

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成27年度採択分  
平成29年3月13日現在

**AIDのRNA編集機構による抗体の多様化と  
ゲノム不安定化の制御機構**

Regulatory mechanism of immunoglobulin diversification  
and genome instability through RNA-editing by AID

課題番号：15H05784

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は、獲得免疫における抗体多様化とその記憶形成の中心酵素である。AIDはTop1を介して抗体遺伝子の体細胞突然異とクラススイッチを行う一方、ミスターゲットによるゲノム不安定性を誘発する。本研究においてはAIDのRNA編集が免疫異常による代謝制御や複製非依存性転写依存性ゲノム不安定化を起こす背景を明らかにする。

研究分野：分子生物学、免疫学

キーワード：抗体遺伝子、Activation-induced cytidine deaminase (AID)、クラススイッチ組換え(CSR)、体細胞変異(SHM)、RNA編集、ゲノム不安定化

1. 研究開始当初の背景

1978年我々はクラススイッチ(CSR)が遺伝子欠失を伴うDNA組換えによることを明らかにし、その後その組換え機構をDNA構造変化として証明した。さらにクラススイッチ制御を行うサイトカインIL-4を発見し、IgAへ特異的にCSRを誘導できるCH12細胞株を確立した。これらの成果に基づき2000年にCSRと体細胞突然変異(SHM)を一元的に制御する酵素AIDを発見した。2009年にはAIDによるDNA切断はTop1による一重鎖切断から開始されること、またそのターゲット特異性には転写によるヘリックスの緩みから反復配列に起こるNon-B構造の形成、ならびに転写によって引き起こされるヒストン修飾が不可欠であることを明らかにした[1,2,3]。

2. 研究の目的

AIDは、ワクチンの有効性を保証する獲得免疫における抗体多様化とその記憶形成の中心酵素である。AIDはCSRとSHMの他、ゲノム不安定性を誘発しさらに高親和性IgAの腸内細菌制御を通して、代謝制御に関わると共にTop1制御異常による遺伝子変異が様々な遺伝性神経疾患の原因になる。従って本研究は獲得免疫の根幹メカニズムの解明に止まらず、免疫異常による代謝制御や複製非依存性転写依存性ゲノム不安定化の背景の解明に繋がる。

1) AIDによるTop1 mRNAの翻訳制御機能の解明、2) Top1によるDNA切断ターゲットの特異性決定機構の解明、3) AIDによる特異的なDNA修復機構の解明

3. 研究の方法

AIDによるRNA編集はhnRNP Kとの複合体によるため、hnRNP KとAIDの独立した免疫沈降の重なりを評価する。Ago2の免疫沈降とRNA ligaseを用いる方法を行い、Top1 mRNAに結合するmiRNA同定を進める。

Top1会合タンパク質を網羅的にプロテオミクスで解析する。CH12細胞の抗体遺伝子S領域にLexA結合サイトを導入し抗体遺伝子特異的な結合タンパク質を同定する。cofactor hnRNP LとAIDの連続免疫沈降実験を行い修復特異的な編集ターゲットを同定する。

4. これまでの成果

CH12細胞でTop1 3'UTRノックアウト細胞を作成した。(未発表)。現在Ago2の免疫沈降とRNA ligaseを用いる方法でTop1 mRNAに結合するmiRNAの同定を進めている。AID-flagを発現させる293T細胞を作成しhnRNP K遺伝子のC末端にHAタグを挿入することに成功した。同細胞を用いてAIDとhnRNP Kとの複合体に結合するRNAを解析しAIDにより編集されたRNAの同定を進めている。AIDの構造解析につ

いては AID と RNA 結合タンパク質の結晶生成を試みている。Top1 結合タンパク質の同定と機能解析については Top1-GFP 融合タンパク質を用いた GFP トラップ法により Top1 会合タンパク質をプロテオミクスにて解析し、Smarca4 も Top1 のクロマチン上への集積を促進する因子であることを発見し、論文を発表した。APE1 も Top1 と会合する因子として同定されたが抗体遺伝子の AID による DNA 切断に APE1 は関与しないことを証明した。(論文投稿中)。CH12 細胞の抗体遺伝子 S 領域に LexA 結合サイトを導入し、さらに LexA タンパク質を発現させた細胞を作成した。安定同位体標識アミノ酸を用いる SILAC 法で結合タンパク質を同定する実験を進めた。hnRNP L 遺伝子の C 末端に HA タグが挿入された 293T 細胞を樹立し cofactor hnRNP L と AID の連続免疫沈降実験の条件を整え、最終的に RNA 産物を回収した。CSR の DNA 修復過程に関わるヒストン関連因子を同定し、同分子と各種スプライシング因子との関連、DNA 修復における機能を解析した。

#### 5. 今後の計画

##### 1) AID による Top1 mRNA の翻訳制御機能の解明:

抗FLAG抗体の結果と抗HA抗体で各々の免疫沈降で得られたタンパク質-RNA 複合体を安定的に回収可能となり、hnRNP K の特異的な結合RNAの濃縮に成功したことから、現在次世代シーケンス法で解析を進めている。

AIDの構造解析については、数種類のRNA結合タンパク質で結晶化が可能か否かを検討する。また、標的RNAがhnRNP KまたはhnRNP LとAID複合体の免疫沈降から同定された場合には、RNAをも含む三者で構造解析を試みる。

##### 2) Top1 による DNA 切断ターゲットの特異性決定機構の解明:

LexA 結合サイトを挿入した細胞の SILAC 法による抗体遺伝子特異的なタンパク質同定から得られた DNA 修復関連因子について機能解析を進める。DNA 切断関連因子についてスクリーニングを進める。

##### 3) AID による特異的な DNA 修復機構の解明:

Top1 と相互作用するタンパク質の同定においては APE1 に関する論文を投稿中であるため、これを完成させる。AID, hnRNP L と

の連続免疫沈降により編集 RNA を同定する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Functional requirements of AID's higher-order structure and interaction with RNA-binding proteins. Mondal, S., Begum, N. A., Hu, W. and Honjo, T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113; E1545-54. (2016)

2. Chromatin remodeler SMARCA4 recruits topoisomerase 1 and suppresses transcription associated genomic instability. Husain, A. Begum, N. A., Kobayashi, M. and Honjo, T. Nature Communications DOI: 10.1038/ncomms10549 (2016).

(招待講演、国際会議、学会発表)

1. Kobayashi, M and Honjo, T.

Topoisomerase 1 enrolls in diversification of Ig gene under the regulation of activation-induced cytidine deaminase (AID). International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe 2017. 1.26-28. 2017.

2. Husain A., Honjo, T. Chromatin remodeler SMARCA4 recruits topoisomerase 1 and suppresses transcription associated genomic instability. International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe 2017. 1.26-28. 2017.

3. Kobayashi, M and Honjo, T. Activation-induced cytidine deaminase (AID) diversifies immunoglobulin gene by regulating topoisomerase 1 (Top1). Maki Kobayashi, 分子生物学会年会、横浜. 11.30-12.2. 2016.

4. 本庶 佑. 京都賞鹿児島講演会、鹿児島市民文化ホール 11.16. 2016.

5. 本庶 佑. 京都賞ワークショップ免疫分子遺伝学からがん制圧への道、受賞者講演「免疫力の再興」京都大学百周年時計台記念館 2016.11.12

6. 本庶 佑. 京都賞記念講演会「獲得免疫の驚くべき幸運」、国立京都国際会館 2016.11.11

(授賞など)

京都賞2016年度「基礎科学部門」

ホームページ等

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