

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650126

研究課題名(和文) RNAスプライシング因子に依存した抗体遺伝子高頻度突然変異の新規な制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of a novel role of an RNA splicing factor in somatic hypermutation of the IgV gene

研究代表者

金山 直樹 (Kanayama, Naoki)

岡山大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：70304334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗体遺伝子への高頻度突然変異へのスプライシング因子SRSF1-3の寄与を分析するための実験系を構築し、その分子機構を解析した。アイソフォームであるSRSF1とSRSF1-3の違いがC末領域だけにもかかわらず、SRSF1-3のSHMにおける機能発現にC末領域が必ずしも必要でないことが明らかになった。さらに、SRSF1-3がAIDの核外排出を制御することがSHMにおける役割の一つであることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed molecular mechanisms for SRSF1-3 to contribute to somatic hypermutation of the IgV gene. It is revealed that although isoforms SRSF1 and SRSF1-3 are different only in the C-terminal region, the C-terminal region of SRSF1-3 is not essential for SHM, suggesting that the conserved region might be involved in SHM. In addition, this study indicated that SRSF1-3 may have a role in regulating the nuclear export of AID during SHM processes.

研究分野：細胞工学、免疫学

キーワード：抗体 体細胞高頻度突然変異 親和性成熟 スプライシング因子 DT40

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、この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須な因子であるが、AID発現だけでは抗体遺伝子への選択的な変異導入を十分に説明できない。抗体遺伝子への選択的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 2005, 2010; J. Biosci. Bioeng. 2006, 2010; NAR 2006 他)。その際、高親和性クローンの選択方法の開発過程で、SRタンパク質スプライシング因子SRSF1(旧名ASF/SF2)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(Kanehiro et al., PNAS 2012)。SRSF1にはアイソフォームが存在し、主要アイソフォームのみを発現するDT40は、必須因子であるAIDの発現があっても変異能力を欠損し、アイソフォームSRSF1-3の発現が必須であった。SRSF1-3は選択的に抗体遺伝子上に集積し、抗体遺伝子転写産物のスプライシングを阻害したことから、SRSF1-3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機能を担っていることが示唆され、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、SRSF1-3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 SFSR1-3の機能解析系の構築
- ② SRSF1-3の機能部位を解明とSRSF1-3に物理的・機能的に相互作用する因子の探索
- ③ SRSF1-3によるAIDと関連因子の活性化

と変異誘導のメカニズムの解明

3. 研究の方法

① SFSR1-3の機能解析系の構築

本研究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。DT40細胞を用いたSRSF1-3の機能解析では、James Manleyらにより樹立されたニワトリB細胞株DT40由来のDT40-ASF細胞を用いた。この細胞はメジャーアイソフォームであるSRSF1のみを発現し、SRSF1-3欠損細胞として用いた。また、野生型DT40細胞においてもSRSF1-3のみを欠損させるためにSRSF1-3発現時にretentionするintronを相同組換えによってdeletionした。今回のケースでは相同組換えが困難であったので、CRISPR/Cas9を用いて相同組換えを誘導した。

DT40細胞以外の系でのSRSF1-3の機能解析のため、自発的に抗体可変部遺伝子に変異を起こすヒトB細胞リンパ腫RamosにおいてもSRSF1-3を欠失させた。この細胞株は相同組換え効率が極めて低いため、RNAiあるいはCRISPR/Cas9を用いてDT40細胞の時と同様にSRSF1-3発現時にretentionされるintronをdeletionした。

野生型あるいはSRSF1-3欠損細胞における抗体遺伝子への変異導入頻度、あるいはニワトリSRSF1-3やヒトSRSF1-3を過剰発現させた場合の変異導入頻度を評価した。

② SRSF1-3の機能部位を解明とSRSF1-3に物理的・機能的に相互作用する因子の探索

SRSF1-3を欠損するDT40-ASF細胞にニワトリSRSF1-3のC末端欠変異体を導入し、各変異体導入細胞における抗体遺伝子への変異導入頻度を評価することによってSRSF1-3の機能部位の同定を試みた。

SRSF1-3に結合する因子を探索するために、T7タグをN末端に付けたSRSF1-3を過剰発現するDT40細胞を作製し、SRSF1-3を免疫沈降して共沈してきたタンパク質を、MS解析によって同定することを試みた。

③ SRSF1-3によるAIDと関連因子の活性化と変異誘導のメカニズムの解明

SRSF1-3 と AID の機能的な接点を探索するために、核外排出シグナルが存在する C 末端部位を欠損する AID を発現する DT40 細胞において SRSF1-3 を過剰発現させた場合において変異導入頻度に与える影響を評価した。

AID と SRSF1-3 の細胞内の局在性における関連を調査するために、AID および SRSF1-3 を、それぞれ GFP および mCherry との融合タンパクとして発現させるためのベクターを作製し、マウス線維芽細胞 NIH3T3 へ導入し、一過性発現系での各因子の局在性の関係について検討した。

4. 研究成果

① SRSF1-3 の機能解析系の構築

変異能力を有し、かつ SRSF1-3 を発現する B 細胞株を用いて、SRSF1-3 の機能を gain of function 解析、loss of function 解析できる実験系を構築した。SRSF1-3 を欠損する DT40-ASF 細胞は抗体遺伝子への変異導入能力を有さず、ニワトリ SRSF1-3 を導入すると変異能力を野生型 DT40 と同レベルに回復することから、SRSF1-3 が SHM において重要な役割を果たしていることが確認された。一方、DT40-ASF 細胞にヒト SRSF1-3 を発現させた場合は、ニワトリ SRSF1-3 ほどの効果は無かった。逆にヒト Ramos 細胞にニワトリ SRSF1-3 とヒト SRSF1-3 を過剰発現させた場合にもニワトリ SRSF1-3 のほうが変異増強効果が強い傾向があった。この違いが、ニワトリ SRSF1-3 とヒト SRSF1-3 の機能的な違いであるかどうかは、今後の詳細な解析が必要である。

SRSF1 遺伝子からは多くのスプライスバリエントが発現するため、野生型 DT40 細胞において SRSF1-3 のみを欠失させるため、SRSF1-3 を発現するとき retention する intron のみを相同組換えにより deletion した。DT40 細胞は本来、相同組換え効率が高いがこの相同組換えコンストラクトを用いた場合は、まったく目的の組換え体は得られなかった。そこで CRISPR/Cas9 を用いて標的部位への組換えを促進することによって効率よく目的の組換え細胞の構築に成功した。当初の予想に反して、この組換え細胞を用いて SHM への SRSF1-3 の寄与を確認することはできなかった。同様に、ヒト Ramos 細胞において SRSF1-3 のみを欠失する細胞株を CRISPR/Cas9 を用いて相同組換えを促進することによって樹立した。しかし、上記と同様に SRSF1-3 の SHM における役割を確認することはできなかった。

SRSF1-3 遺伝子には多くのスプラスバリア

ントが存在するため、今回得られた結果が SRSF1-3 以外の因子の関与によるものか、今回用いた手法により新たに発生した人工的なバリエントによる結果かどうかなどさまざまな可能性について、今後検証していく必要がある。

② SRSF1-3 の機能部を解明と SRSF1-3 に物理的・機能的に相互作用する因子の探索

SRSF1-3 の C 末端を欠失した変異体を作製して DT40-ASF に導入し、SHM に関与する部位を探索したところ、alternative splicing によって獲得される C 末部位は必ずしも必要でないことが分かった。これは、ニワトリ SRSF1-3 とヒト SRSF1-3 で、N 末側が 90% 以上の相同性があるのに対して、C 末側はほとんど相同性がないことと一致する。SRSF1 と SRSF1-3 の違いは C 末のみであることから、SRSF1-3 の SHM における機能発現については SRSF1 との共通部分に関与していることを示唆する。この知見は、SRSF1 あるいは SRSF1-3 がどのように SHM に関与するか、その制御機構を解明する上で重要な点と考えられるので、より詳細な検討が必要である。

SRSF1-3 の SHM への関与の機構に関する手がかりを得るために、IP-MS 分析を用いて SRSF1-3 に結合するタンパク質を網羅的に探索した。今回の検討では、修飾ヒストン分子など、何らかのエピジェネティックな変化との関連を示唆する結果が得られたが、再現性の確認と機能解析が必要である。

③ SRSF1-3 による AID と関連因子の活性化と変異誘導のメカニズムの解明

SRSF1-3 と AID の機能的な接点を探索するために、核外排出シグナルが存在する C 末端部位を欠損する AID を発現する DT40 細胞において SRSF1-3 を過剰発現させた場合の、変異導入頻度に与える影響を評価したところ、野生型 DT40 の場合は SRSF1-3 の過剰発現は SHM を増加させるが、C 末欠失型 AID を発現する DT40 細胞の場合は増加させないことが分かった。すなわち、SRSF1-3 は C 末欠失型 AID と機能的に重複する過程において SHM に関与していることが示唆された。

AID の細胞内局在への SRSF1-3 の関与を調査するために、蛍光タンパク質との融合タンパク質を作製して、線維芽細胞における一過性発現の系で AID の細胞内局在を観察した。AID は核で作用すると考えられているにもかかわらず、AID タンパク質のほとんどは細胞

質に存在し、本実験系でも AID 単独では細胞質への局在が確認された。SRSF1 が核への移行する際、RS ドメインのリン酸化を必要とするが、RS ドメインを有しない SRSF1-3 はこの系では核に局在した。興味深いことに、AID と SRSF1-3 を共発現させると核に局在化した。すなわち、SRSF1-3 は、AID の核局在における役割があることが示唆された。

一方、DT40 細胞での安定形質転換体では、SRSF1-3 の存在にもかかわらず AID 融合タンパク質は細胞質に局在したことから、定常状態で AID を細胞質に局在させるフィードバック機構の存在が示唆された。また、レプトマイシン処理によって AID の核外輸送を阻害すると、SRSF1-3 を発現しない DT40 細胞でも AID の核への輸送が確認された。

野生型の AID を発現する DT40 細胞では、SRSF1-3 の過剰発現は SHM を増強したのに対して、核外輸送シグナルを欠損した AID を発現する DT40 細胞では SRSF1-3 の過剰発現の効果が見られなかったことから、SRSF1-3 の機能と AID の核外排出の制御に関連があることが考えられる。すなわち、SRSF1-3 は AID の核外排出の制御に寄与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- ① Fujiwara, Y., Hiraoka, Y., Fujimoto, T., Kanayama, N., Magari, M. & Tokumitsu, H. Analysis of Distinct Roles of CaMKK Isoforms Using STO-609-Resistant Mutants in Living Cells. *Biochemistry* **54**, 3969-3977 (2015). DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00149, 査読有
- ② Yamane, F., Nishikawa, Y., Matsui, K., Asakura, M., Iwasaki, E., Watanabe, K., Tanimoto, H., Sano, H., Fujiwara, Y., Stanley, E. R., Kanayama, N., Mabbott, N. A., Magari, M. & Ohmori, H. CSF-1 receptor-mediated differentiation of a new type of monocytic cell with B cell-stimulating activity: its selective dependence on IL-34. *J Leukoc Biol* **95**, 19-31 (2014). DOI: 10.1189/jlb.0613311, 査読有
- ③ 曲正樹、金山直樹、免疫グロブリンの体細胞高頻度突然変異と serine/arginine protein splicing factor (SRSF)、臨床

免疫・アレルギー科、Vol. 61、No. 5、2014、pp. 489-495、査読無

- ④ 金山直樹、曲正樹、AIDによる免疫グロブリンの体細胞高頻度突然変異誘導と関連分子、臨床免疫・アレルギー科、Vol. 61、No. 5、2014、pp. 467-471、査読無

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ① 成木 弘明、金山直樹ら、ニワトリ SRSF1-3 の抗体遺伝子変異における機能部位の探索、BMB2015、神戸国際会議場 (神戸市)、2015. 12. 2
- ② 横山 和輝、金山直樹ら、過剰発現させた RNaseH1 は核外へ隔離される、BMB2015、神戸国際会議場 (神戸市)、2015. 12. 2
- ③ KAWAGUCHI Yuka, KANAYAMA Naoki, et al., SRSF1-3 promotes nuclear localization of AID by inhibiting nuclear export of AID, 2015 日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター (札幌市)、2015. 11. 20
- ④ 川口祐加、金山直樹ら、スプライシング因子 SRSF1-3 は抗体の体細胞高頻度突然変異において AID の核内への局在化を促進する、第 34 回岡山免疫懇話会、岡山大学 (岡山市)、2015. 3. 4
- ⑤ 河本 奈緒子、金山直樹ら、AID 依存性の抗体高頻度変異の諸過程への SRSF1-3 の寄与の解析、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (横浜市)、2014. 11. 27
- ⑥ 川口 祐加、金山直樹ら、AID の核への局在化への SRSF1-3 の寄与、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (横浜市)、2014. 11. 27
- ⑦ 松山 雄磨、金山直樹ら、哺乳動物 B 細胞株における SRSF1-3 および BCL6 の SHM への関与、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (横浜市)、2014. 11. 27

〔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〕

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