

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号： 14301
研究種目： 特別推進研究
研究期間： 2010～2014
課題番号： 22000015
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・医学研究科・客員教授
研究者番号： 80090504
交付決定額（研究期間全体）（直接経費）： 348,200,000 円

研究成果の概要（和文）：

Activation-induced cytidine deaminase (AID) による抗体記憶のゲノムへの刻印は DNA 切断により開始される。DNA 構造の維持に働くトポイソメラーゼ 1 (Top1) が AID に誘導され、その DNA 切断を遂行する分子機構を解析し、従来の DNA 編集仮説を正した。AID は DNA 切断と DNA 修復という 2 つの機能を有し、各々はアミノ基側とカルボキシル基側の別々のドメインに依存する。各々の機能に特異的かつ必須の AID の共役分子、hnRNP K と hnRNP L の 2 つを同定し、それらの機能を解析した。AID の突然変異と非常に似た病態の高 IgM 血症 5 型を示すウラシル DNA グリコシラーゼ (UNG) 欠損症では CSR が抑制されるものの SHM は保たれており、2 者の差を分子機構のレベルで証明した。また、AP エンドヌクレアーゼ 1 (APE1) の CSR での機能が DNA 切断後修復に特化していることを証明した。AID による DNA 切断と DNA 修復の 2 つはそれぞれ、特異的なクロマチン構造を要求する過程であることを証明した。クロマチン構造変換因子 SMARCA4 や転写伸長因子 Spt4/5 複合体、ヒストンアセチル化リジンに結合する Brd4 が免疫グロブリン遺伝子組換えにおいて重要な機能を果たすことを示した。

研究成果の概要（英文）：

Activation-induced cytidine deaminase (AID)-dependent immunological memory is engraved in immunoglobulin (IgH) gene and initiated by DNA breaks. Precise molecular mechanism of Topoisomerase1 (Top1)'s involvement in AID-induced DNA breaks was analyzed. This result corrected the previous DNA deamination theory. In type 5 hyper IgM syndrome caused by UNG deficiency, class switch recombination (CSR) is abolished, however, somatic hyper-mutation (SHM) is maintained. Molecular mechanism of UNG in CSR and SHM is analyzed and the results is sufficient for explaining this difference between these two syndrome. AID has two independent functions of DNA breaks and DNA repair which are dependent on N-terminus and C-terminus domain of AID, respectively. The function-specific cofactors, hnRNP K for DNA breaks and hnRNP L for DNA repair are identified and analyzed. DNA breaks and repair steps are conducted in the chromatin structure. We showed that AID-induced IgH gene recombination requires the specific chromatin structure. Actually molecular function of chromatin remodeller SMARCA4, transcription elongation factor Spt4/5 complex and Brd4 which binds to acetylated lysine in IgH diversification were analyzed.

研究分野：

生物系／医歯薬学分野

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年に私たちのグループは、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こし、抗原結合能力を増強させる体細胞突然変異と抗原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の異常発現により各種組織ががん化を起こす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

下記にあげた複数の方法を組み合わせ、解析を進めた。

- ・Top1 特異的阻害剤カンプトテシン、プロテアソーム阻害剤、Brd4 阻害剤などの各種阻害剤を用いた抗体遺伝子組換え (CSR, SHM) の検討
- ・RNA 結合タンパク質に対する抗体を用いた RNA 免疫沈降法 (時に次世代シーケンシングによる RNA-seq と組み合わせた)
- ・ショ糖密度勾配遠心法によるポリソーム分析法を用いた Top1 翻訳効率の検出
- ・クロマチン関連因子のノックダウンによる CSR や SHM 検討
- ・抗 Top1 抗体や各種クロマチン関連因子によるクロマチン免疫沈降法
- ・ビオチン化 TMP と遺伝子座特異的なプライマーを用いた DNA 構造検出法
- ・ビオチン化リンカーを用いた DNA 切断端検出法
- ・グリセロール密度勾配遠心法による AID 分布の検討 (AID やタグ抗体による免疫沈降との組み合わせを含む)
- ・蛍光タンパク質をサブユニットに分解し二量体候補分子と融合することで単量体・多量体形成をモニターする mKG 法
- ・CRISPR/CAS9 による遺伝子ノックアウト法
- ・GFP レポーターを用いた相同組換え・非相同組換えモニタリング法
- ・ペプチドパネルを用いたヒストン修飾体への Top1 結合試験
- ・microRNA array、miRNA-seq

4. 研究成果

(1) AID が発現することにより抗体遺伝子が切断される。この DNA 切断は Top1 のチロシン残基が DNA3' 末端と共有結合を作る結果である。Top1 は普遍的に DNA 構造を維持する酵素で、一本鎖 DNA 切断、DNA 構造のねじれを

解消するための回転と再結合を1つの酵素で行うが、AIDの活性化により抗体遺伝子部位では再結合に至らずDNA切断を残してしまう。私たちは2009年にTop1がAID誘導性のDNA切断酵素であることを報告したが、その確証がさらに増えた。Top1の特異的な阻害剤であるカンプトテシンが抗体遺伝子のSHMを阻害すること(Kobayashi et al., 2011)、Top1はDNAへ共有結合した後にプロテアソームで分解を受けるが、プロテアソーム阻害剤も抗体遺伝子組み換えを阻害すること(Xu et al., 2014)、抗Top1抗体を用いたクロマチン免疫沈降実験からも、実際にTop1の集積が免疫グロブリン遺伝子の局在が高いことが示された(Husain et al, 2016)。

Top1と複合体を形成する分子をGFP融合Top1を用いて同定する試みからTop1はFACT複合体をアダプターとして特に転写が活発な抗体遺伝子組換え部位のヒストン3トリメチル修飾体にリクルートされることを証明した(Stanley et al., 2011, Husain et al, 2016)。同様にクロマチン変換因子SMARCA4はTop1のDNAへの局在に重要であった(Husain et al., 2016)。

AIDがTop1を減少させ、そのTop1減少がDNA構造のねじれ(negative super-helicity)を増強させる(Husain et al, 2016)ことは示されたが、その分子メカニズムについて不明である。AIDが何らかのmiRNAを制御しTop1のmRNAに結合する結果、Top1の翻訳が下がることを抗Ago2抗体を用いたPAR-CLIP法とmiRNAノックダウン法で示すことができた(Kobayashi et al., unpublished data)、RNA編集の証拠が同定できなかった。また、Top1 3' UTR欠損細胞株でCSRとSHMが消失せず、Top1へのmiRNA結合はcoding領域にあると考えられた。現在、AIDとhnRNP K複合体に内包されるRNAの分析を進め同定を試みている。

AIDは抗体遺伝子座を切断する以外に、細胞のがん化につながるその他の遺伝子も切断することが知られていたが、どのような遺伝子が選択的に切断されるか、ということについては未知であった。そこでAIDによるDNA切断端をビオチン化リンカーでラベルする新規のDNA切断端検出法を開発し、ヒトBリンパ腫由来細胞株での切断ターゲットを検索したところ、単純なリピート配列を有し転写が活発な遺伝子座が選択的に切断されていること、切断部位は比較的H3K4me3修飾が高いことが明らかになった(Kato et al., 2012)。

(2) AIDと同様にシチジン脱アミノ化酵素であるAPOBEC1はACFというhnRNPファミリーの共役因子がターゲットRNAを保持すること

により RNA 編集が可能となる。抗体遺伝子組換えに必須の hnRNP ファミリー分子をスクリーニングした結果、AID 誘導性の抗体遺伝子部位の DNA 切断には hnRNP K が、CSR と cMyc-IgH 転座には hnRNP L が必須であり、2つの hnRNP 分子は RNA 依存性に AID と結合していることが明らかになった (Hu et al., 2015)。さらに、グリセロール密度分画法により hnRNP K は AID の単量体と、hnRNP L は AID の二量体と共存しており、各共役因子と AID の複合体に機能的な差異があることが裏付けられた (Mondal et al., 2016)。今後、hnRNP K-AID 複合体や hnRNP L-AID 複合体から取り込まれている RNA を回収し AID による RNA 編集ターゲットを同定する。

(3)① UNG の各種変異体では *in vitro* でのウラシル除去活性が高いものが CSR 活性が低く、また逆のパターンも認められ、酵素活性と抗体遺伝子組み換え現象が相関しないことが明らかになった。さらに UNG 欠損細胞や各種変異体を相補的に発現させた細胞を用いて抗体遺伝子座への各種 DNA 修復関連分子の集積を解析したところ、UNG は CSR において塩基除去修復経路の各種分子の集積に必要なスカフォールド分子としての役割を果たすことが明らかになった。また、CSR と同様に SHM 活性も酵素活性とは相関せず、UNG 欠損細胞では DNA 切断部位へ DNA 損傷乗越え修復経路のポリメラーゼが集積する結果、SHM が高くなっていることが示された。これらの結果から、UNG の抗体遺伝子組換えにおける役割は DNA 脱アミノ化仮説で提唱されたウラシル除去ではないと考えられた (Youshif et al., 2014)。

② APE1 の欠損 CH12 細胞株では APE1 のアリル数減少に伴い CSR 効率が抑制されることは既知であった。しかし、DNA 切断と SHM、また cMyc-IgH 転座は損なわれていないことが本研究で初めて明らかになった。APE1 欠損により Ku80 などの DNA 修復因子の切断端への集積が低下すること、一本鎖から二本鎖への削りこみを試験管内で補うことにより DNA 繋ぎ合わせ効率が上がることから、APE1 欠損により一本鎖 DNA 断端の二本鎖への削りこみ効率が低下することが CSR 効率抑制の主因と考えられた (Xu et al., 2014)。

(4) 抗体遺伝子に限らず、DNA 切断と DNA 修復はヒストン 8 量体に DNA 二重らせんが巻き付いたクロマチン構造を基盤として起きる現象であるため、DNA 切断や組換えの特異性を決定するクロマチン修飾やヒストンシャペロンが局在することやクロマチン構造が変換されることは容易に想像される。本研究により①クロマチン構造変換因子 SMARCA4 が

Top1 の抗体遺伝子座への集積に必要であり、SMARCA4 の減少により遺伝子不安定性が増幅され、抗体遺伝子組換えの効率が変化する過程を明らかにした。②DSIF 複合体を形成する Spt5 はヒストンシャペロン FACT 複合体と同様に H3K4me3 の形成と DNA 切断に必須であったのに対し、Spt4 はその機能を持たず、異所性の転写開始点を抑制していた。興味深いことに両者は相同組換えと非相同組換えの両者を促進していることから、免疫グロブリン遺伝子組換えを素過程に分解すると、Spt4 と Spt5 は各々その複数の過程に独立して関与することが示された。③活発な転写と関連してヒストンアセチル化リジンに結合する Brd4 が DNA 修復過程において果たす役割については知見がなかった。ここで Brd4 は特に非相同組換え過程において抗体遺伝子切断後の 53BP1 や UNG の集積に必要であることが示された。④ヒストンバリエーションである H3.3 は活発な転写部位によく集積し、ヒストンの会合と脱会合に特徴的に局在するが、抗体遺伝子切断部位にもこの H3.3 分子が集積し、H3.3 のロックダウンにより SHM が低下することが観察された (Aida et al., 2013)。

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 28 件)

①Chromatin Reader Brd4 Functions in Ig Class Switching as a Repair Complex Adaptor of Nonhomologous End-Joining. Stanlie, A., Yousif, A. S., Akiyama, H., Honjo, T. and Begum, N. A. *Mol. Cell* **55**, 97-110 (2014)

②Decrease in topoisomerase I is responsible for activation-induced cytidine deaminase (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* **108** 19305-19310 (2011)

③Mice 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.* **12** 264-270 (2011)

④Histone3 lysine4 trimethylation regulated by the facilitates chromatin transcription complex is critical for DNA cleavage in class switch recombination.

Stanlie, A., Aida, M., Muramatsu, M., Honjo, T. and Begum, N. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107 22190-22195 (2010)

⑤B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress *Aicda* by overcoming the effects of silencers. Tran, T. H., Nakata, M., Suzuki, K., Begum, N. A., Shinkura, R., Fagarasan, S., Honjo, T. and Nagaoka, H. Nat. Immunol. 11 148-155 (2010)

[学会発表] (計 24 件)

①本庶 佑 “Epigenetic regulation of S region chromatin is essential to AID-induced S region DNA cleavage by topoisomerase 1” International AID workshop: From Immune Diversification to Cancer, a Marcus Wallenberg Symposium, Stockholm, Sweden, H22 年 6 月

②本庶 佑 “Role of AID in vaccination” The 3rd International Symposium: Regulators and Adaptive Immunity, H22.10 月

③本庶 佑 “Dilemma of AID: infection or cancer” The 2011 Spring Conference of the Korean Association of Immunologists, Seoul, Korea H23 年 6 月

④本庶 佑 “Dilemma of AID: immunity or tumor” Qilu International Conference on Infection and Immunity & 2nd CMI Symposium on Immunology, Jinan, China, H23.10 月

⑤本庶 佑 “Common mechanisms for immune diversity and genome instability” The 2012 Gordon Research Conference on DNA Damage, Mutation and Cancer, California, USA, H24.3 月

⑥本庶 佑 “Acquired immunity, genome instability, and cancer” Keystone Symposia: B Cell Development and Function, Colorado, USA, H25.2 月

⑦本庶 佑 “Common features in the immune diversification and genome instability” The joint conference of Human Genome Meeting 2003 and 21st International Congress of Genetics, Singapore, H25.4 月

⑧本庶 佑 “AID’s function in DNA

cleavage and recombination of the immunoglobulin gene” “Frontiers in immunology - from molecules to disease” at Nobel Forum, Stockholm, Sweden, H26.6 月

⑨本庶 佑 “Antibody Maturation and Class Switch” Keystone Symposia on HIV Vaccines/The Golden Anniversary of B Cells “Antibody Maturation and Class Switch” session, Banff, Canada, H27.3 月

[図書] (計 1 件)

①本庶 佑 「ゲノムが語る生命像」講談社 2012 年

[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

www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本庶 佑 (HONJO, Tasuku)
京都大学・医学研究科・客員教授
研究者番号：80090504

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

長岡 仁 (NAGAOKA, Hitoshi)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：20270647
H23.3.31 まで (異動のため)

ベーガム ナシム アラ (BEGUM, Nasim Ara)
京都大学・医学研究科・特定准教授
研究者番号：80362507

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
H23.4.1 より