

## 「B 細胞の分化・機能の制御における「内在性ヒストン模倣因子」の役割」

熊本大学大学院生命科学研究部免疫学講座 助教

高島 謙

### 要旨

B 細胞の分化や機能の制御にはヒストン修飾等のエピジェネティクス制御が重要だが、制御機構には不明な点が多い。申請者は核小体タンパク質 NOP16 がヒストンを模倣し、ヒストン修飾自体を制御・干渉する内在性ヒストン模倣因子として働くことで、H3K27me3 修飾を制御することを発見した<sup>[1]</sup>。H3K27me3 は B 細胞クラススイッチ (CSR) の制御にも重要であり、NOP16 は CSR が盛んに生じるプレ胚中心 B 細胞で高発現する。本研究では B 細胞 CSR での NOP16 の役割を明らかにすることを目的とし解析を行なった。NOP16 欠損 B 細胞株に刺激を行ったところ、野生型に比べ有意に IgA への CSR が促進し、このときエピジェネティクスの変化を介して CSR に必須である AID の発現も有意に亢進していた。マウス脾臓由来 B 細胞を用いて他のサブクラスへの影響を調べたところ、NOP16 は IgA への CSR は抑制するが、IgG1 や IgE への CSR を促進することがわかった。この際 AID 発現誘導の傾向も一致しており、NOP16 はエピジェネティクスを介した AID 発現誘導の変化を生むことで、CSR の指向性を制御することが示唆された。

### 背景・目的

B 細胞は感染に対する液性免疫応答に必須であり、抗体産生を担う形質細胞へ分化することで、抗体を介した生体防御反応に重要な役割を果たす。B 細胞の分化や機能の制御には DNA メチル化やヒストン修飾等のエピジェネティクス制御が重要だが、その動的な制御機構には不明な点が多い。

申請者は最近、新規ヒストン修飾制御因子として核小体タンパク質 NOP16 を同定し、NOP16 が H3K27me3 修飾のバランスを制御することを発見した<sup>[1]</sup>。興味深いことに NOP16 はヒストン H3 のテール領域と類似した配列を持ち、さらに各種ヒストン修飾因子と相互作用するため、NOP16 はヒストンを模倣し、ヒストン修飾自体を制御・干渉する「内在性ヒストン模倣タンパク質」として機能すると考えられる。そして、この新規ヒストン修飾制御機構の異常が乳癌の形成・進展を引き起こす原因となること、さらには NOP16 が乳癌の新規治療標的となることを見出した<sup>[1]</sup>。

一方で、H3K27me3 修飾は B 細胞の分化や、クラススイッチ (class switch recombination: CSR) 等の機能の制御に重要であることが知られている<sup>[2][3]</sup>。我々の予備実験からも H3K27me3 修飾は IgA へのクラススイッチに抑制的に働いていることがわかった。興味深いことに、データベース解析から NOP16 は CSR が盛んに生じていると考えられるプレ胚中心 B 細胞や、または B 細胞リンパ腫細胞で高発現していることが明らかになったが、NOP16 の B 細胞の分化や機能に与える影響は不明である。本研究では我々が同定した内在性ヒストン模倣因子 NOP16 の B 細胞の機能、特に B 細胞クラススイッチに与える影響を明らかにすることを目的とした。

## 方法

マウス B 細胞リンパ腫株 CH12F3-2A 細胞は 2-3 日間の IL-4, TGF- $\beta$ , CD40L の刺激(以下、CIT 刺激)により IgM から IgA へとクラススイッチを起こすことが知られており、クラススイッチの研究で頻用されている<sup>4</sup>。我々はこの CH12F3-2A 細胞を用いて CRISPR-Cas9 システムにより NOP16 を欠損させ、その上で CIT 刺激を行い、細胞表面の免疫グロブリンのサブタイプを FACS で確認し、クラススイッチ後特異的な転写産物を定量 PCR で、そして免疫グロブリン重鎖領域の DNA 組換えを PCR で評価した。また NOP16 欠損 CH12F3-2A 細胞での、ヒストン修飾やクロマチン構造などのエピゲノム状態については ChIP-qPCR や MNase-qPCR を用いて評価した。さらにマウス脾臓由来プライマリ CD19 陽性 B 細胞を LPS 単独(IgG2b+または IgG3)、LPS+IL-4(IgG1+または IgE)、LPS+IL-4+ TGF- $\beta$  (IgA+) で刺激し、各種アイソタイプへのクラススイッチを Ex vivo で評価した。マウス脾臓由来初代 CD19 陽性 B 細胞に対し、CRISPR-Cas9 システムを導入し、NOP16 を欠損させるモデルを構築し、NOP16 が各種アイソタイプへのクラススイッチに与える影響を FACS などで評価した。統計手法については student t-test(図 5C, D), Multiple t-test(図 2C), Oneway-ANOVA(図 1C), Twoway-ANOVA(図 3A, C, 図 4)を用いた。

## 結果

### 1. クラススイッチの誘導に伴って、NOP16 発現は一過性に減少する。

CH12F3-2A 細胞に IL-4, TGF- $\beta$ , CD40L(CIT 刺激)を加えたところ、6 時間後には *Nop16* mRNA の発現が刺激前の 30%程度まで減少することがわかった。このときクラススイッチに必須である DNA デアミナーゼ AID をコードする *Aicda* 遺伝子の発現は 6 時間から 24 時間にかけて誘導され、逆の傾向となることが明らかとなった(図 1A)。さらにウエスタンブロットによりタンパク質発現を確認したところ、CIT 刺激 12 時間後で NOP16 タンパク質の発現は著減していたが、興味深いことにこれは一過性のもので、24 時間後および 48 時間後には発現量は回復していることがわかった(図 1B)。さらにどの因子が *Nop16* の発現減少に重要なのか調べたところ、IL-4 と TGF- $\beta$  が NOP16 の発現低下に寄与していることがわかった(図 1C)。

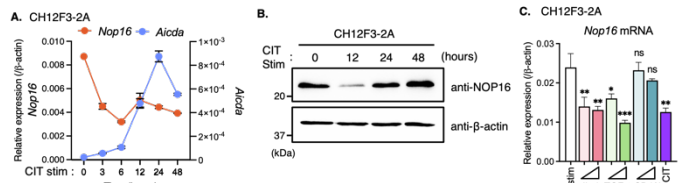


図1: クラススイッチの誘導によりNOP16の発現が減少する

### 2. NOP16の欠損によりIgAへのクラススイッチが促進する。

クラススイッチを誘導する過程でNOP16の発現が減少すること意義を調べるため、CH12F3-2A 細胞に CRISPR-Cas9 システムを導入し、NOP16 を欠損した細胞を構築した(図 2A)。まずコントロール細胞と NOP16 欠損細胞について、CIT 刺激を行い、免疫グロブリン重鎖コード領域での DNA 組換えを調べたところ、NOP16 欠損細胞では IgM から IgA にクラススイッチする際に組換えが起きた際に生じる Su-Sa ジャンクション由来の PCR 産物の量が優位に増加していた(図 2B)。またこの時、細胞表面の免疫グロブリンのサブタイプを評価したところ、NOP16 欠損 CH12F3-2A 細胞では

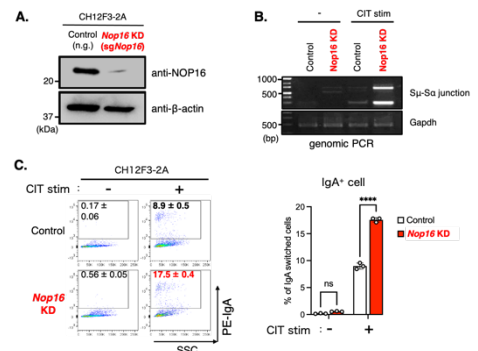


図2: NOP16欠損細胞ではIgAへのクラススイッチが促進する

組換え効率の増加に伴って IgA 陽性細胞の割合が優位に増加していることが明らかとなった(図 2C)。

### 3. NOP16 は CIT 刺激による AID 発現誘導を制御する。

NOP16 の欠損により IgA へのクラススイッチが亢進する機序として、我々はクラススイッチに必須である DNA デアミナーゼ AID の発現に注目した。AID は抗原刺激や CD40L の刺激によって誘導され、クラススイッチや体細胞突然変異など B 細胞の多様性を生む現象で必須の分子である<sup>5</sup>。NOP16 欠損細胞で CIT 刺激に伴う *Aicda* 遺伝子の発現変動を調べたところ、NOP16 欠損細胞では *Aicda* の発現誘導が有意に亢進していた(図 3A)。これは転写のみならずタンパク質のレベルでも顕著にその発現亢進が認められた(図 3B)。さらに抗 AID 抗体を用いたクロマチン免疫沈降から、NOP16 欠損細胞では AID の Sa 領域へのリクルートが有意に増加していることがわかった(図 3C)。以上から NOP16 は AID の発現誘導を抑えることで、IgA へのクラススイッチを抑制することが示唆された。

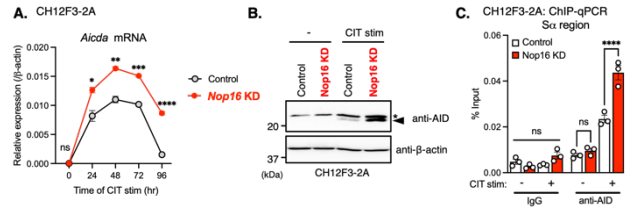


図3: NOP16はCIT刺激によるAID発現誘導を制御する。

### 4. NOP16 はエピジェネティックな様式で AID の発現を制御する。

申請者のこれまで NOP16 は H3K27me3 修飾のバランスを制御することを報告してきた。この B 細胞における NOP16 による AID 発現制御もエピジェネティック様式を経ているか調べるため、まず AID をコードする *Aicda* 遺伝子のプロモーター領域のクロマチン状態を MNase-qPCR 法で評価した。もしクロマチン構造が open である場合は MNase は DNA にアクセスできるため、その領域の DNA 配列は分解を受けるため、その領域を標的とした定量 PCR でのシグナルは低下し、一方でヘテロクロマチン構造など「close」な構造である場合は、定量 PCR でのシグナルが高く保たれる。興味深いことに、NOP16 欠損 CH12F3-2A 細胞ではコントロール細胞に比べて *Aicda* 遺伝子のプロモーター領域が「open」となっていることが示唆された(図 4A)。さらにヒ ChIP-qPCR から、NOP16 欠損細胞では *Aicda* 遺伝子のプロモーター領域の H3K27me3 および H3K9me3 修飾のレベルが有意に減少することがわかった(図 4B)。これら H3K27me3 および H3K9me3 修飾は転写抑制性のヒストン修飾であり、MNase-qPCR の結果と合わせることで、NOP16 欠損細胞では *Aicda* 遺伝子のプロモーター領域の活性状態が高いことが示唆された。

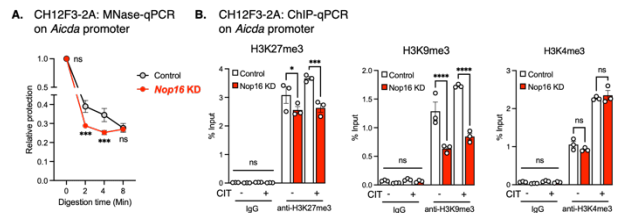


図4: NOP16はAicdaプロモーター領域のエピゲノム状態を制御する

### 5. NOP16 は AID の発現制御を介して、クラススイッチの指向性を制御する。

さらに IgA 以外のサブクラスへの転換を調べるため、マウス脾臓由来プライマリ B 細胞を用いた解析を行なった。マウス脾臓由来 CD19 陽性 B 細胞を MACS 法によって分取し、LPS 単独(IgG2b+または IgG3)、LPS+IL-4(IgG1+または IgE+)、LPS+IL-4+ TGF-β (IgA+)で刺激しながら 4 日間培養することで、各種アイソタイプへのクラススイッチを誘導および評価できる<sup>6</sup>。我々はマウス脾臓由来 CD19 陽性 B 細胞にエレクトロポレーション法によって CRISPR-Cas9 システムを導入し、NOP16 を欠失させることに成功した(図 5A)。この NOP16 欠損 CD19+脾臓 B 細胞について、上記の刺激を行なって NOP16 が各

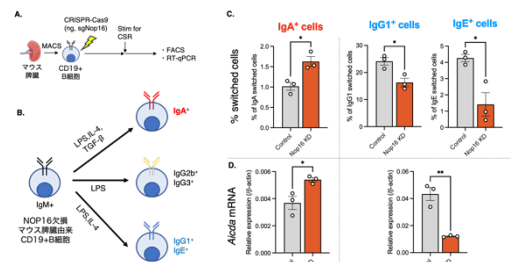


図5: NOP16はクラススイッチの指向性を制御する。

種サブクラスへのクラススイッチに与える影響を調べた(図 5B)。興味深いことに、NOP16 の欠損により IgA 陽性細胞への転換は CH12F3-2A 細胞の場合と同様に亢進するものの、IgG1 や IgE 陽性細胞への転換が有意に減少することが明らかとなった(図 5C)。またこの時 *Aicda* の遺伝子発現を確かめたところ、クラススイッチの傾向と一致して、NOP16 欠損細胞では IgA を誘導する刺激(LPS+IL-4+ TGF-β)の際には *Aicda* の発現誘導が亢進するものの、IgG1 や IgE を誘導する刺激(LPS+IL-4)の際には *Aicda* の発現誘導が顕著に抑制されることが明らかとなった(図 5D)。これらの結果より、NOP16 は AID の発現誘導を制御することによってクラススイッチの指向性を制御していることが示唆された。

## 考察

免疫グロブリンはその定常領域によって IgM, IgG, IgA, IgE, IgD などのサブクラスに分類され、サブクラスごとで局在やその機能が異なる。例えば IgA は粘膜免疫に必須の因子であり、また IgE は 1 型アレルギー応答に重要であることなどはよく知られている。クラススイッチの制御機構については、AID の発見など本邦からの研究成果を中心に世界中で精力的に解析が進められているものの、その全容は明らかになっていない<sup>7)</sup>。本研究より核小体タンパク質 NOP16 によるクラススイッチ制御機構の一端が明らかとなった。CH12F3-2A 細胞を用いた解析から NOP16 は *Aicda* 遺伝子のプロモーター領域のクロマチン状態を制御することにより、クラススイッチを誘導する刺激への応答性に影響を及ぼしており、AID 発現を制御することでクラススイッチそのものの効率を制御していることが示唆された。さらにマウス脾臓 B 細胞を用いた細胞から、NOP16 は IgA への転換には抑制的に働き、一方で IgG1 や IgE への転換は維持・促進の方向に寄与することが明らかとなった。このとき AID の発現誘導も傾向が一致しており、NOP16 は *Aicda* プロモーター領域のエピジェネティクス状態を制御しており、その後の刺激の応答性を規定することでクラススイッチそのものの指向性を制御していることが予想される。今後 NOP16 が制御する *Aicda* プロモーターおよび発現制御領域のエピジェネティクス状態やその詳細な制御機構を明らかにするとともに、現在樹立中の各種遺伝子改変マウスを用いた解析から *in vivo* でのクラススイッチへの影響について解析を行う。本研究での NOP16 に注目した解析を契機として、クラススイッチの指向性を規定する分子機構を明らかにすることで、将来的にはクラススイッチを制御した新たなワクチンやアレルギー治療戦略の開発に繋げていきたい。

## 共同研究者

該当なし

## 引用論文

- [1] Takashima K, Lee DJ, Trovero MF, et al., NOP16 is a histone mimetic that regulates Histone H3K27 methylation and gene repression, bioRxiv, 2023  
Doi: <https://doi.org/10.1101/2023.06.13.544862>
- [2] Su IH, Basavaraj A, Krutchinsky AN, et al., Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement, Nat. Immunol., 2003. 4(2):124-31
- [3] Schatz DG and Ji Y, Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination, Nat. Rev., Immunol., 2011. 11(4):251-63

- [4] M Nakamura I, S Kondo, M Sugai et al., High frequency class switching of an IgM+ B lymphoma clone CH12F3 to IgA+ cells, *Int Immunol.*, 1996. 8(2):193-201
- [5] Muramatsu M., Kinoshita K., Fagarasan S et al., Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme., *Cell.* 2000. 102 553-563
- [6] Snapper CM, Marcu KB, Zelazowski P., The immunoglobulin class switch: beyond "accessibility"., *Immunity.* 1997. 6(3):217-23
- [7] Zhang Y, Zhang X, Dai HQ et al., The role of chromatin loop extrusion in antibody diversification, *Nat Rev Immunol.* 2022. 22(9): 550–566.

#### 助成研究に関連した発表論文

Takashima K, Lee DJ, Trovero MF, et al., NOP16 is a histone mimetic that regulates Histone H3K27 methylation and gene repression, *bioRxiv*, Doi: <https://doi.org/10.1101/2023.06.13.544862>, 2023