

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07173

研究課題名(和文) TREX-2構成因子GANPを介した転写共役機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of transcription-coupled mechanism via TREX-2 component GANP

研究代表者

前田 和彦 (MAEDA, KAZUHIKO)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授(常勤)

研究者番号：20332869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：転写の際には、DNAとRNAのハイブリッド(R-ループ)が一過性に形成される。新たな転写産物は、鋳型DNAから速やかに放出され、mRNA輸送体を介して細胞質に輸送されなければならない。活性化誘導シチジンデアミナーゼ(AID)は、転写の際にR-ループに作用することが示唆されている。我々は、AIDと相互作用するmRNA輸送複合体TREX-2の構成因子GANPが、R-loop形成に直接影響を与えるかどうかを、内因性GANPに対する抗体を用いて調べた。その結果、抗体遺伝子領域で特定するまでには至らなかった。今後は、転写を捕捉するGANP変異体を用いて強制発現系で調べる予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

R-ループ形成は全ての遺伝子の転写時に通過するものであり、特に抗体遺伝子座ではB細胞の抗体産生を支える重要な仕組みの一つである。この仕組みの破綻は、容易くDNA損傷を招くとともに、他の細胞種では多数の疾患の要因ともなっている。R-ループから出た正常な転写物がmRNA輸送体へと運ばれていく一方で、mRNAの品質管理で異常となった転写物は、内在性のRNA分解酵素によって分解されて解消されていくと考えられている。本研究の成果は、基礎的解析に留まらず、遺伝的安定性の維持に関わるような疾患や調節機構の解明に繋がり、重要な役割を果たすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：During transcription, a DNA-RNA hybrid (R-loop) is transiently formed. The newly transcripts must be rapidly released from the template DNA and transported to the cytoplasm via mRNA transporters. It has been suggested that activation-induced cytidine deaminase (AID) acts on the R-loop during transcription. We investigated whether GANP, a component of the mRNA export complex TREX-2 that interacts with AID, directly affects R-loop formation using antibodies against endogenous GANP. As a result, we were not able to identify it in the antibody gene region. In the future, we plan to investigate GANP mutants that capture transcription in a forced expression system.

研究分野：免疫学

キーワード：RNA輸送 胚中心 R-loop AID

1. 研究開始当初の背景

基本転写メカニズムとして、RNA ポリメラーゼ II による mRNA の新生鎖は、転写伸長反応の間に鋳型一本鎖 DNA (ssDNA) と転写産物とのハイブリッド状態 (R-ループ) が形成される。その後、mRNA は鋳型 ssDNA から遊離し、さまざまな RNA 結合タンパク質の介助を得ながら RNA 代謝 (スプライシング、ポリアデニル化など) を受けて、核から細胞質へと輸送されていく。活性型シチジン脱アミノ化酵素 AID による免疫グロブリン (Immunoglobulin; Ig) 遺伝子への脱アミノ化反応は、ssDNA を基質とする「DNA 脱アミノ化モデル」に基づいているため、この R-loop 形成状態から ssDNA へとなるタイミングと、その相補鎖が ssDNA となっている状態が作用点として重要であると考えられる。R-ループは、どの遺伝子発現過程でも転写中間体として形成されることが可能である。その一方で、非制御下にある R-ループ形成は、DNA 損傷とゲノム不安定性を誘発し、とりわけ発がんと密接に関連する事象として知られている (Hamperl & Cimprich, DNA Repair 2014)。抗体を産生する B 細胞では、抗体分子を産生することが第一義的に優先されることであるから、そこには遺伝子発現を緻密に行ない、変異導入やクラススイッチ組換えを効率よく可能とするために、DNA 損傷とゲノム不安定を回避する「仕組み」が存在するものと考えられる。さらに、AID と相互作用する mRNA 輸送複合体 TREX-2 の構成因子 GANP の発現はコピキタスではあるが、細胞増殖が活発で細胞分裂が盛んな末梢リンパ組織の胚中心領域では高発現をしている。すなわち増殖が活発な細胞において、GANP は mRNA 輸送体としてある種々の遺伝子発現が巧みに進行するようにコントロールしているものと考えられる。コンベンショナル GANP 遺伝子欠損マウスは胎生 12 日で致死となり、異常細胞の増殖が認められていることから、転写と共役した領域で何らかの相互作用があるものと示唆される。R-ループ形成の分子基盤の理解は、免疫における抗体産生機構の理解のみならず、がん研究においても革新をなす解明へと繋がることが期待される。

2. 研究の目的

活性型シチジン脱アミノ化酵素 AID は、成熟 B 細胞で特異的発現し、抗体遺伝子が多様性を獲得する上で必須の分子である。我々が同定した GANP 分子は、AID の cofactor として機能することを明らかとしてきた。その後の解析から、GANP は哺乳類 mRNA 輸送複合体 TREX-2 を構成する中心因子として位置付けられている。AID による一本鎖 DNA の WRC (W=A/T, R=プリン) モチーフにあるシチジンを脱アミノ化反応によってウリジンに変換する。細胞内でこの酵素活性が発揮される時点は、転写伸長時の DNA-RNA ハイブリッド (R-ループ) 後の時点と関連するものと考えられる。R-ループ形成保持はゲノム不安定性を招くため、B 細胞では適切に保護され、速やかに収束されなければならない。

本研究では、GANP および AID を基軸とした転写共役 R-ループ形成に着目し、mRNA 輸送体としての GANP の役割があるのか、その分子基盤の解明を目指す。

3. 研究の方法

GANP が関与する転写共役 R-ループがどのように形成され、ゲノム上に位置するのかその状態を分子レベルで解析することが目的である。

- (1) S9.6 モノクローナル抗体は、RNA-DNA ハイブリッドを特異的に認識する抗体として幅広く使用されている。この S9.6 モノクローナル抗体を用いた DRIP (DNA-RNA immunoprecipitation) 法を行い、サンプルの調整と評価を行う。
- (2) 210kDa をコードする GANP の機能ドメイン欠損を主とした各種変異体を作製する。
- (3) 核内における R-loop 形成部位と GANP の局在解析を超解像度顕微鏡で観察する。
- (4) R-ループ形成部位と GANP アクセス部位のマッピング解析を進める。

4. 研究成果

- (1) HeLa 細胞及びマウス由来 B 細胞から細胞可溶化溶液を調整し、S9.6 モノクローナル抗体 (市販またはハイブリドーマ由来) を用いた DRIP 法を行った。回収した沈降物は、徐蛋白後に核酸を精製した。サンプル中の核酸は、RNaseH 処理することで一本鎖 DNA を、DNase 処理することで RNA を回収した。それぞれの収量は、分光光度計及びバイオアナライザを用いて測定した。細胞の状態及び用いる抗体の分量によって最終サンプルの収量と精度に大きく影響を与えることが認められた。純化した精製抗体を用いることで、非特異的結合を減少させることができることを確認した。
- (2) GANP の機能を調べるために、8 種類の機能ドメイン欠損変異体を作製した。N 末端側から、ヌクレオポリン様ドメイン、RNA 結合モチーフ (RRM) 領域、プライマーゼ領域、Sac ドメイン、

SR 領域、RS 領域、RI 領域、HAT ドメインとしてデザインし、緑色蛍光タンパク質(GFP)との融合タンパク質として発現するベクターを構築し、ウェスタンブロット法でコンストラクトの作製を確認した。RRM 欠損体は、さらに *in vitro* 発現系で用いるために、GST 融合タンパク質(GST-GANP RRM)として作製した。全長の GST-GANP とともに、*in vitro* RNA 結合アッセイを行った結果、全長の GANP-GANP-fuII は RNA と結合するが、GST-GANP RRM では、RNA と結合しなかった。GANP の RRM を介して RNA と結合することを確認した。

- (3) GANP の細胞内局在を観察するため、細胞の形態が分かりやすい HeLa 細胞を用いて内在性 GANP の検出を試みた。パラホルムアルデヒドよりも良好なシグナルが得られるメタノール固定を行い、抗 GANP 抗体で染色後、超解像度顕微鏡で観察したところ、核膜に局在する GANP が存在することを確認した。さらに、GANP 陽性の領域は DAPI 染色でも陽性となる領域が部分的に観察することができたため、限りなくゲノム領域に密接することが推察された。しかしながら S9.6 抗体による染色は、陽性シグナルが不明瞭であり、再現性にバラツキがあった。S9.6 抗体自体が、DNA-RNA ハイブリッド以外にも認識している可能性が示唆される。
- (4) マウス B 細胞を用いて抗 GANP 抗体による ChIP アッセイおよび S9.6 抗体を用いた DRIP 法によって調整したサンプルからライブラリを作製し、HiSeq を用いた NGS 解析を進めた。抗 GANP 抗体によるヒト Ramos 細胞でのシグナルは 78%及び 10%のカバレッジで得られたものの、マウス B 細胞のサンプルでは、リード数を増やしてもヒト Ramos 細胞のように十分なシグナルが得られなかった。これは、用いた抗 GANP 抗体がマウス GANP との交差性が弱いことに起因するものと考えられる。そこで、数種類の抗 GANP 抗体を準備し、各種ヒト及びマウスとの交差性をウェスタンブロット法によって検討した。マウス GANP と強く反応する抗体を用いて、再度データの取得を試みる予定である。また、DRIP 法の結果も、純化した精製抗体で良好な結果が得られたが、解析の段階で public dataset のデータと比較して非特異的シグナルの減少が認められたものの、ノイズとの区分が不明瞭な箇所が多く認められた。さらに両データを比較するパイプラインを構築して、絞り込みを試みているが、重要な領域となるエビデンスはまだ得られていない。また、ヒト Ramos 細胞では VH4-34 領域を発現しているが、マウスではレパトアがあるため、シングルセルレベルでの解析が有効となるため、シングルセル解析のシステムを構築している。

これらの結果から、GANP の RRM が RNA 結合能を持ち、核膜近傍のゲノム領域にアクセスすることが確認された。これは、転写が核膜近傍で活発に行われているという知見と一致する。しかし、GANP の RNA と DNA に対する特異性や、RNA-DNA ハイブリッドの R-ループ形成時であるかどうかについては、明確な結論を得るまでには至らなかった。作製した GANP 変異体の中で、転写時に影響を与えるものを見いたしていることで、この強制発現系を用いることで、通常状態よりも R-ループ形成が長く保たれて、効率よく検出できるのではないかと推測している。また、ある刺激や活性化経路状態における経時的条件下も検討している。さらに、今回のデータセットと公開データセットを取り込むことを基盤として活用し、ターゲット領域の選択と検証を進めることが今後は有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Akira S and Maeda K.	4. 巻 39
2. 論文標題 Control of RNA Stability in Immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annu Rev Immunol	6. 最初と最後の頁 481-509
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1146/annurev-immunol-101819-075147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maeda K, Caldez MJ, Akira S	4. 巻 74
2. 論文標題 Innate immunity in allergy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 1660-1674
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/all.13788	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nagahama, Y. Shimoda, M. Mao, G. Singh, S. K. Kozakai, Y. Sun, X. Motooka, D. Nakamura, S. Tanaka, H. Satoh, T. Maeda, K. Akira, S.	4. 巻 115
2. 論文標題 Regnase-1 controls colon epithelial regeneration via regulation of mTOR and purine metabolism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 11036-11041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1809575115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Diez D, Maeda K, Teraguchi S:
2. 発表標題 Automatic cell type identification by transferring information from public transcriptome data.
3. 学会等名 Single Cell Biology: EMBO Workshop（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Diez D, Martin J. Loza-Lopez, Maeda K, Teraguchi S:
2. 発表標題 Identification of immune cells in single cell transcriptomics by transferring information from public datasets.
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田和彦
2. 発表標題 免疫担当細胞におけるシングルセル解析の有効性と実用性
3. 学会等名 Single-Cell 2019 OSAKAセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Singh, S. K. Shimoda, M. Maeda, K. Sakaguchi, N.
2. 発表標題 GANP interacts with translation initiation complex for enhancing c-Myc expression in B cells
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagahama, Y. Shimoda, M. Kozakai, Y. Tanaka, H. Satoh, T. Maeda, K. Akira, S.
2. 発表標題 Metabolic control of Regnase-1 in colon epithelial regeneration
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Maeda, K. Nagahama, Y. Shimoda, M. Mao, G. Akira, S.
2. 発表標題 Endoribonuclease Regnase-1 controls colon epithelial regeneration via regulation of mTOR and purine metabolism
3. 学会等名 The 20th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience RNA Neobiology
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 監修:竹内勤 編集:渥美達也 岡田浩一 金子裕子 熊ノ郷淳 黒川峰夫 藤尾圭志(担当:分担執筆, 範囲:抗体産生)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 368
3. 書名 免疫・炎症疾患のすべて (日本医師会生涯教育シリーズ)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------