

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460567

研究課題名(和文)新しい遺伝子発現制御による女性生殖器特異的IFNの局所発現メカニズムの解明

研究課題名(英文)Study on local regulation of gene expression of female reproductive-specific IFN

研究代表者

松宮 朋穂 (MATSUMIYA, TOMOH)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：30344592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：IFN- は生殖器特異的な型IFNである。申請者らは以前にimportin 9 (IPO9)がIFN- の遺伝子発現に重要な役割を果たしていることを見出した。本研究ではIPO9をはじめとしたIFN- 局所発現機構の解明を目指した。IFN- mRNAの5'非翻訳領域の解析結果から、IPO9はIFN-mRNAの安定化に影響を与えないことが分かった。また、IPO9と相互作用するタンパク質の存在が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：IFN- is unique reproductive-specific type I IFN. We have shown that importin 9 (IPO9) regulate IFN- . In this study, we focused on local regulation of gene expression of IFN- . Analysis for 5' untranslated region of IFN- mRNA showed that IPO9 unaffected mRNA stability of IFN- . In addition we found molecules that can interact with IPO9.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 産婦人科 感染症 IFN

## 1. 研究開始当初の背景

インターフェロン(IFN)- $\beta$ は、女性生殖器特異的に恒常的に発現しているI型IFNであり、IFN- $\beta$ の発現量と、性感染症関連病原体に対する宿主の感染抵抗性には正の相関があることが実験動物で検証されていた。

申請者らによるこれまでの知見から、抗ウイルスシグナルによるI型IFNの発現誘導が必須であり、女性生殖器においてはIFN- $\beta$ の発現誘導が抗ウイルス応答に必須であることが明らかとなった。

IFN- $\beta$ の発現調節機構の解明は、性感染症に対する宿主の局所免疫応答の理解へ向け、極めて重要な検討課題であるが、その詳細は不明であった。

申請者は以前、IFN- $\beta$  mRNAが転写後調節を受けていることを報告したが、さらに詳細な検討を行ったところ、IFN- $\beta$  mRNAの5'非翻訳領域(UTR)は比較的長く、特徴的なループ構造が2つ存在することが判明した。

申請者はループ部に作用するタンパク質の存在を予想して生化学的解析を行い、Importin 9(IPO9)を同定した。その後の解析から申請者らはIPO9による塩基配列や組織(細胞)に特異的な遺伝子発現調節を予想した。

## 2. 研究の目的

申請者らは、性感染症の克服へ向けた宿主の局所免疫応答の解明を目指しており、特に性感染症と密接な関わりがあるとされるIFN- $\beta$ の局所特異的な発現機構の解明を研究目標とした。

目標達成へ向けて、申請者らがIFN- $\beta$ の発現制御分子として同定したIPO9に着目し

つつ、1. IFN- $\beta$  mRNAの恒常的な発現調節機構を明らかにする、2. IFN- $\beta$ の発現誘導因子を探索する、3. IPO9をはじめとする、IFN- $\beta$ 遺伝子発現に関与する分子(群)の生殖器における発現を検討し、IFN- $\beta$ の局所特異性を規定する因子を同定する、以上の項目を明らかにすることを研究目的とした。

## 3. 研究の方法

IPO9によるIFN- $\beta$  mRNA 5'非翻訳領域(5'UTR)を介した転写後調節の有無について、5'UTR依存的なmRNAの安定化(或いは分解)作用を検討するため、mRNAの半減期解析をおこなった。さらに、この半減期に対するIPO9の影響を、IPO9に対するRNA干渉法を用いて検討した。5'UTR依存的な作用の検証には、IFN- $\beta$ の5'UTRを外因性の遺伝子(レポーター遺伝子)の5'UTRと置換したベクターやループ構造に対する各種変異体の発現ベクターを用いた。

IPO9とタンパク質相互作用する分子(群)の同定をおこなった。IPO9の免疫沈降後、タンパク質を電気泳動した。ゲルを染色後、IPO9免疫沈降サンプルでのみ特異的にみられるバンドを抽出し、質量分析法でタンパク質を同定した。

同定された個々のタンパク質につき、HeLa細胞での遺伝子発現を確認した。発現がみられる遺伝子群のタンパク質コード領域をクローニングしたのち、哺乳細胞発現ベクターに組み込んだ。このベクターをIPO9発現ベクターとともにHeLa細胞内に遺伝子導入し、IPO9とのタンパク質相互作用を免疫沈降法で検討した。

## 4. 研究成果

IFN- $\beta$  mRNAの安定化は5'UTRに依存

した。これに対して IPO9 の発現抑制や過剰発現は内因性 IFN- mRNA や IFN- 5'UTR - luciferase 融合 mRNA の半減期に影響を与えなかった。これらの結果から、IPO9 は IFN- mRNA の安定化には関与しないことが示唆された。

IPO9 と相互作用するタンパク質を同定するため IPO9 に対する免疫沈降抗および、質量分析法による解析を行ったところ、数種類のタンパク質が同定された。

それらの HeLa 細胞における遺伝子発現を確認したところ、一部のタンパク質の発現が確認できなかった。この原因として、質量分析法の擬陽性や、HeLa 細胞内での遺伝子スプライシングなどが考えられた。

HeLa 細胞内での発現が確認された遺伝子をクローニング後、IPO9 との結合実験を行ったところ、タンパク質間相互作用が認められ、実験的にタンパク質間の IPO9 との相互作用が示された。

#### 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 12 件)

#### 以下の論文は全て査読有

1. Shirai K, Shimada T, Yoshida H, Hayakari R, Matsumiya T, Tanji K, Murakami M, Tanaka H, Imaizumi T. Interferon (IFN)-induced protein 35 (IFI35) negatively regulates IFN- $\beta$ -phosphorylated STAT1-RIG-I-CXCL10/CCL5 axis in U373MG astrocytoma cells treated with polyinosinic-polycytidylic acid. *Brain Res.* 2017 Mar 1;1658:60-67.
2. Imaizumi T, Yano C, Numata A, Tsugawa K, Hayakari R, Matsumiya T, Yoshida H,

Watanabe S, Tsuruga K, Kawaguchi S, Murakami M, Tanaka H. Interferon (IFN)-Induced Protein 35 (IFI35), a Type I Interferon-Dependent Transcript, Upregulates Inflammatory Signaling Pathways by Activating Toll-Like Receptor 3 in Human Mesangial Cells. *Kidney Blood Press Res.* 2016;41(5):635-642.

3. Hayakari R, Matsumiya T, Xing F, Yoshida H, Hayakari M, Imaizumi T. Critical Role of IRF-3 in the Direct Regulation of dsRNA-Induced Retinoic Acid-Inducible Gene-I (RIG-I) Expression. *PLoS One.* 2016 Sep 23;11(9):e0163520.
4. Xing F, Matsumiya T, Shiba Y, Hayakari R, Yoshida H, Imaizumi T. Non-Canonical Role of IKK $\alpha$  in the Regulation of STAT1 Phosphorylation in Antiviral Signaling. *PLoS One.* 2016 Dec 19;11(12):e0168696.
5. Xing F, Matsumiya T, Hayakari R, Yoshida H, Kawaguchi S, Takahashi I, Nakaji S, Imaizumi T. Alteration of Antiviral Signalling by Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of Mitochondrial Antiviral Signalling Protein (MAVS). *PLoS One.* 2016 Mar 8;11(3):e0151173.
6. Chiba Y, Matsumiya T, Satoh T, Hayakari R, Furudate K, Xing F, Yoshida H, Tanji K, Mizukami H, Imaizumi T, Ito E. Retinoic acid-inducible gene-I-like receptor (RLR)-mediated antiviral innate immune responses in the lower respiratory tract: Roles of TRAF3 and TRAF5. *Biochem Biophys Res Commun.*

- 2015 Nov 13;467(2):191-6.
7. Imaizumi T, Aizawa T, Segawa C, Shimada M, Tsuruga K, Kawaguchi S, Matsumiya T, Yoshida H, Joh K, Tanaka H. Toll-like receptor 3 signaling contributes to the expression of a neutrophil chemoattractant, CXCL1 in human mesangial cells. Clin Exp Nephrol. 2015 Oct;19(5):761-70.
  8. Imaizumi T, Sakashita N, Mushiga Y, Yoshida H, Hayakari R, Xing F, Wang L, Matsumiya T, Tanji K, Chiba Y, Furudate K, Kawaguchi S, Murakami M, Tanaka H. Desferrioxamine, an iron chelator, inhibits CXCL10 expression induced by polyinosinic-polycytidylic acid in U373MG human astrocytoma cells. Neurosci Res. 2015 May;94:10-6.
  9. Meng P, Yoshida H, Tanji K, Matsumiya T, Xing F, Hayakari R, Wang L, Tsuruga K, Tanaka H, Mimura J, Kosaka K, Itoh K, Takahashi I, Kawaguchi S, Imaizumi T. Carnosic acid attenuates apoptosis induced by amyloid- $\beta$  1-42 or 1-43 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Neurosci Res. 2015 May;94:1-9.
  10. Itoh K, Ye P, Matsumiya T, Tanji K, Ozaki T. Emerging functional cross-talk between the Keap1-Nrf2 system and mitochondria. J Clin Biochem Nutr. 2015 Mar;56(2):91-7.
  11. Sakaki H, Matsumiya T, Furudate F, Kobayashi W, Kon T, Itoh R, Kimura H. Identification of a point mutation in the SH3BP2 gene in cherubism. J Oral Maxillo Surg Med Pathol. 2015: 28 880-3.
  12. Tanji K, Miki Y, Ozaki T, Maruyama A,

Yoshida H, Mimura J, Matsumiya T, Mori F, Imaizumi T, Itoh K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Phosphorylation of serine 349 of p62 in Alzheimer's disease brain. Acta Neuropathol Commun. 2014 May 3;2:50. doi: 10.1186/2051-5960-2-50.

〔学会発表〕(計 1件)

1. Matsumiya T, Hayakari R, Xing F, Yoshida H, Imaizumi T. Cell differentiation modulates intracellular antiviral responses in neuronal cells. 12th International Congress of Neuroimmunology. Nov9-13, 2014 Mainz, Germany

〔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  
松宮 朋穂 (MATSUMIYA TOMOH)

弘前大学・医学研究科・助教  
研究者番号：30344592

(2)研究分担者

今泉 忠淳 ( IMAIZUMI TADAATSU )

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号： 90232602

(3)連携研究者

(       )

研究者番号：

(4)研究協力者

(       )