

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570169

研究課題名（和文）ゲノム不安定を導くトポイソメラーゼ1の小RNA分子による調節機構

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of Topoisomerase1 by small RNA molecules which leads genomic instability

研究代表者

小林 牧 (KOBAYASHI MAKI)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20400690

研究成果の概要（和文）：シチジンデアミナーゼ AID の活性化に引き続き、Topoisomerase1(Top1)の翻訳抑制が起きる分子メカニズム解明を進め、miRNA の関与、Ago2 の Top1 mRNA への結合、さらに詳細な結合部位が明らかになった。さらに AID 依存性に Top1 mRNA に結合する miRNA の同定中である。

研究成果の概要（英文）：The molecular mechanism which suppresses Topoisomerase1 (Top1) translation in AID-dependent manner was analyzed. Involvement of miRNA, HuR and Ago2, and Ago2-binding sequence in Top1 mRNA have been realized. The putative miRNA which binds to Top1 mRNA AID-dependently will be identified very soon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	910,000	390,000	1,300,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計			

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：non-B DNA, AID, 免疫グロブリン

1. 研究開始当初の背景

AID により DNA 上のシチジンがウリジンに編集される DNA 仮説が広く信じられているが、その仮説には矛盾が多く、申請者らは AID は RNA 上のシチジンを編集すると考えている。そこで、我々は B 細胞における遺伝子組換え現象において AID 依存性の TopoisomeraseI (Top1) の翻訳抑制現象を独自に発見した。同現象には mRNA 配列依存性があるが、TopI の mRNA そのものに AID による編集はもたらされておらず、一般的

に翻訳抑制に働くとして知られる microRNA (miRNA) などの関与が強く示唆された。Ago2 の関与する miRNA 以外にも small RNA が各種知られており、どの小 RNA 分子なのか、また、Top1 mRNA のどの領域が AID による制御に重要なのか、AID によりどのような RNA 編集が起きるために Top1 翻訳抑制減少が起きるのかが不明であった。

2. 研究の目的

小 RNA 分子の関与を証明し、Top1 mRNA

との結合、翻訳抑制、小 RNA 分子の本体、AID による編集の実態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) miRNA 経路, piRNA などのプロセッシングに関わるたんぱく質のノックダウンによりクラススイッチなど生物学的な効果が認められるか否かを指標に、小 RNA 分子のクラスを同定する。(2) miRNA を網羅的に解析し、AID による編集の有無を解析する。(3) Top1 mRNA と結合するたんぱく質や小 RNA 分子を RNA アプタマーを用いたトラップ法により回収/同定し、AID 依存性に結合し、実際にクラススイッチを制御する小 RNA 分子を同定する。(4) AID による RNA 編集について、標的となる RNA と編集領域について解析する。

4. 研究成果

H22年度は、Topoisomerase1 (Top1) の mRNA に結合する蛋白質の同定を進めた。4-thio uridine(4-SU)を用いたPAR-CLIP法や、BrUラベルプローブによるトラップ実験の結果、AU-rich配列に結合しやすい蛋白質HuRがTop1の3'UTR領域に結合する結果が得られた。また、Top1 3'UTRの中で、特異的に同蛋白質と結合する部位を決定するため、3'UTRの一部をコピーしたBrUラベルプローブにより、同蛋白質がやはりAU-rich配列に選択的に結合することが示された。HuRのノックダウン実験によりIgAへのクラススイッチやTop1蛋白質の新生に実際に影響が認められた事から、この蛋白質の結合はin vitroでの反応にとどまらず、生物学的意義を持つと考えられた。

H23年度は、AIDがHuRとどのような関連を持ってTop1の翻訳に影響するのか、を解析した。HuRがAgo2やmiRNAと協同して働くことが予想されたため、Ago2蛋白質とTop1 mRNAとの結合を確認するためにRNA-IPを行った。PAR-CLIP法とBrUラベルプローブ=トラップ法の両方でAgo2がTop1の特定の3' UTR部分にin vitroで結合している証拠を得た。一方、AIDが行う免疫グロブリン遺伝子の改変のうち、体細胞突然変異においてもTop1のたんぱく質量と転写が重要であると考えられてきたが、2011年度中にTop1による体細胞突然変異での役割について、実際に証明する事ができたため、論文を発表した。

H24年度は、Topoisomerase1 (Top1) の mRNA に結合するAgo2の結合部位について同定を進めた。4-thiouridineを用いたRNA-IPにおいては、Top1の3'UTRの2カ所にAgo2の結合が認められた。そのうちの1カ所はAIDに依存せず、AIDの非誘導時にもAgo2の結合が認められたが、coding領域により近いもう1カ所はAIDに依存性であり、非誘導時にはバックグラウンドレベルだが、誘導時には比較的高い結合が

認められた。それに一致して、BrUを用いたプローブラベルによるトラップ実験の結果、3'UTRとcoding領域の末端に、Ago2の結合部位が認められた。AIDに非依存性のAgo2結合部位にて機能すると予想された4つのmiRNA (これらはいずれも共通するseed配列を持つ)のノックダウン実験や過剰発現実験は、実際にクラススイッチに対して予想される効果を持ち、これらが生体内で機能していると考えられた。また、AIDに依存性のAgo2結合領域にて機能するmiRNAは現在同定中である。また、Ago2と協調して働くTNRC6aやHuRのノックダウンによりクラススイッチが抑制され、miRNAによるTop1 mRNAの翻訳修飾効果は確実なものであると考えられる。また、上記の結果をふまえ、Luciferase assayにより、このTop1 mRNA領域の翻訳抑制機序を再現できるassay系を構築している。

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5件)

1. Hitoshi Nagaoka, Thinh Huy Tran, Maki Kobayashi, Masatoshi Aida and Tasuku Honjo. Preventing AID, a physiological mutator, from deleterious activation: regulation of the genomic instability that is associated with antibody diversity. *International Immunology*. 査読無, 2010, vol 22 p227-235. doi: 10.1093/intimm/dxq023
2. Maki Kobayashi, Zahra Sabouri et al. Decrease in topoisomerase I is responsible for activation-induced cytidine deaminase (AID)-dependent somatic hypermutation. *PNAS USA*. 査読有り, 2011, vol, 108, p19305-19310. doi: 10.1073/pnas.1114522108
3. Lucia Kato, Andre Stanlie, Nasim A Begum, Maki Kobayashi, Masatoshi Aida, Tasuku Honjo. **An evolutionary view of the mechanism for immune and genome diversity.** *J Immunol* 査読有, 2012, vol. 188, p3559-3566, doi: 10.4049/jimmunol.1102397
4. Tasuku Honjo, Maki Kobayashi, Nasim Begum, Ai Kotani, Somayah Sabour and Hitoshi Nagaoka. **The AID Dilemma: Infection, or Cancer?** *Adv Cancer Res*. 査読有, 2013, vol. 113, p1-44 doi:10.1016/B978-0-12-394280-7.00001-4.
5. Le Thi Huong, Maki Kobayashi, et al. In vivo analysis of Aicda gene regulation: a critical balance between upstream enhancers and intronic silencers governs

appropriate expression. PLoS ONE, 査読有、
2013, vol. 8.
doi: 10.1371/journal.pone.0061433

〔学会発表〕 (計 11 件)

1. Maki Kobayashi, Masatoshi Aida, Hitoshi Nagaoka, Nasim A. Begum and Tasuku Honjo. AID-induced decrease in topoisomerase I induces DNA structural alteration and DNA cleavage for class switch recombination. Cold Spring Harbor Meeting on Gene expression and signaling in the immune system. 2010 年 4 月 Cold Spring Harbor, New York.
2. Maki Kobayashi, Masatoshi Aida, Andre Stanlie, Nasim A. Begum, Hitoshi Nagaoka and Tasuku Honjo. Epigenetic regulation of S region chromatin is essential to AID-induced S region DNA cleavage by topoisomerase I. International AID workshop: from Immune Diversification to Cancer. 2010 年 6 月 Stockholm, Sweden
3. Maki Kobayashi, Zahra Sabouri, Masatoshi Aida, Yoko Kitawaki, and Tasuku Honjo. Topoisomerase I regulates AID-induced DNA cleavage. 14th International congress of immunology. 2010 年 8 月. 神戸
4. Maki Kobayashi-Osaki, Makoto Kobayashi, Miki Takeuchi and Masayuki Yamamoto. Transcription Factors Sox13 Regulates the Hematopoietic Expression of GATA2 in Vertebrate Embryos. 9th Japanese Biochemical Society Bio-Frontier Symposium 2010, 5th International Symposium on GATA factors. Sendai 2010 年 1 月 仙台
5. Maki Kobayashi, Somayeh Sabouri, Zahra Sabouri, Yoko Kitawaki, and Tasuku Honjo. Topoisomerase I regulates AID-induced DNA cleavage. Biochemistry and Molecular Biology 2010. 2010 年 12 月. 神戸
6. Maki Kobayashi, Zahra Sabouri, Masatoshi Aida, Yoko Kitawaki, and Tasuku Honjo. AID-induced Topoisomerase I reduction regulates somatic hypermutation frequency. 第 84 回日本生化学会大会. 2011 年 9 月. 京都
7. (招待講演) Maki Kobayashi¹, Zahra Sabouri¹, Somayeh Sabouri¹ and Tasuku Honjo¹ Decrease in topoisomerase I is responsible for AID-dependent somatic hypermutation. 第 23 回日本分子生物学会、シンポジウム「ゲノムダイナミクス」2011 年 12 月 15 日、横浜
8. M Kobayashi, J Xu, Z Sabouri, S

Sabouri, Y Kitawaki, Y Sasaki, Y Pommier, T Honjo. AID-induced Ago2 binding to the 3' UTR of Topoisomerase I (Top1) mRNA is associated with Top1 decrease, which is responsible for somatic hypermutation and class switch recombination. Keystone Symposia - Mutations, Malignancy and Memory - Antibodies and Immunity (C6) 2012. 3. 19 ポストンパーク プラザホテル

9. (招待講演) Maki Kobayashi et al. Activation-induced cytidine deaminase regulates Topoisomerase I protein by miRNA during immunoglobulin gene recombination 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012. 12. 6 神戸国際会議場

10. Maki Kobayashi et al. Activation-induced cytidine deaminase regulates Topoisomerase I protein by miRNA during immunoglobulin gene recombination 第 35 回日本分子生物学会年会 2012. 12. 14 福岡国際会議場

11. Maki Kobayashi et al. Activation-induced cytidine deaminase regulates Topoisomerase I protein by miRNA during immunoglobulin gene recombination. Keystone Meeting, Noncoding RNAs in Development and Cancer. 2013. 1. 22 Fairmont Hotel Vancouver

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 牧 (KOBAYASHI MAKI)

研究者番号 : 20400690

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :