

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15045

研究課題名(和文)複数のCRISPR/Casを用いたDNA構造の改変と転写制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of transcriptional regulation mechanisms and artificial modification of DNA structure by CRISPR/Cas system.

研究代表者

佐藤 克哉 (Sato, Katsuya)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60733508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Bリンパ球において特異的に発現するAIDは、抗体改変に必須のタンパク質であり、その発現は、AID遺伝子(Aicda)上に散在する転写調節領域とそれらに作用する複数の転写因子によって調節されている。AID発現に必須の転写因子の1つであるIRF4は、PU.1やBatfなど複数の転写因子と複合体を形成する。本研究において、AID発現誘導は、PU.1よりもBatfと複合体を形成による寄与が大きいことを明らかにした。また、これらの転写因子が作用した際に、Aicda転写調節領域がどのような構造を取り得るかを理解すべく、転写活性化タンパク質やルシフェラーゼを融合させたdCas9を作用させ、解析を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、従来着目されてきた転写因子とDNAの単純な相互作用による転写調節に加え、遺伝子座全体の構造や、核内においてDNAの存在する区画によって転写が活発な領域とそうでない領域に分けられるという考え方が受け入れられつつある。しかしながらこれらを知るためには3C法やHi-C法といった煩雑な解析が必要であった。今後改善が必要であるものの、本研究で検討したdCas9を用いることでより簡便に遺伝子座の構造解析を行えるようになると考えられる。また、こうして得られた知見をもとにDNA構造を改変することでAID発現の調節が出来れば、将来的に自己免疫疾患の克服や効率的なワクチン開発といった分野への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Activation-induced cytidine deaminase (AID), which encoded by Aicda, is essential for class switch recombination (CSR) and somatic hypermutation (SHM). Although the expression of AID is tightly regulated and restricted in activated B cells, it is thought that aberrant expression of AID can be involved in tumor progression because of its high mutagenetic potential. Many transcription factors have been identified as regulators of Aicda. These factors should coordinately regulate Aicda, but the detailed mechanisms are not fully understood. IRF4, one of the essential factors for AID expression, forms a complex with multiple transcription factors such as PU.1 and Batf. We identified that IRF4-Batf-Jun complex are more important than IRF4-PU.1 complex for AID expression. Also, we tried to analyze 3D structure of Aicda locus by dCas9 fused with transcription activated protein or Luciferase protein. Furthermore, we tried to reconstitute activated Aicda locus by dCas9 system.

研究分野：細胞生物学

キーワード：AID CRISPR/Cas9 遺伝子発現制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫において重要な役割を担う B リンパ球は、骨髄で分化した後、抹消リンパ組織に移動し、抗原や T リンパ球の刺激を介して活性化される。このとき細胞内に発現する Activation induced cytidine deaminase (AID) によって抗体をコードする遺伝子が再構成されることにより、B リンパ球は、さらなる多様性と親和性の高いクラスの抗体を獲得することができる。

AID 遺伝子 (*Aicda*) は、配列上に 5 つのエキソンと、各種転写制御因子が結合する調節領域が少なくとも 6 つ存在することが知られている。各領域には、プロモーターの他に、エンハンサーやサイレンサーとして働く部位が存在し、これまで、STAT6, NF- κ B, B-ATF, HoxC4 など、多数の転写調節因子が結合することが報告されてきた。我々や、他の研究グループは、このうち、IRF4、B-ATF が複合体を形成し、*Aicda* 上に作用することが AID の発現に必須であることを示した。このように、AID の発現は、これらの転写因子の働きや周囲の環境からの刺激により、厳密な制御を経て調節されていると考えられている。一方、活性化した B リンパ球以外でも、病的刺激に伴って AID の発現が起こり、細胞の癌化に関与することが提唱されている。さらに AID は、DNA 脱メチル化を行うことで、細胞リプログラミングに関与することが示唆されている。

Aicda の発現制御に関して、転写因子の働きや、それらが結合する DNA 上の転写調節因子結合部位を含むシスエレメントが明らかになりつつある一方で、これだけ多くの転写因子と遺伝子発現調節エレメントの関与が明らかであるにも関わらず、何故 AID の発現が B リンパ球に特異的であるのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

NF- κ B や Sp-1、SMAD3/4 など、AID 発現に関与する転写因子のうちいくつかは B リンパ球外においても発現が見られる。また DNA の一次配列自体は、基本的には全ての細胞で同様である。このことから、転写因子や DNA の一時配列以外に、ヒストンのメチル化やアセチル化といったエピジェネティックマークや DNA の三次元構造の変化によって AID の発現の組織特異性が生じている可能性が示唆される。

そこで本研究は、*Aicda* 遺伝子の三次元構造を人工的に改変し、AID 発現の際に形成される構造を調べることで、AID の組織特異的な発現を担う新規要因の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 生物発光・蛍光を利用した B リンパ球活性化時・非活性化時における DNA 構造の解析

種々の蛍光タンパク質やルシフェラーゼを融合させた DNA 切断不活性型の Cas9 (dCas9) を B リンパ球由来培養細胞に導入し、細胞刺激を加える。このとき、dCas9 を DNA 上に誘導する gRNA を 2 種類、それぞれ別の DNA 領域に結合するように設計した。それぞれの dCas9 が近接することで、蛍光や発光が生じることを利用し、*Aicda* 調節領域のそれぞれがプロモーターと近接するかを検討した。

(2) B リンパ球活性化時の DNA 構造再現と AID 発現制御

近年、シロイヌナズナ由来の光受容体タンパク質やアプシシン酸結合タンパク質を利用し、光刺激や化学刺激誘導下でタンパク質の結合を誘導出来る技術が開発された。これらのタンパク質などを DNA 切断活性欠損型の Cas9 と融合させることで、DNA 上の任意の領域を近接させることができる。(1)の調査をもとに、B リンパ球活性化時の *Aicda* 構造を再構築し、AID の発現の ON/OFF の制御を試みた。

4. 研究成果

まず、dCas9 タンパク質に転写活性化タンパク質 VP64 を融合させた dCas9-VP64 を作成し、これらの各 DNA 領域の転写活性への寄与を検討した。また、各種蛍光タンパク質融合型の dCas9、およびルシフェラーゼを発現するコンストラクト作製を行い、生物発光、蛍光を利用した B リンパ球活性化時・非活性化時の DNA 構造の解明を試みた。その結果、本研究で用いた細胞においては、dCas9-VP64 による転写の活性化は弱いものの、プロモーター上の適切な配列に dCas9-VP64 タンパク質を結合させることにより、プロモーター下流の遺伝子の転写を活性化することを確認できた。一方、ルシフェラーゼと dCas9 を融合させたコンストラクト (dCas9-Luc) は、*dcas9* とルシフェラーゼコンストラクトをつなぐリンカー配列、および dCas9 上のルシフェラーゼを結合させる位置によって *dcas9*-Luc の活性が大きく影響を受けることが明らかとなった。Cas9 の立体性やリンカー配列などを考慮し、より感度の高い DNA 立体構造の検出系を構築する為に、精密な条件検討を続ける必要があると考えられる。

そこで、AID 遺伝子発現調節に直接関与する転写因子とそれらが標的とする遺伝子配列について

も検討を行った。これまで、明らかにしてきた IRF4 や Batf といった AID の遺伝子発現に関わる転写因子のうち、IRF4 は、種々の転写因子と複合体を形成することができ、形成する複合体によって標的 DNA 領域が変化することが知られている。IRF4 の既知の結合パートナーとして Batf の他に PU.1 が知られており、IRF4-Batf-Jun 複合体を形成すると、DNA 上の AICE と呼ばれる配列に、IRF4-PU.1 複合体を形成すると、EICE と呼ばれる配列に結合し、これにより細胞機能や細胞の分化などの運命決定に変化が生じる。そこで IRF4 の結合パートナーとして、PU.1 に着目した。その結果、我々の実験系では、IRF4 は PU.1 よりも Batf や Jun と複合体を形成することで AID を強く誘導することが示唆された。IRF4-Batf-Jun 複合体が標的とする AICE 配列は、*Aicda* 上の転写開始点より数 kbp 上流にも存在する。このことから、IRF4-Batf-Jun 複合体は、*Aicda* 上の AICE 配列に結合することで、AID 遺伝子発現を誘導している可能性が考えられた。本研究課題終了後も、これらの配列に IRF4-Batf-Jun 複合体が作用するとき、DNA の巨視的構造としてどのような変化が生じているか、引き続き Cas9-Luc 実験系を活用し、検討していく予定である。

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 0件）

1. 著者名 Nishikawa Masashi, Nakano Shun, Nakao Hiromu, Sato Katsuya, Sugiyama Tsuyoshi, Akao Yukihiko, Nagaoka Hitoshi, Yamakawa Hisashi, Nagase Takahiro, Ueda Hiroshi	4. 巻 61
2. 論文標題 The interaction between PLEKHG2 and ABL1 suppresses cell growth via the NF- B signaling pathway in HEK293 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 93 ~ 107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cellsig.2019.04.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Shun, Nishikawa Masashi, Asaoka Rina, Ishikawa Natsuko, Ohwaki Chisato, Sato Katsuya, Nagaoka Hitoshi, Yamakawa Hisashi, Nagase Takahiro, Ueda Hiroshi	4. 巻 459
2. 論文標題 DBS is activated by EPHB2/SRC signaling-mediated tyrosine phosphorylation in HEK293 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 83 ~ 93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Srinontong Piyarat, Wu Zhiliang, Sato Katsuya, Nagaoka Hitoshi, Maekawa Yoichi	4. 巻 506
2. 論文標題 The circulating immunoglobulins negatively impact on the parasite clearance in the liver of Leishmania donovani-infected mice via dampening ROS activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 20 ~ 26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.10.055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Katsuya Sato, Hajime Yasuda, Kenichiro Hori, Hitoshi Nagaoka
2. 発表標題 Regulation of AID expression by transcription factor BATF-IRF complex
3. 学会等名 Nagoya Immunology Network in NCU
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川将司、中野駿、中尾拡、佐藤克哉、杉山剛志、赤尾幸博、長岡仁、山川央、長瀬隆弘、上田浩
2. 発表標題 Rho活性化因子PLEKHG2と非受容体チロシンキナーゼABL1の蛋白質間相互作用が誘導するNF- κ Bシグナルを介した細胞増殖抑制
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田 一、佐藤 克哉、杉山 貴紹、金子 朋仁、堀 賢一郎、李 育朋、長岡 仁
2. 発表標題 AP-1ファミリー転写因子Junによる抗体遺伝子改変酵素AIDの発現調節
3. 学会等名 日本薬学会 第140回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 克哉、杉山貴紹、安田一、堀 賢一郎、李育朋、長岡 仁
2. 発表標題 AID遺伝子発現調節における転写因子Junの関与
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsuya Sato、Hitoshi Nagaoka
2. 発表標題 Evaluation of function of transcription factor, Jun, in Aicda gene regulation
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤克哉、安田一、堀賢一郎、Li Yupeng、長岡仁
2. 発表標題 AID遺伝子発現調節における転写因子BATFとIRF4の相互作用
3. 学会等名 第82回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 克哉、堀 賢一郎、安田 一、長岡 仁
2. 発表標題 転写因子BATF-IRF4複合体による遺伝子座の高次構造形成とAID遺伝子発現調節
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katsuya Sato、Hitoshi Nagaoka
2. 発表標題 Evaluation of Aicda gene expression by signal factor controlled by BATF
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	長岡 仁 (Nagaoka Hitoshi) (20270647)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授 (13701)	

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
---------	---------