

## 炎症が RNA 分解により制御されるメカニズムを解明 - 2つのブレーキが炎症を巧妙にストップする -

### ポイント

- Regnase-1 と Roquin という 2つの蛋白質が、炎症性サイトカインの RNA を分解することで炎症のブレーキとして働いています。
- Regnase-1 と Roquin は同じ RNA 構造を認識しますが、その機能する空間/場、時期、メカニズムがそれぞれ異なることを解明しました。
- 炎症性サイトカインの過剰な産生で引き起こされる炎症性疾患の病態解明への貢献が期待されます。

JST 戦略的創造研究推進事業において、京都大学ウイルス研究所の 竹内 理 教授らの研究グループは、病原体感染などに対する炎症反応が、RNA 分解酵素 Regnase-1<sup>注1)</sup> と RNA 結合蛋白質 Roquin<sup>注2)</sup> という、不必要な mRNA を分解する 2つのブレーキシステムにより巧妙に制御されていることを解明しました。

病原体感染に対する炎症反応は、マクロファージなどの自然免疫<sup>注3)</sup> 担当細胞が炎症性サイトカイン<sup>注4)</sup> を分泌することにより引き起こされます。炎症の活性化と抑制がバランス良く調節されていますが、このバランスの破綻が、免疫不全症や、自己免疫疾患を始めとした炎症性疾患の原因となると考えられています。マクロファージから分泌される炎症性サイトカインの量は mRNA 産生と分解により厳密に制御されていることが知られています。これまで、Regnase-1、Roquin という蛋白質が mRNA に結合し分解すること、これらの分子をマウスで欠損させると自己免疫疾患を発症することが分かっていたのですが、その詳細な機構は不明でした。

本研究では、2つの異なる RNA 結合蛋白質 Regnase-1 と Roquin が、1) 炎症性サイトカイン mRNA に存在する同じステムループ構造を認識し分解することで炎症性サイトカイン量を制御していること、2) しかし機能する空間/場、分解する mRNA の翻訳<sup>注5)</sup> 状態や分解のメカニズムが異なること、3) 分解する時期も、それぞれ炎症早期、後期と異なることを解明しました。本研究は、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、新たな治療法の開発につながることを期待されます。

本研究は、ドイツ マックス・デルブリュック分子医学センター (MDC)、近畿大学、大阪大学、東京大学、オーストラリア国立大学と共同で行ったものです。本研究成果は、2015 年 5 月 21 日(米国東部時間)発行の米国科学誌「Cell」に掲載されます。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。なお、平成 27 年 4 月 1 日に日本医療研究開発機構 (AMED) が設立されたことにともない、本課題は AMED に承継され、引き続き研究開発の支援が実施されます

戦略的創造研究推進事業 チーム型研究 (CREST)

研究領域: 「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」(研究総括: 宮坂 昌之 大阪大学未来戦略機構 特任教授)

研究課題名: 「自然免疫における転写後調節を介した慢性炎症抑制メカニズムの解析」

研究代表者: 竹内 理 (京都大学ウイルス研究所 教授)

研究期間: 平成 24 年 10 月~平成 30 年 3 月

上記研究課題では、自然免疫細胞の活性化調節メカニズムを、転写の観点だけでなく、転写後制御の観点から再定義して、新規炎症制御法開発につなげていくことを目指します。

## <研究の背景と経緯>

細菌やウイルスなどの病原体が感染すると、マクロファージなど自然免疫担当細胞により Toll 様受容体 (TLR) を介して最初に認識されます。マクロファージは病原体を貪食するとともに、炎症性サイトカインという蛋白質を分泌し、これが周りの免疫細胞を活性化させたり、免疫細胞の炎症局所への集積を促すなどして、いわゆる炎症を引き起こします。この炎症は、病原体の排除に重要な免疫反応ですが、過剰、もしくは慢性化した炎症は敗血症性ショック、自己免疫疾患、動脈硬化、代謝性疾患などさまざまな病気の原因となります。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ます。中でも、炎症性サイトカインの量が、炎症の調節において中心的な役割を果たしています。炎症性サイトカインは、感染に伴いマクロファージ内で、DNA から mRNA が転写され、次に mRNA から蛋白質が翻訳されるというステップで作られますが、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調節されています。我々は、以前、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産生調節に重要であることを報告してきました(Nature 2009; Nature Immunology 2011; Cell 2013)。また、他の研究グループにより RNA 結合蛋白質 Roquin も炎症性サイトカイン mRNA 分解や自己免疫疾患発症抑制に重要であることが報告されています。しかしながら、Regnase-1 の標的 mRNA の特異性や作用機構および Regnase-1 と Roquin の制御メカニズムの関係性は分かっていませんでした。

本研究では、2つの異なる RNA 結合蛋白質 Regnase-1 と Roquin が時空間的に異なるメカニズムで共通の炎症性サイトカイン mRNA を制御していることを解明しました。

## <研究の内容>

Regnase-1 がどのような mRNA をどのような目印を通じて認識するかという事を明らかにするために、Regnase-1 と結合する mRNA を RNA-immunoprecipitation sequencing (RIP-Seq) により網羅的に同定するとともに、Regnase-1 の結合領域を high-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation (HITS-CLIP)により網羅的に同定しました(図 1A)。その結果、Regnase-1 は多くの炎症に関わる mRNA のうち、3'非翻訳領域に存在するステムループ構造(図 1B)に結合すること、加えて、Regnase-1 に結合するステムループ構造のループ部分は UAU/UGU loop 配列を持つことが判明しました。興味深いことに、このステムループ構造の特徴は Roquin が認識するステムループ構造と類似しており、Roquin と結合する mRNA を RIP-seq により網羅的に同定した結果から、Regnase-1 と Roquin は同様の標的 mRNA を認識していることが分かりました。また標的となるステムループ構造を持つ RNA を細胞に発現させると、Regnase-1 によっても Roquin によっても分解されたことから、Regnase-1 と Roquin は同じステムループ構造を持つ mRNA を分解していることが分かりました。つまり、このステムループ構造は、Regnase-1 と Roquin という2つの異なる蛋白質により共通して読み取られる認識構造(シスエレメント)であるという事です。

では、Regnase-1 と Roquin はどのような関係性をもって炎症関連 mRNA を制御しているのでしょうか。まず、Regnase-1 と Roquin の細胞内局在を調べると、Roquin は RNA 分解に関わる酵素が豊富なストレス顆粒(SG)や processing bodies (PBs) に局在するのに対し、Regnase-1 は粗面小胞体 (ER)に多く存在し、蛋白質翻訳装置であるリボソームと共局在する事が判明しました(図 2)。この Regnase-1 と Roquin の細胞内局在の違いは機能する”空

間/場”が異なることを示唆しています。実際に、Regnase-1 の発現を低下させると翻訳を活発に行っている mRNA が増加するのに対し、Roquin を欠損させると翻訳活性がほとんどない mRNA が増加しました。更に、Regnase-1 が標的 mRNA を分解するには、翻訳装置（リボソーム）が働いていることが必須であることが分かりました。これまで、異常 mRNA を蛋白質翻訳により検出して分解するシステム(Nonsense-mediated decay)が知られていますが、このシステムに重要な蛋白質 UPF1 と Regnase-1 が相互作用すること、Regnase-1 による mRNA 分解に UPF1 が必須であることを見出しました。この結果は、Regnase-1 による炎症関連 mRNA 分解のシステムと、異常 mRNA を分解するシステムの共通性を示しています。

次に、同じ標的 mRNA に対して異なるメカニズムにより mRNA 安定性制御を行なっている Regnase-1 と Roquin が生物学的に異なる役割を担っているか検討するために、Regnase-1 欠損および Roquin 変異マクロファージの免疫刺激(LPS<sup>注6)</sup>による TLR4 刺激)に対する炎症性サイトカイン mRNA の発現を確認しました。その結果、Regnase-1 欠損マクロファージでは免疫刺激(LPS 刺激)の早期において、Roquin 変異マクロファージでは LPS 刺激の後期において標的 mRNA の発現が亢進していました。これは異なるメカニズムで作用している Regnase-1 と Roquin がそれぞれ時間的に異なる炎症の早期と後期において機能していることを示しています。次に、Regnase-1 と Roquin が RNA 分解能において重複性を有するか検討するために、Regnase-1 と Roquin の二重変異(Regnase-1<sup>-/-</sup>/Rc3h1<sup>san/san</sup>)マウス由来の線維芽細胞(MEF)において Regnase-1 と Roquin の共通の標的 mRNA (IL6、TNF、PTGS2)量を調べたところ、それぞれの単独変異の MEF における mRNA 量よりも増加していました(図 3)。これに対し、Regnase-1、Roquin いずれの標的でもない mRNA (NFKBIA)は正常でした。また、Regnase-1、Roquin の単独変異はそれぞれ、LPS 刺激後早期、後期における標的 mRNA 量を増加させました(図 3)。この結果は Regnase-1 と Roquin は RNA 分解能において重複性を有し、この重複した mRNA 安定性制御が正常な遺伝子発現において重要であることを示しています。

以上の結果より、Regnase-1 と Roquin は共通のステムループ構造を認識するが時空間的に異なる RNA 分解の制御因子として機能している事が明らかとなりました(図 4)。

## <今後の展開>

本研究では、Regnase-1 と Roquin は共通のステムループ構造を認識するが時空間的に異なる RNA 分解の制御因子として機能することにより、炎症を制御している事を解明しました。今後、ヒト自己免疫疾患や炎症性疾患における Regnase-1、Roquin の機能を検討することで、これらの疾患の病態解明につながる事が期待されます。また、Regnase-1、Roquin の機能を変化させることは、自己免疫疾患や炎症性疾患などの創薬ターゲットとなることが期待されます。

本研究では、Regnase-1 は Roquin と共通のステムループ構造を認識して、UPF1 依存的にタンパク質翻訳の終結反応と共役し翻訳を活発に行っている mRNA を分解していることを明らかにしました。しかしながら、Regnase-1 がどのように UPF1 依存的に mRNA 分解を生じているのかまだ分かりません。また、Regnase-1 と Roquin はマクロファージなどの自然免疫担当細胞だけでなく、獲得免疫 T 細胞においても重要な役割を担っているため、T 細胞における Regnase-1 と Roquin による RNA 安定性制御も重要であると考えられます。また、Regnase-1、Roquin の RNA 結合を調節する小分子をスクリーニングすることで、炎症の制御法の開発につなげていきたいと考えています。

<参考図>

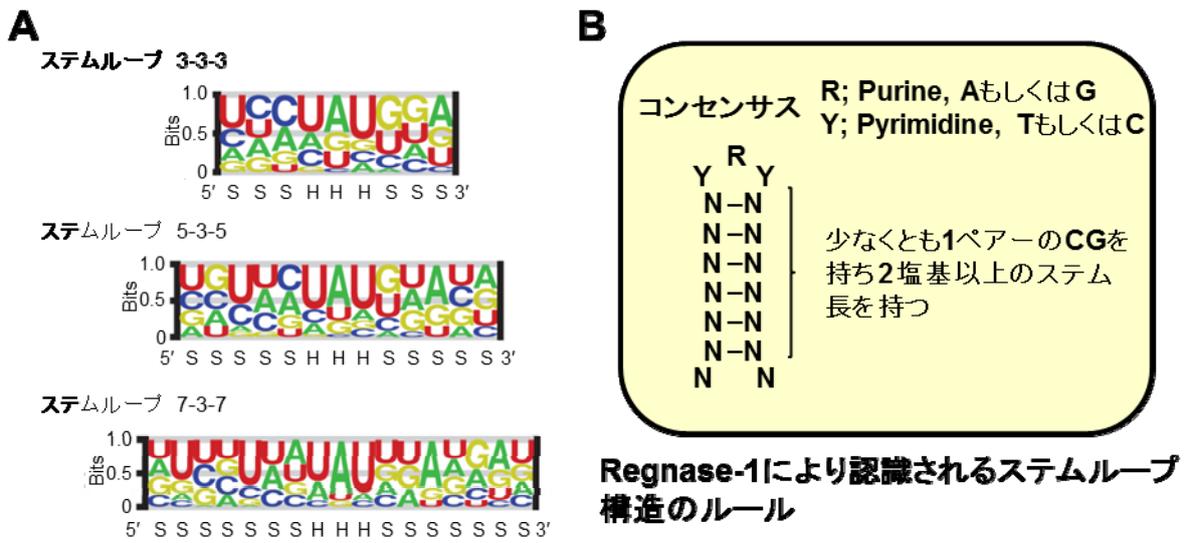


図 1. Regnase-1 と Roquin はステムループ構造を認識する。

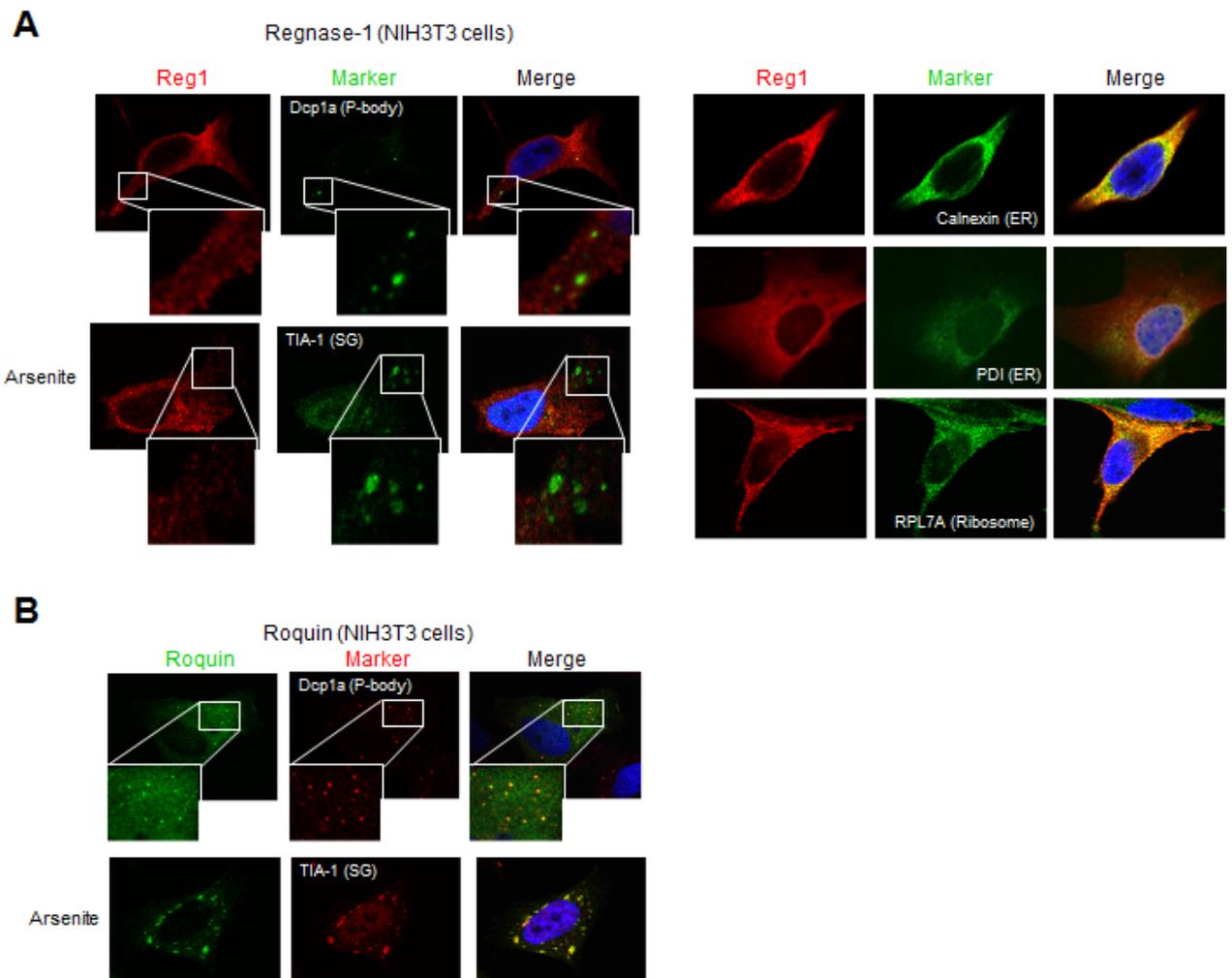


図 2. Regnase-1 と Roquin は ER とストレス顆粒・P body にそれぞれ局在する。

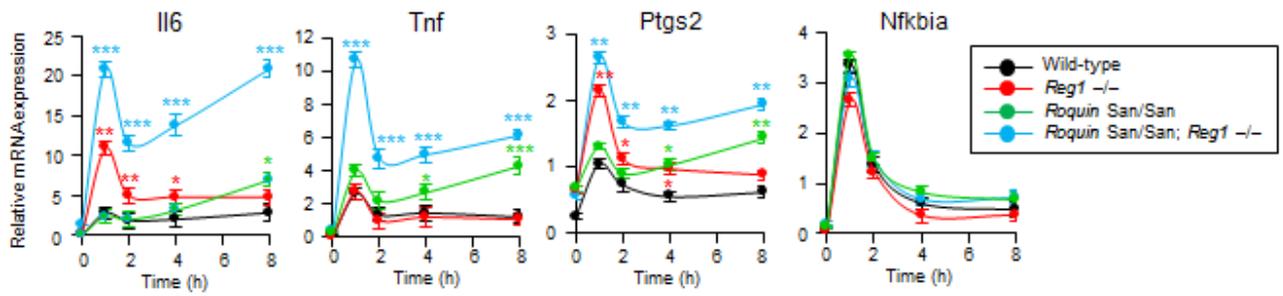


図 3. Regnase-1/Roquin 変異 MEF の LPS に対する応答.

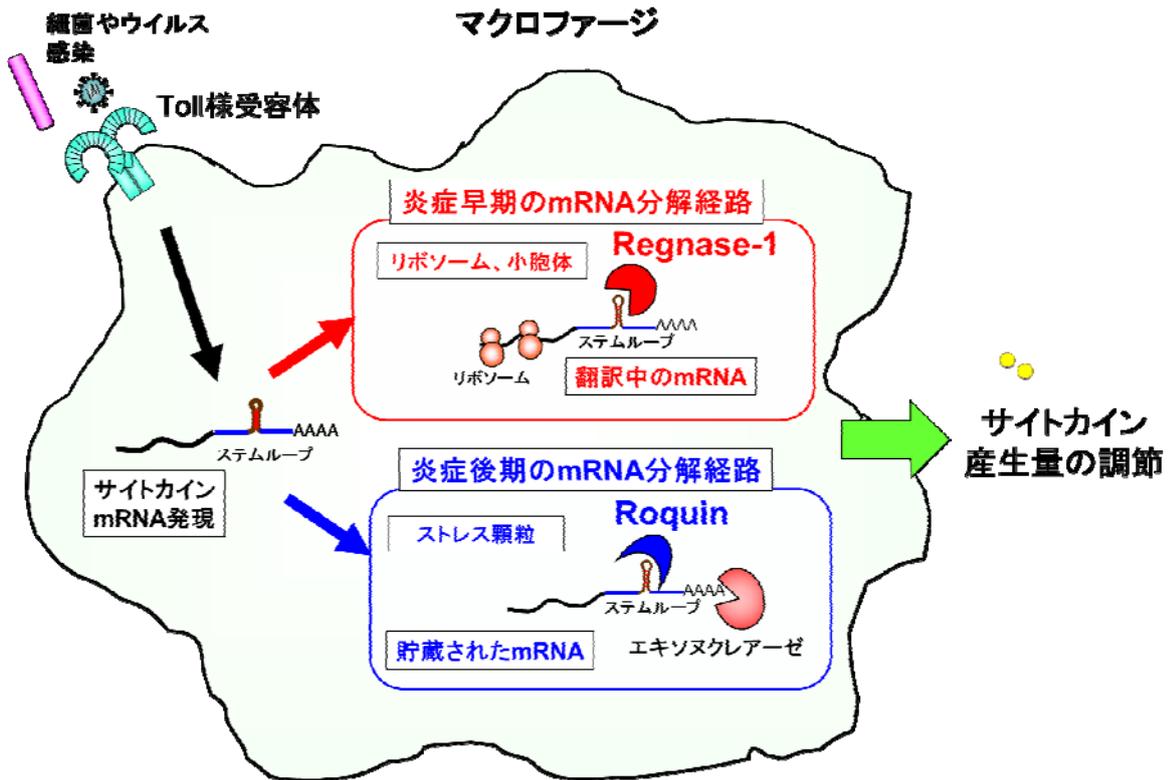


図 4. Regnase-1 と Roquin のサイトカイン mRNA 分解機構モデル.

## <用語解説>

### 注 1) Regnase-1

IL6 や IL12p40 などのサイトカイン mRNA の分解を行うことで過剰な免疫応答を抑制するサイトカイン産生のブレーキ役を担っている RNA 分解酵素。

### 注 2) Roquin (Rc3h1, Rc3h2, RING finger and CCCH zinc finger protein)

Icos や Tnf など炎症に関わる蛋白質をコードする mRNA 分解を誘導することで自己免疫疾患となることを防いでいることが知られている RNA 結合蛋白質。

### 注 3) 自然免疫

病原体の侵入を最初に検知して免疫システムを活性化させる。マクロファージや樹状細胞などの自然免疫担当細胞により担われ、病原体を検出した自然免疫担当細胞は炎症性サイトカインを産生・分泌して炎症を誘導する。

### 注 4) 炎症性サイトカイン

炎症に伴い細胞から分泌される蛋白質のうち、細胞同士の信号伝達に重要なものがサイトカインであり、中でも炎症を引き起こすものを炎症性サイトカインと呼ぶ。これにはインターロイキン 6 (IL6)、インターロイキン 1(IL1)、腫瘍壊死因子(TNF)などがあげられる。

### 注 5) 翻訳

mRNA に記述されたコドン情報に基づいて、蛋白質を合成する反応。mRNA にリボソームと呼ばれる蛋白質複合体が結合することにより蛋白質鎖が作られ、mRNA の終止コドン を認識して終結する。細胞内小器官である粗面小胞体にはリボソームが付着しており、サイトカインなど細胞外に分泌される蛋白質の翻訳を担っている。

### 注 6) リポポリサッカライド (LPS)

グラム陰性細菌の細胞外膜に存在するリポ多糖であり、TLR4 により認識される。LPS によりマクロファージは多量の炎症性サイトカインを産生し、敗血症性ショックなどの原因となる。Bruce Beutler は、LPS 受容体としての TLR4 の発見により、2011 年ノーベル生理学賞を受賞した。

<論文タイトル>

“Regnase-1 and Roquin regulate a common element in inflammatory mRNAs by spatiotemporally distinct mechanisms”

(Regnase-1 と Roquin は時空間的に異なるメカニズムで共通の炎症性 mRNA を制御する)

DOI:10.1016/j.cell.2015.04.029

著者: Takashi Mino, Yasuhiro Murakawa, Akira Fukao, Alexis Vandenbon, Hans-Hermann Wessels, Daisuke Ori, Takuya Uehata, Sarang Tartey, Shizuo Akira, Yutaka Suzuki, Carola G. Vinuesa, Uwe Ohler, Daron M. Standley, Markus Landthaler, Toshinobu Fujiwara, Osamu Takeuchi