

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：17601

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2010

課題番号：20200070

研究課題名（和文）自己免疫とRNA修飾：全身性エリテマトーデス発症の分子機構

研究課題名（英文） Autoimmune diseases and RNA modifications: Molecular mechanism of pathogenesis of systemic lupus erythematosus.

研究代表者

上地 珠代 (UECHI TAMAYO)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・研究員

研究者番号：10381104

研究成果の概要（和文）：生体内の多くの機能性 RNA は修飾を受けている。RNA 修飾の欠如が自己免疫疾患の原因となる可能性がある。この関連性を解析するためのツールとして、RNA または修飾 RNA に結合する抗体をフェージ提示型の人工抗体ライブラリーから単離した。また、ゼブラフィッシュの RNA 修飾欠損モデルを作製し、ただ一箇所の修飾欠如が形態形成に重篤な異常を引き起こすことを個体レベルで初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：A majority of non-coding RNAs undergo posttranscriptional modifications. Lack of such modifications might lead to autoimmune response. To investigate the possible mechanism of pathogenesis, we isolated recombinant anti-RNA antibodies that can bind to the modification sites related to patient autoantibodies. We also developed a zebrafish model of defective rRNA modifications and demonstrated that loss of rRNA modification, even at a single site, have deleterious effects on early development in vertebrates.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2009年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2010年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
年度			
年度			
総計	25,100,000	7,530,000	32,630,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：RNA 修飾、自己免疫疾患、人工抗体

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス（SLE）の患者血清の解析から、これまで知られていた抗 DNA 抗体の他に、RNA に対する抗体も高頻度（約 20%）に検出されることが明らかになった。抗原を詳細に解析したところ、興味深いことに、リボソーム RNA（rRNA）の GTPase ドメインと呼ばれる機能上重要な部位が自己

抗体のターゲットになっていた。

自然免疫を活性化する因子のひとつに DNA が知られているが、この活性化は、非メチル化 CpG を含む DNA が Toll 様受容体のリガンドになることで生じると考えられていた。すなわち、DNA 修飾の欠損が免疫活性化の原因になり得ることを示唆した。一方、高等動物の RNA は、DNA と同様に多くの修飾

を受けると推測されているが、その全貌は明らかになっていなかった。RNA 修飾の欠損が DNA の場合と同様に、自然免疫系の異常な活性化を引き起こすことは十分に考えられた。

私たちは、rRNA が多数の修飾を受けていること、これらの修飾は高等生物において普遍的であることを見出していた。一方で、SLE 患者で rRNA に対する自己抗体が見つかったこと、また、RNA 修飾が免疫活性化に関わっている可能性が発表されたことから、RNA 修飾の欠損が SLE 発症の原因になっているのではないかと推測した。また、このような疾患の発症機序を解明するために、抗 RNA 抗体が解析ツールとして有用であると考え、人工抗体ライブラリーからの抗 RNA 抗体の単離を試みる着想に至った。

2. 研究の目的

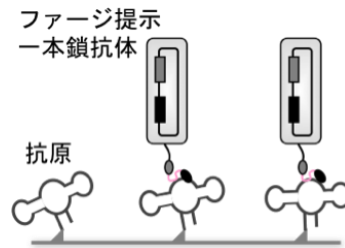
(1) レポートリーが豊富な人工抗体ライブラリーを用いて、RNA 修飾を識別する抗体を単離し、ハイスループットな修飾の検出および機能解析を行うツールを得ることをめざす。

(2) ゼブラフィッシュを用いて修飾の欠損モデルを作製し、生体システムにおける修飾の役割を個体レベルで解析する。さらに、SLE 患者における rRNA の修飾を系統的に解析し、修飾の有無と疾患発症との相関を明らかにする。

これらの解析により、RNA 修飾と自己免疫疾患との関連を明らかにするとともに、生体システムにおける RNA 修飾の意義の解明をめざした。

3. 研究の方法

(1) RNA 修飾を認識する人工抗体の単離
RNA 抗原として化学合成した 50 nt 程度の 28S rRNA (非修飾型 RNA) を用いた。この領域は SLE 患者の自己抗体認識領域であるため、実際に抗体が存在することから、人工抗体ライブラリーからの単離も可能であると考えた。抗原となる非修飾型 RNA の 5' 末端をアミノ化で標識した後、96 穴のプレートに固定し、このプレートで人工抗体ライブラリーをスクリーニングした。選別された陽性クローンは、その特異性と抗体価を ELISA 法とゲルシフトアッセイ法で検定した。次に、RNA 修飾の有無を識別可能な抗体の取得をめざした。上述した非修飾型 RNA の内部にメチル化ヌクレオチドを取込ませた RNA (修飾型 RNA) を化学合成し、同様に抗体のスクリーニングを行った。



(2) RNA 修飾欠損モデル動物の作製・解析

ゼブラフィッシュを用いて修飾に働くタンパク質 (フィブリラリン、ディスクリン) の遺伝子をノックダウンした。ノックダウンは、これらタンパク質の mRNA に結合するモルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を、受精卵に注入することで行った。これにより、標的タンパク質の翻訳が阻害される。また同様に、MO の注入により snoRNA のガイド RNA としての働きを阻害した。フィブリラリン、ディスクリンのノックダウンでは、一度に多くの部位の修飾が阻害されると考えられ、一方、

snoRNA の発現抑制においては、部位特異的に修飾が阻害されることが期待された。RNA 修飾の低下は、質量分析法にて検出した。



4. 研究成果

(1) 抗 RNA 抗体の単離とヒト型 IgG 抗体の特異性の確認

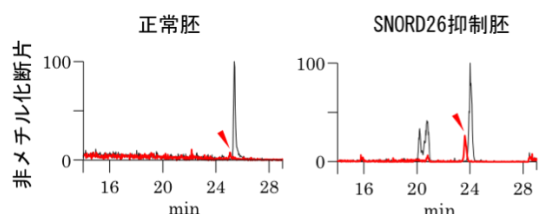
ファージディスプレイ型の人工抗体ライブラリーから、RNA (U1snRNA, 28S rRNA) を認識する抗体を単離した。選別された抗体の特異性を ELISA 法により確認した。これら抗体クローンの配列を解析した結果、相補性決定領域の CDR3 は新規の配列であることがわかった。さらに、得られた抗体配列を IgG 発現用ベクターに組み込み、RNA に対する IgG 抗体を得た。培養細胞を用いて、ヒト型 IgG を大量生産する系を立ち上げた。ELISA による測定で、ファージが提示する一本鎖抗体よりも IgG 化することで抗原に対する結合力が高くなることを確認した。

ファージの抗体提示の効率を高めるために、抗原に対するスクリーニング法を改良した。また、より RNA 構造に特異的な抗体を選別するために、RNA 抗原の標識をランダムから末端に変更した。その結果、U1 snRNA

に対する抗体を提示するファージクローンを新たに同定した。

(2) RNA 修飾欠損モデル動物を用いた修飾の定量解析

ゼブラフィッシュを用いて rRNA の修飾に働くディスクリン、フィブリラリン、および 3 種類の snoRNA 遺伝子 (*SNORD26*, *SNORD44*, *SNORD78*) の発現抑制胚を作製した。非常に多くの修飾が阻害されると予想される DKC、FBL 発現抑制胚でも、ただ一箇所の修飾が阻害される sno 遺伝子発現抑制胚でも、発生異常を呈して受精後 10 日までに致死であった。各 sno 遺伝子がガイドする修飾が特異的に阻害されていることは質量分析により確認した (下図の赤い矢頭は、*SNORD26* 発現抑制胚で、rRNA の非メチル化断片が増加していることを示している)。



また、rRNA のメチル化をガイドする snoRNA 遺伝子 (約 100 種類) のうち、ただ一種類の発現を抑制して一箇所の修飾を阻害しただけで、形態形成に異常が起こることを個体レベルで初めて示した。受精後 24 時間胚では、脳の形成不全、体幹の変形などが観察され、48 時間胚 (下図) では、心臓周辺の浮腫、顎の形成不全が顕著であった。rRNA の修飾の意義は不明であったが、個体の発生に重要な役割を果たしていることが示唆された。



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 7 件)

- ① Higa-Nakamine S, Suzuki T, Uechi T, Chakraborty A, Nakajima Y, Nakamura M, Hirano N, Suzuki T, Kenmochi N. Loss of ribosomal RNA modification causes developmental defects in zebrafish. *Nucleic Acids Res*, 査読有り 40: 391-398 (2012)
- ② Chang C, Takayanagi A, Yoshida T, Shimizu N. Screening of scFv-displaying phages recognizing distinct extracellular domains of EGF receptor by target-guided proximity labeling method. *J Immunol Methods*, 査読有り 372: 127-136 (2011)
- ③ 比嘉三代美, 剣持直哉. ゼブラフィッシュにおける RNA 修飾の機能解析. *蛋白質核酸酵素: mRNA プログラム*, 査読無し 54: 2092-2097 (2009)
- ④ 上地珠代, 剣持直哉. リボソーム病: 翻訳装置のシステム障害. *遺伝子医学 MOOK: 最新 RNA と疾患研究*, 査読無し 15: 79-84 (2009)
- ⑤ Chakraborty A, Uechi T, Higa S, Torihara H, Kenmochi N. Loss of ribosomal protein L11 affects zebrafish embryonic development through a p53-dependent apoptotic response. *PLoS ONE*. 査読有り 4: e4152 (2009)
- ⑥ Uechi T, Nakajima Y, Chakraborty A, Torihara H, Higa S, Kenmochi N. Deficiency of ribosomal protein S19 during early embryogenesis leads to reduction of erythrocytes in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mol Genet*. 査読有り 17: 3204-3211 (2008)
- ⑦ Kusada Y, Morizono T, Matsumoto-Takasaki A, Sakai K, Sato S, Asanuma H, Takayanagi A, Fujita-Yamaguchi Y. Construction and characterization of single-chain antibodies against human insulin-like growth factor-I receptor from hybridomas producing 1H7 or 3B7 monoclonal antibody. *J Biochem*, 143: 9-19 (2008) 査読有り

[学会発表] (計 26 件)

- ① Kenmochi N. Loss of snoRNA expression impairs ribosomal RNA modification and causes developmental defects in zebrafish. Protein-RNA Interactions in Biology and Disease. 2012年3月5日, サンタフェ, 米国.
- ② 剣持直哉. 人工抗体ライブラリーを用いた抗RNA抗体の作製. BioJapan2011. 2011年10月7日, 横浜.
- ③ 剣持直哉. ゼブラフィッシュをモデルとしたリボソーム病発症の分子機構の解析. 日本生化学会大会. 2011年9月22日, 京都.
- ④ Uechi T. Defective erythropoiesis and ribosomal dysfunction in zebrafish model of

Diamond-Blackfan anemia. RNA Society Meeting "RNA 2011 Kyoto". 2011年6月14日, 京都.

- ⑤ 上地珠代. 造血異常を引き起こすリボソームの翻訳調節機構の解析. 日本RNA学会年会. 2010年7月28日, 東京.
- ⑥ Uechi T. Ribosomal dysfunction and bone marrow failure: Analysis of zebrafish model for Diamond-Blackfan anemia. 15th Annual Meeting of the RNA Society. 2010年6月24日, シアトル, 米国.
- ⑦ 剣持直哉. snoRNA遺伝子とイントロンの進化. 日本分子生物学会. 2009年12月10日, 横浜.
- ⑧ 比嘉三代美. snoRNAの機能阻害によるリボソームRNA修飾の機能解析. 日本分子生物学会. 2009年8月30日, 横浜.
- ⑨ Uechi T. Loss of ribosomal protein s19 leads to defective erythropoiesis in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. Ribosomal Synthesis. 2009年8月30日, レーゲンスブルグ, ドイツ.
- ⑩ 比嘉三代美. RNA修飾酵素の機能解析: ゼブラフィッシュを用いた疾患モデルの作製. 日本RNA学会. 2009年7月28日, 新潟.
- ⑪ 比嘉三代美. ゼブラフィッシュを用いたsnoRNAの生成阻害とRNA修飾の役割. 日本RNA学会. 2008年7月23日, 札幌.

[図書] (計1件)

- ① 剣持直哉. クバプロ. 機能性 RNA の分子生物学 The molecular biology of non-coding RNA, 【4章】真核生物の small RNA, 2010, 111-150.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 抗RNA抗体のスクリーニング方法
発明者: 剣持直哉, 吉浜麻生, 高柳淳, 清水信義.

権利者: 宮崎大学, 慶應義塾.

種類: 特願

番号: 2011-098698

出願年月日: 2011年4月26日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

上地 珠代 (UECHI TAMAYO)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・研究員

研究者番号: 10381104

(2)研究分担者

高柳 淳 (TAKAYANAGI ATSUSHI)

慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 80245464

高見 恭成 (TAKAMI YASUNARI)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号: 80236356

比嘉 三代美 (HIGA SAYOMI)

琉球大学・医学研究科・助教

研究者番号: 20381105

(3)連携研究者

剣持 直哉 (KENMOCHI NAOYA)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授

研究者番号: 00133124