

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659186

研究課題名（和文） RNA 修飾と自己識別：自己免疫疾患発症の新たな分子機構

研究課題名（英文） RNA modification and self-discrimination: A possible link to the pathogenesis of autoimmune disease

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

研究成果の概要（和文）：生体内の機能性 RNA は多数の修飾を受けている。RNA 修飾と自己免疫疾患との関連を明らかにするために、RNA に結合する人工抗体の作製および修飾欠損モデル（ゼブラフィッシュ）の作製を試みた。その結果、自己抗体が結合する RNA 部位（エピトープ）を認識する人工抗体の作製に成功した。また、ゼブラフィッシュの RNA 修飾欠損モデルを用いて、脊椎動物の初期発生における RNA 修飾の重要性を初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Non-coding RNAs undergo various posttranscriptional modifications. To investigate the physiological relevance of RNA modifications in autoimmune diseases, we generated artificial anti-RNA antibodies that bind to the epitope for patient autoantibodies and developed a zebrafish model of defective RNA modifications. Impaired RNA modification led to severe morphological defects and embryonic lethality in zebrafish, which suggests that RNA modifications play an important role in vertebrate development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	390,000	3,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：RNA 修飾、ノンコーディング RNA、抗 RNA 抗体、リボソーム RNA、snoRNA

## 1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質に翻訳されないノンコーディング RNA (ncRNA) が生体内で多数存在することが明らかとなり、その生理作用に大きな関心が寄せられていた (RNA 新大陸の発見)。これらの RNA は通常メチル化など種々の修飾を受けているが、その役割は不明

であった。

(2) 自己免疫疾患の全身性エリテマトーデス (SLE) 患者の血清から、リボソーム RNA (rRNA) に対する抗体が多数見つかった。一方、自然免疫を活性化する因子のひとつに DNA が知られていた。この場合、DNA

修飾の欠損が免疫活性化の原因になると考えられていた。そこで、SLE 発症に RNA 修飾の欠損が大きく関わっていると推測した。また、RNA 修飾と自然免疫との関わりを示唆する論文も米国のグループにより報告されていた。

## 2. 研究の目的

RNA 修飾と自己免疫疾患の関連を明らかにするために、SLE 患者の自己抗体のエピトープに結合する人工抗体を作製する。また、RNA 修飾が欠損したゼブラフィッシュモデルを作製し、これを用いて RNA 修飾の生理機能および SLE 発症の分子機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 抗 RNA 抗体認識部位における RNA 修飾の同定：SLE 患者の自己抗体が認識する部位として、ヒト 28S rRNA の 1944-2002 番目のヌクレオチドの領域および U1 snRNA が知られている。そこで、この領域にある RNA 修飾をデータベースから検索した。また、質量分析計を用いた RNA フラグメントの解析による RNA 修飾の同定を試みた。

(2) 自己抗体のエピトープに結合する人工抗体の作製：ファージ提示型の人工抗体ライブラリーを用いて、SLE 患者の自己抗体のエピトープに結合する抗体ファージを単離した。抗体ライブラリーは、連携研究者の高柳が開発したものを用い、抗原は、28S rRNA および U1 snRNA を化学合成または *in vitro* 転写で合成した。また、得られた抗体クローンから、ヒト型の IgG を合成した。ファージ抗体および IgG の結合特異性は ELISA 法およびドットプロット法で確認した。

(3) RNA 修飾を識別する人工抗体の単離：前述の人工抗体ライブラリーを用いて、RNA 修飾の有無を識別できる抗体の単離を試みた。抗原は化学合成により RNA オリゴに修飾を付加したものを用いた。

(4) RNA 修飾欠損モデル動物の作製・解析：ゼブラフィッシュの受精卵にモルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を注入して、RNA 修飾に働くタンパク質 (フィブリラリン、ディスクレリン) または RNA 修飾をガイドする核小体低分子 RNA (snoRNA) の発現を阻害した。表現型を解析するとともに、ゼブラフィッシュ胚から rRNA を抽出して、RNA 修飾の状態を質量分析計で解析した。

## 4. 研究成果

(1) 人工抗体ライブラリーからの抗 RNA

## 抗体の単離

ファージディスプレイ型の人工抗体ライブラリーから RNA を認識する抗体 (抗 RNA 抗体) の単離を試みた。抗原として rRNA および U1 snRNA の自己抗体認識部位を用いてスクリーニングを行った。その結果、これらの RNA に結合する抗体ファージを複数単離することに成功した。また、得られたファージクローンを用いてヒト型の IgG の合成にも成功した。IgG の産生能力を上げるために、ベクターの改良、培養条件の検討も行った。抗体のスクリーニングから IgG の作製までの一連の技術について特許を出願した (特願 2011-098698)。通常の動物を免疫する方法では抗 RNA 抗体を得ることはきわめて困難である。ファージディスプレイ型抗体ライブラリーを用いる本手法は、抗 RNA 抗体を取得するための有効な手段になると考えられる。また、今回得られた抗体は、ncRNA と自己免疫疾患の関連を解析するための有効なツールになると期待される。

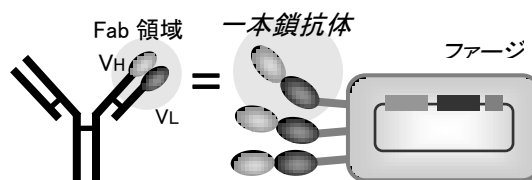


図 1. 抗体と抗体提示ファージ

H鎖とL鎖の変換領域をリンカーでつないだ一本鎖抗体をファージ表面へ提示。VHとVLの組み合わせで $1 \times 10^{11}$ 以上のレパートリーをもつライブラリーが作製可能

## (2) RNA 修飾を識別する人工抗体の単離

前述の人工抗体ライブラリーを用いて、RNA 修飾の有無を識別できる抗体の単離を試みた。化学合成で修飾を取り込ませた U1 snRNA を抗原として同様な方法でスクリーニングを行い、複数のクローンを単離した。現在、抗体の結合特異性について ELISA 法で検討している。DNA の修飾と同様に RNA 修飾も重要な機能を持っていると考えられるが、その機能は不明である。修飾を認識する抗体は、修飾の機能を解析するための強力なツールになると期待される。

## (3) ゼブラフィッシュを用いた RNA 修飾の機能解析 (RNA 修飾酵素)

ゼブラフィッシュを用いて修飾に働くタンパク質 (フィブリラリン、ディスクレリン) 遺伝子のノックダウン (翻訳阻害) を行った。それぞれの修飾酵素の mRNA に対するモルフォリノアンチセンスオリゴを受精卵に注入し、顕微鏡下で初期発生を観察した結果、脳構造の異常、浮腫の形成、血球形成の遅延、

器官原基・色素細胞（黒色細胞・虹色細胞）の形成不全などの表現型が得られた。ノックダウン胚は約 1 週間で致死となることから、これらの RNA 修飾酵素は個体発生に必須であることが明らかになった。また、ディスクレリンのノックダウン胚では、ヘモグロビン染色による血球数の減少も観察されたことから、骨髄不全を主症状とする先天性角化不全症のモデルとして有効であると考えられる。

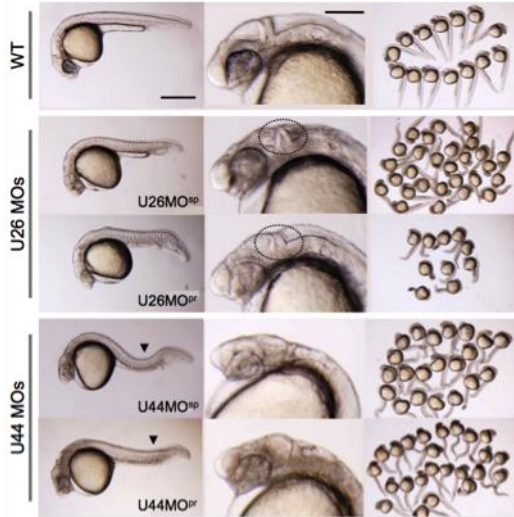


図2 ゼブラフィッシュの解析  
U26, U44 snoRNA の発現をモルフォリノアンチセンスオリゴで阻害

(5) ゼブラフィッシュを用いた RNA 修飾の機能解析 (snoRNA)

イントロン内にコードされた U26 snoRNA と U44 snoRNA の発現を抑えるために、モルフォリノアンチセンスオリゴを受精卵に注入して、宿主遺伝子のスプライシングまたは snoRNA 前駆体のプロセッシングを阻害した。これらの胚は、24 時間で顕著な発育遅滞を示し、頭部の形成や尾部などに異常が見られた。また、7 日以内にすべて死に至った。

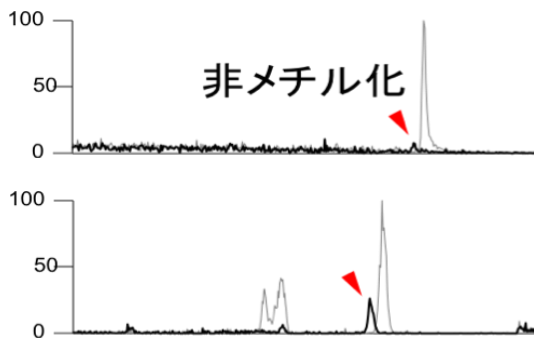


図3 質量分析計による非メチル化 RNA フラグメントの定量  
U26 の発現阻害により 28S rRNA の非メチル化フラグメントが増加

一方、SNORD26 阻害胚において、28S rRNA の修飾を質量分析計で解析したところ、SNORD26 の標的である 398 番目のアデノシンのメチル化が特異的に低下していることが確認された。ヒトのリボソーム RNA は 103 カ所のヌクレオチドがメチル化を受けている。今回、ゼブラフィッシュにおいて 1 カ所のメチル化を阻害するだけで初期発生に大きな影響を与えることが明らかになった。高等動物において RNA 修飾が重要な役割を担っているものと考えられる。

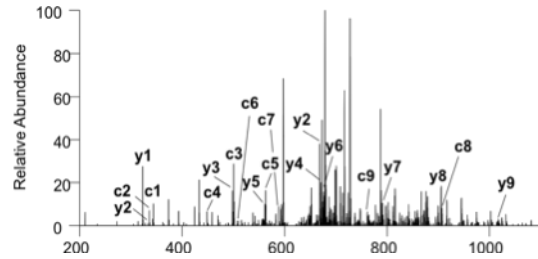


図4 CID スペクトルの解析  
U26 の標的である 398 番目のアデノシンのメチル化が特異的に低下

#### 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 6 件)

- ① Iwakiri, J., Tateishi, H., Chakraborty, A., Patil, P. and Kenmochi, N. Dissecting the protein-RNA interface: the role of protein surface shapes and RNA secondary structures in protein-RNA recognition. *Nucleic Acids Res.* 40, 3299-3306, 2012. 査読有り
- ② Higa-Nakamine, S., Suzuki, T., Uechi, T., Chakraborty, A., Nakajima, Y., Nakamura, M., Hirano, N., Suzuki, T. and Kenmochi, N. Loss of ribosomal RNA modification causes developmental defects in zebrafish. *Nucleic Acids Res.* 40, 391-398, 2012. 査読有り
- ③ 剣持直哉. リボソーム病と p53 経路. 医学のあゆみ (RNA 医学・医療), 238, 476-480, 2011. 査読無し
- ④ Chakraborty, A., Uechi, T. and Kenmochi, N. Guarding the 'Translation Apparatus': Defective ribosome biogenesis and the p53 signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2, 507-522, 2011. 査読有り
- ⑤ Torihara, H., Uechi, U., Chakraborty, A., Shinya, M., Sakai, N. and Kenmochi, N. Erythropoiesis failure due to RPS19 deficiency is independent of an activated p53 response in a zebrafish model of

Diamond-Blackfan anaemia. *Brit. J. Haematol.* 152, 648-654, 2011. 査読有り

- ⑥ Chang, C., Takayanagi, A., Yoshida, T. and Shimizu, N. Screening of scFv-displaying phages recognizing distinct extracellular domains of EGF receptor by target-guided proximity labeling method. *J. Immunol. Methods*, 372, 127-136, 2011. 査読有り
- [学会発表] (計 3 1 件)
- ① N. Kenmochi, S. Higa-Nakamine, T. Uechi, A. Chakraborty, Y. Nakajima, T. Suzuki and T. Suzuki : Loss of snoRNA expression impairs ribosomal RNA modification and causes developmental defects in zebrafish. Keystone Symposia: Protein-RNA Interactions in Biology and Disease. 3/4-9, 2012, Santa Fe.
- ② 上地球代, 中島由香里, 鳥原英嗣, 剣持直哉 : リボソームの異常と赤血球形成不全: ゼブラフィッシュを用いた解析. 第34回日本分子生物学会年会. 12/13-16, 2011, 横浜.
- ③ G.V. Yadav, A. Chakraborty, T. Uechi and N. Kenmochi : Development of transgenic zebrafish using RNAi technology to investigate the role of ribosome in cancer. 第34回日本分子生物学会年会. 12/13-16, 2011, 横浜.
- ④ A. Chakraborty, T. Uechi and N. Kenmochi : When p53 senses faulty ribosomes: Dynamics of c-Myc target nucleolar proteins and their correlation with Tp53 response in Rpl11-deficient zebrafish. 第34回日本分子生物学会年会. 12/13-16, 2011, 横浜.
- ⑤ 高柳淳, 吉田徹彦, 清水信義 : Efficient Production of Recombinant Antibodies in Mammalian Cells by Transient Transfection of Expression Vectors with 2.5K "PEI-MAX". 第34回日本分子生物学会年会. 12/13-16, 2011, 横浜.
- ⑥ 剣持直哉 : ゼブラフィッシュをモデルとしたリボソーム病発症の分子機構の解析. 第84回日本生化学会大会 (シンポジウム招待講演) 9/21-24, 2011, 京都.
- ⑦ A. Chakraborty, T. Uechi and N. Kenmochi : Ribosomal stress and the p53 network: An activated Tp53 response in Rpl11-deficient zebrafish correlates with an upregulated c-Myc activity. Protein Synthesis and Translational Control. 9/7-11, 2011, Heidelberg.
- ⑧ A. Chakraborty, T. Uechi and N. Kenmochi : Ribosomal integrity and p53 pathway: Induction of Tp53 in Rpl11-deficient zebrafish correlates with enhanced transcription of c-Myc and its target genes involved in ribosome biogenesis. RNA 2011:

Sixteenth Annual Meeting of the RNA Society. 6/14-18, 2011, Kyoto.

- ⑨ T. Uechi, Y. Nakajima, H. Torihara and N. Kenmochi : Defective erythropoiesis and ribosomal dysfunction in zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. RNA 2011: Sixteenth Annual Meeting of the RNA Society. 6/14-18, 2011, Kyoto.
- ⑩ 高柳淳 : ヒトゲノム情報と人工抗体ライブラリーを活用したプロテオーム解析の新戦略, 第33回日本分子生物学会年会. 12/13-16, 2010, 神戸.

[図書] (計 1 件)

- ① Chakraborty, A. and Kenmochi, N. Ribosomes and ribosomal proteins: more than just 'housekeeping'. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2012 (in press) 査読有り

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 抗 RNA 抗体のスクリーニング方法及び RNA 抗体の製造方法

発明者 : 剣持直哉、吉浜麻生、高柳淳、清水信義

権利者 : 宮崎大学、慶應義塾

種類 :

番号 : 特願 2011-098698

出願年月日 : 2011 年 4 月 26 日

国内外の別 : 国内

[その他]

ホームページ等

① snoRNA データベース

<http://snoopy.med.miyazaki-u.ac.jp/>

② RPG データベース

<http://ribosome.med.miyazaki-u.ac.jp/>

③ ホームページ

<http://ribosome.med.miyazaki-u.ac.jp/lab/>

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