

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659476

研究課題名(和文) RNA修飾の欠損と自己免疫疾患：SLE発症の新たな分子機構

研究課題名(英文) Loss of RNA modification and autoimmune diseases: a novel mechanism of the SLE pathogenesis

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体内のRNAはすべてなんらかの修飾を受けている。しかし、修飾の生理的役割はほとんど解明されていない。一方、自己免疫疾患の患者からRNAに結合する抗体が検出された。RNA修飾が自己・非自己を識別する目印になっている可能性がある。これを明らかにするために、RNA修飾を特異的に認識する人工抗体の開発と、RNA修飾が欠損したゼブラフィッシュモデルの作製・解析を行った。その結果、脊椎動物の初期発生においてRNA修飾が必須であること、また多数の遺伝子の発現が修飾に呼応して変動していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Although RNAs are known to undergo various modifications, the physiological role of RNA modifications remains unknown. Since autoantibodies that bind to ncRNAs have been found in patients with autoimmune diseases, we speculate that RNA modification could be the marker for self-recognition. To investigate such possibility, we generated artificial anti-RNA antibodies that specifically bind to modified RNA molecules and developed zebrafish with loss of RNA modifications. We found that the RNA modification is essential for zebrafish development and dynamically regulates the expression of many relevant genes.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：RNA修飾 自己免疫 抗RNA抗体 リボソームRNA snRNA snoRNA scaRNA ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

タンパク質をコードしないノンコーディング RNA (ncRNA) が多数発見され、これら RNA の生体内における機能に大きな関心が寄せられていた。一方、ncRNA も DNA と同様に修飾を受けることが知られていたが、その役割についてはほとんど研究が行われていなかった。メチル化などの DNA 修飾が遺伝子発現においてきわめて重要な役割を果たしていることから、RNA 修飾も生体においてなんらかの重要な役割を担っているものと考えられた。

一方、自己免疫疾患の全身性エリテマトーデス (SLE) の患者血清より、リボソームの構成成分である rRNA やスプライシングに働く snRNA に対する抗体が多数検出された。また、DNA 修飾の欠損が自然免疫を活性化するという報告もなされていた。高等生物における RNA 修飾の機能は明らかになっていなかったことから、本研究では免疫活性化との関連に着目して研究を開始した。

2. 研究の目的

rRNA および snRNA はメチル化など多数の修飾を受けているが、その生理機能は不明である。また、SLE 患者ではこれらの RNA に結合する自己抗体が産生され、これが病態にリンクすることも知られている。本研究では、RNA 修飾を検出する人工抗体を作製し、これを用いて RNA 修飾の動態を調べるとともに、ゼブラフィッシュで修飾を欠損したモデル動物を作製し、RNA 修飾と SLE 発症の関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RNA 修飾を認識する人工抗体の作製

ファージディスプレイ型の人工抗体ライブラリーを用い、RNA 修飾を特異的に認識する抗体 (抗 RNA 抗体) の単離を試みた。非修飾型の U1 snRNA および 28S rRNA に結合する抗体の単離にはすでに成功していたことから、この系を用いて修飾型 RNA に特異的に結合するファージ抗体の単離を目指した。まず、非修飾または修飾ヌクレオチドを取込ませた U1 RNA を作製し、これを抗原としてファージディスプレイ型人工抗体ライブラリーのスクリーニングを行った。次に、同定したクローンの特異性を ELISA 法で検討し、RNA 修飾の有無を識別可能な抗体の取得を目指した。

(2) RNA 修飾欠損モデル動物の作製

免疫の活性化と RNA 修飾との関わりを個体レベルで調べるために、ゼブラフィッシュを用いて修飾酵素のフィブリラリン (メチル化) とディスクレリン (ウリジンの異性化) 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。また同様に、

snoRNA (修飾部位を特定するガイド RNA) に対する MO の注入により、snoRNA の発現を抑制し部位特異的に修飾を阻害した。さらに、snRNA の修飾に参与する scaRNA (snoRNA と同様な構造を有する) の発現阻害も行いスプライシングへの影響を調べた。RNA 修飾の低下は、質量分析計を用いて定量した。

(3) RNA 修飾欠損モデル動物の解析

RNA 修飾の欠損が生体の発生にどのような影響を及ぼすのか分子レベルで調べるために、ノックダウン胚と正常胚から RNA を抽出し、この RNA をゼブラフィッシュの DNA チップ (Affymetrix 社) と次世代シーケンサーにて解析した。

(4) snoRNA データベースの作製

rRNA および snRNA の修飾に参与する核小体の低分子 RNA (snoRNA) の情報を公共データベースから収集し、修飾部位の情報とともに整備した。また、EMBL が運用している ncRNA の統合サイト RNACentral と連携を図るため、データフォーマットを互換性のあるものに変更しデータの移行を進めた。

4. 研究成果

(1) RNA 修飾を認識する人工抗体の作製

U1 snRNA のステムループ II 領域 (51G~90C) を抗原として用い、ファージディスプレイ型人工抗体ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、24 個のクローンの単離に成功し、そのうち 8 個のクローンで特異性があることも ELISA 法で確認した。しかし、これらの抗体クローンは RNA への結合力が充分でなかったため、より強力な抗体の取得が必要と考えられた。そこで、抗体クローンの IgG 化やライブラリーの改良などを進めたが、最終的に修飾を識別する実用性のある抗 RNA 抗体は得られなかった。

(2) RNA 修飾欠損モデルの作製・解析

①修飾酵素遺伝子のノックダウン：免疫の活性化と RNA 修飾との関わりを個体レベルで調べるために、ゼブラフィッシュを用いて修飾酵素のフィブリラリン (メチル化) とディスクレリン (ウリジンの異性化) 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。これらの胚は頭部や尾部、色素沈着に異常があり、7 日間で致死となった。ゼブラフィッシュの初期発生に、RNA 修飾酵素が必須である可能性が示された。

②snoRNA の発現阻害：個々の RNA 修飾の機能を解析するために、3 種類の snoRNA (U26、U44、U78) の発現をゼブラフィッシュで阻害した。snoRNA の発現阻害は、受

精卵に MO を注入して、当該 snoRNA がコードされるイントロンのスプライシングを阻害、または snoRNA 前駆体のプロセッシングを阻害することで行った。MO 注入胚は RNA 修飾酵素の場合と同様に、発育不全、頭部の形成異常、尾部の屈曲などの表現型を示し、7 日目までにすべて死亡した。また、発現を阻害した個々の snoRNA に依存して特徴的な表現型も観察された。さらに、質量分析計を用いて RNA 修飾の定量を行い、U26 の場合、標的部位である 398 番目のヌクレオチドのメチル化が低下していることを確認した。これらの結果より、脊椎動物の初期発生において、たった一カ所の RNA 修飾の低下でも重篤な障害を引き起こすことが明らかになった。

③修飾欠損モデルのポリソーム解析：前述の修飾欠損モデルからポリソーム画分を調製し、ポリソームの形成能とポリソーム mRNA の解析を行った。ポリソームパターンの解析では、ディスクリン阻害胚でリボソームの結合能の低下が見られた。一方、U26 阻害胚では大きな差は認められなかった（図 1）。また、ポリソームから mRNA を抽出して、DNA チップと次世代シーケンサーを用いて翻訳される mRNA の量を網羅的に調べた。その結果、欠損モデルにおいて翻訳効率が大きく変動（2 倍または 1/2）した遺伝子を、ディスクリンの発現阻害で 176 個、U26 snoRNA の発現阻害で 252 個同定した。これらの遺伝子の機能分類を調べたところ、脳、神経系、眼などで発現する遺伝子が多数含まれていた。これらのデータは RNA 修飾と疾患との関連を明らかにするための重要な基盤となる。

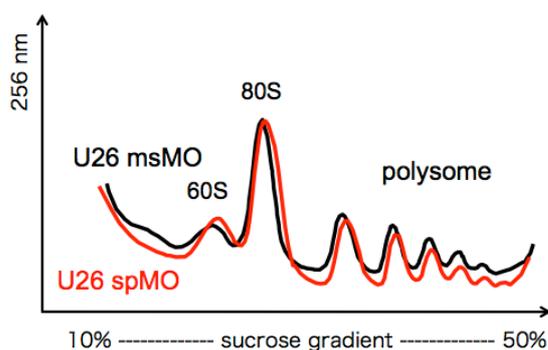


図 1 U26 阻害胚のポリソーム解析

④scaRNAの発現阻害とスプライシング：U2 およびU6 snRNAの修飾にかかわる2つの scaRNA (scaRNA1、U94) の発現をゼブラフィッシュで阻害した。発現阻害はscaRNA 前駆体のプロセッシングをMO注入によりブロックすることで行った。その結果、MO注入胚はいずれも心臓の発達に異常がみられた。また、胚からRNAを抽出しmRNAのスプライ

シングをゲノムワイドに調べたところ、*gata4* や*mbnl1*など心臓の形成に関わる遺伝子に異常が認められた。今後は、免疫関連遺伝子の発現やSLEの病態との関連を調べる必要がある。

(3) データベースの整備

①snoRNA データベースの拡充：snoRNA および scaRNA の情報を公共のデータベースより収集し、snoRNA データベース (snOPY: <http://snoopy.med.miyazaki-u.ac.jp>) として公開した。snOPY は現在、真核生物 34 種類の snoRNA 遺伝子の配列、ローカス (ゲノム上の位置)、オルソログ、また標的 RNA、修飾部位などの情報を提供しており、データベース内で配列の比較や検索などができる。最近では連日 1,000 件以上のアクセスがあり、広く活用されている。

②RNAcentral へのデータ移行：EMBL の支援を受けて 2014 年に新設された ncRNA の統合サイト RNAcentral (<http://rnacentral.org>) と連携し、データの移行を進めた (図 2)。その際、個々のデータのアップデートをマニュアルで行い、データの信頼性の向上を図った。現時点で、1,400 件のレコードの移行が完了した。これにより、他の ncRNA 関連データベースとの整合性が格段に高まった。今後は、snOPY が ncRNA に関する国際標準データベースの一員として、ますます重要な役割を果たすことが期待される。

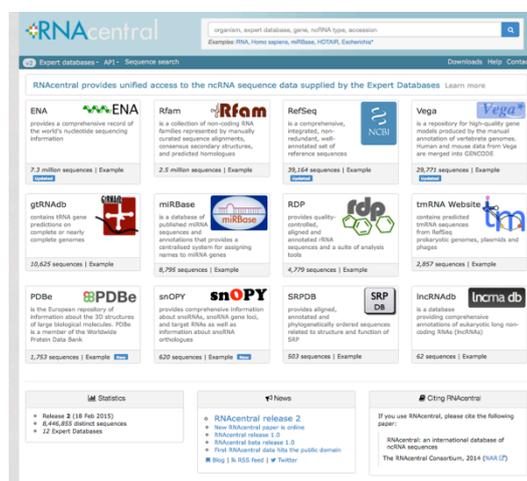


図 2 RNAcentral のトップページ

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Patil, P., Kibiryeva, N., Uechi, T., Marshall, J., Artman, M., O'Brien, J.E., Kenmochi, N. and Bittel, D.C. scaRNAs regulate splicing and vertebrate heart development. *Biochem. Biophys. Acta* (in press). 査読有
DOI: 10.1016/j.bbadis.2015.04.016

- ② Patil, P., Uechi, T. and Kenmochi, N. Incomplete splicing of neutrophil-specific genes affects neutrophil development in a zebrafish model of poikiloderma with neutropenia. *RNA Biol.* 12, 426-434, 2015. 査読有
DOI: 10.1080/15476286.2015.1017240
- ③ Yamamoto, T., Yamamori, K., Kenmochi, N. and Aikawa, M. A detection method for snoRNA modification domain by fully indexable dictionary retrieving. *Artif. Life Robotics*, 19, 209-214, 2014. 査読有
DOI: 10.1007/s10015-014-0149-x
- ④ Yadav, V.G., Chakraborty, A., Uechi, T. and Kenmochi, N. Ribosomal protein deficiency causes Tp53-independent erythropoiesis failure in zebrafish. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 49, 1-7, 2014. 査読有
DOI: 10.1016/j.biocel.2014.01.006 2
- ⑤ Yoshihama, M., Nakao, A. and Kenmochi, N. snOPY: a small nucleolar RNA orthological gene database. *BMC Res. Notes*, 6, 426, 2013. 査読有
DOI: 10.1186/1756-0500-6-426
- ⑥ Yamamori, K., Matsuo, T., Iwakiri, J., Kenmochi, N. and Yoshihara, I. A detection method for intronic snoRNA genes using extended-weight-updating SOM with appearance probability of bases. *Artif. Life Robotics*, 17, 405-411, 2013. 査読有
DOI: 10.1007/s10015-012-0072-y

[学会発表] (計 17 件)

- ① 剣持直哉. ゼブラフィッシュ初期発生における RNA 修飾の役割. 第 37 回分子生物学会年会 (招待講演), 横浜, 2014, 11/25-27.
- ② Patil, P., Uechi, T., Kenmochi, N. Incomplete splicing of myeloperoxidase gene affects neutrophil development in the zebrafish model of poikiloderma with neutropenia. 第 37 回分子生物学会年会, 横浜, 2014, 11/25-27.
- ③ Bittel, DC., Patil, P., Uechi, T., Kibiryeve, N., Marshall, J., Artman, M., O'Brien, JE., Kenmochi, N. Reduced expression of scaRNAs disrupts spliceosome function and heart development in zebrafish and infants with Tetralogy of Fallot. Scientific Sessions of The American Heart Association, Chicago, USA, 2014, 11/16-19.
- ④ Yoshihama, M., Nakao, A., Kamada, S., Kenmochi, N. RPG and snOPY: Databases for ribosomal protein genes and small nucleolar RNA genes. The 19th Annual Meeting of the RNA Society, Quebec, Canada, 2014, 6/3-7.
- ⑤ Yamamoto, T., Yamamori, K., Kenmochi, N., Aikawa, M. A detection method for snoRNA modification domain by fully indexable

dictionary retrieving. The 19th International Symposium on Artificial Life and Robotics. 2014, 1/22-24.

- ⑥ 剣持直哉. リボソーム RNA の修飾はゼブラフィッシュ初期発生に必須の役割を果たす. 第 36 回分子生物学会年会 (招待講演), 神戸, 2013, 12/3-6.
- ⑦ 吉浜麻生, 中尾彰宏, 上地球代, 剣持直哉. RPG and snOPY: リボソームタンパク質遺伝子および snoRNA 遺伝子データベースの構築. 第 36 回分子生物学会年会, 神戸, 2013, 12/3-6.
- ⑧ Kenmochi, N., Higa-Nakamine, S., Uechi, T., Chakraborty, A., Suzuki, T., Suzuki, T. Loss of snoRNA expression leads to developmental defects in zebrafish. Keystone symposia "Noncoding RNAs in Development and Cancer", Vancouver, Canada, 2013, 1/20-24.
- ⑨ 吉浜麻生, 中尾彰宏, 上地球代, 剣持直哉. 機能性 RNA の構造特異的な抗体のスクリーニング法の開発. 第 36 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 宮崎, 2012, 9/6-8.
- ⑩ Higa-Nakamine, S., Uechi, T., Chakraborty, A., Suzuki, T., Suzuki, T., Kenmochi, N. Loss of ribosomal RNA modification causes developmental defects in zebrafish. International Conference on Ribosome Synthesis, Banff, Canada, 2012, 8/22-25.
- ⑪ Higa-Nakamine, S., Uechi, T., Chakraborty, A., Suzuki, T., Suzuki, T., Kenmochi, N. Impairment of ribosomal RNA modification causes developmental defects in zebrafish. The 17th Annual Meeting of the RNA Society, Ann Arbor, USA, 2012, 5/29-6/3.

[その他]

ホームページ等

- ① snoRNA データベース (snOPY)
<http://snoopy.med.miyazaki-u.ac.jp>
- ② ncRNA データベース (RNACentral)
<http://rnacentral.org>
- ③ 研究室ホームページ
<http://ribosome.med.miyazaki-u.ac.jp/labo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

高柳 淳 (TAKAYANAGI, Atushi)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 80245464