

平成30年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06898

研究課題名(和文) 免疫細胞におけるRNA結合タンパクの網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of RNA binding proteins in the immune system

研究代表者

植畑 拓也 (Uehata, Takuya)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：50785970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：RNA結合蛋白質(RBP)はmRNAの運命決定を司る中心的役割を果たしている。炎症応答におけるRBP-RNA結合のダイナミズムを理解することは、新たな転写後制御機構の開拓にとって不可欠である。本研究では、T細胞株を用いて活性化に伴うRNA-蛋白質結合を網羅的に解析した。この結果750個のRBPを同定し、この中から特に細胞活性化によってダイナミックにRNA-蛋白質結合が変化するRBP群を同定した。さらに、機能未知な特定の遺伝子に関して免疫応答との関連を明らかにした。結果、炎症誘導の観点から細胞内で起こるRBPのダイナミックなRNA制御に関して、網羅的にRBP-RNA結合を捉えることに成功した。

研究成果の概要(英文)：RNA binding proteins (RBPs) play a central role in the fate decision of mRNA. Better understanding of dynamic changes in RBP-RNA interaction during inflammation is important for discovery of new post-transcriptional mechanisms. In this study, RBP-RNA interactome was determined using T cell line post-activation. I found that 750 RBPs were detected and that a gene cluster related to inflammatory responses was identified from among them. RBPs that are presumably involved in inflammatory responses were selected and I obtained preliminary data that these RBPs regulate inflammation including cytokine production. Collectively, I demonstrated that RBPs underwent a dynamic change in RNA interaction status during inflammation.

研究分野：免疫学

キーワード：RNA結合蛋白質 転写後制御 炎症制御

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子発現は、遺伝情報がコードされた塩基配列を転写し mRNA となり、これが翻訳過程を経て蛋白質となる、いわゆるセントラルドグマに従っている。このような過程において、転写後制御機構は、RNA 誕生から分解に至るあらゆる RNA 代謝を司る遺伝子制御システムである。特に、RNA 結合蛋白質 (RBP) は転写後制御において中心的な役割を果たしている。ゲノム上にはおよそ 1500 個の RBP が存在するとされる。これら RBP の機能異常は、神経・筋変性疾患や悪性腫瘍などとの関連が指摘されているが、免疫制御に与える影響に関しては十分には解明されていない。

(2) 申請者らはこれまでに RNA 分解を誘導する因子として Regnase-1 (別名 Zc3h12a) を同定し炎症制御に関して解析を行ってきた。Regnase-1 は免疫細胞に恒常的に発現しており、炎症性サイトカインなどをコードする mRNA を不安定化する。Regnase-1 欠損マウスでは、著しい脾腫・リンパ節腫大が認められ、免疫細胞の活性化や抗核抗体や抗 dsDNA 抗体といった自己抗体が出現する。このことは、Regnase-1 が免疫細胞の活性化を厳密に制御していることを示唆している。実際に、Regnase-1 蛋白質は細胞の活性化によりダイナミックに発現量に変化することを報告してきた (Iwasaki et al., Nature Immunology 2011, Uehata et al., Cell 2013)。興味深いことに、マクロファージや T 細胞では、それぞれ LPS や T 細胞受容体刺激により Regnase-1 蛋白質は速やかに分解し、数時間後には発現量は元の状態まで回復する。これにより、Regnase-1 は免疫細胞の活性化状態に合わせて mRNA の安定性を変化させ、炎症誘導及び収束をコントロールしていることが伺える。

Regnase-1 以外にも、これまでに Tristetraprolin や Roquin といった RNA 結合蛋白質が炎症制御に重要な RBP として報告されているが、細胞の活性化により蛋白質修飾や分解など様々な様式で、その機能が制御されていることが明らかとなっている。

(3) このように RBP による mRNA 代謝は細胞活性化によって大きく変化するが、これには RBP 発現量の変化や蛋白質修飾などが関与しており、これによって標的 RNA に対する結合状態の量的・質的变化が機能的に重要と考えられる。さらにこのことが、mRNA のスプライシング、修飾、翻訳、分解など、様々な RNA 代謝が RBP を介して制御されている (図 1)。これまでに、免疫細胞の機能に関わる RBP の報告は多くなされているが、炎症制御に関与する RBP の全貌を RNA-蛋白質結合の観点から明らかにしたもののはほと

んど報告はない。

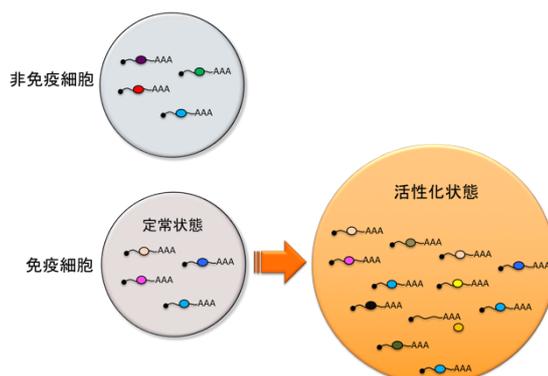


図 1 RNA 結合蛋白質は細胞種や細胞の状態によって大きく変化することが予想される。

## 2. 研究の目的

本研究では、免疫恒常性維持に重要な RBP を RNA interactome 解析によって網羅的に同定し、新たな RNA 制御機構を解明する。まず、1.免疫細胞における RNA interactome 解析による網羅的 RBP 同定を行う。このために、mRNA を標的とした免疫沈降法を用いて RNA-蛋白質複合体を抽出し、その後定量的質量分析を行う。

次に、2.免疫機能制御に関連する新規 RBP の同定を行う。免疫細胞に特徴的な RNA 制御、即ち RNA-蛋白質結合は、定常状態よりもむしろ、多くの炎症に関連した遺伝子群の発現が認められる活性化状態に起こると考えられる。そこで、1.で得られた情報をもとに、特に活性化状態において認められる RBP に着目し、その中から免疫機能制御に関連した RBP を同定する。

3. 2.で同定された RBP に関して、in vivo での役割を明らかにするために遺伝子欠損マウスを作製する。これを用いて、RBP がどのように免疫恒常性維持にとって重要であるかについて、個体レベルで明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 免疫細胞における RNA interactome 解析による網羅的 RBP 同定。T 細胞として代表的な免疫細胞株である Jurkat 細胞を用いて mRNA と結合する蛋白質の同定を行った。具体的に、Jurkat 細胞を PMA とイオノマイシンで 4 時間刺激したのち細胞を回収し、254nm あるいは 4SU 存在下で 365nm の UV 照射を行い RNA-蛋白質結合を架橋する。UV 照射後、細胞を溶解し oligo(dT)ビーズを加え磁気分離により poly(A)+RNA を免疫沈降する。この免疫沈降サンプルを定量的質量分析を行うことにより RNA interactome 解析を行った (図 2)。この結果に基づき、T 細胞の活性化によって起こる RNA-蛋白質結合の変化を明らかにする。

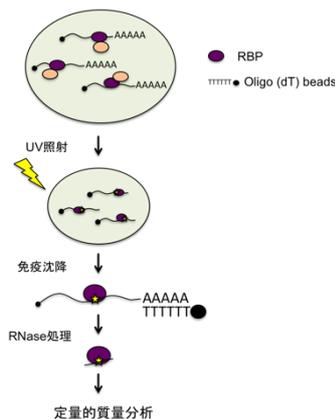


図2 網羅的RBP同定に関するワークフロー

(2) 免疫機能制御に関連する新規RBPの同定。RBPはRNAと結合することにより様々な転写後制御機構に関与することから、免疫応答において重要なRBPは、免疫細胞が活性化した状態において、RNAと結合が増加すると予想される。そこで、細胞刺激によってRNA-蛋白質結合が増加するRBPに着目する。この中から選択された候補遺伝子に関してノックダウンなどによる*in vitro*解析により、サイトカイン産生などの免疫応答を検討する。

(3) 免疫機能制御RBPにおける新規RNA制御機構の解明。(2)において免疫細胞の炎症応答に影響を与えうる候補遺伝子に関して、個体レベルでの解析を可能にするため遺伝子欠損マウスを作製する。これを用いて、候補遺伝子がRBPとしてどのようにRNA制御に関与するのかを、*ex vivo*及び*in vivo*の解析を通じて明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) Jurkat細胞に対して、254nmでUVクロスリンク、あるいは4SU添加12時間後に365nmでUVクロスリンクを行ったところ、両方の条件において良好なクロスリンク効率が認められた(図3)。次に、254nm UVクロスリンクによりoligo(dT) capture法を行い、免疫沈降サンプルに関して定量的質量分析を行ったところ、RNAと結合状態にあった750個の蛋白質を同定した。このうち大部分は免疫沈降前のプロテオームにおいても同定された蛋白質であったが、15%程度は免疫沈降サンプルにのみ認められた。この中で有意にRNA結合が認められた324の蛋白質においてクラスター解析を行ったところ、4つのクラスターを同定することができた(図4)。中でも、クラスター1はPMA+イオノマイシン刺激によってRNA結合が増加した蛋白質であり、クラスター2は逆にRNA結合が低下する群であることがわかった。これらのクラスターにおいてGO解析を行った

ところ、クラスター1ではクラスター2よりも多くのmRNA代謝に関連したGO termが含まれていた。さらに、このクラスター1には、mRNA分解因子であるRegnase-1も含まれており炎症制御に関連した遺伝子の存在が示唆された。クラスター3もまた、クラスター1よりも程度は低いものの、細胞活性化によってRNAとの結合が増加する群であることがわかった。以上より、RBPは細胞活性化によってRBPによるRNA結合能がダイナミックに変化していることが明らかとなった。

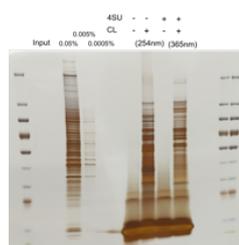


図3 oligo(dT)ビーズを用いた免疫沈降によってRNA結合蛋白質は効率的に得られる。

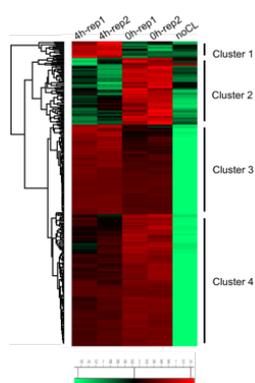
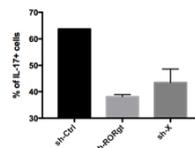


図4 活性化前後で同定されたRBPは4つのカテゴリーに分類される。

(2) まず、(1)で認められたクラスター1に着目したところ、RNA結合能がRegnase-1と非常に良く似た挙動を示す遺伝子Xを同定した。この遺伝子を初代CD4陽性T細胞を用いてノックダウンを行い、T細胞分化及びサイトカイン産生を検討した。ノックダウンした細胞をTh17分化条件で培養したのち、PMA+イオノマイシン刺激後のサイトカイン産生を評価したところ、IL-17A、IL-17F産生がコントロールと比較して低下していた(図4)。このことから、遺伝子XはT細胞の活性化によって炎症を制御する因子であることが示唆された。

図4 IL-17A産生細胞におけるsh-Control、sh-RORgt、sh-X間での比較。

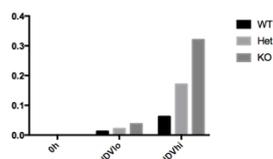


一方、クラスター3にも、炎症応答を制御するRBPが存在すると考えられた。この中から

特に細胞刺激によって、RBP 自身の発現が誘導される遺伝子に着目したところ、poly(I:C)によって誘導される遺伝子 Y を同定した。特に、肺において高発現を示し、in vivo で poly(I:C)刺激すると、著明に発現誘導が認められた。そこで、HeLa 細胞に対して siRNA を用いてノックダウンを行い、NDV 感染で I 型インターフェロン産生を評価したところ、コントロールと比較し IFN $\beta$  の発現上昇が認められた。このことから、遺伝子 Y は RNA ウイルス感染において I 型 IFN 産生に関与する RBP であることが示唆された。

(3) 遺伝子 X における遺伝子欠損マウスは機能的な面を考慮し胎生致死に陥る可能性が高いと考えられた。一方、遺伝子 Y に関しては、CRISPR/Cas9 システムにより遺伝子欠損マウスを作製することができた。このマウスより骨髄由来マクロファージを単離し、NDV で刺激したところ、野生型と比較して遺伝子 Y 欠損細胞は IFN $\beta$  の発現上昇が認められた (図5)。さらに遺伝子 Y ヘテロにおいても若干の上昇が認められた。このことから、遺伝子 Y はウイルス応答に関与し、I 型インターフェロンの発現に寄与していることが示唆された。今後引き続き、遺伝子機能解析を遺伝子欠損マウスを用いることにより、これら新規遺伝子が免疫恒常性維持にとって重要であるかを個体レベルで検討する。これらの研究成果により、新たな RNA 制御機構の発見につながることを期待される。

図5 骨髄由来マクロファージを単離し、NDV による刺激後の IFN $\beta$ 1 の発現を野生型、遺伝子 Y ヘテロ及びホモ間で比較した。



## 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 3件)

1. X. Cui, T. Mino, M. Yoshinaga, T. Uehata, Y. Nakatsuka, F. Hia, D. Yamasoba, T. Tsujimura, K. Tomonaga, Y. Suzuki, O. Takeuchi, Regnase-1 and Roquin non-redundantly regulate Th1 differentiation causing cardiac inflammation and fibrosis, *J Immunol. in press* (査読有)

2.M. Yoshinaga, Y. Nakatsuka, A. Vandenbon, D. Ori, T. Uehata, T. Tsujimura, Y. Suzuki, T. Mino, O. Takeuchi, Regnase-1 Maintains Iron Homeostasis via the Degradation of Transferrin

Receptor1 and Prolyl-Hydroxylase-Domain-Containing Protein 3 mRNAs, *Cell Rep.* 19 (2017) 1614-1630. (査読有)

3. T. Uehata, O. Takeuchi, Regnase-1 Is an Endoribonuclease Essential for the Maintenance of Immune Homeostasis, *J Interferon Cytokine Res.* 37 (2017) 220-229. (査読有)

[学会発表] (計 1件)

[図書] (計 1件)  
植畑拓也、竹内理、「マウスマウス表現型解析スタンダード；免疫系の表現型解析」、実験医学別冊、2016年 (査読無)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 1件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

[https://www2.infront.kyoto-u.ac.jp/Takeuchi\\_HP/index.html](https://www2.infront.kyoto-u.ac.jp/Takeuchi_HP/index.html)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

植畑 拓也 (UEHATA TAKUYA)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所  
助教

研究者番号：50785970

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )