

令和元年6月7日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07251

研究課題名(和文) RNA編集を介した内因性ゲノム不安定化の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of genomic instability by RNA editing

研究代表者

小林 牧 (Kobayashi, Maki)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：20400690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：「はしかに二度かからない」ことに象徴される感染防御のしくみ、「免疫」の根本原理のひとつが抗体遺伝子の多様化である。抗体遺伝子がどのようにして生体内で効率的に組換えをおこし体を守るしくみを作り上げるのか、その一端を解明した。あらゆる細胞に存在し、ゲノムDNAの恒常性を守るとともに、壊す可能性ももつトポイソメラーゼ1が、基本的に免疫細胞のみで働くAIDにより翻訳抑制という制御をかける結果、特殊な繰り返し構造を持つ抗体遺伝子の壊れやすさを助長し、多様化を促していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を活かして抗体遺伝子組換えの効率化促進が可能になれば、感染防御システムを強化し、病原微生物の変化に迅速に対応する治療法が開発される可能性がある。トポイソメラーゼ1はすべての細胞に発現しているため、AID以外の細胞への刺激などがトポイソメラーゼ1の制御を介して細胞のがん化をもたらす分子機構が発見される可能性がある。また、トポイソメラーゼ1が不安定化することを防ぐ薬剤を発見できれば、一生の間にゲノムDNAに蓄積しがん化につながる遺伝子変異を最小限に抑えることができるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：One of the basic principles of "immunity" is the diversification of antibody genes, which is one of the mechanism of infection defense symbolized by the fact that you never suffer from measles twice. We elucidated a part of the complex story, how antibody genes are efficiently recombined in vivo to create a defense system. The topoisomerase 1 (Top1) presents in all the cells and have both function of maintenance of the integrity of the genomic DNA and also of destabilization the genomic DNA. By our study it was discovered that AID expressed only in immune B cells regulates Top1 by suppressing its translation and achieves highly efficient and specific gene recombination of antibody genes to produce diversified antibody proteins.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：抗体遺伝子 AID クラススイッチ 体細胞突然変異 トポイソメラーゼ1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA に組換えや変異が起きる生理的な現象は、生殖細胞における減数分裂、B リンパ球での抗体遺伝子の VDJ 組換えと本研究で扱うクラススイッチ組換え (CSR) および体細胞突然変異 (SHM) などのごく限られたものであり、病的変化に至らない合目的な遺伝子組換え機構は新たな制がん戦略を開発する上でも興味深い。AID の活性化による DNA 切断が Ig 遺伝子をターゲットする本来のプログラムから外れた場合、染色体転座とリンパ腫発症に直結する⁽²⁾。さらに *Helicobacter Pylori* や C 型肝炎ウイルスなどの慢性感染に際し AID は異所性に発現し⁽³⁾⁽⁴⁾、ゲノム不安定化からがんを誘発するため、AID による DNA 切断の精密な制御機構の解明は重要である。ところが、AID はシチジン脱アミノ化酵素であり直接 DNA を切断する酵素活性を持たないため、どのようにして DNA 切断を導くのか、切断 DNA 部位の特異性はいかにして確保されているのか、については長らく不明であった。

Top1 は転写に伴う DNA の二次構造ストレスを検出し、DNA 二重らせんの一本鎖を切断、回転し、再結合することでストレスを解消し、二重らせん構造を保つ。Top1 が減少すると DNA の二重らせんストレスが蓄積し Top1-DNA 共有結合が解消されず再結合不能となるため、Top1 自身による不可逆的 DNA 切断が増加しゲノム不安定化をきたす。応募者らは 2009 年、AID 依存性の CSR と SHM の最初のステップである「DNA 切断」の責任酵素として Top1 を同定し、さらに AID が Top1 の量を Top1 3'UTR 依存的に下げることがを証明した。以後、Top1 は酵母の転写依存性変異(TAM)、中枢神経疾患の原因となるトリプレット反復配列の増幅や毛細血管拡張性運動失調症においても、DNA 切断の責任酵素であることが報告された。AID は B リンパ球以外においてもゲノムを不安定化することから、AID による Top1 の減少と DNA 切断に働く分子機構は、組織特異的の無い普遍的なものであり、諸種の発がんにおいて働く可能性のあるものであろう。トリプレット反復配列であるハンチントン舞踏病遺伝子 Htt の CAG 反復配列は酸化ストレスにより増幅する報告があるが、一方、応募者は AID による免疫グロブリン遺伝子の多様化においても酸化ストレスが働く予備的結果を観察しており、Ig 遺伝子と Htt 遺伝子などのトリプレット配列に認められる転写依存性の遺伝子不安定化には共通の分子基盤が予想される。

なお、海外の研究者らにより AID が DNA 中のシチジンを脱アミノ化する仮説が提唱されたが、その仮説では AID の N 末と C 末のドメイン機能の違いを説明できない。また DNA 切断に中心的な 2 つの酵素、ウラシル DNA グリコシダーゼと DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase はいずれも DNA 切断以後の修復段階に働くことが証明されたため、DNA 脱アミノ化仮説は AID の機能を説明できないことがわかった。応募者らが提唱する AID の RNA 編集仮説は未だ編集のターゲットを同定できていないが、Top1 が DNA 切断の主役であることは疑う余地がなく、Ig 遺伝子の多様化については国内及び海外において応募者らが最も先駆的な結果を出している。

また、DNA 損傷研究は、放射線や化学物質といった外因性 DNA 切断に続く修復過程に焦点を当てるものが多く、本研究で扱う Ig 遺伝子の切断や、トリプレット反復配列の転写依存性切断など、内因性のゲノム不安定化である Top1 による DNA 切断分子機構についてはあまり研究が進んでおらず今後の知見の蓄積が待たれる。

2. 研究の目的

Activation-induced cytidine deaminase (AID) は、B リンパ球において miRNA を介してトポイソメラーゼ 1 (Top1) を減少させ、免疫グロブリン (Ig) 遺伝子を始めとする限られた反復 DNA 配列を切断し、抗体の多様化、すなわちクラススイッチ組み換え (CSR) および体細胞突然変異 (SHM) を起こすという巧妙なしくみを持つ。AID が何らかの RNA を編集することにより miRNA の Top1 mRNA へのリクルートが増加すると予想されるがその詳細な分子メカニズムは明らかで

はない。また、Top1 mRNA 以外の分子も AID により制御されると予想されるため、本研究は単一の AID 分子が複数の RNA 分子を統合的に制御することで Top1 を介した内因性のゲノム不安定化をもたらす分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) [Top1 mRNA に結合する miRNA と RISC 構成タンパク質の同定]

S1 アプタマーはループ・ヘアピン構造をとる RNA 分子であり、ストレプトアビジンに親和性がある。S1 アプタマーの改良版 S1m に Top1 mRNA を結合したプローブを CH12 細胞に発現させる。その細胞抽出液を用いて S1m アプタマーをストレプトアビジンビーズで捕捉することにより、Top1 mRNA に結合する miRNA を得る。RNA 分画を網羅的に次世代シーケンス法により解析し、AID の有無で比較することにより結合 miRNA の候補を得る。最初に S1m が実際に働くか否かを AU rich 配列と結合した S1m を発現させ、HuR などの AU 結合性タンパク質の回収の有無を確認する。もしも S1m が機能する確証が得られない場合には、MS2CP アプタマーを用いる。Top1 3'UTR に結合する RNA 分画を次世代シーケンス法により解析し、AID の有無で比較することにより結合 miRNA の候補を得る。miR-92a が含まれているか否かを検証する。Top1 mRNA に結合する miRNA を CH12 細胞内で過剰発現させ、CSR や SHM の表現型に与える影響を解析し、AID の作用を再現できる miRNA の組み合わせを同定する。当該 miRNA のノックアウトマウスを作成し、個体レベルで表現型を解析する。当該 miRNA の前駆体を解析し、AID による編集部位を同定する。

(2) [AID により制御される Top1 以外のタンパク質とその制御に働く miRNA の同定]

AID ノックアウトと野生型の CH12 細胞またはマウス脾臓 B 細胞から Ago2 結合性 RNA-タンパク質複合体を抽出し、RNA ligase を用いて RNA-RNA 対合部位をクロスリンクする。miRNA-mRNA がここでクロスリンクされると予想されるため、抗 Ago2 抗体による免疫沈降で得られた RNA 画分を網羅的に次世代シーケンサーを用いて解析し、miRNA-mRNA キメラ分子を同定する。これらの miRNA-mRNA キメラ分子を AID の有無で比較することにより、AID により制御されるものを絞り込む。

SILAC 法で得られる AID 制御性タンパク質の候補と RNA ligase クロスリンク法により同定される AID 制御性 mRNA の候補とがオーバーラップする可能性がある。多角的に解析することで Top1 以外の分子メカニズムの全体像を確実に同定する。同定された miRNA の CSR や SHM における機能を過剰発現またはノックダウンにより解析し、AID の機能を完全に再現することを目指す。当該タンパク質や miRNA のノックアウトマウスを作成し機能を検証する。

(3) DNA 切断領域に集積する RNA 分子の解析

Ig 遺伝子の DNA 切断領域である S 領域に LexA 結合配列が挿入された CH12 細胞を応募者らは既に確立した。さらに、LexA-flag タンパク質と抗 flag 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により効率よく Ig 遺伝子がトラップされることを確認している。この細胞を用いて AID による DNA 切断時に Ig 遺伝子に集積する RNA 分子を同定する。AID により特異的に DNA 切断領域に集積する RNA 分子が同定された場合、これらの機能をノックダウンや過剰発現により解析する。また、これらの RNA 分子が他の Htt 遺伝子の CAG 反復配列にも集積するか否かを、Htt 遺伝子を発現する培養細胞を用いて検証する。AID が当該 RNA の発現を制御する可能性がある場合には、その制御機構を解析する。

(4) CAG 反復配列増幅は Top1 の安定化により阻止できるか？

Htt 遺伝子に含まれるトリプレット配列の増幅・不安定化も、Ig 遺伝子と同様に Top1 安定化により防がれるか否かを解析する。既に酸化ストレスにより増幅することが報告された、94

回の CAG 反復配列を含む Htt 遺伝子第一エクソンを EF1 プロモーター下に発現する構築 (HttQ94) を CH12 細胞に導入し、酸化ストレスの他、サイトカイン刺激や AID の発現が反復配列を増幅するか否かを確認する。また、HttQ94 構築を Top1 3'UTR をノックアウトした CH12 細胞に導入し、Top1 の安定化が酸化ストレスによる増幅の程度を低下させるか否かを確認する。Top1 3'UTR に結合し、miRNA の機能を阻害するような核酸分子を設計し、Top1 の安定化と CAG 反復配列の増幅防止作用を検証し、Top1 の 3'UTR を介した Top1 の安定化がゲノム不安定化を阻止できるか否かを検討する。

4. 研究成果

- (1) 本研究により、Top1 3'UTR の部分欠損細胞を CRISPR/Cas9 法で樹立した。多数の欠損細胞株を単離し、内因性の AID 発現の元で CSR と SHM とを観察し、それらの効率低下を確認した。しかし、外因性の AID-ER による CSR と SHM の変化が顕著でなかったため、再び Top1 3'UTR の完全欠損細胞を CRISPR/Cas9 法により樹立した。こちらは内因性 AID、外因性 AID-ER による CSR、SHM が野生型の約 30%程度に低下することを発見し、Top1 翻訳効率の抗体遺伝子組換えにおける機能的意義とともに Top1 3'UTR のいずれかに AID の制御を受ける領域があることを明らかにした。以前より AID に依存的な Ago2 の結合部位が Top1 3'UTR にあることを示していたため、何らかの miRNA による制御と考え、完全欠損細胞では AID による Top1 の翻訳抑制が働かないことをポリソーム分画法で新たに証明した。
- (2) 候補 miRNA として以前から miR-92a の過剰発現やノックダウンが 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。
- (3) miRNA 同定のために、Top1 coding 領域にプローブをデザインし、4-アミノメチルトリオキサレン (ソラーレン) により RNA-RNA 結合をクロスリンクした細胞抽出液を用いて Top1 mRNA に結合する RNA の単離を試みた。RNase の使用やライブラリー作成の条件を最適化したものの、有意なシーケンスを得ることができなかった。現在、Top1 3'UTR 領域にプローブを再度デザインし、各種条件を見直し単離を試みている。
- (4) Top1 3'UTR には多数の A, U に富んだ配列が存在し、HuR が結合することが予想されたため、HuR が miRNA、Ago2 複合体の Top1 3'UTR への結合を助けるという仮説を立てた。これを証明するために CH12 細胞株で HuR のノックアウト細胞を CRISPR/Cas9 法により樹立した。野生型 HuR 分子によるレスキューを行い、HuR の欠損により CSR と SHM、また同じく AID 依存性の抗体遺伝子組換え現象である cMyc/IgH 転座の低下を検出した。直接、DNA 切断効率が下がっていること、HuR の欠損細胞では AID 依存的な Top1 タンパク質の減少が妨げられていることを示した。これらの結果は、AID による Top1 の減少に HuR が必要であることを証明している。
- (5) 一方、Top1 タンパク質の量低下のみでは AID のように効率の良い DNA 切断を起こすことができないため、AID はそれ以外の機能を持つと考えた。AID による抗体遺伝子領域の DNA 切断には必ず noncoding RNA の転写が必要であることは多数の研究者の成果から明らかであったが、転写産物自体に機能があるか否かは不明であった。この noncoding RNA のノックダウンを行うことにより、抗体遺伝子に DNA 切断が引き起こされることを発見し、その配列特異性を各種細胞株を用いて示した。クロマチン修飾の変化やクラススイッチ時の IgA 領域との結合部位の変化が明らかになり、DNA 二次構造の複雑性が変化することが予想された。この noncoding RNA のノックダウンは AID が活性化せずとも DNA 切断を引き起こすことから、AID がこの noncoding RNA を分解する作用を持つとの仮説を立て、検証実験を行なっている。このように Germline

transcript の機能を明らかにし、AID の機能のうち、Top1 の制御以外の方面に新しい証拠を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

1. Helena Islam, Maki Kobayashi and Tasuku Honjo. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) is dispensable for activation-induced cytidine deaminase (AID)-dependent somatic hypermutation in the immunoglobulin gene. *International Immunology*. *International Immunology*, dxz028, (2019) <https://doi.org/10.1093/intimm/dxz028>
2. Azza Al Ismail, Afzal Husain, Maki Kobayashi, Tasuku Honjo and Nasim Begum. 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. *International Immunology* 29; 525-537 (2017) doi:10.1093/intimm/dxx061
3. Maki Kobayashi, Misao Takemoto and Tasuku Honjo. The novel activation-induced deoxycytidine deaminase (AID) mutants, AIDv and AIDv Δ 15 are defective in SHM and CSR. *DNA Repair* 53; 1-3 (2017)

〔学会発表〕 (計 13 件)

1. Maki Kobayashi, Tasuku Honjo. RNA interference-mediated immunoglobulin gene instability. The 20th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, RNA Neobiology. 2019年2月1-2日、吹田
2. Ziwei Yin, Maki Kobayashi, Wenjun Hu, Nasim A. Begum, Tasuku Honjo. hnRNP K の RNA 結合モチーフは AID による免疫グロブリン遺伝子多様化に必須である。第 41 回日本分子生物学会年会 2018年11月29日 横浜
3. 小林 牧, 本庶 佑. IgH 遺伝子多様化におけるノンコーディング germline transcript の機能。第 41 回日本分子生物学会年会 2018年11月28日 横浜
4. Helena Islam, Maki Kobayashi and Tasuku Honjo. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) is dispensable for activation-induced cytidine deaminase (AID)-dependent somatic hypermutation in the immunoglobulin gene. 2nd International Symposium of Radiation Therapeutics and Biology. Japan. Nov.11, 2018. 京都
5. 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.
6. 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.
7. 森脇 隆仁, Afzal Husain, 小林 牧, 本庶 佑. クラススイッチ組換えにおけるメチルトランスフェラーゼ FBL の役割 生命科学系学会合同年次大会 Conbio2017, 2017年12月7日 神戸
8. Helena Islam, Maki Kobayashi, Tasuku Honjo. Apurinic/Apyrimidinic endonuclease 1 (APE1)'s enrollment in activation induced cytidine deaminase (AID)-dependent IgH gene diversification. 生命科学系学会合同年次大会 Conbio2017, 2017年12月6日神戸
9. 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）
10. Helena Islam, Maki Kobayashi, Tasuku Honjo. Apurinic/Apyrimidic endonuclease 1 (APE1) 's enrollment in Somatic Hypermutation (SHM) in V and S regions of human BL 2 cells. International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe 2017. 2017年1月26-28日 神戸
 11. 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）
 12. Maki Kobayashi, Hiroyuki Wakaguri, Masakazu Shimizu, Koh-ichiro Higasa, Fumihiko Matsuda and Tasuku Honjo. Immunoglobulin gene diversification by activation-Induced cytidine deaminase 8AID) through Topoisomerase1 (Top1). The 2nd IFOM-Kyoto University Joint Symposium 2015年10月6日 京都（招待講演）
 13. 小林 牧、本庶 佑. トポイソメラーゼ I 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年7月16日、札幌

〔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/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：該当はありません

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者 該当はありません

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。