

## 21. 自然免疫応答を制御する長鎖非コード RNA の研究

秋光 信佳

東京大学 アイソトープ総合センター

Key words : ノンコーディング RNA, 自然免疫

### 緒言

ヒトを含めた真核細胞のゲノムからはタンパク質のアミノ酸一次配列情報をコードしないノンコーディング RNA (非翻訳 RNA、非コード RNA と呼ばれる) が多種大量に発現している。高等動物細胞ほど多数種類のノンコーディング RNA を発現することから、ノンコーディング RNA の機能を解明することが高等動物細胞における複雑な生理機能を分子レベルで理解する鍵になると期待されている。実際、20 数塩基長の小分子ノンコーディング RNA が分化やストレス応答において重要な役割を担っていることが判明してきた。一方、全長が 200 塩基から数万塩基長となる長鎖ノンコーディング RNA の生理機能は長らく不明であったが、近年徐々に生理機能が解明され始めた。しかしながら、長鎖ノンコーディング RNA の大部分は未だ生理的機能が判明しておらず、その機能解明に世界中の研究者がしのぎを削っている。今回の研究では、細胞レベルの自然免疫応答における長鎖ノンコーディング RNA (特に、筆者らが発見した短寿命長鎖ノンコーディング RNA である SLiTs (Short-Lived noncoding Transcripts)) の役割を明らかにする。さらに、今回の研究では、この SLiTs の誘導機構の研究を通じて、核内 RNA 分解の重要性も示唆されるという興味深い結果も得たので合わせて報告する。

### 方法

長鎖ノンコーディング RNA のゲノムワイドな RNA 安定性測定から筆者が同定した短寿命長鎖ノンコーディング RNA である SLiTs<sup>1-3)</sup> のリストを元に、サルモネラ感染した細胞における遺伝子発現を次世代シーケンサー解析によって網羅的に調べ、サルモネラ感染で誘導される SLiTs を同定した。サルモネラは細胞内寄生菌であり、宿主細胞内に進入して増殖するという興味深い生活環を有する。また、大腸菌とほぼ同様な遺伝子工学的手法と遺伝学的手法を適用することができるため、サルモネラの細胞感染系は宿主と病原体との相互作用を解析する上で対迎有用な系である。このような理由から本研究ではサルモネラを用いた。

次世代シーケンスはイルミナ Hi-seq2500 を用いて解析し、RNA-seq のリードは TpoHat でヒトリファレンスゲノム (hg19) にマッピングし、Cufflinks で各遺伝子にマッピングされたシーケンスリードを計数することで遺伝子発現を測定した。そのほか必要に応じて Perl, R 記述した解析スクリプトを用いることで次世代シーケンス解析結果をバイオインフォマティクス解析した。

サルモネラ感染後の SLiTs の RNA 分解速度を測定する実験では、筆者らが開発した BRIC 法を用いた。BRIC 法とは、培地中にウリジンアナログである 5-bromouridine (BrU) を添加することで、細胞に取り込まれた BrU によって内在性 RNA をメタボリック標識し、その後、BrU 無しの培地に交換してから (パルスラベル終了) 経時的に BrU 標識された RNA の減少を測定することで RNA 分解を測定する手法である。具体的には、HeLa 細胞を 150 microM BrU 含有培地中で 24 時間標識後、経時的に BrU 標識 RNA 含有 total RNA を回収精製した。その後、BrU 標識 RNA のみを特異的抗体 (クローン 2B1) で回収した。精製回収した BrU 標的 RNA の品質はアジレントバイオアナライザーで評価した。精製回収した BrU 標的 RNA を RT-qPCR 解析あるいは次世代シーケンス解析 (RNA-seq) した。

本研究では CRISPR/Cas9 システムを用いてサルモネラ感染で誘導された SLiTs ノックアウト細胞を作出し、SLiTs ノックアウト細胞に対する感染実験を実施した。感染実験時の細胞生存数は、サルモネラ感染 18 時間後にトリパンブルー染色した細胞を血球計算盤で直接計数することで求めた。また、同時に、細胞からサルモネラを回収し、LB プレ

ートに播種後に LB プレート上に形成されるコロニー数を計数することで細胞感染後のサルモネラ生菌数を求めた。この感染実験から、細胞レベルの病原体抵抗性における SLiTs の役割を明らかにする。サルモネラ感染によってノックアウト細胞で発現変動する遺伝子の同定では、アジレントの SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ Ver. 3.0 を用いた。マイクロアレイの結果は、アジレント社の GeneSpring ソフトウェア (ver. 13.0) を用いて発現変動解析を行った。

## 結 果

HeLa 細胞をサルモネラに感染させてから、2、6、18 時間後にサンプリングし、次世代シーケンサー解析によって網羅的な遺伝子発現解析を行った。まず、mRNA の発現変動に着目したところ 1,210 種類の遺伝子が発現増加していた。これらについて Gene Ontology term 解析を行ったところ、免疫関連遺伝子が統計的に有意に発現増加していることがわかった。実際に、サルモネラ感染で誘導される NF- $\kappa$ B mRNA の発現増加などを確認できた。従って、この実験で同定されるノンコーディング RNA も免疫応答関連の機能を持つと期待された。

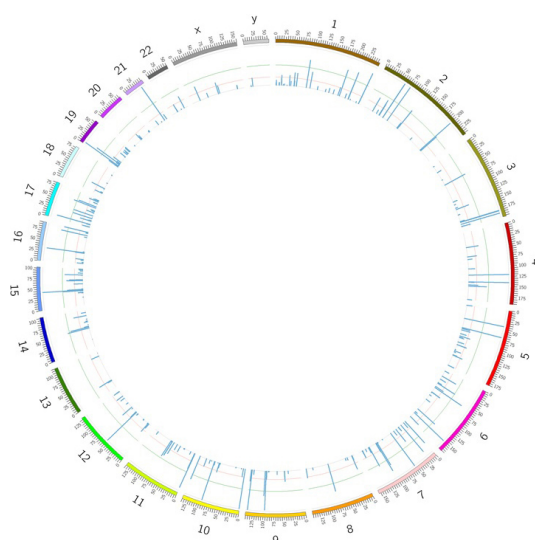


図 1. サルモネラ感染で誘導される SLiTs

サーカスプロットの内側より、感染 2、6、18 時間後に誘導された SLiTs をゲノムワイドに表示した。

次に、筆者が独自に整備した短寿命長鎖ノンコーディング RNA である SLiTs のリストを元に、サルモネラ感染で発現増加する SLiTs を探索したところ、310 種類の SLiTs を同定できた。これら同定された SLiTs は核に局在するものであった。この中には、予備の実験から同定していた核内長鎖ノンコーディング RNA の NEAT1 も含まれていた。NEAT1 は、ウイルス感染で転写誘導される核内長鎖ノンコーディング RNA であったが<sup>4)</sup>、サルモネラ感染でも NEAT1 誘導されたことから幅広い病原体応答に関わる核内長鎖ノンコーディング RNA と考えられる。また、ウイルス感染では NEAT1 誘導によってパラスペックルと呼ばれる核内構造体の過剰形成が観察されたが、サルモネラ感染でも同様にパラスペックルの過剰形成が観察された。

また、サルモネラ感染による SLiTs 誘導のメカニズムを調べるため、サルモネラ感染後の各遺伝子の転写活性化と RNA 安定性変化の有無を調べた。転写活性化の評価は、遺伝子への RNA polymerase II のリクルートをクロマチン免疫沈降法で調べた。その結果、サルモネラ感染で発現増加する SLiTs 遺伝子へのサルモネラ依存的な RNA polymerase II 動員は確認されなかった。従って、サルモネラ感染による SLiTs 増加は転写活性化では説明できなかった。次に、RNA 分解測定を調べたところ、サルモネラ感染によって SLiTs の分解が抑制されることがわかった。これらの結果から、サルモネラ感染による SLiTs の誘導は RNA 分解抑制による RNA の蓄積によるものであることがわかった。

さらに、サルモネラ感染が核内 RNA 分解を抑制する仕組みについて調べた。予備的知見であるが、サルモネラ感染によって、核内 RNA 分解因子が消失することが特異的抗体を用いたウエスタンブロットによって示唆された。

最後に、CRISPR/Cas9 システムを用いてサルモネラ感染で誘導された SLiTs ノックアウト細胞を作出し、SLiTs ノックアウト細胞に対する感染実験を実施した。2種類の SLiTs ノックアウト細胞（NEAT1 ノックアウト細胞、ならびに eRNA511 ノックアウト細胞）を作出し、サルモネラ感染実験を行った結果、いずれのノックアウト細胞もサルモネラ感染で高感受性となった。また、コントロールに比べて、ノックアウト細胞中ではサルモネラがより沢山増殖していることが分かった。

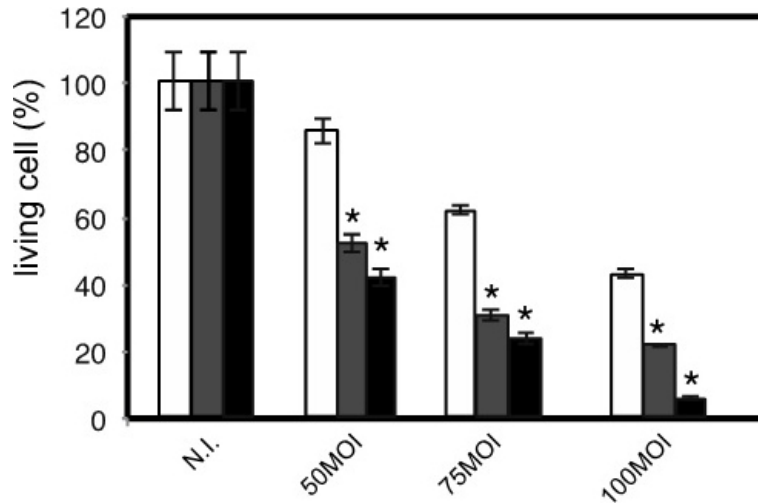


図2. SLiTs ノックアウト細胞のサルモネラ高感受性

サルモネラ感染後の各細胞の生細胞数をトリパンブルー染色にて評価した。白バーはコントロール細胞、灰色と黒バーは SLiTs ノックアウト細胞を示す。アスタリスクは student t 検定により求めた有意差 0.05 以下を示す。

## 考 察

サルモネラ感染で発現量が増加する SLiTs がサルモネラ抵抗性に重要な役割を担っていることが判明した。これらの結果は、SLiTs に着目することで全く新しい自然免疫応答機構を解明できることを示している。なお、現時点では、SLiT がどのようなメカニズムで下流の免疫関連標的遺伝子を活性化しているかの分子機構の詳細は不明であるが、一部の SLiT については、核内の転写因子との相互作用が標的遺伝子群の活性化を引き起こすことが示唆された。今後は、SLiT と結合する核内タンパク質を同定することを通じて各 SLiT の機能解明を行って行く予定である。

さらに、サルモネラ感染によって SLiTs が発現増加するメカニズムとして、核内 RNA 分解の抑制が示唆された。これまで、病原体感染が核内 RNA 分解を阻害することは知られておらず、免疫関連の遺伝子発現制御の新しい作用点として、今後、核内 RNA 分解が重要になることが期待される。また、遺伝子発現制御を担う SLiT の発現を核内 RNA 分解が調節していることが示された結果は、RNA 分解が転写制御の調節を担う可能性を示しており、新しい遺伝子発現制御様式の解明が今後期待される。

## 文 献

- 1) Tani H, Mizutani R, Salam KA, Tano K, Ijiri K, Wakamatsu A, Isogai T, Suzuki Y, Akimitsu N. Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived noncoding transcripts in mammals. *Genome Res.* 2012 May;22(5):947-56. doi: 10.1101/gr.130559.111.
- 2) Imamachi N, Tani H, Mizutani R, Imamura K, Irie T, Suzuki Y, Akimitsu N. BRIC-seq: a genome-wide approach for determining RNA stability in mammalian cells. *Methods.* 2014 May 1;67(1):55-63. doi: 10.1016/j.jymeth.2013.07.014.
- 3) Maekawa S, Imamachi N, Irie T, Tani H, Matsumoto K, Mizutani R, Imamura K, Kakeda M, Yada T, Sugano S, Suzuki Y, Akimitsu N. Analysis of RNA decay factor mediated RNA stability contributions on RNA abundance. *BMC Genomics.* 2015 Mar 6;16:154. doi: 10.1186/s12864-015-1358-y.

- 4) 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, Akimitsu N. Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli. *Mol Cell*. 2014 Feb 6;53(3):393-406. doi:10.1016/j.molcel.2014.01.009.