

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04642

研究課題名(和文) 長鎖ノンコーディングRNAによる自然免疫応答制御機構の解明

研究課題名(英文) Study of long noncoding RNAs in immune response

研究代表者

秋光 信佳 (Akimitsu, Nobuyoshi)

東京大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号：40294962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内寄生細菌のサルモネラに感染した宿主ヒト細胞では、核内RNA分解経路が抑制され、その結果、普段は不安定な核内長鎖ノンコーディングRNAが安定化されて発現増加することを本研究の遂行で申請者は発見した。サルモネラ感染で発現増加する核内長鎖ノンコーディングRNAは、インターフェロン遺伝子などの免疫関連遺伝子の発現制御分子として働くことも示した。さらに、核内RNA分解経路が抑制されるメカニズムとして、核内RNA分解経路の就寝分子であるMTR4がタンパク質分解されることを発見した。これらの結果から、核内RNA分解経路は自然免疫応答を制御する上で重要な機構を形成していることが世界で初めて判明した。

研究成果の概要(英文)：We found that nuclear RNA degradation pathway is dysregulated in response to Salmonella infection, causing the upregulation of nuclear long noncoding RNAs that are unstable in human nucleus of naïve cells. The nuclear long noncoding RNAs induced upon Salmonella infection are involved in the regulation of immune-related genes such as interferons. In addition, we showed that MTR4, an important component of nuclear RNA degradation pathways, are diminished after Salmonella infection. Our study clearly show the importance of nuclear RNA degradation pathway in immune response.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA 感染 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

自然免疫システムは全ての多細胞生物が保有する感染防御機構であり、哺乳動物では獲得免疫の活性化にも重要である。また、自然免疫システムの異常はアレルギーや自己免疫疾患の原因ともなるため、創薬のターゲットとしても重要な生体内機構である。そのため、自然免疫を担う分子機構は生物系薬学分野において極めて重要な研究対象と言える。

近年、ノンコーディング RNA と呼ばれる翻訳されない機能性 RNA 群が注目されている。中枢神経系や免疫系が複雑な高等生物ほど多種多様なノンコーディング RNA を発現していることから、ヒトを含めた高等生物の生命現象や疾患の原因を理解するためには、ノンコーディング RNA の機能を分子レベルで解明することが必須であると考えられている。

ノンコーディング RNA は、小分子ノンコーディング RNA と長鎖ノンコーディング RNA に大別される。小分子ノンコーディング RNA の代表であるマイクロ RNA は、ヒトゲノム中には約 1000 種類存在し、標的 mRNA と特異的な相補対を形成することで標的 mRNA の発現を制御して多様な生命現象に関与している。

一方、全長が数百から数万塩基長にも及ぶ「長鎖ノンコーディング RNA」は、ヒトゲノム中に数万種類がコードされている。長鎖ノンコーディング RNA は、マイクロ RNA と相補対を形成してマイクロ RNA の機能を制御したり、特定の RNA 結合タンパク質と相互作用することで、転写から RNA 分解までの一連の遺伝子発現反応を制御すると考えられている。しかしながら、分子機能の判明した長鎖ノンコーディング RNA は全体の 1% 未満であり、長鎖ノンコーディング RNA の機能の全貌は未だ不明である。自然免疫系で機能すると考えられる長鎖ノンコーディング RNA は linc1992、li ノンコーディング RNA-Cox2、NEAT1 など数種類知られるが、分子機能が明確に示されている長鎖ノンコーディング RNA は極めて限られている。

2. 研究の目的

申請者は、過去約 10 年に渡って長鎖ノンコーディング RNA の生理機能を研究してきた。最近、核局在型長鎖ノンコーディング RNA である NEAT1 が自然免疫応答における遺伝子発現制御のスイッチ分子として機能することを解明した。この研究を継続・発展する過程で、ウイルス感染は NEAT1 の転写を誘導することに対し、バクテリア感染は NEAT1 の RNA 分解抑制を介して NEAT1 量の増加を引き起こすことを見いだした。さらに、NEAT1 以外にも数多くの長鎖ノンコーディング RNA がバクテリア感染で誘導されることも確認した。

ここで、申請者は、NEAT1 と転写リプレッサー-SFPQ との相互作用が IL8 や CCL5 などの自然免疫関連遺伝子の発現を制御していることを示していたが、NEAT1 によって発現制御を受ける遺伝子の半数以上は NEAT1 と SFPQ との相互作用による発現制御を受けていないことも確認していた。この結果は、NEAT1 は SFPQ 以外の分子との相互によって一群の遺伝子転写を制御していることを示唆する。ここで、最近、核内で NEAT1 が転写因子やエピジェネティック制御因子 (SWI/SNF complex の構成因子など) と共同在することが分かってきた。そこで申請者は、これらの分子との相互作用を通じて NEAT1 が標的遺伝子の転写を制御する可能性も考えた。

本研究では、NEAT1 のように病原体感染で誘導される核内長鎖ノンコーディング RNA を新たに同定し、それらの生理機能、特に遺伝子発現制御に対する役割を解明する。さらに、病原体感染によって核内長鎖ノンコーディング RNA が発現誘導する仕組みも解明する。

3. 研究の方法

今回、病原体としては細胞内寄生細菌であるサルモネラに着目した。サルモネラは、現在でも世界的に感染が起きており、日本でも頻繁に食中毒の原因となっている。そのため、薬学領域でも重要な病原体である。サルモネラは、III 型分泌経路を使って SPI1 エフェクターと呼ばれるタンパク質を宿主細胞に注入し、侵入を開始する。その後、Salmonella containing vacuole と呼ばれる膜で覆われた細胞質顆粒中で宿主細胞内環境に適応した後、増殖を行ってゆく。さらに、再度宿主細胞に SPI2 エフェクターと呼ばれる因子を注入してゆく。このような特徴的な生活環を有するサルモネラに感染した宿主細胞の応答、特に長鎖ノンコーディング RNA の発現応答はとても興味深く、このサルモネラ感染をモデル系として実験を進める。まず、サルモネラ感染細胞を準備し、そこから抽出した total RNA を次世代シーケンス解析することで、サルモネラ感染で発現誘導する長鎖ノンコーディング RNA を網羅的に解析する。次に、局在、発現量、時間的発現変動などのいくつかの指標で解析対象を絞り込む。注目する長鎖ノンコーディング RNA について、分子生物学的手法、細胞生物学的手法、生化学的手法で研究を進めて行く。また、これら長鎖ノンコーディング RNA の発現制御機構についても研究を行う。

4. 研究成果

申請者らは、サルモネラ感染で誘導される長鎖ノンコーディング RNA を 200 種類近く発見した (図 1)。興味深いことに、サルモネラ感染で誘導される長鎖ノンコーディング RNA の中に、NEAT1 が含まれていた。さらに解析

を進めると、ウイルス感染では NEAT1 は TLR3-p38MAPK 経路の活性化を通じた転写活性化で誘導されるのに対し、サルモネラ感染では NEAT1 分解の抑制(すなわち、RNA 安定化)で発現増加していることが分かった(図2)。すなわち、NEAT1 は転写と RNA 分解の2つの経路で発現が制御されていることが判明した。

次に、核内長鎖ノンコーディング RNA の分解が抑制される機構を調べたところ、核内 RNA 分解の中心的分子である MTR4 がサルモネラ感染後に消失、すなわちタンパク質分解が起きていることが分かった。これまで、サルモネラ感染で核内タンパク質が分解されることは知られておらず、核内 RNA 分解系のみならず核内タンパク質分解系についても新たな知見を得た。

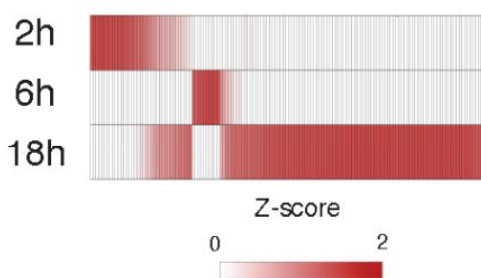


図1:サルモネラ感染後に発現増加する長鎖ノンコーディングRNA

HeLa細胞にサルモネラをMOI=100で感染させた後、2, 6, 18時間後にtotal RNAを抽出してHiSeq2000でRNA-seq解析した。

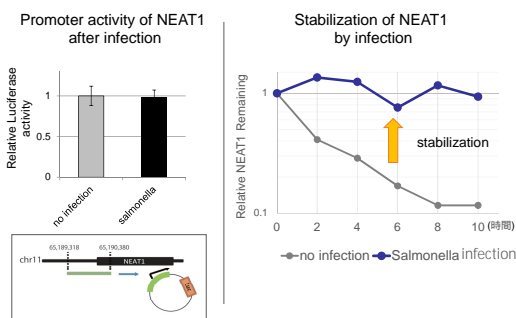


図2:サルモネラ感染後の宿主細胞長鎖ノンコーディングRNAの安定化
左:ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、NEAT1長鎖ノンコーディングRNAの転写活性化の有無を評価した。右:BRIC法を用いて、NEAT1長鎖ノンコーディングRNAのRNA安定性を評価した。

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 9件)

1. Imamura K., Takaya A., Ishida Y., Fukuoka Y., Taya T., Nakaki R., Kakeda M., Imamachi N., Sato A., Yamada T., Onoguchi-Mizutani R., Akizuki G., Tanu T., Tao K., Miyao S., Suzuki Y., Nagahama M., Yamamoto T., Jensen TH. and Akimitsu N., Diminished nuclear RNA decay upon

Salmonella infection upregulates antibacterial noncoding RNAs, *EMBO J.* in press 査読有り

2. Tano K., Onoguchi-Mizutani R., Yeasmin F., Uchiyama F., Suzuki Y., Yada T. and Akimitsu N., (2018) Identification of minimal p53 promoter region regulated by MALAT1 in human lung adenocarcinoma cells, *Frontiers in Genetics.* 8, 208 査読有り
3. Yamada T., Imamachi N., Mizutani R., Imamura K., Suzuki Y. and Akimitsu N. (2017) 5'bromouridine IP Chase (BRIC)-seq to determine RNA half lives. *Methods in Mol. Biol.*, 1720, 1-13. 査読有り
4. Imamachi N., Salam K.A., Suzuki Y. and Akimitsu N. (2017) A GC-rich sequence feature in the 3' UTR directs UPF1-dependent mRNA decay in mammalian cells. *Genome Res.* 27, 407-418. 査読有り
5. Okada T., Kurabayashi A., Akimitsu N. and Furihata M. (2017) Expression of cadherin-17 promotes metastasis in a highly bone marrow metastatic murine breast cancer model. *BioMed Res. Inter.*, 2017, 8494286. 査読有り
6. Hermawan I., Furuta A., Higashi M., Fujita Y., Akimitsu N., Yamashita A., Moriishi K., Tsuneda S., Tani H., Nakakoshi M., Tsubuki M., Sekiguchi Y., Noda N. and Tanaka J. (2017) Four Aromatic Sulfates with an Inhibitory Effect against HCV NS3 Helicase from the Crinoid *Alloeocomatella polycladia*, *Marine Drugs*, 15, E117. 査読有り
7. Mizutani R., Imamachi N., Suzuki Y., Yoshida H., Tochigi N., Oonishi T., Suzuki Y., Akimitsu N. (2016) Oncofetal protein IGF2BP3 facilitates the activity of proto-oncogene protein eIF4E through the destabilization of EIF4E-BP2 mRNA. *Oncogene*, 35, 3495-3502 査読有り
8. Xia J., Inagaki Y., Sawakami T., Song P., Cai Y., Hasegawa K., Sakamoto Y., Akimitsu N. and Tang W. (2016) Preliminary investigation of five novel long non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma cell lines. *Biosci Trends.*, 10, 315-319. 査読有り
9. Katsura M., Cyou-Nakamine H., Zen Q., Zen Y., Nansai H., Amagasa S., Inoue T., Kaneki K., Taguchi A., Kobayashi M., Kaji T., Kodama T., Miyagawa K., Wada Y., Akimitsu N., and Sone H. (2016) Effects of Exposure to Low Dose Radiation on Differentiation in Human Neural Progenitor Cells. *Sci. Rep.*, 6, 20027 査読有り

[学会発表](計 14件)

1. ノンコーディングRNA = 免疫システムを操るノーベルプレイヤー =、(2015年7月19日、福岡県福岡市) 平成27年度九州大学大学院薬学研

究院公開講座

2. 長鎖 non-coding RNA の機能探索、(2015年9月8日、北海道札幌市) オーダーメイド医療・創薬開発セミナー
3. がん・免疫系におけるノンコーディング RNA の役割、(2015年9月25日) 宮城県立がんセンターセミナー
4. トランスクリプトームデータの再解釈から挑むがんの理解、(2015年10月10日) 第74回日本癌学会学術総会ランチョンセミナー
5. Roles of noncoding RNAs in cancer and the immune response、(2015年10月14日、熊本市) 熊本大学リエゾンラボ研究会/HIGO プログラム最先端研究セミナー
6. ストレスに应答した RNA 分解制御に関する研究、(2015年11月7日、東京都) 第10回臨床ストレス 应答学会大会ランチョンセミナー
7. 生命科学を楽しみ、創る、(2016年4月15日、福岡県飯塚市) 創立記念特別講演会
8. Regulation of cellular response against pathogenic infection by mammalian long noncoding RNAs、(2016年6月21日、静岡県浜松市) 分子生物学特別講演会
9. RNA 分解制御を通じた核内長鎖ノンコーディング RNA の発現制御と病原体抵抗機構、(2016年9月25日、宮城県仙台市) 第89回日本生化学会大会シンポジウム
10. 病原体と戦うノンコーディング RNA、(2016年10月26日、東京都) 国立医薬品食品衛生研究所セミナー
11. 核内 RNA 分解制御を通じた病原体抵抗機構、(2016年11月30日、神奈川県横浜市) 第39回日本分子生物学会年会 シンポジウム
12. Gene regulation through RNA degradation in mammalian cells、(2016年12月6日、千葉県野田市) 東京理科大学総合教育機構情報教育センター
13. 病原体に対する細胞応答を制御する長鎖ノンコーディング RNA、(2017年6月14日、宮城県仙台市) 第69回日本細胞生物学会大会シンポジウム
14. 長鎖非コード RNA の研究を通じた放射線生物影響の理解、(2017年8月21日、茨城県つくば市) TIA 連携プログラム「かけはし」シンポジウム

〔図書〕(計 2 件)

1. Mizutani R., Yamada T. and Akimitsu N. Techniques for genome-wide expression analysis of non-coding RNA. in Handbook of Epigenetics, 2nd Edition, in press. 分担執筆 (査読あり)
2. 遺伝子発現制御機構(2017年、東京化学同人)分担執筆 (査読なし)

〔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

<http://www.ric.u-tokyo.ac.jp/akimitsu/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋光 信佳 (Akimitsu Nobuyoshi)

東京大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号：40294962

(2)研究分担者

高屋 明子 (Takaya Akiko)

千葉大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：

80334217

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()