

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830062

研究課題名(和文)炎症応答を調節する新規miRNAおよび分子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of novel miRNA and molecule regulating immune responses.

研究代表者

米沢 朋 (YONEZAWA, , Tomo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：60515964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、炎症応答に関与する新規のmiRNAおよび分子を見つけている。新規分子TRIM39Rが実際に免疫応答に関与するかを調べるために、培養細胞を用いた2つの過剰発現系を樹立し、マイクロアレイ解析を行った。結果として、有意にI型インターフェロン経路およびその抗ウイルス効果に関与する遺伝子群を制御していることが明らかとなった。さらに、ルシフェラーゼを用いたリポーターアッセイにより、実際にNFκBおよびIRFの転写活性を惹起させることが確認できた。miRNAに関しては、新規mir-125bおよびその標的が典型的な作用機序で機能することをルシフェラーゼアッセイと変異体を用いて証明できた。

研究成果の概要(英文)：We found miRNAs and novel molecules regulating inflammatory responses. To examine whether or not novel molecule, TRIM39R regulates immune responses, we established two gain-of-function models in cultured cells. Then, we performed microarray analysis on the models. The results indicates that TRIM39R significantly regulates genes involved in type I interferon pathway and its anti-viral effects. Furthermore, we confirmed that it actually induces immune responses, such as NFκB and IRF, using luciferase-based reporter assay. We also demonstrated novel miRNA involved in immune responses, mir-125b regulates its target, ADAMTS-4 mRNA according to miRNA dogma by luciferase-based assay and site-directed mutagenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：miRNA 新規分子 炎症応答

1. 研究開始当初の背景

我々は、自己免疫疾患に深く関与し、IL-17 を分泌する Th17 および炎症応答を収束させる Treg などの T 細胞集団の分化誘導系を樹立し、マイクロアレイ解析により、分化誘導時の経時的な miRNA および mRNA の発現プロファイルを取得した。Th17 分化時に顕著な発現変化を示す未知の miRNA が 7 個、一方、Treg 分化では 5 個を同定した。同時に、mRNA 発現解析から、Th17 分化および Treg 分化時の両方において顕著な発現変化を示す新規分子を同定している。本研究では、同定した新規分子の T 細胞集団への効果を検証し、新規分子の分子機序を解明し、新たな自己免疫疾患への治療および創薬標的を同定することを目指す。

2. 研究の目的

同定した miRNA および新規分子の分子機序の解明を目指すために、培養細胞を用いた解析を行った。具体的には、新規 TRIM 分子は、HEK293T 細胞およびマウス in vitro Germinal B (iGB) 細胞を用いて過剰発現系の樹立を行い、マイクロアレイ解析による生物学的パスウェイの抽出を行った。炎症応答を定量化するために、分泌型アルカリフォスファターゼを用いたリポーターアッセイを樹立し、炎症応答への関与を検討した。新規 TRIM 分子のドメイン欠損体を作製した。また、miRNA に関しては培養細胞を用いた機能検証のために、ルシフェラーゼによるリポーターアッセイ系を樹立し、HEK293T 細胞を用いて検証した。

3. 研究の方法

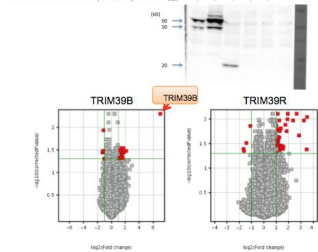
TRIM39R の過剰発現系を樹立するために、HEK293T 細胞では、一過性遺伝子導入を、また、iGB 細胞では、レトロウイルスによる遺伝子導入を行った。過剰発現系が樹立できているかどうかは、抗 V5 抗体によるウェスタンブロットにより確認した。また、レトロウイルスのベクターには IRES-EGFP が組み込まれており、感染細胞を FACS により濃縮した。RNA を抽出し、アジレント社のプラットフォームを用いたマイクロアレイを行った。コントロールと比べ、有意に発現変化した遺伝子群を抽出し、GO 解析による機能予測を行った。NF- κ B および IRF 応答領域に分泌型アルカリフォスファターゼを繋げたりポーターコンストラクトを作製し、TRIM39R のドメイン欠損体を共発現させた時の転写活性を検討した。炎症に関与する miRNA である mir-125b に関して、機能検証するために発現コンストラクトを作製し、標的 mRNA と予測される ADAMTS-4 の 3'UTR とルシフェラーゼを繋いだリポーターコンストラクトを作製し、miRNA の機能検証を行った。さらなる機能検証のために miRNA の高次構造を保持しながら機能に重要なシード配列の変異体を作製し分子機能

の検証を行った。

4. 研究成果

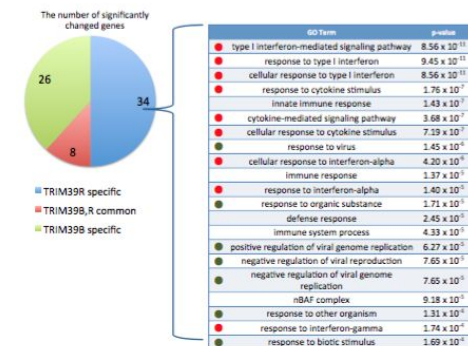
TRIM39R および TRIM39B の過剰発現系を、HEK293T を用いて樹立し、マイクロアレイを行って遺伝子プロファイルを取得した(上図 上)。空ベクターに比べ 2 倍以上、かつ FDR<0.05 を有意に変化した遺伝子とし抽出した(上図 下)。

Establishment of gain-of-function of TRIM39 related genes and microarray analysis

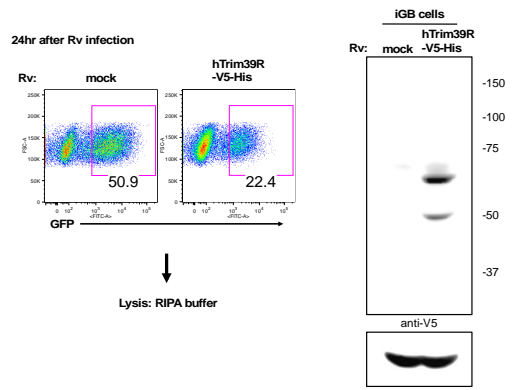


有意な遺伝子群を用いて、GeneSpring を用いて GO 解析を行い統計的に有意な生物学的パスウェイを予測した(下図)。TRIM39R が有意に I 型インターフェロン応答およびそれに付随する抗ウイルス応答を惹起することが予測された。

Identification of novel molecule regulating type I interferon



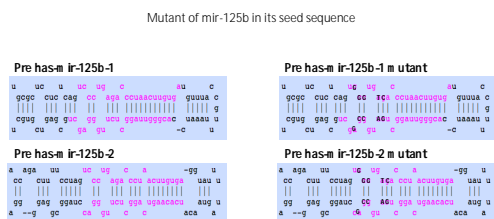
マウス iGB 細胞を用いて、レトロウイルスによる B 細胞への TRIM39R 遺伝子導入も行った(下図)。EGFP を用いて、遺伝子導入細胞を観察したところ、コントロールの空ベクターに比べ、TRIM39R 導入 iGB 細胞では有意に細胞が減少していた(下図 左)。恐らく炎症が惹起され細胞死が誘導されていると考えている。EGFP を指標に FACS によりソートし濃縮を行い、同じ細胞数でウイスタンブロットにより TRIM39R 過剰発現が確認できた(下図 右)。



既に RNA を抽出し、マイクロアレイによる遺

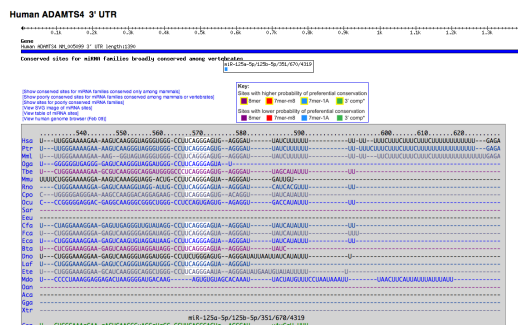
伝子プロファイルを取得しており、炎症応答および細胞死に關与する遺伝子が抽出できている。また、NF B および IRF リポーターコンストラクトを使った炎症惹起の検証では、マイクロアレイの結果と一致して TRIM39R が炎症を惹起する結果が得られており、さらにドメイン欠損体による分子機能に必須のドメインが明らかとなっている。今後これらの結果を纏め国際的な学術雑誌にて発表する予定である。

miRNA に関しては、炎症応答に關与する mir-125b の発現コンストラクトを作製した(下図 左)、mir-125b はゲノム中に2つ存在することが予想されたので、その両方をクローニングした。また、シード配列変異体は GC 含量および高次構造を保持するように考慮し作製した(下図 右)。



TargetScan による mir-125b の標的 mRNA の予測を行ったところ、ADAMTS-4 の 3' UTR に進化的に高度に保存されている標的配列が予測された(下図)。

ADAMTS-4 の 3' UTR にルシフェラーゼを繋げたりポーターコンストラクトを作製し、



miRNA の機能検証を行ったところ確かに mir-125b は ADAMTS-4 を標的にして翻訳抑制を行っていることが明らかとなった。また、シード配列の変異体を用いた検証により、miRNA のドグマに沿ったシードシーケンスを介して翻訳抑制効果を示すことも明らかとなった。

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)

全て査読有り

1. Riho Kurata, Tajima Atsushi, Tomo Yonezawa, Hidetoshi Inoko, TRIM39R, but not TRIM39B, regulates type I interferon response. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013 436:90-95.

2. Tomo Yonezawa, Riho Kurata, Kaori Yoshida, Murayama A Masanori, Xiaofeng Cui, Hasegawa Akihiko, Free fatty acids-sensing G protein-coupled receptors in drug targeting and therapeutics. *Current Medicinal Chemistry* 2013 20:3855-3871.
3. Tetsuya Matsukawa, Tadahiro Sakai, Tomo Yonezawa, Hideki Hiraiwa, Takashi Hamada, Motoshige Nakashima, Yohei Ono, Shinya Ishizuka, Hiroyuki Nakahara, Martin K Lotz, Hiroshi Asahara and Naoki Ishiguro, MicroRNA-125b regulates the expression of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Research and Therapy* 2013 15:R28.
4. Riho Kurata, Xiaofeng Cui, Roh Sang-gun and Tomo Yonezawa, Supplementation of long-chain fatty acids with lactating mammary glands and beef cow has potential benefits. *Advances in Plants & Agricultural Research* 2015 2(5):00063.
5. Mana Furuoka, Kei-ichi Ozaki, Daichi Sadatomi, Sayaka Mamiya, Tomo Yonezawa, Susumu Tanimura, Kohsuke Takeda. TNF- α induces Caspase-1 activation independently of simultaneously induced NLRP3 in 3T3-L1 cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2016 (In Press).

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Riho Kurata, Atsushi Tajima, Tomo Yonezawa, Hidetoshi Inoko. TRIM39R, but not TRIM39B, regulates type I interferon response. 15th International Congress of Immunology. 2013 年 8 月 22 日~27 日 Milan, Italy.
2. Tomo Yonezawa. Functional analysis for microRNA involving in arthritis. 15th International Congress of Immunology. 2013 年 8 月 22 日~27 日 Milan, Italy.
3. 倉田 里穂、田嶋 敦、米沢 朋、猪子 英俊、TRIM39R, but not TRIM39B, regulates type I interferon. 第 36 回日本分子生物学会 神戸 2013 年 12 月 3 日~6 日
4. Tomo Yonezawa. Transcriptome analysis of miRNA in differentiation of T cell subsets. 第 36 回日本分子生物学会 神戸 2013 年 12 月 3 日~6 日
5. Tomo Yonezawa, Akihisa Oda, Riho Kurata, Sachiko Kubo, Shyhei Ogawa, Yoichiro Iwakura. Pronuclear injection of circular plasmids expressing hCas9 and gRNA generates mutant mice in

genes involved in immune responses.
The 43rd Annual Meeting of The
Japanese Society for Immunology.
2014年12月10日～12日 京都国際
会議場 京都

6. **Tomo Yonezawa**, Akihisa Oda, Riho Kurata, Sachiko Kubo, Shyhei Ogawa, Yoichiro Iwakura. Pronuclear injection of circular plasmids expressing hCas9 and gRNA generates mutant mice in genes involved in immune responses. International Cytokine & Interferon Society (ICIS)-Cytokines Down Under in 2014: From Bench to Beyond. 2014年10月26日～29日 Melbourne, Australia.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0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 0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

6. 研究組織

(1)研究代表者

米沢 朋 (YONEZAWA, Tomo)
長崎大学, 医歯薬学総合研究科(薬学系),
准教授
研究者番号: 60515964