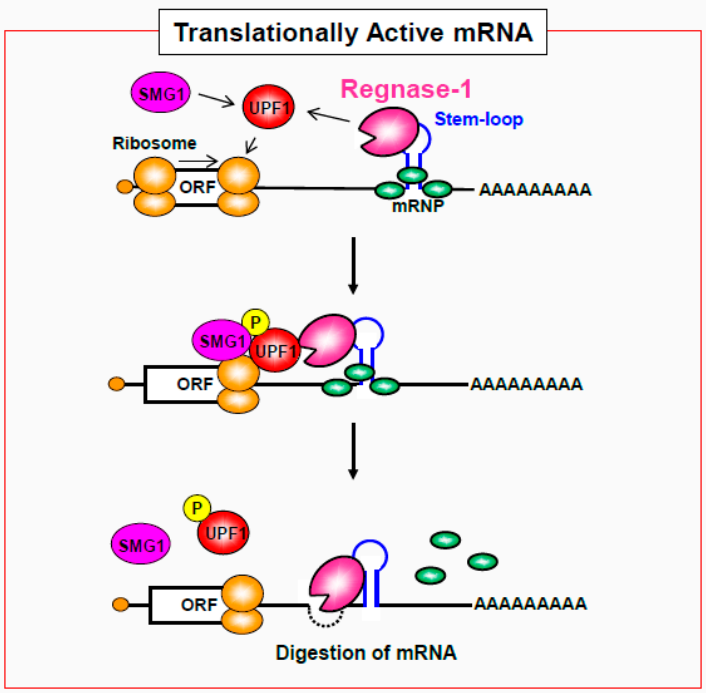
160　自然免疫における転写後制御機構の解明	三野　享史

【目的】自然免疫は、病原体感染を最初に認識し、炎症性サイトカインを介して急性炎症を引き起こす。病原体による免疫刺激に対する炎症性サイトカインの発現は、転写および転写後制御により厳密に制御されており、中でも RNA の安定性や翻訳を制御する転写後制御はサイトカイン産生を制御する重要なプロセスの一つである。我々はこれまで新規 RNA 分解酵素 Regnase-1 が炎症性サイトカイン mRNA を分解する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事を見出し、そして最近 Regnase-1 は RNA helicase UPF1 依存的にタンパク質翻訳が生じている（translationally active）mRNA を分解していることを明らかにした。しかしながら、どのように UPF1 が Regnase-1 による mRNA 分解に関与しているのかほとんど分かっていなかった。そこで、本研究ではその作用メカニズムについて検討した。

【方法】Regnase-1 と UPF1 の相互作用のメカニズムを検討するために、Regnase-1 と相互作用している UPF1 の領域を様々な Regnase-1 変異体と UPF1 変異体を用いた免疫沈降法により検討した。更に、その Regnase-1 と UPF1 の相互作用が Regnase-1 による mRNA 分解に必要かどうかを検討するために、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に Regnase-1 の標的 3′ UTR（*Il6* および *Ptgs2* の 3′ UTR）を挿入したレポーターアッセイを行なった。また、UPF1 リン酸化のキナーゼを同定するために、siRNA によるノックダウン実験を行なった。

【結果】UPF1 の T28 リン酸化が Regnase-1 と UPF1 の相互作用に必要であった。更に、PI3 キナーゼのファミリーの 1 つである SMG1 によりこの UPF1 の T28 リン酸化は生じ、SMG1 による UPF1 の T28 リン酸化が Regnase-1 と UPF1 の相互作用を制御し、Regnase-1 による mRNA 分解に必要である事を明らかにした。すなわち、SMG1 は Regnase-1 による mRNA 分解を介した炎症性サイトカイン産生の新しい転写後制御因子である事が明らかとなった。

SMG1 による Regnase-1 を介した炎症関連 mRNA 制御



160. 自然免疫における転写後制御機構の解明

三野　享史

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 感染防御分野

Key words：自然免疫，mRNA 分解，Regnase-1，UPF1，SMG1

緒　言

自然免疫は、病原体感染を最初に認識し、炎症性サイトカインを介して急性炎症を引き起こす。この初期認識に関わる細胞種として自然免疫細胞であるマクロファージや樹状細胞などが知られ、これらの細胞は病原体を感知すると炎症性サイトカインを産生・分泌し、T 細胞を始めとする獲得免疫系の活性化などにより病原体の排除を行う［1］。炎症性サイトカインは炎症の調節において中心的な役割を果たしており、病原体による免疫刺激に対する炎症性サイトカインの発現は転写および転写後制御により厳密に制御されている。中でも RNA の安定性や翻訳を制御する転写後制御はサイトカイン産生を制御する重要なプロセスの一つであり、転写後制御は炎症などの免疫応答の開始や終結の制御にも重要であることが明らかとなってきた［2］。我々は、これまで転写制御（シグナル伝達による mRNA 産生の制御）と比較して未知の領域である、炎症の転写後制御のメカニズムに関し研究を進めてきた。そして、新規 RNA 分解酵素である Regnase-1（Reg-1： Zc3h12a、 Mcpip1 とも呼ばれる）が *Interleukin-6*（*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事を見出した［3, 4］。また、Regnase-1 はマクロファージなどの自然免疫細胞だけでなく、獲得免疫 T 細胞において *c-Rel* や *Icos*、*Ox40*、*Il2* などの mRNA を分解することによって過剰な T 細胞活性化を抑制していることを報告した［5］。更に Regnase-1 による RNA 分解機構について検討を加えたところ、Regnase-1 は標的 mRNA の 3′ 非翻訳領域（3′ UTR）に存在するステムループ構造を認識して、サイトカイン蛋白質の翻訳中に RNA helicase UPF1 と相互作用して、translationally active mRNA を分解していることを最近見出した［6］。しかしながら、どのように UPF1 が Regnase-1 による mRNA 分解に関与しているのかほとんど分かっていなかった。そこで、本研究ではその作用メカニズムについて検討し、SMG1 による UPF1 の T28 リン酸化が Regnase-1 と UPF1 の相互作用を制御し、Regnase-1 による mRNA 分解に必要である事を明らかにした。

方法および結果

1. UPF1 の T28 リン酸化は Regnase-1 との結合および Regnase-1 による mRNA 分解に必要である

我々はこれまでの研究で、Regnase-1 は RNA helicase UPF1 と相互作用してタンパク質翻訳が生じている（translationally active）mRNA を分解していることを明らかにした［6］。しかしながら、どのように UPF1 が Regnase-1 による mRNA 分解に関与しているのかほとんど分かっていない。そこで、Regnase-1 と UPF1 の相互作用のメカニズムを検討した。まず、Regnase-1 と相互作用している UPF1 の領域を免疫沈降法により検討した。その結果、UPF1 の N 末端欠損体（ΔN）は Regnase-1 と相互作用を生じなく、UPF1 の N 末端領域が Regnase-1 との相互作用に必要である事が分かった（図 1A，B）。UPF1 は N 末端と C 末端に進化的に保存されたセリン（S）／スレオニン（T）-グルタミン（Q）（ST/Q）残基（T28、S1073、S1078、S1096、S1116）を有し、それらのアミノ酸残基が細胞内でリン酸化を受けることが報告されている［7］。そこで、次に UPF1 のリン酸化が Regnase-1 との相互作用に必要かどうかを免疫沈降法により検討した。その結果、UPF1 の S1073A/S1078A/S1096A/S1116A 変異体（4SA）は Regnase-1 との結合を生じるが、UPF1 の T28A 変異体は Regnase-1 と相互作用しなかった（図 1C）。しかしながら、UPF1 の T28E 変異体は Regnase-1 との結合を生じたため、Regnase-1 はリン酸基を認識しているわけではなく、UPF1 のリン酸化に伴

って生じるネガティブチャージが Regnase-1 と UPF1 との結合に必要であることが分かった（図 1D）。次に、UPF1 の T28 リン酸化が Regnase-1 による mRNA 分解に必要であるか検討するために、HeLa 細胞において内在性 UPF1 を siRNA によりノックダウンして、siRNA 抵抗性 UPF1^{R}-T28A 変異体を発現させ（図 1E）、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に Regnase-1 の標的 3′ UTR（*Il6* および *Ptgs2* の 3′ UTR）を挿入したレポーターアッセイを行なった。その結果、UPF1 の T28A 変異は Regnase-1 による mRNA 分解を阻害した（図 1F）。以上の結果は、UPF1 の T28 リン酸化が Regnase-1 との相互作用を制御することで Regnase-1 による mRNA 分解に必要である事を示唆している。

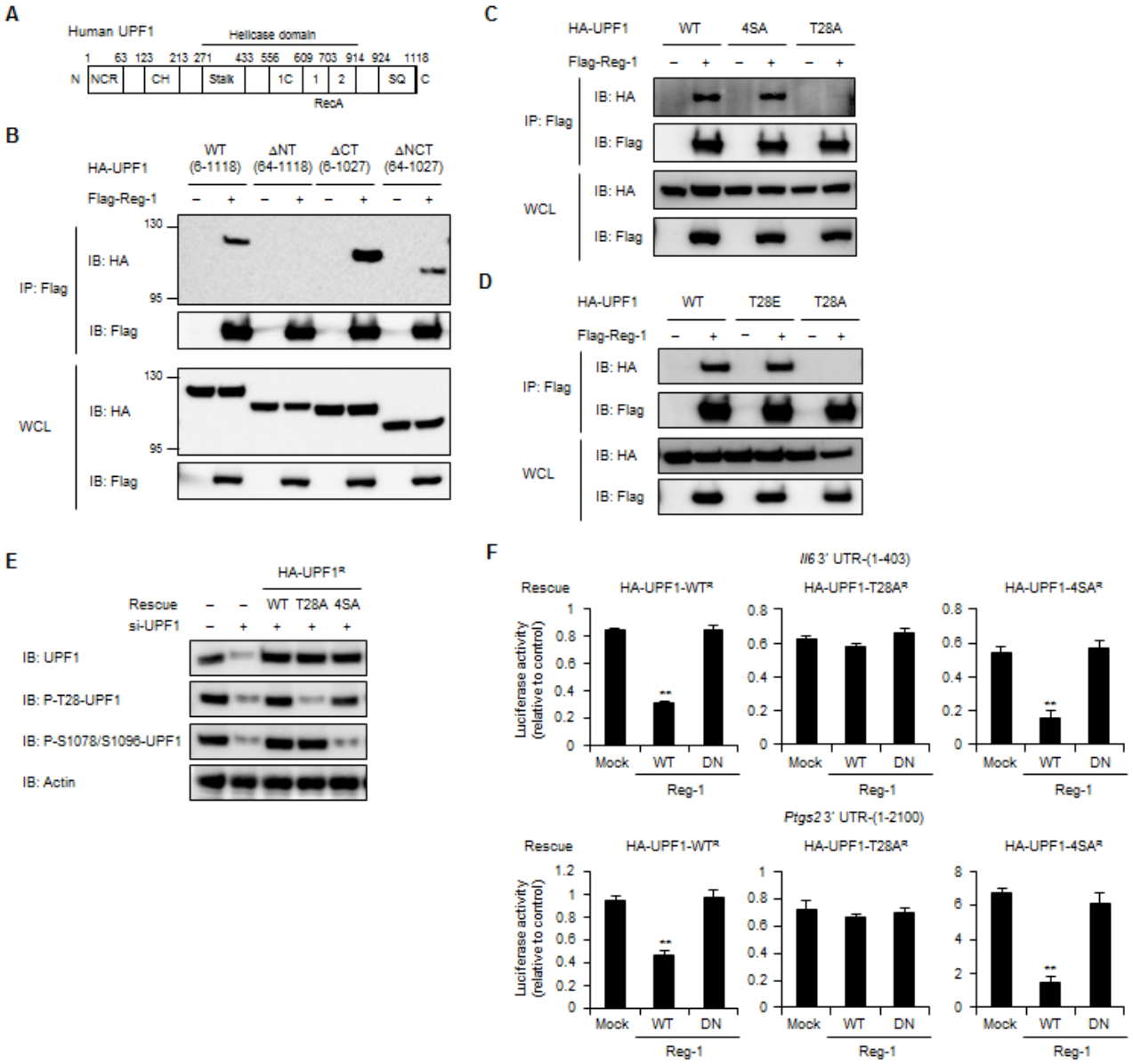


図 1. UPF1 の T28 リン酸化は Regnase-1 との結合に必要である

(A) ヒト UPF1 の模式図。

(B～D) 免疫沈降実験による Regnase-1 と UPF1 の結合評価。 HeLa 細胞に Flag-Regnase-1 と HA-UPF1 を発現させ、Regnase-1 と UPF1 の結合をウエスタンブロットにより評価した。

(E) UPF1 の P-T28 および P-S1078/S1096-UPF1 リン酸化レベルの評価。HeLa 細胞に、UPF1 特異的な siRNA をトランスフェクションし、その後 siRNA 抵抗性 HA-UPF1^{R} を発現させ、UPF1 の P-T28 および P-S1078/S1096-UPF1 リン酸化レベルをウエスタンブロットにより評価した。

(F) ルシフェラーゼレポーターアッセイによる Regnase-1 の mRNA 分解評価。HeLa 細胞に、UPF1 特異的な siRNA をトランスフェクションし、その後ルシフェラーゼ遺伝子の下流に Regnase-1 の標的 3′ UTR を挿入したルシフェラーゼレポーター遺伝子と Flag-Regnase-1 および siRNA 抵抗性 HA-UPF1^{R} を発現させ、Regnase-1 による mRNA 分解をルシフェラーゼ活性により評価した。データは平均値 ± 標準偏差として示した。統計処理は Student's t 検定を行なった (*p < 0.05、**p < 0.01)。

2. Regnase-1 の KR257258 は UPF1 の T28 リン酸化を認識する

次に、Regnase-1 が UPF1 の T28 リン酸化をどのように認識しているのかを検討した。まず Regnase-1 の UPF1 の T28 リン酸化結合領域を免疫沈降法により検討した結果、Regnase-1 の RNase domain が UPF1 の T28 リン酸化を認識している事が分かった。更に、Regnase-1 の RNase domain のポジティブチャージを持つ進化的に保存されたアミノ酸(リシンやアルギニン)をアラニンに置換して、UPF1 の T28 リン酸化のネガティブチャージを認識している Regnase-1 のアミノ酸の同定を試みた結果、257 番目のリシン（K）と 258 番目のアルギニン（R）が UPF1 の T28 リン酸化と結合しており、この Regnase-1 の KR257258AA（KRAA）変異は UPF1 との結合を阻害した（図 2A)。また、Regnase-1 の KR257258 による UPF1 の T28 リン酸化の認識が Regnase-1 による mRNA 分解に必要であるか検討するために、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に Regnase-1 の標的 3′ UTR（*Il6* および *Ptgs2* の 3′ UTR）を挿入したレポーターアッセイを行なった。その結果、Regnase-1 の KRAA 変異は Regnase-1 による mRNA 分解を阻害した（図 2B)。これは、Regnase-1 の KR257258 が UPF1 の T28 リン酸化を認識して安定な UPF1 との相互作用を形成し、その結果 Regnase-1 による mRNA 分解が誘導される事を示唆している。

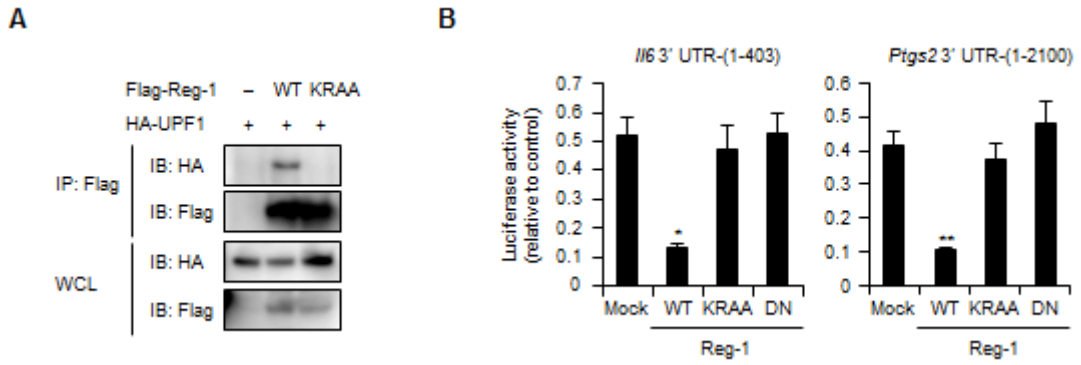


図 2. Regnase-1 の KR257258 は UPF1 の T28 リン酸化を認識する

(A) 免疫沈降実験による Regnase-1 と UPF1 の結合評価。HeLa 細胞に Flag-Regnase-1 と HA-UPF1 を発現させ、Regnase-1 と UPF1 の結合をウエスタンブロットにより評価した。

(B) ルシフェラーゼレポーターアッセイによる Regnase-1 の mRNA 分解評価。HeLa 細胞に、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に Regnase-1 の標的 3′ UTR を挿入したルシフェラーゼレポーター遺伝子と Flag-Regnase-1 を発現させ、Regnase-1 による mRNA 分解をルシフェラーゼ活性により評価した。データは平均値±標準偏差として示した。統計処理は Student's t 検定を行なった (*p < 0.05、** p <0.01)。

3. SMG1 による UPF1 のリン酸化は Regnase-1 による mRNA 分解に必要である

次に、Regnase-1 による mRNA 分解に関わる UPF1 リン酸化のキナーゼの同定を試みた。これまでの研究により、PI3 キナーゼのファミリーの 1 つである SMG1 が UPF1 をリン酸化することでナンセンス変異依存 mRNA 分解機構（NMD）において重要な役割を担っていることが報告されている [8]。そこで、次に SMG1 が Regnase-1 による mRNA 分解にも関わっているかどうかを検討した。SMG1 の siRNA によるノックダウンにより UPF1 の T28 リン酸化および UPF1 と Regnase-1 の相互作用が減少した（図 3A)。そして、SMG1 のノックダウンにより、Regnase-1 による mRNA

分解が阻害された（図 3B）。これは、SMG1 は UPF1 の T28 リン酸化を介して Regnase-1 と UPF1 の相互作用を制御することで Regnase-1 による mRNA 分解に必要である事を示唆している。

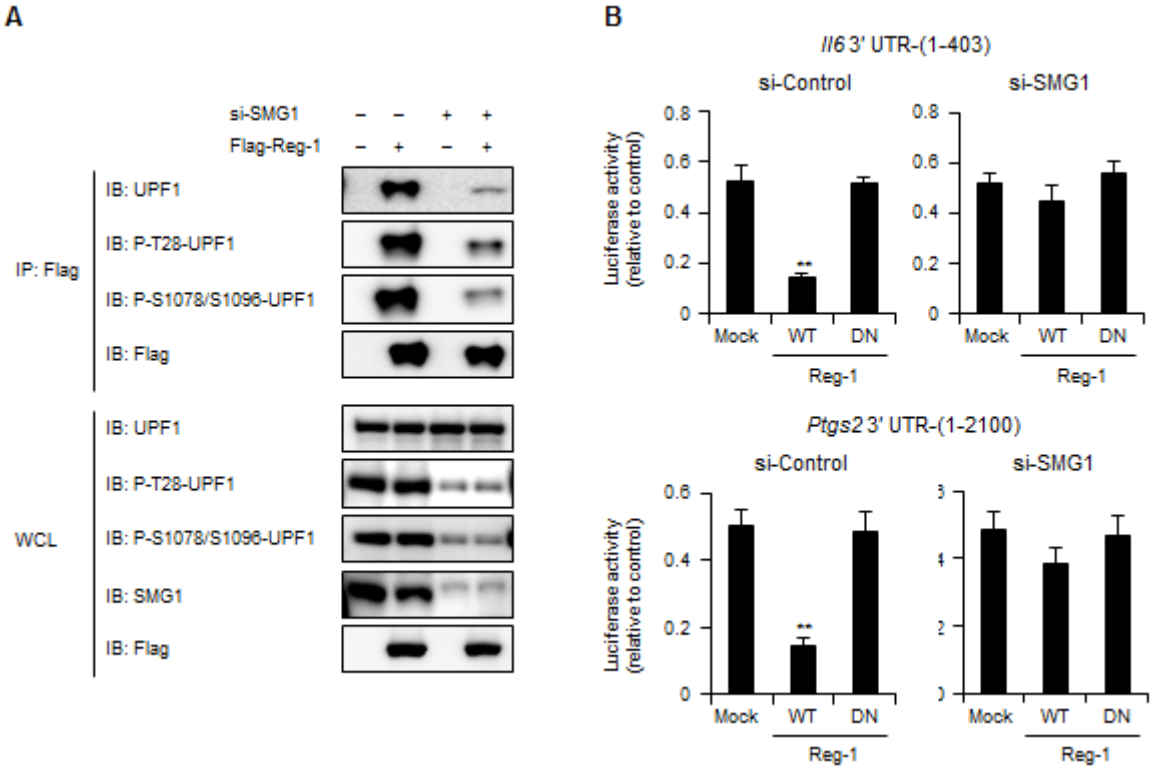


図 3. SMG1 による UPF1 のリン酸化は Regnase-1 による mRNA 分解に必要である

(A) 免疫沈降実験による Regnase-1 と UPF1 の結合評価。HeLa 細胞に SMG1 特異的な siRNA をトランスフェクションし、その後 Flag-Regnase-1 と HA-UPF1 を発現させ、Regnase-1 と UPF1 の結合をウエスタンブロットにより評価した。

(B) ルシフェラーゼレポーターアッセイによる Regnase-1 の mRNA 分解評価。HeLa 細胞に、SMG1 特異的な siRNA をトランスフェクションし、その後ルシフェラーゼ遺伝子の下流に Regnase-1 の標的 3′ UTR を挿入したルシフェラーゼレポーター遺伝子と Flag-Regnase-1 を発現させ、Regnase-1 による mRNA 分解をルシフェラーゼ活性により評価した。データは平均値±標準偏差として示した。統計処理は Student's t 検定を行なった（*$p < 0.05$、**$p < 0.01$）。

考　察

本研究により、SMG1 による UPF1 の T28 リン酸化が Regnase-1 と UPF1 の相互作用を制御し、Regnase-1 による mRNA 分解に必要である事を明らかにした。すなわち、SMG1 は Regnase-1 による mRNA 分解を介した炎症の転写後制御の新しい制御因子である事が明らかとなった。SMG1 のキナーゼ活性を SMG1 阻害剤などで調節する事によりサイトカイン産生量を制御出来るかもしれない。すなわち、SMG1 阻害剤は自然免疫応答を賦活化させるアジュバントとして機能する可能性が考えられる。

本研究により、自然免疫におけるサイトカイン産生が SMG1 により制御されている事が明らかとなった。しかしながら、SMG1 のキナーゼ活性がどのように制御されているのか不明である。例えば、免疫刺激により SMG1 のキナーゼ活性が変化するのかどうかなどの検討が今後必要である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学ウイルス・再生医科学研究所感染防御分野の竹内理教授、岩井紀貴、赤木宏太朗、Alexis Vandenbon 博士および竹内研究室メンバー、横浜市立大学大学院医学研究科分子細胞生物学教室の山下暁朗博士、大阪大学微生物病研究所ゲノム情報解析分野の Daron M. Standley 教授、大阪大学蛋白質研究所細胞システム研究室の岡田眞里子教授、宮崎大学工学部情報システム工学科の井上健太郎博士、東京大学大学院新領域創成科学研究科の鈴木譲教授である。

文　献

1) Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell. 2010 Mar 19;140(6):805-20.PMID:20303872 DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.022

2) Anderson P. Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation. Nat Rev Immunol. 2010 Jan;10(1):24-35. PMID: 20029446 DOI: 10.1038/nri2685

3) Matsushita K, Takeuchi O, Standley DM, Kumagai Y, Kawagoe T, Miyake T, Satoh T, Kato H, Tsujimura T, Nakamura H, Akira S. Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. Nature. 2009 Apr 30;458(7242):1185-90. PMID: 19322177 DOI: 10.1038/nature07924

4) Iwasaki H, Takeuchi O, Teraguchi S, Matsushita K, Uehata T, Kuniyoshi K, Satoh T, Saitoh T, Matsushita M, Standley DM, Akira S. The IκB kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR-IL-1R by controlling degradation of regnase-1. Nat Immunol. 2011 Oct 30;12(12):1167-75. PMID: 22037600 DOI: 10.1038/ni.2137

5) Uehata T, Iwasaki H, Vandenbon A, Matsushita K, Hernandez-Cuellar E, Kuniyoshi K, Satoh T, Mino T, Suzuki Y, Standley DM, Tsujimura T, Rakugi H, Isaka Y, Takeuchi O, Akira S. Cell. 2013 May 23;153(5):1036-49. PMID: 23706741 DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.034

6) Mino T, Murakawa Y, Fukao A, Vandenbon A, Wessels HH, Ori D, Uehata T, Tartey S, Akira S, Suzuki Y, Vinuesa CG, Ohler U, Standley DM, Landthaler M, Fujiwara T, Takeuchi O. Cell. 2015 May 21;161(5):1058-1073. PMID: 26000482 DOI: 10.1016/j.cell.2015.04.029

7) Okada-Katsuhata Y, Yamashita A, Kutsuzawa K, Izumi N, Hirahara F, Ohno S. N- and C-terminal Upf1 phosphorylations create binding platforms for SMG-6 and SMG-5:SMG-7 during NMD. Nucleic Acids Res. 2012 Feb;40(3):1251-66. PMID: 21965535 DOI: 10.1093/nar/gkr791

8) Yamashita A, Ohnishi T, Kashima I, Taya Y, Ohno S. Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. Genes Dev. 2001 Sep 1;15(17):2215-28. PMID: 11544179 DOI: 10.1101/gad.913001