

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成22年度採択分

平成25年5月27日現在

研究課題名（和文） **AIDによるtopoisomerase1を介した
ゲノム不安定性誘導のメカニズム**
研究課題名（英文） Mechanism for genome instability by activation
induced cytidine deaminase induced-reduction of
topoisomerase1



研究代表者

本庶 佑 (HONJO TASUKU)

京都大学・大学院医学研究科・客員教授

研究の概要：AIDによる抗体記憶のゲノムへの刻印メカニズムに関して、以下のような新たな成果を得た。AIDの発現により Top1 mRNA にマイクロ RNA が特異的に結合し、Top1 が低下する。その結果、Top1 の免疫グロブリン遺伝子座への切断中間体結合が増える。DNA 切断に関わるとされた Ung は DNA 切断後の SHM の制御と遠く離れた S 領域間のシナプス形成に関わる。シナプス形成には AID の C 末端部分の他の蛋白質との結合が必要である。今後は Top1 mRNA に結合するマイクロ RNA の同定を目指す。

研究分野：生物系・医歯薬学分野

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：体細胞突然変異・クラススイッチ組換え・RNA 編集・DNA 修復

1. 研究開始当初の背景

2000 年に私達のグループは、Activation-induced cytidine deaminase (AID) という酵素が抗体記憶をゲノムに刻み込む酵素であることを明らかにした。AID は抗体遺伝子に変化を起し、抗原結合能力を増強させる体細胞突然変異と抗原の処理の多様化をもたらすクラススイッチ組換えを引き起こす。さらに AID の異常発現で発癌が起こることも明らかにした。

2. 研究の目的

この研究の目的は、AID がどのような仕組みで DNA に変化を引き起こすのか、なぜ抗体遺伝子のみならず、他の癌遺伝子にも変異を起こすのかという課題を解決することである。

3. 研究の方法

我々は、AID が抗体の遺伝子を切断するために Topoisomerase 1 (Top1) という DNA の立体構造を変える酵素の量を低下させることを見いだした。Top1 の量が下がることにより、抗体遺伝子の DNA 構造に変化が起こり、ここに Top1 自身による切断導入が引き起こされる。本研究では AID がどのような仕組みで Top1 の蛋白質の量を低下させるかを明らかにする。現在の作業仮説は Top1 mRNA の翻訳段階を AID が阻害すると考えている。その仕組みとしては、AID が cytidine 脱アミノ活性により低分子 RNA 中の C から U への変異を導入す

ることによって Top1 mRNA の翻訳効率を低下させると考えている。このために AID によって脱アミノ化される RNA を遺伝子塩基配列決定法により同定する方法や、Top1 mRNA に結合する RNA および蛋白質の分析法を用いる。また、AID によって切断を受ける全ゲノム中 DNA の構造を全ゲノム塩基配列決定により解明する。

4. これまでの成果

(1) AID による top1 翻訳阻害のメカニズムの解明

マイクロ RNA-Ago2 を含む RISC 複合体が Top1 mRNA の特定の部位に結合することを PAR CLIP 法で確定した。その結果、3' UTR 領域に 2 箇所の Ago2 特異的な結合サイトがあり、上流側は AID 刺激時のみに Ago2 が結合し、下流側は AID の有無にかかわらず Ago2 の結合が見られるという性質の異なる部位であった。このことは AID により編集された新たなマイクロ RNA が Top1 mRNA に RISC 複合体として結合することを示唆する。さらに B 細胞抽出液と Top1 mRNA のコード領域 3' 側配列との混合によりマイクロ RNA 結合が AID 発現依存的に増強した。現在、結合したマイクロ RNA の同定を deep sequence 法で行っている。

(2) AID 依存 DNA 切断ターゲットの特異性決定メカニズムの解明

AID により誘発された切断断端を標識し、集めたライブラリーを用いた全ゲノム塩基配列

によって AID の切断ターゲットとして未知の 4 遺伝子座を同定した。このいずれの遺伝子においても S 領域同様の反復配列が存在し、我々が提唱する Non B DNA が切断ターゲットの指標であることを裏付けた。

一方で FACT 複合体や H3.3 の集積ならびに H3K4me3 や H4Kac のクロマチン修飾がターゲットの特異性決定に関わることを明らかにした。

また、Top1 との共沈タンパク質をプロテオミクスで網羅的に解析したところ、H3K4me3 ヒストン修飾体と共に FACT 複合体を同定し、さらにこれらと Top1 との結合を ChIP 法で確認した。このことからクロマチン修飾と FACT の S 領域への集積により Top1 が S 領域に特異的に集積することが想定される。

(3) AID 依存 DNA 切断部位における Ung による SHM と CSR の制御機構の解明

Ung は AID 活性化により生じた単鎖ギャップに結合し、Pol β 他の一連の BER 酵素と複合体を形成する足場タンパク質として正しい修復を促進する。このためには Ung の酵素活性は不要である。一方、TLP である Rev3 やその足場タンパク質である Rev1 は Ung と競合して単鎖ギャップを持つ S 領域に結合する。Ung と Rev1 との間の競合関係によって SHM が調節される。Ung の CSR への関与は DNA 切断ではなく、S 領域間のシナプス形成とマイクロホモロジーペアリングの維持である。

(4) AID の N 末端による切断活性と C 末端による CSR 活性の分別メカニズムの解明

N 末端に点突然変異を導入した G23S AID の knock-in マウスでは DNA 切断活性が弱く、SHM 頻度が著しく低下した。それにも関わらず CSR 活性は比較的正常に近かった。このことは DNA 切断活性が N 末端に局在することを示す。一方、C 末端の欠失または変異を持つ AID は、SHM を起こすが CSR は起こせない。これらのことは、AID には N 末端による DNA 切断活性と別に C 末端による CSR 特異的な活性があることを示している。

以上をまとめた図が最下段の通りである。

5. 今後の計画

まず第一に、結合 Top1 mRNA に AID 依存性に結合するマイクロ RNA を同定する。さらに

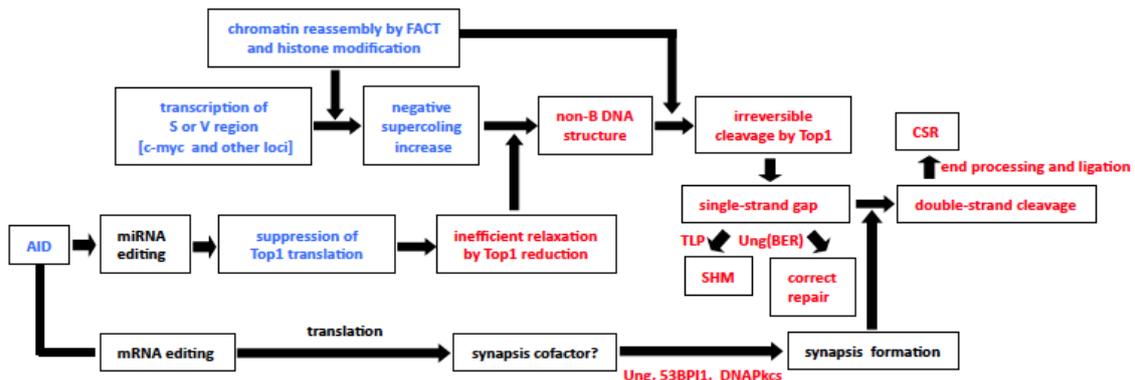
切断後の DNA 修復の過程として生じる SHM と CSR のメカニズムについて Ung を通じた新たな制御機構の詳細を解明する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)
(研究代表者は二重線、研究分担者は一重下線、連携研究者は点線)

1. Accumulation of the FACT complex as well as histone H3.3 serves as a target marker for somatic hypermutation. Aida, M., Hamad, N., Stanlie, A., Begum, N.A., and Honjo, T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 査読有り。110. 7784-7789 2013
2. The DSIF subunits Spt4 and Spt5 have distinct roles at various phases of immunoglobulin class switch recombination. Stanlie, A., Begum, N.A., Akiyama, H. and Honjo, T. PLoS Genet. 査読有り。8. 1-11 e1002675 2012
3. Nonimmunoglobulin target loci of activation-induced cytidine deaminase (AID) share unique features with immunoglobulin genes. Kato, L., Begum, N.A., Burroughs, A.M., Doi, T., Kawai, J., Daub, C.O., Kawaguchi, T., Matsuda, F., Hayashizaki, Y. and Honjo, T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 査読有り。109. 2479-2484 2012
4. Decrease in topoisomerase I is responsible for AID-dependent somatic hypermutation. Kobayashi, M., Sabouri, Z., Sabouri, S., Kitawaki, Y., Pommier, Y., Abe, T., Kiyonari, H. and Honjo, T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 査読有り。108. 19305-19310 2011
5. Mice carrying a knock-in mutation of *Aicda* resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. Wei, M., Shinkura, R., Doi, Y., Maruya, M., Fagarasan, S. and Honjo, T. Nat. Immunol. 査読有り。12. 264-270 2011

本庶 佑 2012 年 11 月ロベルト・コッホ賞受賞ホームページ

<http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/>



これまでの実績で明らかになった点は赤、すでに明らかであったところは青、また未確定のところは黒。