

48. mRNA 分解による免疫制御機構の解明

竹内 理

*京都大学 ウイルス研究所 感染防御研究分野

Key words : RNA 分解, 鉄代謝, 炎症, 貧血

緒 言

免疫システムと鉄代謝機構は密接なかかわりを持つ。鉄はヒトをはじめとする宿主にとって重要であると同時に、微生物にとっても生存に欠かせない元素である。したがって、微生物が利用可能な鉄を減少させることは宿主の感染制御において必要である。実際に、鉄代謝は免疫系を含めたさまざまな機構により厳密に制御されている。

鉄代謝を調節する機構の一つとして、mRNA の安定性を調節する転写後制御機構が知られている。鉄代謝においては、mRNA を安定化する因子として IRP の存在がよく知られている。これに加えて、鉄代謝にかかわる遺伝子のひとつであるトランスフェリン受容体の mRNA は、RNA 分解酵素により分解されると長きにわたり提唱されていた¹⁾。しかしながら、このプロセスにどの RNA 分解酵素が関与するかは不明なままであった。

我々は以前、RNA 分解酵素である Regnase-1 を同定し、この分子が炎症関連遺伝子の mRNA を分解することで、自然免疫系と獲得免疫系の双方を抑制していることを報告した²⁻⁶⁾。この研究の過程で、我々は Regnase-1 を欠損したマウスが重度の貧血を発症することを見出した³⁾。しかしながら、この貧血がどのようにして起こるのかは明らかになっていなかった。そこで本研究では、Regnase-1 が鉄代謝において果たす役割を検討した。

方 法

Regnase-1 欠損細胞でのトランスフェリン受容体の mRNA と細胞膜表面でのタンパク質の発現量は、RT-qPCR 解析や FACS 解析により検討した⁷⁾。

Regnase-1 による標的 mRNA 分解には、ドキシサイクリンによる転写の制御が可能な Tet-Off システムを用いた。標的の mRNA は RT-qPCR により解析した。

Regnase-1 標的領域の同定を行うため、HEK293T 細胞に各図に示した発現ベクターとルシフェラーゼレポーターを強制発現させ、ルシフェラーゼアッセイを行った。

マウス臓器鉄および血清鉄測定には Ferrozine 法を用いた。組織鉄染色にはベルリン青染色を用いた。血液学的検査としては、EDTA を添加した全血を Celltac α (日本光電) を用いて解析した。

Regnase-1 標的遺伝子同定のためのトランスクリプトーム解析には HiSeq 2500 (Illumina) を使用した。*Regnase-1* 欠損マウスと対照マウスの十二指腸から得られた RNA を解析に用いた。

結 果

まず *Regnase-1* を欠損した細胞を用いて解析を進めたところ、トランスフェリン受容体の mRNA と細胞膜表面での受容体発現量が、さまざまな細胞種で増加していることを見出した⁷⁾。そこで、次に Regnase-1 が直接トランスフェリン受容体の mRNA を分解しているかどうか検討したところ、Regnase-1 はトランスフェリン受容体の 3'非翻訳領域に存在するステムループ構造を介して mRNA を分解することが明らかとなった (図 1)。

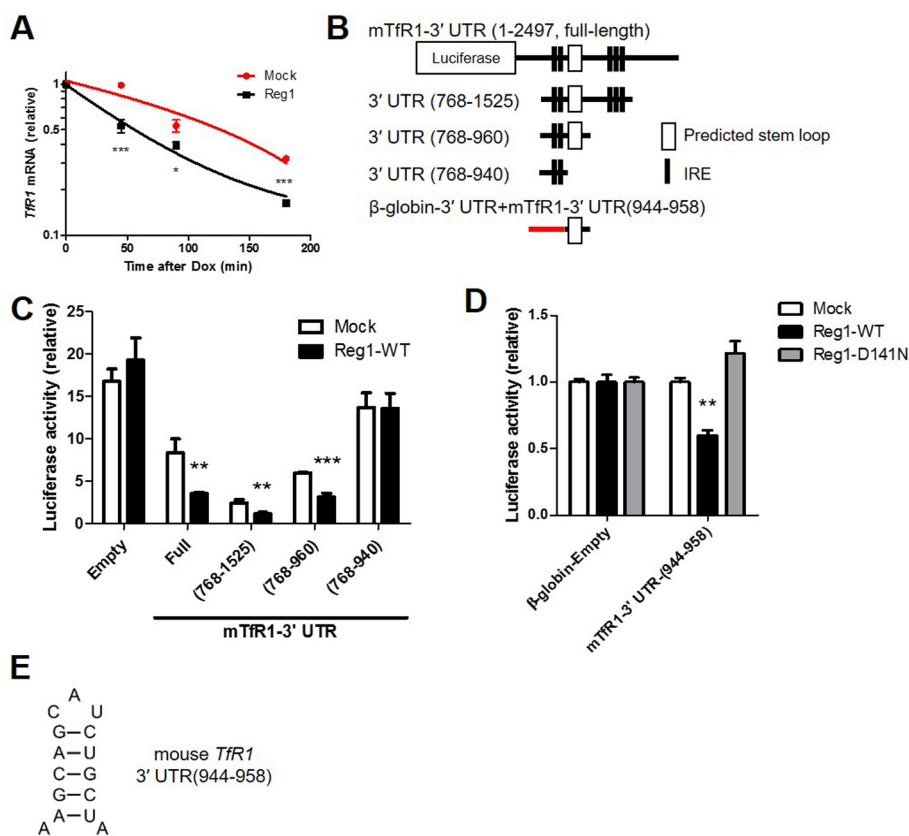


図1. Regnase-1 はトランスフェリン受容体 mRNA を直接分解する

(A) Tet-Off システムを用いて、マウストランスフェリン受容体 mRNA 全長の分解速度を Regnase-1 の強制発現下で調べた。

(B-D) マウストランスフェリン受容体 3'非翻訳領域の全長、または断片をルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポーターを作製した (B)。HEK293T 細胞にこれらのレポーターと、野生型、もしくは変異型 Regnase-1 (D141N, RNA 分解活性を喪失) の発現ベクターをトランスフェクションさせた (C-D)。2 日後にルシフェラーゼ活性を測定した。

(E) マウストランスフェリン受容体 3'非翻訳領域にある Regnase-1 の標的ステムループ構造。

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。解析には t 検定を用いた。

次にトランスフェリン受容体の mRNA を安定化する IRP と Regnase-1 の関係性をルシフェラーゼアッセイにより調べたところ、Regnase-1 には IRP の安定化作用に拮抗して mRNA を分解する作用があることが明らかになった。これらの結果は、Regnase-1 がトランスフェリン受容体の mRNA を分解する新規の因子であることを示している。

次に Regnase-1 の生体での鉄代謝における役割を調べるため、*Regnase-1* を欠損したマウスを用いて解析を行ったところ、このマウスは重度の貧血に加えて鉄欠乏状態であることが明らかになった (図2)。

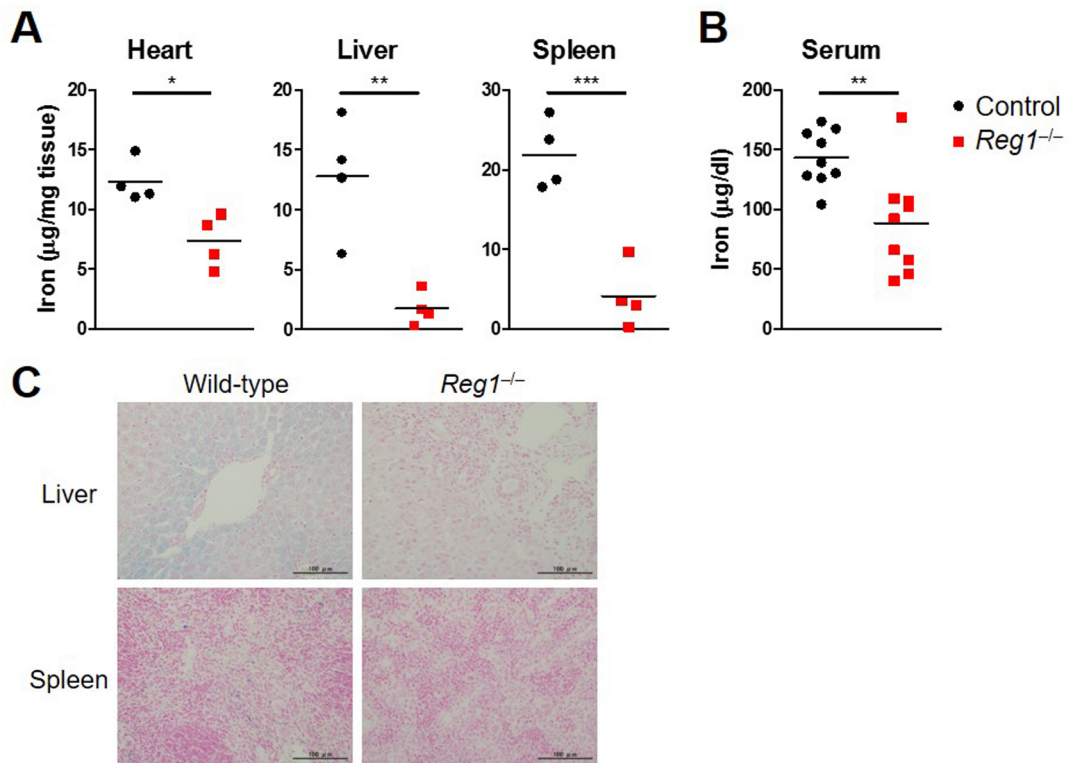


図 2. *Regnase-1* 欠損マウスは重度の鉄欠乏状態である

(A-B) *Regnase-1* 欠損マウスでの臓器鉄および血清鉄濃度を測定した。

(C) *Regnase-1* 欠損マウスでの組織鉄染色を実施した (ベルリン青染色)。Scale Bars: 100 µm。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。解析には t 検定を用いた。

さらなる解析の結果、*Regnase-1* 欠損マウスでは十二指腸での鉄吸収が低下しているため鉄欠乏性貧血が起こることが明らかとなった。したがって、*Regnase-1* は十二指腸での鉄吸収にとって重要な因子であると考えられた。

次に、十二指腸での鉄吸収調節にかかわる *Regnase-1* の標的遺伝子の同定を試みた。*Regnase-1* 欠損マウスの十二指腸を用いたトランスクリプトーム解析の結果、腸管での鉄吸収に関与する *Regnase-1* の標的遺伝子として *PHD3* が見出された。*PHD3* は十二指腸での鉄吸収に重要な転写因子である *HIF2a* を分解することが知られている。そこで、*HIF2a* の標的遺伝子の発現を検討したところ、*Regnase-1* 欠損マウスの十二指腸ではこれらの遺伝子の発現が誘導されていないことが明らかとなった。つまり *Regnase-1* 欠損マウスの十二指腸では *HIF2a* の活性が抑制されており、*PHD3* の発現亢進のため鉄吸収機構を活性化できないことが、*Regnase-1* 欠損マウスでの鉄吸収異常の原因と考えられた。次に *PHD3* と *Regnase-1* の二重欠損マウスを作製したところ、このマウスでは鉄欠乏性貧血が改善することが明らかになった (図 3)。

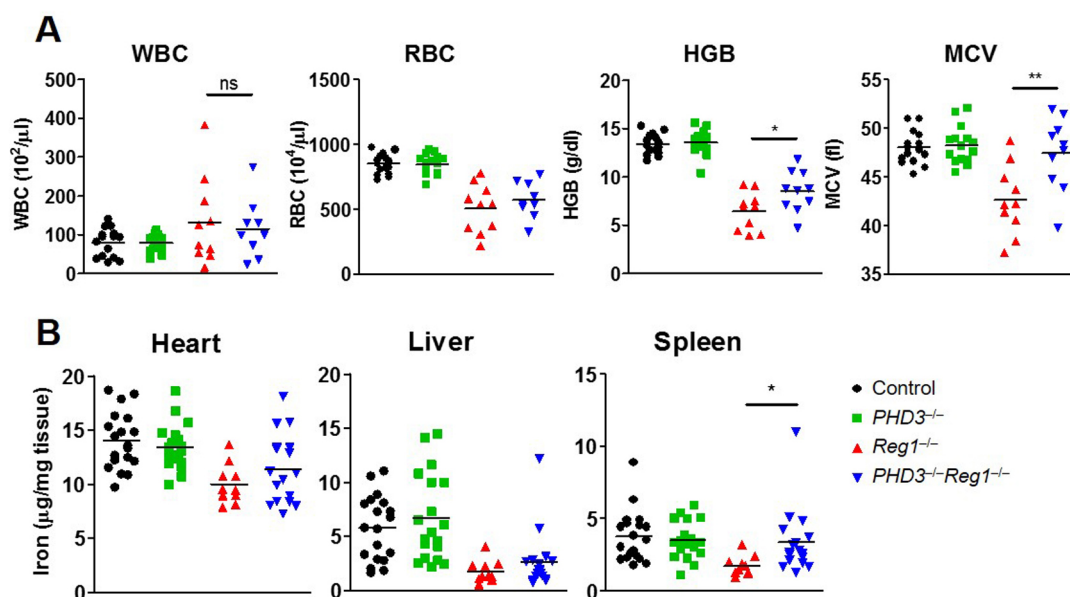


図3. Regnase-1はPHD3 mRNAの分解を介して鉄吸収を制御する
 (A) *PHD3*, *Regnase-1*二重欠損マウスの血算を行った。
 (B) *PHD3*, *Regnase-1*二重欠損マウスでの臓器鉄濃度を測定した。
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。解析にはt検定を用いた。

これらの結果から、PHD3がRegnase-1の鉄吸収における重要な標的であることが示された。

次に、Regnase-1自身が鉄の濃度によって制御を受けるか検討した。その結果、Regnase-1は鉄欠乏において発現が増加する遺伝子であることを見出した。また、鉄欠乏で活性化される因子であるHIF2 α によって、Regnase-1の転写が促進されることも明らかになった。

考 察

これらの結果から、Regnase-1が鉄代謝に関連する遺伝子のmRNAを分解するRNA分解酵素であることが明らかとなった。また、この作用を介して鉄欠乏時にはRegnase-1、PHD3、HIF2 α の三者からなる正のフィードバックループが活性化し、腸管での適切な鉄吸収を行っていることが示された。したがって、Regnase-1は炎症の制御のみならず、鉄代謝の制御にも重要な因子であることが明らかになった。今後ヒトの貧血や鉄代謝異常におけるRegnase-1の役割を検討することで、これら疾患のさらなる病態解明に発展することが期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学ウイルス・再生医科学研究所の吉永正憲、中塚賀也、植畑拓也、三野享史である。

文 献

- 1) Binder, R., et al., Evidence that the pathway of transferrin receptor mRNA degradation involves an endonucleolytic cleavage within the 3' UTR and does not involve poly(A) tail shortening. EMBO J. 1994;13(8):1969-80. PubMed PMID: 7909515.
- 2) Matsushita, K., et al., Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. Nature. 2009;458(7242):1185-90. PubMed PMID: 19322177.
- 3) Iwasaki, H., et al., The IkappaB kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR-IL-1R by controlling degradation of regnase-1. Nat Immunol. 2011;12(12):1167-75. PubMed PMID: 22037600.

- 4) Uehata, T., et al., Malt1-induced cleavage of regnase-1 in CD4(+) helper T cells regulates immune activation. *Cell*. 2013;153(5):1036-49. PubMed PMID: 23706741.
- 5) Mino, T., et al., Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct Mechanisms. *Cell*. 2015;161(5):1058-73. PubMed PMID: 26000482.
- 6) Mino, T. and O. Takeuchi, Regnase-1 and Roquin regulate inflammatory mRNAs. *Oncotarget*. 2015;6(20):17869-70. PubMed PMID: 26255671.
- 7) Yoshinaga, M., et al., Regnase-1 Maintains Iron Homeostasis via the Degradation of Transferrin Receptor 1 and Prolyl-Hydroxylase-Domain-Containing Protein 3 mRNAs. *Cell Reports*. 2017;19(8):1614-30. PubMed PMID: 28538180.