

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02497

研究課題名(和文) リジン水酸化酵素Jmjd6を介したAire発現制御の分子基盤とその進化的考察

研究課題名(英文) Molecular basis for Jmjd6-mediated control of Aire protein expression and its evolutionary insight

研究代表者

福井 宣規 (Fukui, Yoshinori)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：60243961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,700,000円

研究成果の概要(和文)：Jmjd6は、鉄と2-オキシグルタル酸、および溶存酸素を共役因子として、リジン残基の水酸化を触媒する酵素である。研究代表者は最近、Jmjd6を欠損した胸腺では、Aire (autoimmune regulator) 遺伝子のイントロン2のスプライシングが障害され、N末端103アミノ酸残基だけからなる不完全なAireタンパク質 (immature Aire) が増加する結果、免疫寛容誘導が正常に作動しないことを見いだした。本研究では、Jmjd6が選択的スプライシングを制御する分子基盤の一端を解明すると共に、Jmjd6の新たな機能を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

intron retentionはミスプライシングの結果であるとの考えから、その生物学的重要性は見直されて来た。しかしながら研究代表者は、Aireのタンパク質発現が、intron retentionにより、2段階の制御を受けることを発見した。Aireはpromiscuousな遺伝子発現を誘導する「危ない遺伝子」であり、その発現は厳密にコントロールされている必要があると推測されてきたが、それがこのような2段階制御機構によって担われていることは、全く予想外であった。本研究の成果は、タンパク質の機能発現制御における新たなパラダイムの創出につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Jmjd6 is a member of the JmjC-domain containing proteins that are involved in a wide range of oxidation reactions. Jmjd6 catalyses lysyl hydroxylation of multiple substrates, including splicing regulatory proteins, transcription factors and histones, in a manner dependent on the Fe(II) and 2-oxoglutarate. We found that Jmjd6 plays a key role in induction of central tolerance by controlling Aire expression in mTECs. Although Jmjd6 deficiency did not affect abundance of Aire transcript, the intron 2 of Aire gene was not effectively spliced out in the absence of Jmjd6, owing to the unique 3' splice site sequence. As a result, the expression of Aire protein was markedly reduced in Jmjd6-deficient mTECs, and T cells generated in such thymic microenvironments caused multi-organ autoimmunity in mice. In this project, we have analyzed the mechanism for Jmjd6-mediated control of Aire RNA splicing and revealed several functions of Jmjd6.

研究分野：機能生物科学

キーワード：発現制御 遺伝子 生体分子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

JmjC ファミリー分子は、鉄と 2-オキシグルタル酸、および溶存酸素を共役因子として、基質の水酸化、脱メチル化等を行う酸素添加酵素であり、HIF α 、FIH、KDM5、PHD2 といった他の酸素添加酵素群と共にスーパーファミリーを形成する (Trends Biochem. Sci. 36:7, 2011)。Jmjd6 は、このファミリーに属する分子であり、当初ホスファチジルセリンを認識する受容体としてクローニングされたが (Nature 405:85, 2000)、最近になって、1) ヒストンのアルギニン酸の脱メチル化酵素として機能すること、2) RNA スプライシング因子 U2AF65 などのリジン残基を水酸化すること、3) Brd4 と協調的に機能し転写を制御すること等が報告され (Science 318:444, 2007; Science 325:90, 2009; Cell 157:1581, 2013)、その生体機能は大きな注目を集めている。

胸腺は未熟な T 細胞である胸腺細胞の教育の「場」であり、成熟 T 細胞を産生するための器官である。胸腺細胞はその分化過程で、正と負の選択を受け、末梢で免疫応答に寄与する T 細胞レパトアが決定される。正の選択は、MHC 拘束を付与する過程であり、これは胸腺皮質上皮細胞 (cTEC) によって担われている。一方、負の選択は、自己反応性 T 細胞を除去する過程であり、これには胸腺髄質上皮細胞 (mTEC) が重要な役割を演じている。mTEC には、Aire (autoimmune regulator) と呼ばれる核内因子が発現し、インスリンといった組織特異的抗原の発現を誘導することで、自己反応性 T 細胞の除去に働くと考えられおり (Science 298:1395, 2002)、実際、Aire 遺伝子の異常により、I 型多腺性内分泌自己免疫症候群といった病態が発症することが知られている (Nature Genet. 17:393, 1997; Nature Genet. 17:399, 1997)。

Jmjd6 のノックアウト (KO) マウスは胎生致死となる (Blood 103:3362, 2004)。研究代表者は、Jmjd6 KO マウスの胎児胸腺では Aire のタンパク質発現が著減しており、それをヌードマウスの腎皮膜下に移植すると、自己抗体の産生を伴う自己免疫疾患を自然発症することを見いだした。Jmjd6 欠損は Aire の遺伝子発現には影響しないが、イントロン 2 のスプライシングが障害され、その結果 N 末端 103 アミノ酸残基だけからなる不完全な Aire タンパク質 (immature Aire) が産生され、TSA の発現が激減することを見出した。しかしながら、immature Aire タンパク質が、正常な Aire タンパク質 (mature Aire) の発現を抑制する機構は、よくわかっていない。また、イントロン 2 の 3' スプライスサイトには、通常認められる polypyrimidine tract (TTT) でなく 'GAG' 配列が存在しており、mini-gene を用いた解析から、このシスエレメントにより intron retention (IR) が惹起され、その解除に Jmjd6 を介したスプライシング因子のリジン水酸化が必要であると考えられるが、その分子機構の詳細は不明である。興味深いことに、この GAG 配列はヒトを含む超霊長類に保存されているため、これらの種において Aire の発現を抑える仕組みが進化してきたものと推察されるが、現時点でその意義は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、

- 1) Jmjd6 が Aire 遺伝子の選択的スプライシングを制御する分子基盤を解明する。このため、Jmjd6 の基質となっているスプライシング因子を同定すると共に、
- 2) immature Aire タンパク質が mature Aire タンパク質の発現を抑制するメカニズムを、局在やタンパク質分解の視点から解析する。また、
- 3) コンディショナル KO マウスを用いて、Jmjd6 の生体機能を明らかにすると同時に、
- 4) Aire イントロン 2 の 3' スプライスサイトの GAG 配列を TTT に置換したノックインマウスを作製し、超霊長類に保存される GAG 配列の生理的意義に迫る。

3. 研究の方法

1) Jmjd6 が Aire 遺伝子の選択的スプライシングを制御する分子基盤

Aire のイントロン 2 をはさむエクソン 2~エクソン 3 から成る DNA コンストラクトを作製し、in vitro transcription により mRNA 断片を調製し、磁気ビーズに固相化する。この RNA 固相化ビーズを用いて、Aire を内在的に発現する ES 細胞もしくは mTEC 培養細胞株の細胞粗抽出液から会合分子を精製する。精製したタンパク質の LC-MS/MS 質量分析をおこない、会合分子を同定する。また、これら分子の Jmjd6 との会合を解析すると共に、候補分子の機能を ES 細胞において

ノックダウンすることで検証する。

2) immature Aire タンパク質が mature Aire タンパク質の発現を抑制するメカニズム

GFP および mCherry で標識した mature Aire タンパク質と immature Aire タンパク質をマウス繊維芽細胞 (MEF) に発現させ、その局在を解析する。また、これらを共発現させ、mature Aire タンパク質の局在に及ぼす影響を解析する。また、mature Aire タンパク質を恒常的に発現する HEK 293 細胞に遺伝子導入を行うことで、doxycycline 依存的に immature Aire タンパク質を誘導できる細胞株を開発する。この実験系を用いて、immature Aire タンパク質が、mature Aire タンパク質の発現に及ぼす影響を解析する。プロテアソームによるタンパク質分解の可能性が考えられた場合、E3 リガーゼ候補を同定する。

3) Jmjd6 の生体機能

FoxN1-Cre マウスと交配することで、TEC 特異的に Jmjd6 を欠損したマウスを樹立する。これを、インスリンプロモーターの下流で OVA (卵白アルブミン) を発現し、且つ OVA 抗原特異的に反応する T 細胞受容体 (OTI TCR) を発現するマウスと交配し、膵臓に発現する自己抗原 (OVA) に対する免疫寛容誘導を解析する。また、がんにおける Jmjd6 の機能を解析する。

4) Aire インترون 2 の 3'スプライスサイトの GAG 配列を TTT に置換したノックインマウス

Aire intron 2 の 3'スプライスサイトの GAG 配列を TTT に置換したノックインマウスを作製し、超霊長類に保存される GAG 配列の生理的意義を解明する。

4. 研究成果

1) Jmjd6 が Aire 遺伝子の選択的スプライシングを制御する分子基盤

in vitro transcription により、Aire のイントロン 2 およびイントロン 1 を含む mRNA 断片を調製し、これに結合するタンパク質を LC-MS/MS を用いて同定した。その結果、イントロン 2 特異的に会合する分子を 20 種類同定した。また、Jmjd6 の会合分子として、スプライシング因子である U2AF65 と Srsf3 を同定し、その機能を Aire を内在性に発現する ES 細胞を用いて検証した。その結果、U2AF65 をノックダウンすると、Jmjd6 ノックアウトの場合と同様に、Aire のスプライシング異常が生じることを見出した。

2) immature Aire タンパク質が mature Aire タンパク質の発現を抑制するメカニズム

immature Aire タンパク質と mature Aire タンパク質を共発現させると、mature Aire タンパク質の局在が核から細胞質に変化し、プロテアソーム依存性にタンパク質分解を受けることを見いだした。そこで、分解に関わる E3 リガーゼの探索を実施し、TRIM21、MIB1、Roquin、TRIM25、TRIM11 を候補として同定した。

3) Jmjd6 の生体機能

新たに作製したコンディショナル KO マウスを FoxN1-Cre マウスと交配することで、胸線上皮細胞特異的に Jmjd6 を欠損したマウスを樹立した。このマウスを、インスリンプロモーターの下流で OVA を発現し、且つ OVA 抗原特異的に反応する T 細胞受容体 (OTI TCR) を発現するマウスと交配することで、膵臓に発現する自己抗原 (OVA) に対する免疫寛容誘導を解析した。その結果、胸線上皮細胞特異的に Jmjd6 を欠損したマウスでは、自己免疫性糖尿病の発症が、亢進・増悪することを見いだした。また、ヒト大腸がん細胞株 DLD-1 を対象に、CRISPR/Cas9 システムを用いて、Jmjd6 をノックアウトした細胞株を樹立し、Jmjd6 欠損株では S 期への移行が障害されていることを見出した。

4) Aire インترون 2 の 3'スプライスサイトの GAG 配列を TTT に置換したノックインマウス

Aire intron 2 の 3'スプライスサイトの GAG 配列を TTT に置換したノックインマウスを作製した。このマウスにおいて、Aire タンパク質の発現が亢進することを期待したが、そのような変化は解析した限り認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 15 件)

1. Gotoh K, Morisaki T, Setoyama D, Sasaki K, Yagi M, Igami K, Mizuguchi S, Uchiumi T, Fukui Y, Kang D : Mitochondrial p32/C1qbp is a critical regulator of dendritic cell metabolism and maturation. **Cell Rep.**, 査読有, 25:1800–1815, 2018. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.10.057
2. Sakurai T, Uruno T, Sugiura Y, Tatsuguchi T, Yamamura K, Ushijima M, Hattori Y, Kukimoto-Niino M, Mishima-Tumagari C, Watanabe M, Suematsu M, Fukui Y: Cholesterol sulfate is a DOCK2 inhibitor that mediates tissue-specific immune evasion in the eye. **Science Signaling**, 査読有, 11:1–11, 2018. DOI: 10.1126/scisignal.aao4874
3. Tomino T, Tajiri H, Tatsuguchi T, Shirai T, Oisaki K, Matsunaga S, Sanematsu F, Sakata D, Yoshizumi T, Maehara Y, Kanai M, Côté JF, Fukui Y, Uruno T: DOCK1 inhibition suppresses cancer cell invasion and macropinocytosis induced by self-activating Rac1P29S mutation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 査読有, 497:298–304, 2018. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.073
4. Ushijima M, Uruno T, Nishikimi A, Sanematsu F, Kamikaseda Y, Kunimura K, Sakata D, Okada T, Fukui Y: The rac activator DOCK2 mediates plasma cell differentiation and IgG antibody production. **Front Immunol.**, 査読有, 9:243, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00243
5. Yanagihara T, Tomino T, Uruno T, Fukui Y: Thymic epithelial cell-specific deletion of Jmjd6 reduces Aire protein expression and exacerbates disease development in a mouse model of autoimmune diabetes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 査読有, 489:8–13, 2017. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.113
6. Yamazaki S, Tanaka Y, Araki H, Kohda A, Sanematsu F, Arasaki T, Duan X, Miura F, Katagiri T, Shindo R, Nakano H, Ito T, Fukui Y, Endo S, Sumimoto H: The AP-1 transcription factor JunB is required for Th17 cell differentiation. **Sci. Rep.**, 査読有, 7:17402, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-17597-3
7. Okumura F, Joo-Okumura A, Obara K, Petersen A, Nishikimi A, Fukui Y, Nakatsukasa K, Kamura T: Ubiquitin ligase SPSB4 diminishes cell repulsive responses mediated by EphB2. **Mol. Biol. Cell.**, 査読有, 28:3532–3541, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-17597-3
8. Ackerknecht M, Gollmer K, Germann P, Ficht X, Abe J, Fukui Y, Swoger J, Ripoll J, Sharpe J, Stein JV: Antigen availability and DOCK2-driven motility govern CD4⁺ T cell interactions with dendritic cells in Vivo. **J. Immunol.**, 査読有, 199:520–530, 2017. DOI: 10.4049/jimmunol.1601148
9. Peters LA, Perrigoue J, Mortha A, Iuga A, Song WM, Neiman EM, Llewelly SR, Di Narzo A, Kidd BA, Telesco SE, Zhao Y, Stojmirovic A, Sendekci J, Shameer K, Miotto R, Losic B, Shah H, Lee E, Wang M, Faith JJ, Kasarskis A, Brodmerkel C, Curran M, Das A, Friedman JR, Fukui Y, Humphrey MB, Iritani BM, Sibinga N, Tarrant TK, Argmann C, Hao K, Roussos P, Zhu J, Zhang B, Dobrin R, Mayer LF, Schadt EE: A functional genomics predictive network model identifies regulators of inflammatory bowel disease. **Nat. Genet.**, 査読有, 49:1437–1449, 2017. DOI:10.1038/ng.3947
10. Tajiri H, Uruno T, Shirai T, Takaya D, Matsunaga S, Setoyama D, Watanabe M, Kukimoto-Niino M, Oisaki K, Ushijima M, Sanematsu F, Honma T, Terada T, Oki E, Shirasawa S, Maehara Y, Kang D, Côté JF, Yokoyama S, Kanai M, Fukui Y: Targeting Ras-Driven cancer cell survival and invasion through selective inhibition of DOCK1. **Cell Rep.**, 査読有, 19:969–980, 2017. DOI:10.1016/j.celrep.2017.04.016
11. Yamamura K, Uruno T, Shiraishi A, Tanaka Y, Ushijima M, Nakahara T, Watanabe M, Kido-Nakahara M, Tsuge I, Furue M, Fukui Y : The transcription factor EPAS1 links DOCK8 deficiency to atopic skin inflammation via IL-31 induction. **Nat. Commun.**, 査読有, 8:13946, 2017. DOI:10.1038/ncomms13946
12. Shiraishi A, Uruno T, Sanematsu F, Ushijima M, Sakata D, Hara T, Fukui Y: DOCK8 Protein Regulates Macrophage Migration through Cdc42 Activation and LRAP35a Interaction. **J. Biol. Chem.**, 査読有, 292:2191–2202, 2017. DOI: 10.1074/jbc.M116.736306
13. Uematsu K, Okumura F, Tonogai S, Joo-Okumura A, Alemayehu DH, Nishikimi A, Fukui Y, Nakatsukasa K, Kamura T: ASB7 regulates spindle dynamics and genome integrity by targeting DDA3 for proteasomal degradation. **J. Cell. Biol.**, 査読有, 215:95–106, 2016. DOI:10.1083/jcb.201603062
14. Liu Z, Man SM, Zhu Q, Vogel P, Frase S, Fukui Y, Kanneganti TD: DOCK2 confers immunity and intestinal colonization resistance to Citrobacter rodentium infection. **Sci. Rep.**, 査読有, 6:27814, 2016. DOI:10.1038/srep27814

15. Okumura F, Uematsu K, Byrne SD, Hirano M, Joo-Okumura A, Nishikimi A, Shuin T, Fukui Y, Nakatsukasa K, Kamura T: Parallel Regulation of von Hippel-Lindau Disease by pVHL-Mediated Degradation of B-Myb and Hypoxia-Inducible Factor α . **Mol Cell Biol.**, 査読有, 36:1803-1817, 2016. DOI:10.1128/MCB.00067-16

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 福井宣規: DOCK ファミリー分子によるアレルギー疾患制御の分子基盤. 第 5 回総合アレルギー講習会 (招待講演). 2018 年
2. Fukui Y: Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and diseases. The 9th Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases, Symposium (招待講演) (国際学会). 2018 年
3. Fukui Y: Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and diseases. Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine 2018 (招待講演) (国際学会). 2018 年
4. 福井宣規: 免疫アレルギー疾患と DOCK ファミリー分子. 第 55 回日本小児アレルギー学会学術大会特別講演 (招待講演). 2018 年
5. 福井宣規: DOCK2 の機能を阻害する代謝産物の発見: その産生と生体機能. 第 91 回日本生化学会大会シンポジウム (招待講演). 2018 年
6. Matsubara K, Yanagihara T, Fukui Y: Jmjd6 controls Aire protein expression and self-tolerance induction in the thymus. The 5th European Congress of Immunology (国際学会). 2018 年
7. Yamamura K, Fukui Y: The transcription factor EPAS1 links DOCK8 deficiency to atopic skin inflammation via IL-31 induction. 第 46 回日本免疫学会学術集会. 2017 年
8. Uruno T, Fukui Y: Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and diseases. Pfizer Science Day 2017 「自己免疫・炎症疾患と NASH の革新的な医療ニーズを探る」(招待講演). 2017 年
9. Fukui Y: Immune regulatory functions of DOCK8 in health and diseases. 11th International Symposium of The Institute Network “Frontiers in Biomedical Sciences” (招待講演). 2017 年
10. 福井宣規: Rac 活性化を標的とした新しい抗がん剤創出の試み. 創薬等支援技術基盤プラットフォーム公開シンポジウム (招待講演). 2016 年
11. 福井宣規: 生体防御システムにおける DOCK ファミリー分子の機能とその制御機構. 生体防御学会 (招待講演). 2016 年
12. 福井宣規: 免疫システムにおける DOCK ファミリー分子の機能とその制御機構. 第 68 回日本細胞生物学会大会 (招待講演). 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ: <http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/iden/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 宇留野 武人

ローマ字氏名: Takehito Uruno

所属研究機関名: 九州大学

部局名: 生体防御医学研究所

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 80532093

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。