

令和 4 年 4 月 11 日現在

機関番号：14301  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19H03488  
研究課題名(和文) 免疫システムにおけるmRNAの翻訳制御機構の解明

研究課題名(英文) Study of mRNA translation in immune system

## 研究代表者

三野 享史 (Mino, Takahsi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60646149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、免疫におけるmRNAの翻訳制御機構の解明を目的としている。これまでの研究より、RNA分解酵素Regnase-1は翻訳が生じている免疫関連mRNAの分解を誘導することが分かっているが、その詳細な分子メカニズムは不明である。そこで、本研究では、Regnase-1を介したmRNA翻訳制御機構に関して研究を進めた。その結果、Regnase-1は翻訳初期段階のバイオアラウンド翻訳が生じているmRNAを標的としており、そのRegnase-1によるバイオアラウンド翻訳のmRNA分解が、迅速に炎症性mRNAの翻訳状態を解消し、素早くそして効率的に炎症の終結を誘導していることを明らかにした。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症は、病原体の排除に重要な免疫反応であるが、過剰な炎症は敗血症性ショックや自己免疫疾患、動脈硬化、代謝性疾患など様々な病気の原因である。この炎症応答の厳密な制御にRNA制御が重要であることが近年明らかとなってきたが、その分子メカニズムは不明であった。本研究は、Regnase-1によるバイオアラウンド翻訳が生じているmRNA分解が免疫制御に重要であることを解明した。本研究の成果は、過剰もしくは慢性的な炎症で生じる炎症性疾患の病態解明や、ワクチンの効果を高める添加剤(ワクチンアジュバント)の開発など、新たな治療法の開発につながることを期待される。

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 in immune system. Regnase-1-mediated mRNA decay (RMD), in which inflammatory mRNAs harboring specific stem-loop structures are degraded, is a critical part of proper immune homeostasis. However, the mechanisms of the RMD remain to be clarified. This study is aiming to investigate molecular mechanism of mRNA regulation and translation mediated by RMD. We found that Regnase-1 targets pioneer rounds of translation and is critical for rapid resolution of inflammation through restriction of the number of proteins translated by a given mRNA. Our findings reveal that RMD is essential for efficiently degrading inflammatory mRNAs undergoing pioneer rounds of translation.

研究分野：免疫学、分子生物学

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

## 1. 研究開始当初の背景

細菌やウイルスなどの病原体が感染し体内に侵入すると、マクロファージや樹状細胞などの自然免疫細胞により Toll 様受容体を介して最初に認識される。マクロファージや樹状細胞は、炎症性サイトカインを分泌し、これが周辺の免疫細胞を活性化し、また免疫細胞の遊走を促すなどして、炎症を引き起こす。炎症は、病原体の排除に重要な免疫反応であるが、過剰な炎症は敗血症性ショックや自己免疫疾患、動脈硬化、代謝性疾患など様々な病気の原因となる。そのため、生体には、炎症を精緻にコントロールする機構が備わっており、その破綻が炎症性疾患の発症に関連すると考えられている。中でも、免疫細胞による炎症性サイトカインの産生量が、炎症の調節において中心的な役割を果たしている。炎症性サイトカインは、感染に伴い自然免疫細胞で、DNA から mRNA が転写され、次に mRNA からタンパク質が翻訳されるというステップで産生されるが、mRNA は単に転写で作られるだけでなく、分解されることでその量が厳密に調節されている。更に、mRNA からタンパク質への翻訳も複雑なメカニズムで制御されていると考えられるが、その免疫システムにおけるタンパク質翻訳の制御メカニズムは不明である。

我々は、これまで、RNA 分解酵素 Regnase-1 を発見し、この分子が炎症性サイトカイン mRNA を分解して、その産生を負に調節するブレーキであることを報告してきた(Nature 458, 1185-1190, 2009; Nature Immunology 12, 1167-1175, 2011; Cell 153, 1036-1049, 2013)。更に、Regnase-1 の制御メカニズムに関して検討したところ、Regnase-1 が標的 mRNA 上に存在するステムループ構造を認識し、RNA ヘリカーゼ UPF1 と協調的に作用して、タンパク質翻訳が生じている炎症性 mRNA を分解することを報告した(Cell 161, 1058-1073, 2015)。しかしながら、どのように Regnase-1 が UPF1 と協調して翻訳が生じている炎症性 mRNA を分解しているのか不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、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、免疫システムにおける mRNA の転写後制御機構(mRNA の局在、分解、翻訳)を解明することを目的とした。特に、近年、我々が免疫応答における mRNA 制御に関わることを見出した RNA 分解酵素 Regnase-1 および RNA ヘリカーゼ UPF1 に着目し、それらの制御因子を通じて免疫システムにおける新たな mRNA の翻訳制御機構の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 共免疫沈降実験

HeLa 細胞あるいは HEK293T 細胞などに Regnase-1 あるいは UPF1 などの発現プラスミドや siRNA をトランスファクションし、一晩培養した。細胞を溶解後、Regnase-1 あるいは UPF1 を抗体を用いて免疫沈降し、ウエスタンブロット法により、免疫沈降したタンパク質に結合しているタンパク質の結合量を評価した。

### (2) RNA 免疫沈降実験

Regnase-1 欠損細胞、HeLa 細胞あるいは HEK293T 細胞などに Regnase-1 あるいは UPF1 などの発現プラスミドや siRNA をトランスファクションし、一晩培養した。細胞を溶解後、Regnase-1 あるいは UPF1 などを抗体を用いて免疫沈降し、免疫沈降したタンパク質に結合している RNA を回収し、RT-qPCR 法あるいは次世代 DNA シーケンスにより解析した。

### (3) mRNA 発現解析および mRNA 分解アッセイ

骨髄由来樹状細胞(bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs)、HeLa 細胞あるいは HEK293T 細胞などに Regnase-1 あるいは UPF1 などの発現プラスミドや siRNA をトランスファクションし、一晩培養した。細胞を TLR リガンドや IL-1 $\beta$ などで刺激後、RNA を Trizol を用いて回収し、RT-qPCR 法により解析した。mRNA 分解アッセイでは、細胞を転写阻害剤 Actinomycin D により処理した後、RNA を Trizol を用いて回収し、RT-qPCR 法により解析した。

### (4) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

HeLa 細胞あるいは HEK293T 細胞にルシフェラーゼレポータープラスミド、Regnase-1 あるいは UPF1 などの発現プラスミドや siRNA をトランスファクションし、一晩培養した。細胞を溶解後、ルシフェラーゼ活性をルミノメーターにより測定した。

### (5) 試験管内 RNA 切断アッセイ

<sup>32</sup>P で 5' 末端ラベル化した RNA プローブと Regnase-1 や UPF1 のリコンビナントタンパク質を混ぜて反応させた。反応後、変性 TBE-Urea ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して、RNA 切

断を解析した。

#### (6) ATPase アッセイ

Regnase-1 や UPF1 のリコンビナントタンパク質を 2 mM ATP を含む反応液に混ぜて反応させた。反応後、UPF1 の ATPase 活性による遊離リン酸を BIOMOL GREEN reagent (Enzo Life Sciences Inc)により解析した。

#### (7) ヘリカーゼ活性アッセイ

<sup>32</sup>P で 5' 末端ラベル化した RNA プローブと Regnase-1 や UPF1 のリコンビナントタンパク質を混ぜて反応させた。反応後、非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して、RNA を解析した。

#### (8) 原子間力顕微鏡観察(AFM)

DNA フレームに Regnase-1 の標的ステムループ RNA をハイブリさせた。その DNA フレーム上で、RNA と Regnase-1 や UPF1 のリコンビナントタンパク質を反応させ、高速原子間力顕微鏡 (Nano Live Vision, RIBM)により観察した。

#### (9) フローサイトメトリー解析

骨髄由来樹状細胞(bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs)を TLR リガンドおよび SMG1 阻害剤で処理した。反応後、anti-CD11c, anti-CD40, anti-CD80 抗体などで細胞を処理して、FACSVerse および LSRFortessa X-20 (BD Biosciences)で解析した。

#### (10) 樹状細胞と T 細胞の同種リンパ球混合培養反応

C57BL/6J マウス由来の骨髄由来樹状細胞(bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs)を TLR リガンドおよび SMG1 阻害剤で処理した。反応後、X 線(30 Gy)を照射し、次に、C57BL/6J マウス由来の脾臓の CD4<sup>+</sup> T 細胞と共培養した。培養終了の 16 時間前に [<sup>3</sup>H]Thymidine を添加し、 [<sup>3</sup>H]Thymidine の T 細胞への取り込みを TopCount NXT (Packard)で解析した。

## 4. 研究成果

Regnase-1 はタンパク質翻訳が生じている mRNA の分解を誘導することが分かっているが、タンパク質翻訳は大きく分けて 2 つのクラスに分類されることが知られている。1 つは、翻訳の初期段階であるパイオニアラウンド翻訳と呼ばれるもので、mRNA の 5'-cap 構造に cap 結合蛋白質 CBP80 が結合した mRNA から生じる。もう一つは、ステディーステート翻訳と呼ばれるもので、CBP80 が別の cap 結合蛋白質 eIF4E に置換されて、mRNA の 5'-cap 構造に eIF4E が結合した mRNA から生じる。RNA 免疫沈降法により Regnase-1 が CBP80 と eIF4E のどちらが結合した mRNA と結合しているのかを検討した結果、Regnase-1 は CBP80 と結合した mRNA と結合していた。更に、RNA 免疫沈降シーケンスにより、Regnase-1 欠損細胞において、CBP80 が結合した Regnase-1 標的 mRNA が増加していた。つまり、Regnase-1 はパイオニアラウンド翻訳において mRNA の分解を生じていることが分かった。更に、この Regnase-1 によるパイオニアラウンド翻訳状態の mRNA 分解が蛋白質の生成量に与える影響を数理モデルにより検討した結果、Regnase-1 がパイオニアラウンド翻訳状態の mRNA 分解することで、1 分子の mRNA から生成される蛋白質の量を低く制限していることが分かった。すなわち、Regnase-1 による翻訳初期段階のパイオニアラウンド翻訳の mRNA 分解が、迅速に炎症性 mRNA の翻訳状態を解消し、素早くそして効率的に炎症の終結を誘導していることが明らかとなった。

次に、どのように Regnase-1 が翻訳初期段階のパイオニアラウンド翻訳の mRNA 分解を行っているか検討した。RNA 分解酵素 Regnase-1 は、標的 mRNA 上に存在するステムループ構造を認識し、タンパク質を翻訳している mRNA を特異的に分解するが、まず、タンパク質翻訳が Regnase-1 の標的 mRNA への結合に必要なかを検証した。その結果、タンパク質合成阻害剤 Anisomycin でタンパク質合成を止めても、Regnase-1 と標的 mRNA の結合に変化は無かった。また、試験管内 RNA 切断実験で、Regnase-1 タンパク質がステムループ RNA を分解しなかったことから、Regnase-1 は、翻訳と関係なく mRNA に結合していること、また、翻訳していない場合には、Regnase-1 が結合していても標的 RNA を分解できないことが分かった。これらの結果は、タンパク質翻訳によって Regnase-1 による RNA 分解を ON にする機構が存在することを示唆している。そこで、Regnase-1 は RNA ヘリカーゼ UPF1 と結合することから、UPF1 が Regnase-1 による mRNA 分解のスイッチとなっている可能性を検証した。試験管内での RNA 切断実験や、原子間力顕微鏡観察(AFM)による 1 分子イメージングの結果、Regnase-1 は UPF1 共存下でステムループ RNA を素早く切断した。更に、最初にステムループ RNA を UPF1 と混ぜることでステムループ RNA が巻き戻されて一本鎖となった RNA は、Regnase-1 により素早く分解されることが明らかとなった。これらの結果は、UPF1 がステムループ RNA をほどくことが Regnase-1 による RNA 切断のスイッチになっていることを示している。

次に、UPF1 による Regnase-1 による mRNA 切断のスイッチがどのように制御されているかを検討した。UPF1 は ATP 依存的 RNA ヘリカーゼであり、UPF1 はそのヘリカーゼ活性によって RNA を解くが、UPF1 の N 末端の CH ドメインがヘリカーゼ活性に重要な RecA ドメインと分子内で会合することで、UPF1 のヘリカーゼ活性が通常は抑えられていることが知られている。興味深い事に、UPF1 の ATPase アッセイと非変性ポリアクリルアミドゲルを用いたヘリカーゼ活性アッセイにより、Regnase-1 は UPF1 のヘリカーゼ活性を上昇させることが分かった。更に、詳細な Regnase-1 と UPF1 の共免疫沈降実験により、Regnase-1 の (90-130)リンカー領域が UPF1 の RecA ヘリカーゼドメインに結合することで、UPF1 の CH ドメインと RecA ドメインの分子内会合を阻害していた。以上の結果は、Regnase-1 が UPF1 の CH ドメインと RecA ドメインの分子内会合を阻害することにより、UPF1 のヘリカーゼ活性を ON にしていることを示唆している。

Regnase-1 と UPF1 はタンパク質翻訳依存的に結合するが、UPF1 T28A 変異体を用いた共免疫沈降実験により、この Regnase-1 と UPF1 の会合には UPF1 の T28 残基のリン酸化が必要であることが分かった。更に、UPF1 T28A 変異体の再構成実験により、この UPF1 のリン酸化は Regnase-1 による RNA 分解にも必須であることが明らかとなった。更に、詳細な Regnase-1 と UPF1 の共免疫沈降実験およびウフスタンプロット実験により、この UPF1 のリン酸化は Regnase-1 の (90-130)リンカー領域が UPF1 の RecA ヘリカーゼドメインに結合することで誘導され、この UPF1 の T28 リン酸化は Regnase-1 の RNase ドメインの K257/R258 残基により認識され、Regnase-1 と UPF1 の安定的な会合を形成していることが明らかとなった。

次に、この UPF1 のリン酸化を誘導しているキナーゼの同定を試みたところ、詳細な siRNA による SMG1 のノックダウン実験、共免疫沈降実験やルシフェラーゼレポーターアッセイなどにより、PI3 キナーゼファミリーの 1 つである SMG1 による UPF1 のリン酸化が Regnase-1 と UPF1 の結合および Regnase-1 による RNA 切断に必須であることを見出した。つまり、以上の結果により、SMG1 による UPF1 のリン酸化が Regnase-1 との安定的な相互作用を形成し、そして UPF1 がステムループ RNA を解くことで Regnase-1 が標的ステムループ RNA を切断すると考えられる。

最後に、Regnase-1 による mRNA 分解に SMG1 が必須であることが解明されたので、SMG1 のキナーゼ活性を操作する事で、免疫応答をコントロールする事が出来るかどうかを試みた。そのために、本研究では、SMG1 のキナーゼ活性を阻害する小分子化合物(SMG1 阻害剤)を使用した。樹状細胞を SMG1 阻害剤で処理して、炎症性サイトカイン mRNA の発現量を定量 PCR 法により測定した結果、Regnase-1 の標的の炎症性サイトカイン mRNA の発現が SMG1 阻害剤の処理により亢進した。樹状細胞が病原体の認識により活性化すると、細胞表面の CD40 および CD80 共刺激分子の発現量が増加することが知られているが、SMG1 阻害剤の処理により、樹状細胞の CD40 および CD80 の発現量が増加していた。この CD40 と CD80 の mRNA も Regnase-1 の標的であることが遺伝子発現解析(ルシフェラーゼレポーターアッセイ)により確認された。更に、樹状細胞と T 細胞の同種リンパ球混合培養反応により、SMG1 阻害剤で活性化した樹状細胞が T 細胞の活性化も誘導することが明らかとなった。つまり、SMG1 のキナーゼ活性を操作する事で、樹状細胞による自然免疫応答を活性化し、更に T 細胞の獲得免疫の活性化も誘導することが明らかとなった。

以上の結果より、Regnase-1 による翻訳初期段階のバイオアラウンド翻訳の mRNA 分解が、迅速に炎症性 mRNA の翻訳状態を解消し、素早くそして効率的に炎症の終結を誘導していることが明らかとなった。更に、SMG1-UPF1-Regnase-1 経路による RNA 分解は免疫応答に重要な制御機構であり、UPF1 による RNA の構造変化が Regnase-1 による RNA 分解のスイッチとして働き、巧妙に RNA 分解を制御し、タンパク質の産生量をコントロールしていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakatsuka Yoshinari, Yaku Ai, Handa Tomohiro, Vandenbon Alexis, Hikichi Yuki, Motomura Yasutaka, Sato Ayuko, Yoshinaga Masanori, Tanizawa Kiminobu, Watanabe Kizuku, Hirai Toyohiro, Chin Kazuo, Suzuki Yutaka, Uehata Takuya, Mino Takashi, Tsujimura Tohru, Moro Kazuyo, Takeuchi Osamu	4. 巻 57
2. 論文標題 Profibrotic function of pulmonary group 2 innate lymphoid cells is controlled by regnase-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Respiratory Journal	6. 最初と最後の頁 2000018 ~ 2000018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1183/13993003.00018-2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamasoba Daichi, Sato Kei, Ichinose Takuya, Imamura Tomoko, Koepke Lennart, Joas Simone, Reith Elisabeth, Hotter Dominik, Misawa Naoko, Akaki Kotaro, Uehata Takuya, Mino Takashi, Miyamoto Sho, Noda Takeshi, Yamashita Akio, Standley Daron M., Kirchhoff Frank, Sauter Daniel, Koyanagi Yoshio, Takeuchi Osamu	4. 巻 4
2. 論文標題 N4BP1 restricts HIV-1 and its inactivation by MALT1 promotes viral reactivation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Microbiology	6. 最初と最後の頁 1532 ~ 1544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41564-019-0460-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mino Takashi, Iwai Noriki, Endo Masayuki, Inoue Kentaro, Akaki Kotaro, Hia Fabian, Uehata Takuya, Emura Tomoko, Hidaka Kumi, Suzuki Yutaka, Standley Daron M, Okada-Hatakeyama Mariko, Ohno Shigeo, Sugiyama Hiroshi, Yamashita Akio, Takeuchi Osamu	4. 巻 47
2. 論文標題 Translation-dependent unwinding of stem-loops by UPF1 licenses Regnase-1 to degrade inflammatory mRNAs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 8838 ~ 8859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz628	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tomita Takeshi, Kato Masayoshi, Mishima Taishi, Matsunaga Yuta, Sanjo Hideki, Ito Ken-ichi, Minagawa Kentaro, Matsui Toshimitsu, Oikawa Hiroyuki, Takahashi Satoshi, Takao Toshifumi, Iwai Noriki, Mino Takashi, Takeuchi Osamu, Maru Yoshiro, Hiratsuka Sachie	4. 巻 12
2. 論文標題 Extracellular mRNA transported to the nucleus exerts translation-independent function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23969-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mino Takashi, Takeuchi Osamu	4. 巻 304
2. 論文標題 Regnase 1-related endoribonucleases in health and immunological diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunological Reviews	6. 最初と最後の頁 97 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imr.13023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akaki Kotaro, Ogata Kosuke, Yamauchi Yuhei, Iwai Noriki, Tse Ka Man, Hia Fabian, Mochizuki Atsushi, Ishihama Yasushi, Mino Takashi, Takeuchi Osamu	4. 巻 10
2. 論文標題 IRAK1-dependent Regnase-1-14-3-3 complex formation controls Regnase-1-mediated mRNA decay	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e71966
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.71966	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Mino Takashi, Takeuchi Osamu
2. 発表標題 Unwinding of stem-loops by UPF1 licenses Regnase-1 to degrade inflammatory mRNAs
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三野享史
2. 発表標題 Regnase-1による炎症性mRNA分解機構
3. 学会等名 第7回CCR4-NOT研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三野享史
2. 発表標題 RNA structure profiling reveals differential accessibility to regulatory RBPs in responses to immune stimulation
3. 学会等名 第8回CCR4-NOT研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三野享史
2. 発表標題 炎症におけるRNA制御の分子基盤
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学大学院医学研究科医化学分野竹内研究室HP  <a href="https://mc.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/index.html">https://mc.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/index.html</a></p> <p>炎症が制御される新たなRNA分解メカニズムを解明 - 新たな免疫賦活法の開発に道筋 -  <a href="http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2019/190722_2.html">http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2019/190722_2.html</a></p> <p>炎症が制御される新たなメカニズムの解明  <a href="https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2021-10-19-2">https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2021-10-19-2</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	竹内 理  (Takeuchi Osamu)  (10379092)	京都大学・大学院医学研究科・教授    (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関