

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860355

研究課題名(和文) Regnase-1の作用機構から探る自然免疫応答における転写後調節の解明

研究課題名(英文) Analysis of posttranscriptional mechanisms of Regnase-1-mediated mRNA decay in innate immune system

研究代表者

三野 享史 (Mino, Takashi)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：60646149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、インターロイキン6などのサイトカインmRNAの分解を行うことで過剰な免疫応答を抑制するRNase Regnase-1の作用機構の解明を試みた。Regnase-1はサイトカインなどの分泌蛋白質の翻訳が生じている小胞体に多く存在し、蛋白質合成装置であるリボソームと共局在する事が明らかとなった。そして、Regnase-1はリボソームおよびRNAヘリカーゼUPF1と相互作用し、UPF1依存的に蛋白質翻訳が生じているmRNAを分解すること分かった。この蛋白質翻訳と共役したRegnase-1によるmRNA分解機構は免疫応答において早急な蛋白質翻訳の停止を可能にすると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Posttranscriptional regulation that modifies mRNA stability and translation provides rapid and flexible control of gene expression and control of mRNAs stability is important for coordinating the initiation and resolution of inflammation. However, the posttranscriptional mechanisms in innate immunity remain to be clarified. This study is aiming to investigate the posttranscriptional mechanisms in innate immunity based on the roles of an RNase Regnase-1 we identified. In this study, we demonstrate that Regnase-1 localized to cytoplasm and endoplasmic reticulum (ER), but not to PB and SGs, and colocalizes with ribosome. Regnase-1 destabilized translationally active mRNAs and the helicase activity of UPF1 was required for the Regnase-1-mediated mRNA decay, similar to the decay mechanisms of nonsense mRNAs. Our findings reveal that Regnase-1 might function in recognizing the translationally active mRNA and triggering mRNA destabilizing immediately.

研究分野：分子生物学, 免疫学

キーワード：自然免疫 炎症 サイトカイン 転写後調節 RNA安定性制御 Regnase-1 Ribosome UPF1

1. 研究開始当初の背景

自然免疫は、病原体感染を最初に認識し、炎症性サイトカインを介して急性炎症を引き起こす。この初期認識に関わる細胞種として自然免疫細胞であるマクロファージや樹状細胞などが知られ、これらの細胞は病原体を感知するとサイトカインを産生・分泌し、T細胞を始めとする獲得免疫系の活性化などにより病原体の排除を行う(Cell 140, 805-820, 2010)。炎症性サイトカインは炎症の調節において中心的な役割を果たしており、病原体による免疫刺激に対する炎症性サイトカインの発現は、転写および転写後調節により厳密に制御されている。中でもRNAの安定性や翻訳を制御する転写後調節はサイトカイン産生を制御する重要なプロセスの一つであり、転写後調節は炎症などの免疫応答の開始や終結の制御にも重要である(Nat. Rev. Immunol. 10, 24-35, 2010)。我々は、これまで転写制御と比較して未知の領域である、炎症の転写後調節のメカニズムに関し研究を進めてきた。そして、新規RNaseであるRegnase-1 (regulatory RNase-1, Zc3h12a, Mcp1)がInterleukin-6 (Il6)やIL12p40などのサイトカイン mRNA の分解を行うことで過剰な免疫応答を抑制するサイトカイン産生のブレーキ役を担っている事を見出した(Nature 458, 1185-1190, 2009; Nat. Immunol. 12, 1167-1175, 2011)。また、Regnase-1はマクロファージなどの自然免疫担当細胞だけでなく、獲得免疫T細胞において*c-Rel*や*Icos*, *Ox40*, *Il2*などのmRNAを分解することによって過剰なT細胞活性化を抑制していることを報告した(Cell 153, 1036-1049, 2013)。しかしながら、Regnase-1の標的mRNAの特異性や作用機構はほとんど分かっていない。そこで、Regnase-1の作用機構を検証するために、最近Regnase-1の細胞内局在に関し検討を加えると、このRegnase-1はこれまでtristetraproline (TTP)を始めいくつかのmRNA安定性制御に関わる分子が局在することが知られているRNAやRNA分解に関わる酵素が豊富なprocessing (P)-bodiesやstress granulesでは無く、サイトカインなどの分泌蛋白質の翻訳が生じているendoplasmic reticulum (ER)に多く存在し、蛋白質合成装置であるリボソーム(ribosome)と共同在する事が明らかとなってきた(未発表)。この結果はRegnase-1が翻訳とカップルしmRNA安定性を調節している可能性を示しており、サイトカイン産生が不必要な定常状態において蛋白質翻訳状態(translationally active)となった不必要なmRNAを完全に除去するメカニズムと考えると合目的である。そこで、本申請研究では、特にリボソームを介したRegnase-1の作用機構を解明すると共に、これまでほとんど解明されていない自然免疫応答における転写後調節の新たな作用機構の解明を試みる。

2. 研究の目的

本申請研究は、これまで転写制御(mRNA産生の制御)と比較して未知の領域である、自然免疫の転写後調節のメカニズムの解明に関する研究であり、本申請研究の目的は、以下に示す2点を達成し、自然免疫における転写後調節に関わるRNase Regnase-1の作用機構を解明するとともに、自然免疫応答における転写後調節の新たな作用機構を解明することである。

- (1) Regnase-1によるリボソームを介したmRNA安定性制御の解明
- (2) Regnase-1の相互作用蛋白質の同定とその作用機構の解明-炎症の転写後調節における新たな制御因子の探索と制御機構の解明

3. 研究の方法

RNase Regnase-1によるmRNA分解機構を解明するために、以下の実験を行なった。

- (1) Regnase-1の細胞内局在を解明するために、HeLe細胞やNIH3T3細胞を用いた免疫染色による観察、免疫電子顕微鏡による観察および細胞分画を行なった。
- (2) Regnase-1がmRNAの蛋白質翻訳活性化状態であるポリソーム(polysome)に局在しているか検討するために、HeLa細胞について超遠心を用いた細胞分画法であるpolysome fractionationを行なった。また、Regnase-1がpolysomeのmRNAを標的としているかどうかを検討するために、siRNAによりRegnase-1をノックダウンしたHeLa細胞についてpolysome fractionationを行ない、polysome分画からmRNAを回収し、RT-qPCRによりpolysome分画のmRNA量を定量した。
- (3) Regnase-1の相互作用蛋白質を網羅的に同定するために、免疫沈降法によりRegnase-1の相互作用蛋白質をpull-downし、プロテオミクスの1つの方法であるiTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation)法を用いた質量分析を行なった。
- (4) Regnase-1が細胞内の蛋白質合成装置であるリボソームと直接結合するか検討するために、Regnase-1のリコンビナントタンパク質とHeLa細胞から精製したリボソームを用いたribosome-binding assay (ribosome pull-down assay)を行なった。
- (5) Regnase-1がRNA helicase UPF1と相互作用するか免疫沈降法により検討した。
- (6) Regnase-1が蛋白質翻訳が生じているmRNA (translationally active mRNA)を特異的に切断しているか検証するために、蛋白質合成阻害剤(AnisomycinやCycloheximide)や蛋白質翻訳不活性化mRNA (リボソームをストールさせる安定なstem loop構造を導入したmRNA)を用いたRegnase-1による*Il6* mRNA分解

アッセイを行なった。

- (7) Regnase-1 による mRNA 分解に UPF1 が必要かどうかを検証するために, siRNA により UPF1 ノックダウンして, Regnase-1 による *I16* mRNA 分解アッセイを行なった。

4. 研究成果

Regnase-1 の作用機構を検証するために, まず Regnase-1 の細胞内局在に関し検討を加えると, Regnase-1 はサイトカインなどの分泌蛋白質の翻訳が生じている endoplasmic reticulum (ER)に多く存在し, 蛋白質合成装置であるリボソームと共局在する事が明らかとなった。更に, Regnase-1 は mRNA の蛋白質翻訳活性化状態であるポリソーム(polysome)に局在することが分かった。

次に, Regnase-1 の相互作用蛋白質をプロテオミクスの 1 つの方法である iTRAQ 法により網羅的に解析した結果, 多くの ribosomal protein と RNA helicase UPF1 が Regnase-1 の相互作用蛋白質として検出された。そこで, Regnase-1 がリボソームと直接結合するか ribosome-binding assay により解析した結果, Regnase-1 はリボソームと直接結合する RNase であることが分かった。更に, Regnase-1 は UPF1 とも相互作用することが分かった。以上の結果は, Regnase-1 がリボソームや UPF1 と相互作用して translationally active mRNA を分解していることを示唆している。

実際に, Regnase-1 のノックダウンは蛋白質翻訳活性化状態である polysome の mRNA を増加させていた。更に, Regnase-1 が translationally active mRNA を分解しているかどうかを, 蛋白質合成阻害剤や蛋白質翻訳不活性化 mRNA を用いて検討した結果, Regnase-1 は蛋白質翻訳不活性化状態では mRNA を分解しないことが分かった。つまり, Regnase-1 は translationally active mRNA を分解していることが分かった。

次に, Regnase-1 がどのように translationally active mRNA を分解しているか検討した。Regnase-1 は蛋白質翻訳の終結反応(translation termination)と共役して mRNA 分解を生じていた。そして, UPF1 をノックダウンすると Regnase-1 による mRNA 分解は生じなくなることから, Regnase-1 は UPF1 依存的に mRNA を分解していた。更に, この Regnase-1 と UPF1 の相互作用は蛋白質合成を阻害すると減少することから, Regnase-1 と UPF1 の相互作用は蛋白質翻訳依存的に生じていることが分かった。また, Regnase-1 は UPF1 の helicase activity 依存的に mRNA を分解しており, これは UPF1 の helicase activity による mRNA-蛋白質(mRNP)複合体のリモデリングが Regnase-1 による mRNA 分解に関与していることを示唆している。

本研究により, Regnase-1 は蛋白質合成装置であるリボソームおよび RNA helicase

UPF1 と結合することによって, translationally active mRNA を分解するこれまでに報告されていない全く新しいタイプの RNase であることが明らかとなった。この蛋白質翻訳と共訳した Regnase-1 による mRNA 分解機構は免疫応答において早急なサイトカイン蛋白質翻訳の停止を可能にすると考えられる。以上の研究成果が米国科学雑誌「Cell」に掲載された(Cell 161, 1058-1073, 2015)。

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 10 件)

Takashi Mino, Yasuhiro Murakawa, Akira Fukao, Alexis Vandebon, Hans-Hermann Wessels, Daisuke Ori, Takuya Uehata, Sarang Tartey, Shizuo Akira, Yutaka Suzuki, Carola G. Vinuesa, Uwe Ohler, Daron M. Standley, Markus Landthaler, Toshinobu Fujiwara, Osamu Takeuchi. Regnase-1 and Roquin regulate a common element in inflammatory mRNAs by spatiotemporally distinct mechanisms. Cell 161, 1058-1073, 2015. DOI: 10.1016/j.cell.2015.04.029. 査読有り.

Sarang Tartey, Kazufumi Matsushita, Tomoko Imamura, Atsuko Wakabayashi, Daisuke Ori, Takashi Mino, Osamu Takeuchi. Essential function for the nuclear protein Akirin2 in B cell activation and humoral immune responses. The Journal of Immunology in press. 査読有り.

Sarang Tartey, Kazufumi Matsushita, Alexis Vandebon, Daisuke Ori, Tomoko Imamura, Takashi Mino, Daron M. Standley, Jules A. Hoffmann, Jean-Marc Reichhart, Shizuo Akira, and Osamu Takeuchi. Akirin2 is critical for inducing inflammatory genes by bridging I κ B- ζ and the SWI/SNF complex. The EMBO Journal 33, 2332-2348, 2014. DOI: 10.15252/embj.201488447. 査読有り.

Takashi Mino, Tomoaki Mori, Yasuhiro Aoyama, and Takashi Sera. Inhibition of DNA Replication of Human Papillomavirus by Using Zinc Finger-Single-Chain FokI Dimer Hybrid. Molecular Biotechnology 56, 731-737, 2014. DOI: 10.1007/s12033-014-9751-3. 査読有り.

Takashi Mino, Osamu Takeuchi. Post-transcriptional regulation of cytokine mRNA controls the initiation and resolution of inflammation. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews 29, 49-60, 2013. DOI: 10.1080/02648725.2013.801236. 査読有り.

Takuya Uehata, Hidenori Iwasaki, Alexis Vandebon, Kazufumi Matsushita, Eduardo

Hernandez Cuellar, Kanako Kuniyoshi, Takashi Satoh, Takashi Mino, Yutaka Suzuki, Daron M. Standley, Tohru Tsujimura, Hiromi Rakugi, Yoshitaka Isaka, Osamu Takeuchi, and Shizuo Akira. Malt1-Induced Cleavage of Regnase-1 in CD4+ Helper T Cells Regulates Immune Activation. *Cell* 153, 1036-1049, 2013. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.034. 査読有り.

Kazuya Masuda, Barry Ripley, Riko Nishimura, Takashi Mino, Osamu Takeuchi, Hiroshi Kiyonari, Go Shioi, and Tadimitsu Kishimoto. Arid5a controls IL-6 mRNA stability, which contributes to elevation of IL-6 level in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 9409-9414, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1307419110. 査読有り.

Masahiro Fukasaka, Daisuke Ori, Tatsukata Kawagoe, Satoshi Uematsu, Kenta Maruyama, Toshihiko Okazaki, Tatsuya Kozaki, Tomoko Imamura, Sarang Tarte, Takashi Mino, Takashi Satoh, Shizuo Akira, and Osamu Takeuchi. Critical Role of AZI2 in GM-CSF-Induced Dendritic Cell Differentiation. *The Journal of Immunology* 190, 5702-5711, 2013. DOI: 10.4049/jimmunol.1203155. 査読有り.

Daisuke Ori, Hiroki Kato, Hideki Sanjo, Sarang Tarte, Takashi Mino, Shizuo Akira and Osamu Takeuchi. Essential Roles of K63-Linked Polyubiquitin-Binding Proteins TAB2 and TAB3 in B Cell Activation via MAPKs. *The Journal of Immunology* 190, 4037-4045, 2013. DOI: 10.4049/jimmunol.1300173. 査読有り.

Takashi Mino, Tomoaki Mori, Yasuhiro Aoyama, and Takashi Sera. Gene- and protein-delivered zinc finger-staphylococcal nuclease hybrid for inhibition of DNA replication of human papillomavirus. *PLoS One* 8, e56633, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0056633. 査読有り.

[学会発表](計 9 件)

Takashi Mino, Osamu Takeuchi. Regnase-1 destabilizes inflammation-related mRNAs in a translation-dependent manner. 2014 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. 京都府京都市. 2014 年 12 月 10 日 ~ 12 日.

Masanori Yoshinaga, Takashi Mino, Osamu Takeuchi. A novel role of Regnase-1 in the iron homeostasis and anemia. 2014 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. 京都府京都市. 2014 年 12

月 10 日 ~ 12 日.

三野享史, 深尾亜喜良, 藤原俊伸, 竹内理. Regnase-1 は翻訳に依存して炎症関連 mRNA を分解する. 第 37 回日本分子生物学会年会, 神奈川県横浜市. 2014 年 11 月 25 日 ~ 27 日.

阿部壮岐, 三野享史, 村川泰裕, 竹内理. Regnase-1 標的 mRNA 配列の網羅的同定. RNA フロンティアミーティング 2014. 和歌山県西牟婁郡白浜町. 2014 年 9 月 16 日 ~ 18 日.

三野享史. 炎症の転写後調節における Regnase-1 の作用機構. 新学術領域「ゲノム支援」2014 年度 拡大班会議. 兵庫県神戸市. 2014 年 8 月 20 日 ~ 21 日.

Takashi Mino, Akira Fukao, Toshinobu Fujiwara and Osamu Takeuchi. Regnase-1 destabilizes inflammation-related mRNAs in a translation-dependent manner. 第 16 回日本 RNA 学会年会. 愛知県名古屋市. 2014 年 7 月 23 日 ~ 25 日.

三野享史. 自然免疫応答の転写後調節における Regnase-1 の作用機構. 日本化学会北海道支部 平成 25 年度室蘭・苫小牧地区化学講演会. 北海道苫小牧市. 2013 年 12 月 6 日.

三野享史. 自然免疫応答の転写後調節における Regnase-1 の作用機構. 名古屋市立大学大学院薬学研究科藤原研究室セミナー. 愛知県名古屋市. 2013 年 10 月 17 日.

三野享史. Regnase-1 の作用機構から探る自然免疫応答における転写後調節の解明. 新学術領域「ゲノム支援」2013 年度 拡大班会議. 兵庫県神戸市. 2013 年 8 月 28 日 ~ 29 日.

[その他]

京都大学 HP での研究成果発表

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2015/150512_2.html

JST HP での研究成果発表

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20150522/index.html>

京都大学ウイルス研究所竹内研究室 HP

http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/Takeuchi_HP/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三野 享史 (MINO, Takashi)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号: 60646149