

平成 31 年 4 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08832

研究課題名(和文) UPF1の作用機構から探る自然免疫における転写後制御機構の解明

研究課題名(英文) Study of UPF1-mediated mRNA regulation in immune system

研究代表者

三野 享史 (MINO, Takashi)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：60646149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、RNAヘリカーゼUPF1による自然免疫システムにおけるmRNA制御機構を解明することを目的とした。UPF1欠損マクロファージを用いた遺伝子発現解析より、UPF1はTNFなどのこれまで知られていないサイトカインmRNA制御にも関わっている事が分かった。このUPF1によるTNF mRNA制御メカニズムを検討したところ、UPF1はRNA結合蛋白質Tristetraprolin (TTP)と結合し、TTPを介したサイトカインmRNA分解に必要であることが分かった。本研究により、UPF1はサイトカインmRNA制御に重要なRNAヘリカーゼであり、TTPを介したmRNA制御に関わることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、UPF1はサイトカインmRNA制御に重要なRNAヘリカーゼであり、新たなmRNA制御メカニズムとして、UPFがTTPを介したmRNA制御に関わることを見出した。免疫応答制御には転写調節だけでなく、転写後調節によるmRNA安定性制御が重要な役割を果たしていることが近年明らかとなってきた。転写後調節による"ブレーキ"を失うとサイトカイン産生は劇的に増加し、自己免疫疾患を誘発し組織破壊や死亡へ繋がる。したがって、免疫応答における転写後調節の理解は炎症性疾患などの原因の解明や治療法の開発に繋がると期待される。本研究成果は、UPF1を標的とした新たな免疫制御法の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Post-transcriptional regulation that modifies mRNA stability and translation provides rapid and flexible control of gene expression and control of mRNA stability is important for coordinating the initiation and resolution of inflammation. However, the mechanisms of mRNA regulation in innate immune system remain to be clarified. This study is aiming to investigate the role of RNA helicase UPF1 in innate immune system. We generated LysM-Cre-UPF1Flox/Flox mice and found that UPF1 negatively regulated cytokine mRNAs such as IL6 and TNF by analyzing UPF1-deficient macrophages from LysM-Cre-UPF1Flox/Flox mice. Moreover, we found that UPF1 associated with Tristetraprolin (TTP), which is an RNA-binding protein and destabilize cytokine mRNAs such as TNF and CSF2 by targeting AU-rich elements in 3' untranslated region, and UPF1 was required for the TTP-mediated mRNA decay. Our findings reveal that UPF1 plays a critical role in regulating cytokine mRNAs in innate immune system.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 サイトカイン 転写後制御 mRNA分解 UPF1 Regnase-1 TTP 翻訳

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炎症性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, Mcpip1)が *Interleukin-6 (IL-6)* や *IL-12p40* 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)。更に Regnase-1 による RNA 分解機構について検討を加えたところ、Regnase-1 は UPF1 依存的に蛋白質翻訳されている(translationally active) mRNA を分解していることを最近見出した(Cell 161, 1058-1073, 2015)。UPF1 は premature termination codons (PTC) を含んだ異常な RNA を排除する RNA 分解機構 nonsense-mediated mRNA decay (NMD)において必須な RNA helicase であり、現在の NMD の 1 つのモデルでは蛋白質翻訳中に PTC に UPF1 がリクルートされることで PTC を含んだ異常 RNA の分解が誘導されると考えられている(Biochim. Biophys. Acta. 1829, 612-623, 2013)。しかしながら、NMD における UPF1 の機能解析はこれまで数多く行なわれているが、免疫応答を含めてその他の生命現象における UPF1 の役割はほとんど分っていない。一方、siRNA による UPF1 のノックダウンは、PTC を含んだ異常な mRNA だけでなく、正常な mRNA の発現も亢進させることが知られている(Genes & Dev. 20, 153-158, 2006)。これは、UPF1 が NMD だけでなく別の RNA 安定性制御機構にも関わっていることを示唆している。そして、最近我々は UPF1 が Regnase-1 による RNA 分解機構に必須であり、Regnase-1 を介して自然免疫制御に関わっている事を見出した。すなわち、RNA の品質管理に重要な UPF1 が Regnase-1 を介したサイトカイン mRNA 分解にも必要であることは、UPF1 が自然免疫においても重要な役割を担っていることを示唆している。そこで、本申請研究では UPF1 による自然免疫制御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新たな転写後制御機構の解明を試みることを目的とした。

2. 研究の目的

本申請研究は、これまでの転写制御(mRNA 産生の制御)と比較して未知の領域である、自然免疫における情報伝達分子である炎症性サイトカインの転写後制御機構(mRNA 安定性やタンパク質翻訳制御機構)を解明することを目的としている。特に、最近我々が炎症性サイトカインの転写後制御に関わる事を見出した RNA helicase UPF1 に着目し、UPF1 を介した新たな自然免疫の転写後制御機構の解明を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) UPF1 コンディショナルノックアウトマウス(*UPF1^{Flox/Flox}* マウス)の作製

Cre-loxP system を用いた UPF1 のコンディショナルノックアウトマウス(*UPF1^{Flox/Flox}* マウス)を作製するために、UPF1 の exon 4-6 を loxP 配列で挟んだターゲティングベクターを作製し、そのターゲティングベクターをマウス ES 細胞にインジェクションしてキメラマウスを作製した。得られたキメラマウスに B6 マウスを交配させて、UPF1 のコンディショナルノックアウトマウス(*UPF1^{Flox/Flox}* マウス)を作製した。

(2) 自然免疫細胞(マクロファージ)特異的 UPF1 欠損マウスの作製

ミエロイド(骨髄系)細胞特異的に欠損させる *LysM-Cre* マウスと *UPF1^{Flox/Flox}* マウスを交配させて、自然免疫細胞の 1 つであるマクロファージ特異的に UPF1 を欠損したマウス(*LysM-Cre-UPF1^{Flox/Flox}*)を作製した。マクロファージにおける UPF1 の欠損効率を RT-qPCR や Western blot により確認した。

(3) UPF1 欠損マクロファージの遺伝子発現解析

マクロファージ特異的 UPF1 欠損マウス(*LysM-Cre-UPF1^{Flox/Flox}* マウス)から腹腔内膜マクロファージを回収し、そのマクロファージを種々の Toll-like receptor (TLR)のリガンドで刺激し、炎症性サイトカイン TNF および IL-6 の発現量を ELISA により測定した。その際、TLR のリガンドとして、Pam3CSK4 (TLR2 リガンド)、LPS (TLR4 リガンド)、Poly I:C (TLR3 リガンド)、LPS

(TLR4 リガンド), R-848 (TLR7/8 リガンド), CpG (TLR9 リガンド)を使用した。更に, 遺伝発現変化を網羅的に解析するために, LPS で刺激した UPF1 欠損マクロファージから mRNA を回収して, その mRNA 発現量を次世代 DNA シーケンサーにより解析した (mRNA-sequencing)。

(4) SILAC 法による UPF1 結合タンパク質の同定

新たな UPF1 結合タンパク質を同定するために, プロテオミクスの 1 つの方法である SILAC (Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell Culture)法を行なった。HeLa cells を異なる質量数の lysine で Light ($^{12}\text{C}_6$ L-lysine)-ラベリングおよび Heavy ($^{13}\text{C}_6$ L-lysine)-ラベリングして, Light-ラベリングした HeLa cells にコントロール(HA タグのみ)を発現させ, Heavy-ラベリングした HeLa cells に HA-UPF1 を発現させた。それぞれの cell lysate を混ぜた後, HA-UPF1 を anti-HA antibody で共免疫沈降(Co-IP)して, 得られたタンパク質複合体を質量分析で解析した。

(5) UPF1 による mRNA 制御における TTP の機能解析

TTP が UPF1 に結合するか検討するために, Flag-TTP と HA-UPF1 を HeLa cells に発現させて, anti-Flag antibody で共免疫沈降(Co-IP)して, Western blot により解析した。また, TTP による mRNA 分解に UPF1 が必要であるかを検討するために, HeLa cells に siRNA を用いて UPF1 をノックダウンし, その細胞に Flag-TTP を発現させて TTP による *TNF* mRNA 分解にアッセイを行なった。

4. 研究成果

UPF1 の免疫システムにおける機能解析を行なうために, UPF1 のコンディショナルノックアウトマウス(*UPF1^{Flox/Flox}* マウス)を作製し, このマウスに *LysM-Cre* マウスを交配させて, 自然免疫細胞の 1 つであるマクロファージ特異的に UPF1 を欠損したマウス(*LysM-Cre-UPF1^{Flox/Flox}*)を作製した。このマウスから回収した UPF1 欠損腹腔内マクロファージを種々の TLR リンガンドにより刺激して, 炎症性サイトカイン *TNF* および *IL-6* の発現量を ELISA により測定した。その結果, UPF1 欠損マクロファージでは *TNF* および *IL-6* の発現が共に亢進していた。これは, UPF1 がマクロファージにおいて炎症性サイトカインの発現を負に制御している事を示唆している。また, 全ての TLR リガンドにおいて, *TNF* および *IL-6* の発現が増加しており, これは, UPF1 が転写制御ではなくて転写後制御(mRNA 制御)に関わっている事を示唆している。

UPF1 により制御されている mRNA を網羅的に解析するために, LPS で刺激した UPF1 欠損腹腔内マクロファージから mRNA を回収して, mRNA 発現量を次世代 DNA シーケンサーにより解析した(mRNA-sequencing)。その結果, UPF1 は, これまで知られている *IL-6*, *PTGS2*, *NFKBIZ* などの Regnase-1 の標的 mRNA だけでなく, *TNF*, *CSF2*, *ZFP36* などの AU-rich element (ARE) を 3' 非翻訳領域(3' UTR)に含んだ Regnase-1 の標的以外のサイトカイン mRNA 制御にも関わっている事が分かった。

この UPF1 による ARE を 3' UTR に有する mRNA 制御メカニズムを解明するために, 新規 UPF1 結合タンパク質の同定を SILAC 法により試みた。その結果, UPF1 結合タンパク質の 1 つとして Tristetraprolin (TTP)が同定された。TTP は, *TNF* などの炎症性 mRNA の 3' UTR に存在する ARE に結合して, 標的 mRNA の不安定化を誘導する RNA 結合蛋白質として知られている。そこで, UPF1 が TTP を介したサイトカイン mRNA 分解に必要かどうかを UPF1 の siRNA ノックダウン実験で検討した結果, UPF1 のノックダウンにより TTP による *TNF* mRNA 分解が阻害された。これは, UPF1 が TTP を介したサイトカイン mRNA 分解に必要であることを示唆している。更に, UPF1 と TTP の相互作用には蛋白質翻訳が必要であり, TTP によるサイトカイン mRNA 分解にもタンパク質翻訳が必要であった。これは TTP が蛋白質翻訳依存的に UPF1 と結合し, 標的 mRNA の分解を誘導していること示唆している。

本研究により, UPF1 はサイトカイン mRNA 制御に重要な RNA ヘリカーゼであり, 新たな mRNA 制御メカニズムとして, UPF1 が TTP を介した mRNA 制御に関わることを見出した。免疫応答制御には転写調節(mRNA 産生の制御)のみでなく, 転写後調節による mRNA 安定性制御が重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。転写後調節による"ブレーキ"を失うとサイトカイン産生は劇的に増加し, 自己免疫疾患を誘発し組織破壊や死亡へ繋がる。したがって, 免疫応答における転写後調節の理解は炎症性疾患などの原因の解明や治療法の開発に繋がると期待される。しかしながら, mRNA 安定性制御と免疫応答制御の関連の研究は緒に就いたばかりであり, その制御機構は複雑であり, ほとんど解明されていない。本研究成果は, UPF1 を標的とした新たな免疫制御法の開発に繋がると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- (1) Nakatsuka, Y., Vandebon, A., Mino, T., Yoshinaga, M., Uehata, T., Cui, X., Sato, A., Tsujimura, T., Suzuki, Y., Sato, A., Handa, T., Chin, K., Sawa, T., Hirai, T., Takeuchi, O. (2018). Pulmonary Regnase-1 orchestrates the interplay of epithelium and adaptive immune systems to protect against pneumonia. *Mucosal Immunology* 11, 1203-1218. doi: 10.1038/s41385-018-0024-5. 査読有り.
- (2) Mino, T., Takeuchi, O. (2018). Post-transcriptional regulation of immune responses by RNA binding proteins. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 94, 248-258. doi: 10.2183/pjab.94.017. 査読有り.
- (3) Mino, T., Takeuchi, O. (2017). NSD3 keeps IRF3 active. *J. Exp. Med.* 214, 3475-3476. doi: 10.1084/jem.20171980. 査読有り.
- (4) Cui, X., Mino, T., Yoshinaga, M., Nakatsuka, Y., Hia, F., Yamasoba, D., Tsujimura, T., Tomonaga, K., Suzuki, Y., Uehata, T., Takeuchi, O. (2017). Regnase-1 and Roquin Nonredundantly Regulate Th1 Differentiation Causing Cardiac Inflammation and Fibrosis. *J. Immunol.* 199, 4066-4077. doi: 10.4049/jimmunol.1701211. 査読有り.
- (5) Yoshinaga, M., Nakatsuka, Y., Vandebon, A., Ori, D., Uehata, T., Tsujimura, T., Suzuki, Y., Mino, T., Takeuchi, O. (2017). Regnase-1 maintains iron homeostasis via the degradation of transferrin receptor 1 and prolyl hydroxylase domain-containing protein 3 mRNAs. *Cell Reports* 19, 1614-1630. doi: 10.1016/j.celrep.2017.05.009. 査読有り.

〔学会発表〕(計 24 件)

- (1) 吉永 正憲, 三野 享史, 竹内 理 Regnase-1 は鉄代謝関連の mRNA を分解することで鉄恒常性を維持する 第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2018 年 11 月 28-30 日.
- (2) 三野 享史, 岩井 紀貴, 赤木 宏太郎, 山下 暁朗, 竹内 理 SMG1 は Regnase-1 経路を介して炎症性 mRNA を制御する 第 20 回日本 RNA 学会年会, 大阪市, 2018 年 7 月 9-11 日.
- (3) 吉永 正憲, 三野 享史, Bassik, M. C., 竹内 理 鉄代謝を制御する転写後調節機構の解明 第 20 回日本 RNA 学会年会, 大阪市, 2018 年 7 月 9-11 日.
- (4) 三野 享史 Regnase-1 による炎症性 mRNA 分解機構 第 6 回 CCR4-NOT 研究会, 和歌山県西牟婁郡白浜町, 2018 年 5 月 12-14 日.
- (5) Yoshinaga, M., Mino, T., and Takeuchi, O. The ribonuclease Regnase-1 maintains iron homeostasis via the destabilization of iron-regulatory transcripts. RNA2018, Berkeley, May 29-June 3, 2018.
- (6) Yoshinaga, M., Mino, T., Takeuchi, O. Regnase-1 maintains iron homeostasis via the destabilization of iron-regulatory transcripts. Consortium of Biological Sciences (ConBio) 2017. Kobe, Japan, December 6-9, 2017.
- (7) Mino, T., Takeuchi, O. Regnase-1 regulates inflammation-related mRNAs during pioneer rounds of translation. 2017 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Sendai, Japan, December 12-14, 2017.
- (8) Yamasoba, D., Sato, K., Uehata, T., Mino, T., Koyanagi, Y., Takeuchi, O. Identification of a novel HIV-1 restriction factor which selectively degrades viral transcripts. 2017 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Sendai, Japan, December 12-14, 2017.
- (9) Cui, X., Mino, T., Yoshinaga, M., Uehata, T., Nakatsuka, Y., Takeuchi, O. Interactions between Regnase-1 and Roquin Regulate Helper T Cell Polarization. 2017 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Sendai, Japan, December 12-14, 2017.
- (10) Mino, T. Post-transcriptional regulation of inflammation-related mRNAs by Regnase-1. The 12th International Symposium of the Institute Network -Driving Next-Generation Medicine: the Spirit of Pioneering Discovery in Medical Science-. Tokyo, Japan, November 28-29, 2017.
- (11) 岩井 紀貴, 三野 享史, 竹内 理 内因性抗原提示における Regnase-1 の役割 RNA フロンティアミーティング 2017, 滋賀県大津市, 2017 年 11 月 8-10 日.
- (12) Nakatsuka, Y., Mino, T., Yoshinaga, M., Uehata, T., Sato, A., Handa, T., Chin, K., Hirai, T., Takeuchi, O. Pulmonary Regnase-1 functions as a posttranscriptional switch in anti-bacterial immunity. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society. Kanazawa, Japan, October 29- November 2, 2017.
- (13) Yamasoba, D., Sato, K., Uehata, T., Mino, T., Koyanagi, Y., Takeuchi, O. Identification of a novel HIV-1 restriction factor which selectively degrades viral transcripts. 18th Kumamoto AIDS seminar. Kumamoto, Japan, October 30-November 1, 2017.
- (14) Yamasoba, D., Sato, K., Uehata, T., Mino, T., Koyanagi, Y., Takeuchi, O. Identification of an interferon inducible RNA binding protein as a restriction factor of HIV-1. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Osaka, Japan, October 24-26, 2017.
- (15) 吉永 正憲, 三野 享史, 竹内 理 Regnase-1 は鉄代謝関連の mRNA を分解することで鉄恒常性を維持する 第 19 回日本 RNA 学会年会, 富山県富山市, 2017 年 7 月 19-21 日.

- (16) Mino, T., Iwai, N., Akaki, K., Yamashita, A., Takeuchi, O. SMG1 regulates inflammatory mRNAs through Regnase-1-mediated mRNA decay. The 19th RNA meeting of the RNA Society of Japan. Toyama, Japan, July 19–21, 2017.
- (17) Iwai, N., Mino, T., Takeuchi, O. Regulation of Regnase-1-mediated mRNA decay by SMG1 inhibitor. 15th International Student Seminar. Kyoto, Japan, February 23–28, 2017.
- (18) Mino, T., and Takeuchi, O. Post-transcriptional regulation of inflammation-related mRNAs by Regnase-1. 2016 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Ginowan City, Japan, December 5–7, 2016.
- (19) Nakatsuka, Y., Mino, T., and Takeuchi, O. A pivotal role of Regnase-1 at the airway epithelium for the protection against pathogens through the enhancement of IgA secretion. 2016 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Ginowan City, Japan, December 5–7, 2016.
- (20) Yoshinaga, M., Mino, T., and Takeuchi, O. The ribonuclease Regnase-1 plays a critical role in iron homeostasis and anemia. 2016 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Ginowan City, Japan, December 5–7, 2016.
- (21) Mino, T. Regnase-1 and Roquin regulate a common element in inflammatory mRNAs by spatiotemporally distinct mechanisms. The 23rd East Asia Joint Symposium. Taipei City, Taiwan, October 18–20, 2016.
- (22) Mino, T. Post-transcriptional regulation of inflammation-related mRNAs by Regnase-1 and Roquin. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan, September 6–9, 2016.
- (23) 岩井 紀貴, 三野 享史, 竹内 理 SMG 1 阻害剤による Regnase-1 依存性 mRNA 分解の制御 RNA フロンティアミーティング 2016, 北海道虻田郡二セコ町, 2016 年 8 月 31 日-9 月 2 日.
- (24) Yoshinaga, M., Mino, T., and Takeuchi, O. The ribonuclease Regnase-1 plays a role in iron homeostasis and anemia. International Congress of Immunology 2016. Melbourne, Australia, August 21–26, 2016.

〔図書〕(計4件)

- (1) 三野 享史 (2016). Regnase-1 と Roquin による炎症性 mRNA の制御 臨床免疫・アレルギー科 65, 180-184. 査読無し.
- (2) 三野 享史, 竹内理 (2016). 免疫研究における RNA-Seq システム免疫学へのアプローチ 実験医学別冊 NGS アプリケーション RNA-Seq 実験ハンドブック 197-203. 査読無し.
- (3) 三野 享史, 竹内 理 (2016). Regnase-1 と Roquin による炎症性 mRNA の制御 医学のあゆみ 257, 180-182. 査読無し.
- (4) 三野 享史, 竹内 理 (2016). Regnase-1 と Roquin による炎症性 mRNA の制御 日薬理誌 特集 147 351-356. 査読無し.

〔産業財産権〕

○取得状況(計1件)

名称：SMG1 阻害剤による免疫操作
 発明者：竹内 理，三野 享史，山下 暁朗
 権利者：竹内 理，三野 享史，山下 暁朗
 種類：特許
 番号：特願 2017-199591
 出願年：2017 年
 国内外の別： 国内

〔その他〕

京都大学医学研究科医化学分野所竹内研究室ホームページ
<https://mc.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(2) 研究協力者
 研究協力者氏名：竹内 理
 ローマ字氏名：(TAKEUCHI, Osamu)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。