

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14783

研究課題名(和文) RNAスプライシング因子の新規機能による抗体遺伝子高頻度突然変異の制御

研究課題名(英文) Regulation of somatic hypermutation on the immunoglobulin gene by novel functions of an RNA splicing factor

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗体の抗原に対する高親和性は、抗体遺伝子可変部上に起こる体細胞高頻度突然変異によって向上する。AIDがこの変異導入に必須であることは示されているが、変異導入機構の詳細は不明な点が多い。本研究では、抗体遺伝子への変異導入の必須因子として見いだしたRNAスプライシング因子SRSF1のアイソフォーム(SRSF1-3)の機能を、突然変異能を有するB細胞株を用いて解析した。その結果、SRSF1-3はAIDと複合体を形成して核内にAIDを蓄積させ、AIDのC末領域を介する機構によって抗体遺伝子変異を促進していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The affinity of antibodies is improved by somatic hypermutation on the immunoglobulin variable region gene. Although it has been shown that AID is essential for somatic hypermutation, it remains unclear how the AID-dependent mutation machinery works. In this study, functions of SRSF1-3, which is an isoform of the RNA splicing factor SRSF1 and essential for somatic hypermutation, were analyzed using a hypermutating B cell line. Results revealed that SRSF1-3 forms a protein complex with AID, and promotes somatic hypermutation through a mechanism linked to the C-terminal region of AID.

研究分野：細胞工学、免疫学

キーワード：SRタンパク質 スプライシング AID DT40

1. 研究開始当初の背景

感作抗原に対する高親和性抗体の産生は、重要な生体防御応答である。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病機構を理解する上で重要である。

申請者は、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)、SRSF1 のアイソフォーム SRSF1-3 が抗体遺伝子への変異導入に必須であることを発見した (Kanehiro et al., PNAS 2012)。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することから、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役割を担っていることが示唆された。その後の研究により、通常、核外に排出されている AID が、SRSF1-3 の作用により AID の作用部位である核に集積することを新規に発見し、SRSF1-3 機能の解明が抗体遺伝子の変異機構を理解する上で重要となってきた。

2. 研究の目的

AID に依存した抗体遺伝子の高頻度突然変異は、(a) AID の発現、(b) 細胞質に保持された AID の核への移行、(c) 転写装置による AID の基質となる ssDNA の形成、(d) AID を含む変異導入装置の活性化、(e) 分解や排出による AID の核からの除去、といった多層に渡る制御を受けている。一方、SRSF1 は、転写、翻訳、ゲノム安定性維持、と核と細胞質で局在を変化させて機能する。このように、SRSF1-3 と AID は、抗体遺伝子変異における必須因子であるほか、転写装置との相互作用、核と細胞質での局在変化、ゲノム安定化・不安定化への関与、と機能的に類似しており、本研究ではこれら類似点を切り口に SRSF1-3 の抗体遺伝子変異における機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) SRSF1-3 の ssDNA 形成への関与

SRSF1-3 が転写後プロセッシング過程に作用して DNA-RNA 二本鎖形成を促進し、抗体遺伝子上に AID の基質となる ssDNA を生成しているかどうかを検討した。(i) SRSF1-3 発現による抗体遺伝子上の ssDNA 形成の増加、(ii) 抗体遺伝子の変異における ssDNA 形成の必要性を明らかにするため、抗体遺伝子上の ssDNA は、バイサルファイト法によって遊離 DNA 鎖のシチジンをウリジンに変換して同定した。また、DT40 細胞に DNA-RNA 二本鎖を分解する RNase H を発現させ、ssDNA 形成を阻害した場合に変異導入は抑制されるのかを検討した。

(2) AID の細胞内局在への SRSF1-3 の関与

AID は通常、細胞質に大部分が存在するが、抗体遺伝子 DNA に変異を引き起こすためには、核への局在化が必要である。AID と SRSF1-3 に異なる蛍光タンパク質を融合させたタンパク質を作製し、HEK293T 細胞に一過性発現させた場合や、B 細胞株に安定発現させた場合の AID の局在に対する SRSF1-3 の発現の影響を調査した。

(3) AID と SRSF1-3 の機能的相互作用

核外排出シグナルを含む C 末領域を欠損した AID を発現する DT40 細胞における SRSF1-3 の過剰発現の変異導入への効果を検討し、AID に依存した抗体遺伝子変異において SRSF1-3 が関与する機構を探索した。また、AID と SRSF1-3 を共発現させた細胞において免疫沈降によって両タンパク質間の相互作用を検討した。

4. 研究成果

(1) SRSF1-3 の ssDNA 形成への関与

SRSF1-3 を発現する野生型 DT40 細胞、および、SRSF1-3 を欠損する改変細胞株 DT40-ASF 細胞をホルムアルデヒドで固定し、固定細胞をバイサルファイト処理することによって、生細胞の染色体中での抗体遺伝子上の ssDNA 部分のシチジンをウリジンに変換した。変換した細胞から抽出したゲノム DNA から PCR によって抗体遺伝子重鎖可変部を増幅して塩基配列を決定したところ、SRSF1-3 の有無にかかわらず、ssDNA は一定量、抗体遺伝子可変部に検出され、SRSF1-3 の存在によって増加する傾向は見られなかった。AID が存在するにもかかわらず、SRSF1-3 が存在しないことで抗体遺伝子変異が起こらない DT40-ASF 細胞においても ssDNA が野生型細胞と同等量検出されたことは、この方法で検出される ssDNA の大部分は AID によるへん猪木室とならないか、変異の標的となる ssDNA は一過性かつ微量にしか生成せずこの方法では定量できないのかもしれない。

SRSF1-3 と、R-loop 形成を介した変異の基

質なる ssDNA 生成の関係を調査するために、SRSF1-3 を過剰発現させて変異を増強した DT40 細胞において RNaseH1 を過剰発現させた細胞株を作製した。RNaseH1 の mRNA からは開始コドンの違いによってミトコンドリア型と核型が生成するため、それぞれを発現できる発現ベクターを構築した。ミトコンドリア型は過剰発現細胞を樹立できず、ミトコンドリアでの RNaseH1 の過剰発現は細胞毒性を示す可能性がある。核型 RNaseH1 を発現する DT40 細胞を樹立できたので、RNaseH1 の過剰発現の有無による抗体遺伝子変異の差異を調査した。もし、SRSF1-3 が R-loop 形成を介して ssDNA 生成に関与するならば、RNaseH1 に感受性を示す R-loop の消失により変異頻度の低下が観察されることが期待されたが、RNaseH1 の過剰発現は抗体遺伝子変異にまったく影響をおよぼさなかった。発現された RNaseH1 は核に局在していることが免疫蛍光染色により確認され、RNaseH1 の過剰発現により、細胞抽出液中の RNA-DNA ハイブリッドの *in vitro* 消化活性は上昇したことから、発現させた RNaseH1 は活性を有していることが推測される。すなわち、AID の基質となるような ssDNA の生成には過剰発現させた RNaseH1 が作用可能な RNA-DNA ハイブリッドの形成が関与していないのかも知れない。

(2) AID の細胞内局在への SRSF1-3 の関与

蛍光タンパク質との融合タンパク質を作製して、AID の細胞内局在性に対する SRSF1-3 発現の影響を調べた。これまでの報告通り、HEK293T 細胞における一過性発現においても、DT40 細胞における安定発現においても AID は通常大部分が細胞質に局在していることが確認できた。一方、SRSF1-3 は HEK293T 細胞における一過性発現においても、DT40 細胞における安定発現においても核に大部分が存在しており、主要アイソフォームである SRSF1 と同様な細胞内局在性を示した。次に AID を SRSF1-3 と HEK293T 細胞に一過性に共発現させると、核に蓄積する AID の割合が増加することを見いだした。核に蓄積した AID は SRSF1-3 と共局在していた。DT40 細胞での安定発現では、SRSF1-3 の有無にかかわらず、大部分の AID は核に存在し、核外排出を阻害するレプトマイシン B で DT40 細胞を処理すると、SRSF1-3 の有無にかかわらず、AID は核に蓄積したことから、SRSF1-3 は AID の核内への輸送や核外への排出には関与せず、AID とタンパク質複合体を形成することにより AID の核内への一時的な蓄積を促進していることが示唆された。

(3) AID と SRSF1-3 の機能的相互作用

DT40 細胞に、核外排出シグナルを含む C 末領域を欠損した AID を発現させた場合も、野生型 AID の存在下で SRSF1-3 を過剰発現させた場合も抗体遺伝子発現は増大する。DT40 細胞ではともに抗体遺伝子変異に必須な因子

である AID と SRSF1-3 の機能的な接点を探索するために、野生型 AID あるいは C 末領域欠損 AID を発現した DT40 細胞に SRSF1-3 を過剰発現させたときの、変異頻度について検討した。過去の報告通り、C 末欠損 AID 発現と野生型 AID 発現+SRSF1-3 過剰発現は同様に変異頻度を増大されたが、C 末欠損 AID 発現下で SRSF1-3 を過剰発現させても、変異頻度のさらなる増大は確認されなかった。すなわち、SRSF1-3 は AID の C 末領域に関与する機能を有していることが示唆される。

AID と SRSF1-3 のタンパク質相互作用の有無を確認する為に、AID と SRSF1-3 を HEK293T 細胞に一過性に発現させ、免疫沈降により共沈を確認したところ、AID と SRSF1-3 は共沈し、少なくとも同一のタンパク質複合体中に含まれていることが示唆された。さらに、C 末欠損 AID と共発現して相互作用を確認したところ、野生型 AID と同様に SRSF1-3 と共沈した。これらの結果から、SRSF1-3 は AID の C 末に関与する機能を有しているが、その部分を介して結合しているのでは無く、AID の C 末以外の部位を介して結合して、直接、あるいは他の因子を介して AID の C 末領域に作用していることが示唆される。

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 1 件)

① Yuka Kawaguchi, Hiroaki Nariki, Naoko Kawamoto, Yuichi Kanehiro, Satoshi Miyazaki, Mari Suzuki, Masaki Magari, Hiroshi Tokumitsu, Naoki Kanayama
SRSF1-3 contributes to diversification of the immunoglobulin variable region gene by promoting accumulation of AID in the nucleus.
Biochemical and biophysical research communications (査読有)
485 巻 2 号、261-266,
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.02.097

[学会発表] (計 9 件)

① 太田 愛美, 金山 直樹, 他
スプライシング因子の過剰発現及び標的遺伝子配列の操作によるニワトリ B 細胞株における遺伝子変異の増強
2017 年度生命科学系学会合同年次大会
2017 年 12 月 6 日
神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

② 金山 直樹, 他
抗体遺伝子変異の転写関連過程における SRSF1-3 の役割の解析
2017 年度生命科学系学会合同年次大会
2017 年 12 月 6 日
神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

③ 梶浦 雄也, 金山 直樹, 他
AID 発現と SHM 誘導における BCR シグナルの
役割
2017 年度生命科学系学会合同年次大会
2017 年 12 月 6 日
神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

④ 金山 直樹, 他
抗体遺伝子変異能力を操作できるニワトリ B
細胞を用いた動物細胞ディスプレイ
第 69 回 日本生物工学会大会
2017 年 9 月 14 日
早稲田大学 (東京都新宿区)

⑤ 梶浦 雄也, 金山 直樹, 他
AID 発現と SHM 誘導における BCR シグナルの
役割
第 39 回 日本分子生物学会年会
2016 年 12 月 2 日
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

⑥ 川口 祐加, 金山 直樹, 他
抗体遺伝子変異における転写依存性過程に
おける SRSF1-3 の役割の解析
第 39 回 日本分子生物学会年会
2016 年 12 月 2 日
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

⑦ 横山 和輝, 金山 直樹, 他
抗体遺伝子高頻度突然変異における ssDNA 形
成への SRSF1-3 の関与の解析
第 39 回 日本分子生物学会年会
2016 年 12 月 2 日
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

⑧ 成木 弘明, 金山 直樹, 他
SRSF1-3 の高度保存領域が抗体遺伝子変異に
寄与する
第 39 回 日本分子生物学会年会
2016 年 12 月 2 日
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

⑨ 太田 愛美, 金山 直樹, 他
スプライシング因子過剰発現による B 細胞
株における抗体遺伝子変異の増強
第 68 回 日本生物工学会大会
2016 年 9 月 26 日
富山国際会議場 (富山県富山市)

[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://www.okayama-u.ac.jp/user/saibou/
index.html](http://www.okayama-u.ac.jp/user/saibou/index.html)

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()