抗体の産生機構やガン細胞の発生機構を理解する上で重要である。

我々は、抗体遺伝子に突然変異を起こすニワトリ B 細胞株 DT40 に注目して、新規な *in vitro* 抗体作製システムを構築した (BBRC 327, 70, 2005; *ibid*, 396, 353, 2010; *J. Biosci. Bioeng.*, 102, 478, 2006; *ibid*, 110, 351,

2010; NAR, 34, e10, 2006)。その際、高親和性クローンの選択方法の開発過程で、選択的スプライシング因子 Alternative Splicing Factor (ASF)/Splicing Factor (SF) 2 の発現制御の利用を検討したところ(特許第4482693号)、興味深い事実を発見した。ASF/SF2にはアイソフォーム(ASF1, ASF2, ASF3)が存在し、主要アイソフォームであるASF1のみを発現するDT40ではAIDが発現するにもかかわらず変異が起こらなかったが、ASF3を導入すると変異が復活した。さらに、ASF/SF2は選択的に抗体遺伝子上に集積していた。これらの予備の結果は、ASF3が変異導入装置の活性化や抗体遺伝子への標的化において重要な役割を担っていることを示唆し、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では、以下の項目を検討して、ASF3が変異導入装置の活性化や抗体遺伝子への変異導入の選択性において果たす役割を解明し、体細胞高頻度突然変異においてスプライシング因子が関与する新規な原理を見いだすことを目的として研究を実施した。

- (1) 変異誘導能を有するASF/SF2アイソフォーム
- (2) ASF3により誘導される変異の抗体遺伝子への選択性
- (3) ASF3による変異誘導メカニズム

3. 研究の方法

本研究計画では、抗体遺伝子への自発的な変異導入能力を有するニワトリB細胞株DT40を用いた。DT40は、以下の理由で体細胞高頻度突然変異の機構解析モデルとして適している：(i) 抗体遺伝子への変異が培養時に自発的に起きる、(ii) 高頻度の相同組換えにより遺伝子ノックアウトによる分子の機能解析が容易である。ニワトリB細胞株DT40由来のDT40-ASFは、メジャーアイソフォームであるASF1のみを発現し、その発現をTet-offシステムによって制御できる細胞株で、James Manleyのグループにより樹立された。申請者らは、この細胞株を提供してもらいDT40特有の性質である抗体遺伝子への変異を解析したところ、変異能を失っていることを発見した(図1)。

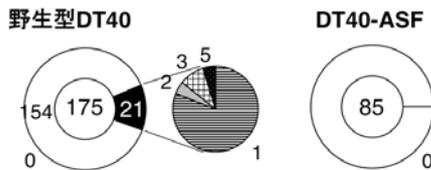


図1 DT40-ASFにおいては抗体遺伝子への変異が見られない細胞を30日間培養し、抗体軽鎖遺伝子をPCRによりクローニングし、塩基配列を決定した。円グラフの中の数字は解析クローン数で、外の数字はクローンあたりの変異数を示す。

野生型DT40にはalternative splicingにより複数のアイソフォームが発現しており、マイナーアイソフォームの一つであるASF3をDT40-ASFに発現させたところ変異導入が回復したことから、ASF3の発現が変異に必須であることが示唆された。本研究ではDT40細胞および改変株DT40-ASFを用いてASF3の機能を解析した。

4. 研究成果

(1) 変異誘導能を有するASF/SF2アイソフォームの同定

野生型DT40にはalternative splicingにより複数のアイソフォームが発現していた(図2)。

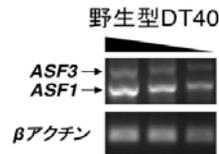


図2 野生型DT40におけるASF1のアイソフォームの転写

マイナーアイソフォームが変異導入に関与するかどうかを調べるために、抗体遺伝子変異を欠失しているASF1のみを発現するDT40-ASF細胞において、ASF1またはASF3を高発現させた細胞株を作製した。これらの細胞株を30日間培養後、細胞株から抽出したゲノムDNAから抗体軽鎖可変部遺伝子をPCRで増幅してクローニングし、塩基配列を決定して変異導入の有無を解析した。その結果、DT40-ASFにASF1を発現させた場合には、抗体遺伝子への変異が見られなかったが、ASF3を発現させた場合には変異が野生型細胞と同等レベルの頻度で起こっていた(図3)。

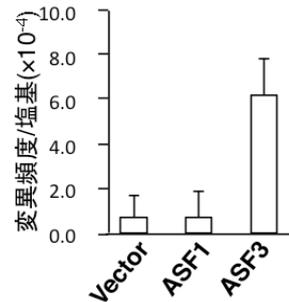


図3 DT40-ASFにおけるASF3の発現は変異能力を回復する

また、翻訳されないように改変したASF3遺伝子を導入した場合は変異が導入されなかったことから、各アイソフォームの発現の効果が、転写産物ではなく翻訳産物によることが明らかになった。また、ASF3の発現の増強が野生型DT40において効果があるかどうかを検討するために、変異頻度を緑色蛍光でモニターできる人工基質(図4A)を抗体遺伝子

上に導入している野生型 DT40 において、ASF3 を高発現させたところ変異頻度が増大した (図 4B)。上記の結果から ASF3 が抗体遺伝子への変異導入に必須であることが明らかになった。

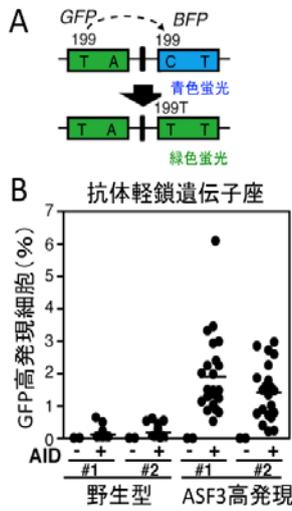


図4 ASF3高発現は野生型DT40において変異能力を増強する

(2) ASF3 による変異誘導の抗体遺伝子への選択性の解明

① ASF3 の抗体遺伝子への集積の解析

抗体遺伝子への選択的な変異導入が ASF/SF2 の抗体遺伝子への集積と関連があるかどうかを解明するため、Flag タグを付加した ASF3 を発現させた DT40-ASF において、ASF3 が抗体遺伝子に集積するかどうかについて ChIP 解析した。ASF3 は抗体遺伝子へ集積していたが (図 5A)、変異導入に必須の因子である AID の抗体遺伝子への集積には ASF3 の発現の有無は無関係であった (図 5B)。

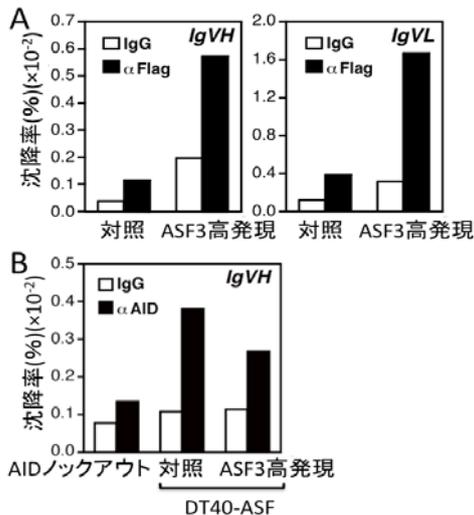


図5 抗体可変部遺伝子へのASF3およびAIDの集積

すなわち、ASF3 が AID の抗体遺伝子への集積ではなく、AID を含む変異導入装置の活性化

に関与していることが示唆された。

② ASF3 による変異誘導の抗体遺伝子への選択性の検証

変異頻度を緑色蛍光でモニターできる人工基質を抗体遺伝子とは無関係な卵白アルブミン遺伝子上に導入した野生型 DT40 においては、ASF3 の発現増強は全く変異導入に効果が無かったことから、ASF3 による変異誘導が抗体遺伝子選択的であることが示唆された (図 6)。

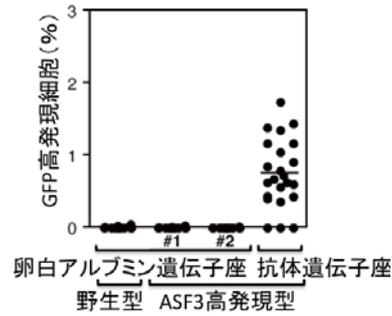


図6 ASF3高発現は抗体遺伝子以外の変異を誘導しない

一方、抗体遺伝子への変異導入に必須な AID は抗体以外の遺伝子への作用することが明らかになってきた。ASF3 が AID のこの活性に関与するかどうかを検討するために、AID 発現依存的にゲノム遺伝子の転座をモニターできる系を用いた。DT40-ASF の ASF1 の発現はテトラサイクリン誘導性プロモーターにより調節可能であり、テトラサイクリン (Tet) あるいはその誘導体であるドキシサイクリン (Dox) を細胞に添加して ASF1 の発現を OFF にすると、転座が誘導されてその頻度を Tet (または Dox) 耐性細胞数として評価することができる。この系において AID を大量発現させると転座頻度が大幅に上昇したが (図 7A)、ASF3 を高発現した場合には転座の増加は見られなかった。これらの結果は、ASF3 の作用が抗体遺伝子特異的であることを示唆している。

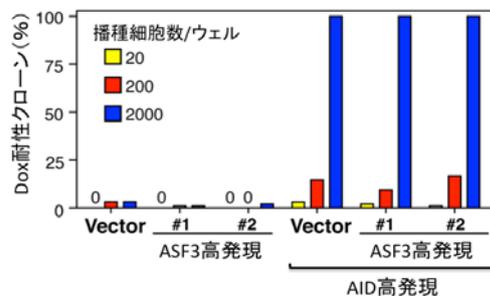


図7 ASF3はAID依存的な抗体以外の遺伝子への変異に関与しない

(3) ASF3 による変異誘導メカニズムの解明

ASF3 は、ASF1 と競合してスプライシングを阻害することが知られている。すなわち、

抗体遺伝子上に集積した ASF3 が転写途中の RNA のプロセッシングを阻害し、その結果、mRNA 前駆体と鋳型鎖 DNA との DNA-RNA 二本鎖を形成が促進している可能性を検討した。mRNA 前駆体を特異的に検出できる RT-PCR を用いて解析したところ、抗体遺伝子の転写産物のうち mRNA 前駆体の量が ASF3 の発現に依存して増加することが明らかになった(図 8)。

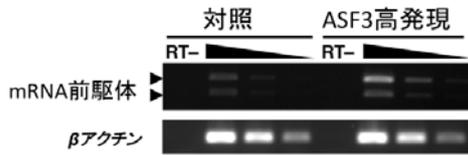


図8 ASF3高発現による抗体遺伝子のmRNA前駆体の蓄積

さらに、DNA-RNA 二本鎖を特異的に分解する RNaseH を DT40 に発現させたところ、抗体遺伝子への変異導入が減少した(図 9)。

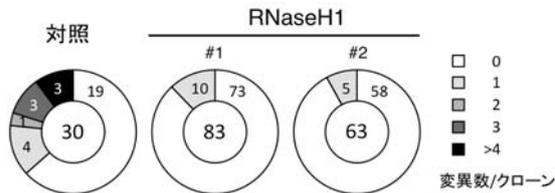


図9 RNaseH1の強制発現はASF3依存的な抗体遺伝子への変異導入を抑制する

AID は R ループ中の遊離した非鋳型鎖 DNA にアクセスしやすいことから、ASF3 が抗体遺伝子に R ループを形成させることにより AID 依存性の変異を誘導していることが示唆される。

体細胞高頻度突然変異は、通常の変異の 100 万倍の頻度で成熟 B 細胞の抗体遺伝子座のゲノム情報を書き換える。B 細胞の特定の活性化状態でのみこのゲノム情報の書き換えを抗体遺伝子選択的に起こす制御機構を解明することは、免疫システムのみならず発ガンの回避機構を理解する上でも重要である。2000 年に本庶らによって AID が高頻度突然変異に必須の因子であることが報告され、変異導入の分子機構解明に向けての大きな一歩となったが、AID を高発現させただけでは突然変異を高頻度に誘発させるには不十分であり、変異導入装置の活性化や抗体遺伝子への標的化を AID 発現のみで説明することは出来ない。体細胞高頻度突然変異の導入機構は、現在、AID による DNA 鎖上のシチジンの脱アミノ化と、それに引き続くエラープロロン遺伝子修復系による DNA 塩基の置換で説明されており、すべての過程が DNA 鎖状の反応として理解されている。抗体遺伝子の転写は、高頻度突然変異の必要条件の一つとして示されており、今回明らかになったスプライシング因子の関与は、抗体遺伝子から転写される RNA 鎖が関与する変異導入機構の

存在を示唆する。今後、詳細な機能解析によりこの機構の実態が明らかになると期待される。ASF3 の発現の増強が B 細胞の変異能力を向上させることにも有効であることが示唆されたことから、本研究の成果は変異能力を有した B 細胞株を用いた新規な抗体作製技術の開発にも応用可能であると考えられる。

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 4 件)

(1) Saki Yurimoto, Tomohito Fujimoto, Masaki Magari, Naoki Kanayama, Ryoji Kobayashi, Hiroshi Tokumitsu, In vitro substrate phosphorylation by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase using guanosine-5'-triphosphate as a phosphate donor, BMC Biochemistry, 査読あり, 13 巻, 2012, p. 27, doi:10.1186/1471-2091-13-27.

(2) 曲 正樹, 金山直樹, 大森 斉, 胚中心における B 細胞のnegative selectionと濾胞樹状細胞, 臨床免疫・アレルギー科, 査読無し, 58 巻, 2012, 259-265.

(3) 金山直樹, 大森 斉, 抗体遺伝子への突然変異能を有するニワトリ B 細胞株の機能拡張による in vitro モノクローナル抗体作製・改良システム, 細胞工学, 査読無し, 31 巻, 2012, 1159-1165.

(4) Yuichi Kanehiro, Kagefumi Todo, Misaki Negishi, Junji Fukuoka, Wenjian Gan, Takuya Hikasa, Yoshiaki Kaga, Masayuki Takemoto, Masaki Magari, Xialu Li, James L. Manley, Hitoshi Ohmori, Naoki Kanayama, Activation-induced cytidine deaminase (AID)-dependent somatic hypermutation requires a splice isoform of the serine/arginine-rich (SR) protein SRSF1, Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 査読あり, 109 巻, 2012, 1216-1221, doi:10.1073/pnas.1120368109.

〔学会発表〕 (計 8 件)

(1) 金山直樹ら, 抗体遺伝子への突然変異能を有するニワトリ B 細胞株の抗体工学的応用による抗体機能改変, 第 35 回 日本分子生物学会 年会, 2012 年 12 月 14 日, 福岡国際会議場.

(2) 渡邊康二, 金山直樹ら, DT40 細胞株を用いた in vitro 抗体作製システムにおける, 抗原レセプターの刺激に依存した生存による抗原特異的抗体産生細胞の選択法の開発, 第 35 回 日本分子生物学会 年会, 2012 年 12 月 14 日, 福岡国際会議場.

(3) 川口祐加, 金山直樹ら, スプライシング因子SRSF1 のアイソフォームSRSF1-3 は, R-loopを形成することでIgV高頻度突然変異を誘導する, 第 35 回 日本分子生物学会年会, 2012年12月11日, 福岡国際会議場.

(4) Kanayama Naoki et al., A splicing isoform of the splicing factor SRSF1, SRSF1-3, has role in R-loop formation in IgV hypermutation, 2012 日本免疫学会総会・学術集会, 2012年12月5日, 神戸国際会議場.

(5) 川上夏奈江, 金山直樹ら, ヒト型抗体産生ニワトリB細胞株DT40 を用いた抗原特異的抗体の作製, 第 64 回 日本生物工学会大会, 2012年10月26日, 神戸国際会議場.

(6) 日笠卓哉, 金山直樹ら, 変異能力を有する培養B細胞株DT40 を用いた新規なタンパク質ディスプレイシステムの開発, 第 64 回 日本生物工学会大会, 2012年10月26日, 神戸国際会議場.

(7) 佐井燕, 金山直樹ら, ニワトリB細胞株DT40-SWを用いた異種抗体改良システムの構築, 第 64 回 日本生物工学会大会, 2012年10月26日, 神戸国際会議場.

(8) 金山直樹ら, AIDに依存したIgV変異には, SRタンパク質SRSF1のスパライズアイソフォームが必要である, 2011 日本免疫学会総会・学術集会, 2011年11月28日, 幕張メッセ

〔図書〕(計1件)

金山直樹, 大森齊, シーエムシー出版, 次世代抗体医薬開発に向けた抗体工学の最前線 監修:熊谷泉 第13章 ニワトリ抗体ライブラリーからの高親和性抗体の作製, 2012, 9.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金山 直樹 (KANAYAMA NAOKI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号:70304334