

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07923

研究課題名(和文)細菌感染における非コードRNAの機能解析

研究課題名(英文)Analysis of nuclear non-coding RNA upon bacterial infection

研究代表者

今村 亮俊 (Imamura, Katsutoshi)

千葉大学・大学院薬学研究院・日本学術振興会特別研究員(PD)

研究者番号：60741923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、本研究期間全体を通じて、サルモネラ感染によって、核内RNA分解に関与するMTR4とRRP6が消失し、その結果、核内lncRNAが安定化することで下流の遺伝子発現を制御していることを見出した。また、この意義を解明する目的で、核内lncRNAのKO細胞を作出し解析した結果、この安定化はサルモネラ感染抵抗性に寄与していることを見出した。さらに、本研究遂行過程において、新規核内RNA分解因子を発見することが出来た。

研究成果の概要(英文)：Cytoplasmic mRNA degradation controls gene expression to help eliminate pathogens during infection. However, it has remained unclear whether such regulation also extends to nuclear RNA decay. Here, we show that 145 unstable nuclear RNAs, including enhancer RNAs (eRNAs) and long noncoding RNAs (lncRNAs) are stabilized upon Salmonella infection in HeLa cells. In uninfected cells, the RNA exosome, aided by the Nuclear EXosome Targeting (NEXT) complex, degrades these labile transcripts. Upon infection, the levels of the exosome/NEXT components RRP6 and MTR4 dramatically decrease, resulting in transcript stabilization. Depletion of lncRNAs in HeLa cells triggers increased susceptibility to Salmonella infection concomitant with the deregulated expression of a distinct class of immunity-related genes, indicating that the accumulation of unstable nuclear RNAs contributes to antibacterial defense.

研究分野：核内RNA

キーワード：核内RNA分解 サルモネラ感染 長鎖非コードRNA

1. 研究開始当初の背景

この20年で、ヒトやマウスの大規模なゲノム解析が進み、タンパク質をコードしない非コード RNA (non-coding RNA, ncRNA) の存在が明らかとなった。この中でも核内に存在する200塩基以上の長さをもつ核内長鎖非コード RNA (long ncRNA, lncRNA) が、がんなどの疾患や感染応答に関与すること、遺伝子発現制御に直接関与していることなどが明らかとなりつつある。長鎖非コード RNA は、様々なタンパク質と相互作用することで、複雑なゲノム情報発現ネットワークを形成すると考えられる。このように、長鎖非コード RNA の存在・機能については理解が進んでいる。これらの多くが、転写制御によって RNA 量を説明されているが、RNA は転写と分解のバランスによって量が規定されていると考えられる。しかしながら、これら RNA がどのように壊されているのか、核内 RNA 分解の制御機構については、これまでほぼ明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、細菌感染症に対する免疫応答における長鎖非コード RNA の分解制御機構を解明することが目的である。これまでに申請者は、ウイルス感染に感染して、宿主細胞内で長鎖非コード RNA の1つである NEAT1 が発現上昇し、NEAT1 が転写因子の核内局在変化を引き起こすことで細胞内転写プログラムを変化させ、サイトカインの発現制御をしていることを発見した (K. Imamura, et al, Mol Cell 2014.)。本研究ではこの成果を発展させ、細菌感染における長鎖非コード RNA の機能も理解することを目的とする。さらに、核内 RNA 分解機構の制御についても明らかにしたい。本研究を遂行することで、感染症という俯瞰的な視点からの「長鎖非コード RNA による自然免疫応答制御」という学問分野を大きく開拓したい。具体的には、サルモネラ感染をモデルとして扱い、核内長鎖非コード RNA がどのように制御されているのか、抵抗性にどのように関わっているのかを調べる。

3. 研究の方法

細菌感染に対する核内長鎖非コード RNA の機能解明のために、細胞内寄生細菌であるサルモネラを用いる。HeLa 細胞にサルモネラを感染させ、経時的にサンプリングし、次世代シーケンズによって、網羅的に RNA の発現量を調べる。発現量が上昇した長鎖非コード RNA について、それが転写制御か分解抑制によるのかを調べる目的で、RNA ポリメラーゼ II に対するクロマチン免疫沈降実験、RNA 分解速度を測定する BRIC 法・アクチノマイシンチェイス法を実施する。分解抑制が起きている RNA について、サルモネラの細胞内寄生のどの段階が重要なのか・どの因子が重要なのかを変異体による感染実験によって調べる。さらに、どのように RNA 分解抑制が起きているの

かを、RNA 分解因子の量をウエスタンブロットによって検出し、またそのメカニズムを阻害剤や siRNA ライブラリーなどを用いて同定する。最後に、サルモネラ感染による RNA 分解の安定化によって発現が上昇した長鎖非コード RNA が、サルモネラ感染抵抗性に寄与しているのかを調べる目的で、Crispr/Cas システムを用いて、ノックアウト細胞を作り、解析する。

4. 研究成果

(1) サルモネラ感染によって発現変動する遺伝子群の探索

HeLa 細胞にサルモネラを感染させ、2,6,18 時間後に RNA を回収し、次世代シーケンズによって RNA の発現量解析を行った。その結果、サルモネラ感染で発現が上昇する核内の短寿命非コード RNA が145種見つかった。この中には、長鎖非コード RNA の1つである NEAT1、またエンハンサー領域から発現するエンハンサー RNA も含まれていた。さらに、発現上昇のメカニズムを調べる目的で、RNA ポリメラーゼ II に対するクロマチン免疫沈降実験と RNA 分解速度を BRIC 法及びアクチノマイシン D チェイス法で測定した結果、転写ではなく RNA の分解抑制によって蓄積し、発現が上昇していることがわかった。

(2) サルモネラ変異体を用いた核内 RNA 分解抑制メカニズムの解明

サルモネラ感染において、何がシグナルとなって核内 RNA 分解が抑制されるのかを調べる目的で、細胞内侵入の出来ない菌株、細胞内で増殖できない菌株を用いて感染実験を行った。その結果、細胞内で増殖することが核内 RNA 分解抑制には必要であることがわかった。さらに現在、細胞内で増殖するために必要とされるサルモネラが産生する各種エフェクター欠損株の感染実験を行っている。

(3) 核内 RNA 分解抑制のメカニズム解明

RNA 分解は、エキソソームと呼ばれる、3'-5' エキソヌクレアーゼ活性を有するエキソソームによって担われている。核内 e エキソソームは、9 つのタンパク質からなるコアエキソソームと、エキソヌクレアーゼ活性を有する RRP6 を含む触媒サブユニットからなる。さらに、核内エキソソームのターゲット RNA 認識において、RNA ヘリカーズ MTR4、the Zn-finger タンパク質 ZCCHC8、そして RNA 結合タンパク質 RBM7 からなる Nuclear EXosome Targeting (NEXT) 複合体と結合して、エンハンサー領域から産生される enhancer RNA (eRNA) の分解に寄与していることが報告されている。さらにエキソソームは MTR4、the Zn-finger タンパク質 ZFC3H1、そしてポリ A タンパク質 PABPN1 からなる Poly(A) tail eXosome Targeting (PAXT) 複合体とも結合して、ポリ A テールを持つ核内 RNA (SNORNA Host Gene SNHG) を壊していることが近年報告された。サルモネラ感染によって、核内 RNA 分解がどの

ようにして抑制されているのかを調べる目的で、まず各種核内 RNA 分解複合体タンパク質に対するウエスタンブロットを行った。その結果、サルモネラ感染時に MTR4 と RRP6 が消失していることを見出した(図1)。また、グリセロールグラジエント解析などにより、サルモネラ感染時には、核内 RNA 分解複合体が正常に形成されていないことを確認した。

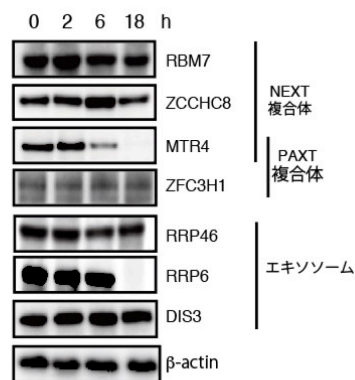


図1：サルモネラ感染による MTR4, RRP6 の消失

(4)サルモネラ感染に対する短寿命非コード RNA 蓄積の効果

短寿命長鎖非コード RNA の蓄積がサルモネラ感染に対して、どのような影響をもたらすのかを調べる目的で長鎖非コード RNA の1つである NEAT1 とエンハンサー領域から産生される非コード RNA であるエンハンサーRNA のノックアウト(KO)細胞を作出した。

これらの KO 細胞は、野生型細胞に比べサルモネラ感染で死にやすくなり、細胞内でのサルモネラの増殖率も増えていた。一方で侵入したサルモネラの菌数に差はなかったことから、KO 細胞は、サルモネラが増殖しやすい環境になっている、つまり KO した遺伝子はサルモネラ感染抵抗性に寄与していると考えられた。

つぎに、これら KO した遺伝子がサルモネラ感染抵抗性にどのように寄与しているかを調べる目的で、KO 細胞にサルモネラを感染させて、遺伝子発現をマイクロアレイで解析した。その結果、NEAT1 やエンハンサーRNA が細菌感染抵抗性に関わる遺伝子群を制御していることが明らかになった。

(5)サルモネラ感染による MTR4, RRP6 消失のメカニズム解明

サルモネラ感染によって、MTR4, RRP6 が消失することがわかったが、そのメカニズムは未だわかっていない。そこで、購入可能なプロテアーゼ阻害剤を各種購入し、サルモネラ感染での MTR4, RRP6 消失に関与するプロテアーゼの同定を試みたが、購入したプロテアーゼ阻害剤では、効果がなかった。また、現在プロテアーゼ約 500 種類の siRNA スクリーニングを試みようとしている。

以上の結果から、宿主はサルモネラ感染に抵抗

するために核内 RNA 分解を抑制し、下流の感染抵抗性に関与する遺伝子発現が変化していることが明らかになった。これまで、核内 RNA 分解複合体や基質認識に関わる複合体はわかっていたが、細胞内でこれらが制御され、RNA 量が増加する現象の発見は本研究が初めてである。今後は、RNA 分解複合体が制御される詳細なメカニズムの解明に取り組んでいく。本研究結果の一部は、EMBO Journal に発表した。

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 5 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, Akimitsu N Diminished nuclear RNA decay upon *Salmonella* infection upregulates antibacterial noncoding RNAs **EMBO J**, Accepted (査読有り)
- ② Yamada T, Imamachi N, Onoguchi-Mizutani R, Imamura K, Suzuki Y, Akimitsu N 5'-Bromouridine IP Chase (BRIC)-Seq to Determine RNA Half-Lives, **mRNA Decay**, 1-13, 2018 (査読有り)
- ③ Urai M, Aizawa T, Imamura K, Hamamoto H, Sekimizu K Characterization of the chemical structure and innate immune-stimulating activity of an extracellular polysaccharide from *Rhizobium* sp. strain M2 screened using a silkworm muscle contraction assay **Drug discoveries & therapeutics** 11 (5), 238-245, 2017 (査読有り)

- ④ Maekawa S, Imamachi N, Irie T, Tani H, Matsumoto K, Mizutani R, **Imamura K**, Kakeda M, Yada T, Sugano S, Suzuki Y, Akimitsu N
Analysis of RNA decay factor mediated RNA stability contributions on RNA abundance **BMC Genomics**. 2015 Mar 6;16:154 (査読有り)
- ⑤ Tani H, Imamachi N, Mizutani R, **Imamura K**, Kwon Y, Miyazaki S, Maekawa S, Suzuki Y, Akimitsu N.
Genome-wide analysis of long noncoding RNA turnover. **Methods Mol Biol**. 2015;1262:305-20. (査読有り)

[学会発表] (計 3件)

- ① Imamura K., Akimitsu N. “Loss of RNA degradation factors upon *Salmonella* infection stabilizes turnover of nuclear long non-coding RNAs” Eukaryotic RNA turnover at EMBO Conference, 2017, Oxford, United Kingdom
- ② Imamura K., Akimitsu N. “Loss of RNA degradation factors upon *Salmonella* infection stabilizes nuclear long non-coding RNAs” The 21st Annual Meeting of the RNA Society, 2016, Kyoto, Japan
- ③ 今村 亮俊、高屋 明子、石田 洋一、長浜 正巳、山本 友子、Torben Heick Jensen、秋光 信佳 「サルモネラ感染に対する核内 RNA 分解機構による応答」2017 年、第 19 回日本 RNA 学会年会 (富山県富山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 亮俊 (IMAMURA Katsutoshi)

千葉大学・大学院薬学研究院・日本学術振興会特別研究員 (PD)

研究者番号 : 60741923

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし