

**核内 ncRNA の分解抑制を介した自然免疫応答**  
東京大学アイソトープ総合センター 研究開発部  
秋光信佳

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

自然免疫システムは全ての多細胞生物が保有する感染防御機構であり、哺乳動物では獲得免疫の活性化にも重要である。また、自然免疫システムの異常はアレルギーや自己免疫疾患の原因ともなる。そのため、医療や創薬のターゲットとしても重要な生体内機構である。したがって、自然免疫を担う分子機構を解明することは、基礎生物学的な興味のみならず、新しい医療や医薬品の開発にとっても大きな意義がある。

近年、ノンコーディングRNA (ncRNA) と呼ばれる翻訳されない機能性RNA群が注目されている。中枢神経系や免疫系が複雑な高等生物ほど多種多様なncRNAを発現していることから、ヒトを含めた高等生物の生命現象や疾患の原因を理解するためには、ncRNAの機能を分子レベルで解明することが必須であると考えられている。ncRNAは、小分子ncRNAと長鎖ncRNAに大別される(図1)。小分子ncRNAの代表である

マイクロRNAは、ヒトゲノム中には約1000種類存在し、標的mRNAと特異的な相補対を形成することで標的mRNAの発現を制御して多様な生命現象に関与している。自然免

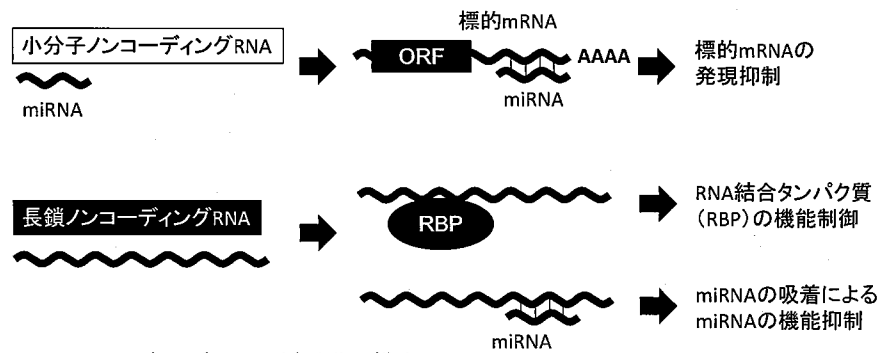
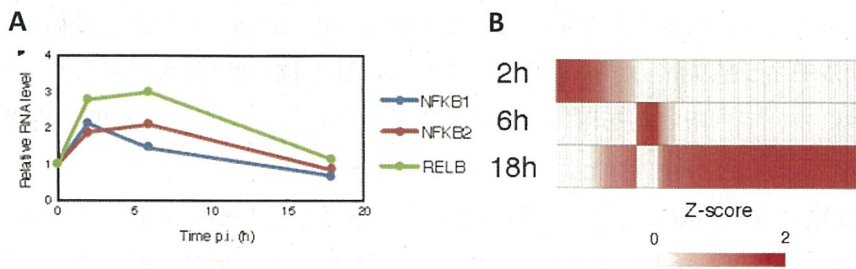


図1: ノンコーディングRNAの分類と作用様式

疫の制御に関わるマイクロRNAは多数知られている。例えば、miR-155は白血球細胞やマクロファージなどの分化における遺伝子発現の制御を担っている。また、抗原刺激された樹状細胞の活性化においても機能することが知られる。そのため、miR-155を欠損したマウスは病原菌感染に対して高感受性となることが報告されている。一方、全長が数百から数万塩基長にも及ぶ「長鎖ncRNA」は、ヒトゲノム中に数万種類がコードされている。長鎖ncRNAは、マイクロRNAと相補対を形成してマイクロRNAの機能を制御したり、特定のRNA結合タンパク質と相互作用することで、転写からRNA分解までの一連の遺伝子発現反応を制御すると考えられている。しかしながら、分子機能の判明した長鎖ncRNAは全体の1%未満であり、長鎖ncRNAの機能の全貌は未だ不明である。自然免疫系で機能すると考えられる長鎖ncRNAはlinc1992、lincRNA-Cox2、NEAT1など数種類知られるのみである。

申請者は、過去約10年に渡って長鎖ncRNAの生理機能を研究してきた。最近、核局在型長鎖ncRNAであるNEAT1が自然免疫応答における遺伝子発現制御のスイッチ分子として機能することを解明した。この研究を継続・発展する過程で、ウイルス感染はNEAT1の転写を誘導することに対し、バクテリア感染はNEAT1のRNA分解抑制を介してNEAT1量の増加を引き起こすことを見いだした。申請者の研究から、NEAT1意外にも多数の長鎖ncRNAがサルモネラ感染によって発現増加することが判明した(図2、現在投稿後のリバイス中)。



**図2: サルモネラ感染によってHeLa細胞で発現増加する長鎖ncRNA**  
 サルモネラ感染させたHeLa細胞からtotal RNAを調製し、illumina Hi-seq2500でRNA-seq解析した。A; サルモネラ感染HeLa細胞で発現増加することが知られている3種類の遺伝子(NFKB1, NFKB2, RELB)の経時的な発現変動。B; サルモネラ感染HeLa細胞で発現増加する長鎖ncRNAをヒートマップで表した。

本研究では、サルモネラ感染で発現する長鎖ncRNAの発現制御機構、ならびに長鎖ncRNAの生理的機能の解明を試みた。

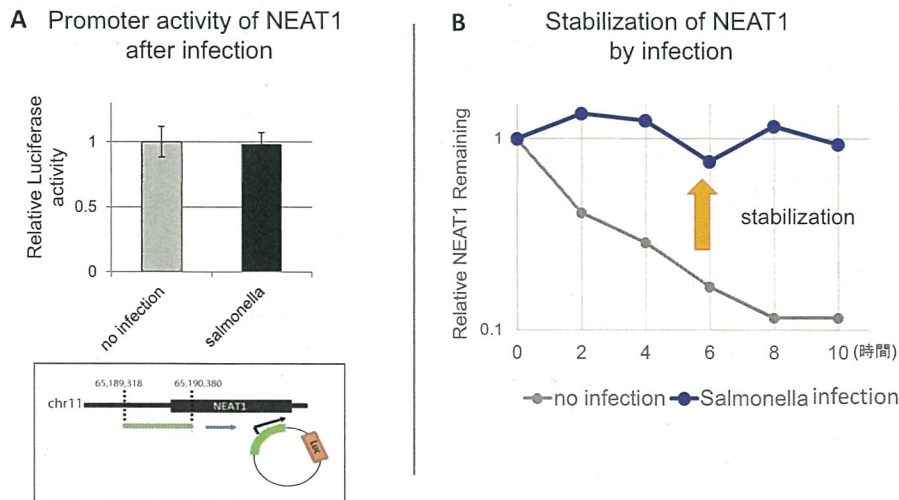
## 2. 方法

長鎖ncRNAの生理機能解明では、CRISPR/Cas9を用いた遺伝子ノックアウト法を用いて該当長鎖ncRNAノックアウト細胞を作成し、それらのサルモネラ感染に対する抵抗性の変化を定量的調べた。

長鎖ncRNAの発現制御機構の解析では、サルモネラ感染後の該当長鎖ncRNAの転写活性化の有無をDNA polymerase IIに対するクロマチン免疫沈降法で評価した。NEAT1長鎖ncRNAについては、NEAT1遺伝子のプロモーターを用いたルシフェラーゼレポーター系を用いて転写活性化を評価した。また、RNAの安定性について、申請者が開発したBRIC法（培地にBromouridineを添加することで細胞内RNAをBromouridineパルスラベルし、その後、経時的なBromouridine標識RNAの現象を定量することでBromouridine標識RNAの減少を測定し、RNA分解速度を求める方法（Tani H. et al., Genome Res., 2012; Tani H. and Akimitsu N., RNA Biol., 2012a; Tani H. et al., RNA Biol., 2012b; Imamachi N. et al., Methods, 2014; Tani H. et al., Methods Mol. Biol., 2015; Yamada T. et al., Methods Mol. Biol., 2018)）を用いた。

## 3. 結果と考察 研究成果とまとめ

サルモネラ感染後に発現増加する長鎖ncRNAについて、その遺伝子の転写活性化とRNA分解を評価した結果、その多くがRNA分解抑制によって安定化していることが分かった（図3、現在投稿後のリバイス中）。



**図3: サルモネラ感染後の長鎖ncRNAの安定化**  
 A; サルモネラ感染で発現増加するNEAT1長鎖ncRNAの転写活性化をNEAT1遺伝子プロモーターをクローニングしたレポーターアッセイ系で評価した。B; サルモネラ感染後のNEAT1のRNA分解をBRIC法で評価した。

次に、サルモネラ感染後になぜRNA分解が抑制されるかを調べた結果、サルモネラ感染後に核内RNA

分解因子がタンパク質分解されることを見いだした (data not shown、現在論文投稿してリバイス中)。さらに、サルモネラ感染後のどのようなシグナル伝達が核内RNA分解因子のタンパク質分解をになっているかについて、阻害剤を用いた系統的探索実験を行った。その結果、p38MAPKがシグナル伝達に関わっていることが分かった。

これまで、核内RNA分解が刺激に応答して制御されることは全くわかっておらず、本研究の発見は、核内RNA分解経路を利用した遺伝子発現制御メカニズムの存在を世界で初めて示した結果である。

#### 4. 発表論文、参考文献

1. Yamada T., Imamachi N., Mizutani R., Imamura K., Suzuki Y and Akimitsu N. (2017) 5' bromouridine IP Chase (BRIC)-seq to determine RNA half lives. *Methods in Mol. Biol.*, 1720, 1-13.
2. Imamura K., Imamachi N., Akizuki G., Kumakura M., Kawaguchi A., Nagata K., Kato A., Kawaguchi Y., Sato H., Yoneda M., Kai C., Yada T., Suzuki Y., Yamada T., Ozawa T., Kaneki K., Inoue T., Kobayashi M., Kodama T., Wada Y., Sekimizu K. and Akimitsu N. (2014). Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation between nuclear body paraspeckle and promoter mediates IL8 expression in response to immune stimuli. *Mol. Cell*, 53, 393-406
3. Imamura K. and Akimitsu N. (2014) Long non-coding RNAs involved in immune responses. *Front. Immunol.*, 5, 573.
4. Tani H., Mizutani R., Salam KA, Tano K., Ijiri K., Wakamatsu A., Isogai T., Suzuki Y. and Akimitsu N., (2012) Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived non-coding transcripts in mammals. *Genome Res.*, 22, 947-956.