

RNA 分解による自然免疫調節メカニズムの解析

京都大学 ウイルス研究所 感染防御研究分野
竹内 理

1. はじめに

自然免疫はマクロファージや樹状細胞などにより担われゲノム上にコードされた受容体により病原体を認識し、初期の病原体の排除や炎症応答に重要なシステムである[1]。炎症の惹起、調節には、インターロイキン (IL) -1、IL-6、腫瘍壊死因子 (TNF) など炎症性サイトカインが関わる事が知られている。これらのサイトカインは、活性化したマクロファージや樹状細胞から、病原体の感染に際し産生される。自然免疫に関わる病原体認識受容体ファミリーとしてToll-like receptor (TLR)などが知られている[1]。TLRはNF- κ BやAP-1と言った転写因子を活性化し、サイトカイン遺伝子の転写を開始する。しかしながら、サイトカインなどをコードするmRNAは、microRNAや様々なRNA結合タンパク質により転写後制御を受けその発現量が精緻にコントロールされていることが知られている。これにはmRNAの3' untranslated region (UTR)に存在するAU rich配列に結合するTTPやStem loopに結合するRoquinなどが有る。これらのタンパク質はP bodyやStress granuleと言った細胞内小器官に局在し、標的mRNAを不安定化している。

私はIL-6を始めとした免疫関連mRNAを分解する酵素Regnase-1をTLR刺激により誘導される遺伝子Zc3h12aとして同定した[2]。Regnase-1はRNase領域と、CCCH型Zinc finger領域を持ち、IL6 mRNAと結合、その3' UTRに存在するStem-loop領域を介して分解する [2]。Regnase-1タンパク質はマクロファージにおいてTLR刺激により分解され、炎症の過程で動的な制御を受ける [3]。また、Regnase-1欠損マウス由来のマクロファージはTLRリガンドによる刺激に対するIL-6やIL-12p40などの産生が亢進していた。Regnase-1欠損マウスは成長遅延を示し、生後12週までにほぼ全例死亡した。Regnase-1欠損マウスは血清中の様々なクラスの免疫グロブリンが増加しており、また、抗核抗体、抗2本鎖DNA抗体など自己抗体を産生した。Regnase-1欠損下ではプラズマ細胞の増加、またエフェクターT細胞の増加が観察された。Regnase-1欠損マウスの組織観察を行うと、肺などの組織へのリンパ球、特にプラズマ細胞の浸潤が著明であり、肺においてIgGやIgA産生細胞の著明な増加を認めた。しかしながら、Regnase-1欠損下での炎症性疾患発症の病態や、その分子メカニズムには不明な点も多い。本研究では1.細胞種特異的Regnase-1欠損マウスを作製することにより、その病態に重要な細胞としてT細胞を同定し、T細胞におけるRegnase-1の役割を解明し、2. また、その分子機構を解析し、他のmRNA不安定化タンパク質とは異なり、Ribosomeと結合し翻訳とカップルしてmRNA分解を誘導することを見出した。

2. 方法

2-1. T細胞におけるRegnase-1の機能解析、T細胞におけるRegnase-1の修飾

Regnase-1欠損によって惹起される炎症のメカニズムを検討するために、Cre-loxPシステムを用いて、細胞種特異的Regnase-1欠損マウスを作製した。特に、CD4Creマウスと交配させることによりT細胞特異的Regnase-1欠損マウスを得た。このマウスの二次リンパ組織におけるT細胞の数、活性化

をFACSで検討すると共に、T細胞をソートしT細胞刺激に対するサイトカイン産生を検討した。また、野生型、変異マウス由来の脾臓CD4⁺T細胞における遺伝子発現をRNA sequencingを用いて網羅的に解析し、Regnase-1欠損下で発現上昇する一群のmRNAを得た。これらの遺伝子がRegnase-1の直接の標的となるか強制発現系を用いて検証を行った。また、MALT1のRegnase-1タンパク質発現における影響をその遺伝子欠損マウスや、強制発現系を用いて解析した。

2-2. Regnase-1による標的mRNA分解機構の解明

Regnase-1の細胞内局在をRegnase-1安定発現株を用いて免疫染色し共焦点顕微鏡を用いて解析した。また、細胞内のERを始めとした小器官を精製し、タンパク質を抽出、Western blot法を用いてRegnase-1の発現を検討した。また、iTRAQ法を用いてRegnase-1をPull downした際に共沈してくるタンパク質を網羅的に同定した。更に翻訳阻害剤下で細胞でのRegnase-1強制発現による標的mRNA分解を検討することにより、Regnase-1活性における翻訳装置の役割を解析した。

3. 結果 研究成果

3-1. T細胞におけるRegnase-1の機能解析、T細胞におけるRegnase-1修飾

CD4-Cre+Regnase-1 floxマウスではT細胞特異的にRegnase-1が欠損しており、このマウスは全身でRegnase-1を欠損するマウスと同様の炎症性疾患を発症した。T細胞でRegnase-1が欠損するだけで、様々な臓器への炎症細胞浸潤や著明な脾腫を認め、エフェクターT細胞やプラズマ細胞が増加していた。また、T細胞受容体刺激によるCD4⁺T細胞からのサイトカイン産生も亢進しており、T細胞に発現するRegnase-1がT細胞活性化を抑制する役割を果たしている事が明らかとなった。CD4⁺T細胞における標的mRNAをTranscriptome解析により検討すると、サイトカインであるIL2や細胞表面分子であるICOS、OX40、転写因子の中でもc-RelがRegnase-1により分解されている事が明らかとなり、Regnase-1は細胞種毎に特異的mRNAを標的として免疫細胞活性化を調節していると考えられた[4]。

また、Regnase-1はT細胞においても動的制御を受けていることが明らかとなってきた。T細胞受容体の活性化シグナル伝達によっても、Regnase-1の分解を認めるが、その機構はプロテオソーム阻害剤によっても抑制されず、マクロファージのTLR刺激に対する分解機構とは異なると考えられた。T細胞でのRegnase-1分解は、BCL10やMALT1/paracaspaseを欠損する細胞では認めず、BCL10、MALT1複合体が重要であった。MALT1はキャスパーゼのようにアルギニン残基の次の基質を切断する蛋白質分解酵素活性を持ち、T細胞においてNF- κ B活性化に重要なタンパク質である。我々はMALT1プロテアーゼ活性阻害薬であるzVRPR-fmkでT細胞を処理すると、T細胞受容体刺激に対するRegnase-1分解が起こらなくなることを見出した。また、MALT1はRegnase-1を111番目のアルギニン残基の次で切断する活性を持つことを見出した。Regnase-1の111番目のアルギニンをアラニンに置換した変異体は、T細胞受容体刺激に対しても分解を受けなかったことから、MALT1によるRegnase-1切断がその分解、タンパク質不安定性に重要であることが明らかとなった。従って、T細胞は刺激に対し、MALT1によりRegnase-1を分解しエフェクター分子のmRNA安定性を介してその発現を調節することが示唆された[4]。

3-2. Regnase-1による標的mRNA分解機構の解明

Regnase-1の細胞内局在を共焦点顕微鏡により観察したところ、これまでのRNA結合タンパク質の局在領域として知られたP bodyやStress granuleには局在せず、Ribosomeタンパク質と共局在し、Endoplasmic reticulum (ER) や細胞質に存在することが明らかとなった。また、同時に、Regnase-1

結合タンパク質をFlag-Regnase-1発現、非発現細胞を用いてFlag抗体によりPull downしiTRAQ法により検討した。その結果、Regnase-1と共に多くのリボソームタンパク質がPull downされてくることが明らかとなった。リボソームとRegnase-1の結合は、リコンビナントタンパク質同士のPull downアッセイでも再現することが出来た。また、Regnase-1が標的mRNAを細胞内で分解するにはアクティブな翻訳装置が働いていることが必要であることも明らかとなった（論文投稿準備中）。

4. 考察 まとめ

本研究では、Regnase-1による免疫制御のメカニズムに関し、生体レベル、及び細胞レベルでの解析を行った。まず、T細胞特異的Regnase-1欠損マウスの作製、解析により、Regnase-1が、自然免疫細胞の活性化抑制のみならず、獲得免疫細胞であるT細胞でもその活性化調節重要であり、個体としての炎症性疾患発症の抑制に関わることが明らかとなった。また、Regnase-1はT細胞活性化の過程でも動的な調節を受けることを明らかにし、免疫細胞を活性化する外的なシグナルは、これまでの転写を介するセントラルドグマのみではなく、mRNA安定性をも直接制御することで、免疫系の調節に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。また、Regnase-1は、他のmRNA安定性調節機構とは異なり、リボソームと結合しERに局在し、翻訳機構とカップルして機能を発揮する特徴的な機構で標的mRNA量を調節していると考えられた。この機構は、サイトカインなど不必要な際に迅速なmRNAのシャットダウンを担保するために役立つのでは無いかと考えている。

5. 発表論文、参考文献

1. **Takeuchi, O.** and Akira, S., Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell** 2010. 140: 805-820.
2. Matsushita K*, **Takeuchi O***, Standley DM, Kumagai Y, Kawagoe T, Miyake T, Satoh T, Kato H, Tsujimura T, Nakamura H, Akira S. (*Equal contribution) Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. **Nature**. 458, 7242, 1185-90, Apr, 2009
3. Iwasaki, H., **Takeuchi, O.**, Teraguchi, S., Matsushita, K., Uehata, T., Kuniyoshi, K., Satoh, T., Saitoh, T., Matsushita, M., Standley, D. M. and Akira, S., The IkappaB kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR-IL-1R by controlling degradation of regnase-1. **Nature immunology** 2011. 12: 1167-1175.
4. Uehata, T., Iwasaki, H., Vandenbon, A., Matsushita, K., Hernandez-Cuellar, E., Kuniyoshi, K., Satoh, T., Mino, T., Suzuki, Y., Standley, D. M., Tsujimura, T., Rakugi, H., Isaka, Y., **Takeuchi, O.** and Akira, S. Malt1-induced cleavage of regnase-1 in CD4(+) helper T cells regulates immune activation. **Cell** 2013. 153: 1036-1049.