

論文の内容の要旨

核内 long non-coding RNA による 自然免疫応答制御機構の解析

今村 亮俊

【序】

病原体による感染症に抵抗する上で、個体内における免疫応答の制御は大変重要である。ヒトの疾患において特に感染症は、未だなお死亡原因の上位を占め、多くの問題を孕んでいる。

この10年で、ヒトやマウスの大規模なゲノム解析が進み、タンパク質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) の存在が明らかとなった。この中でも核内に存在する200塩基以上の長さをもつ核内 long-ncRNA(long ncRNA, lncRNA)がガンなどの疾患に関与すること、遺伝子発現制御に直接関与していることなどが明らかとなりつつある。核内 lncRNA は進化的に新しい分子であることから、遺伝子発現などを調節する因子として、免疫応答などのストレス刺激時の制御に働いていることが予想されるが、免疫応答における lncRNA の関与については全く知見がなかった。

核内 lncRNA NEAT1v2 は転写制御などに関与することが知られている SFPQ や NONO と結合し、核内構造体パラスペックルを形成していることは知られているが、機能は分かっていない。私は、様々なストレス刺激下での核内 lncRNA の発現を調べていく中で、ウイルス感染を模擬する2本鎖 RNA poly I:C が NEAT1v2 の発現上昇を引き起こしていることを見出した。lncRNA は様々なタンパク質と相互作用することで、複雑なゲノム情報発現ネットワークを形成すると考えられることから、私は lncRNA によるサイトカイン産生制御が複雑な免疫システムを作り出しているのではないか、つまり核内構造体パラスペックル及び NEAT1v2 がウイルス感染時のサイ

トカインの発現を制御するのではないかと仮説を立てた。

【結果・考察】

1. poly I:C 刺激による核内 lncRNA NEAT1v2 の発現上昇及び核内構造体パラスペックルの肥大化

私はウイルス感染を模擬する2本鎖 RNA poly I:C の添加により、lncRNA NEAT1v2 の発現上昇が引き起こされることを RT-qPCR の結果から見出した(図1A)。さらに、poly I:C 添加時における NEAT1v2 のプロモーター活性を調べたところ、転写活性の誘導が見られた(図1B)。一方で、poly I:C 添加時における NEAT1v2 の分解速度は変化がなかったことから、poly I:C による NEAT1v2 の発現上昇は転写段階による制御であると考えられた。さらに、poly I、poly C 刺激や IFN- α , β を添加時には NEAT1v2 の発現上昇は引き起こされないことから、NEAT1v2 の発現上昇は二重鎖 RNA である poly I:C 特異的な現象であり、poly I:C 刺激の直接的な制御であると考えられた。次に私は、TLR3 によって認識される poly I:C による NEAT1v2 の発現上昇が TLR3 を介しているか否かをノックダウン実験を用いて検討した結果、TLR3 を介していることが分かった。

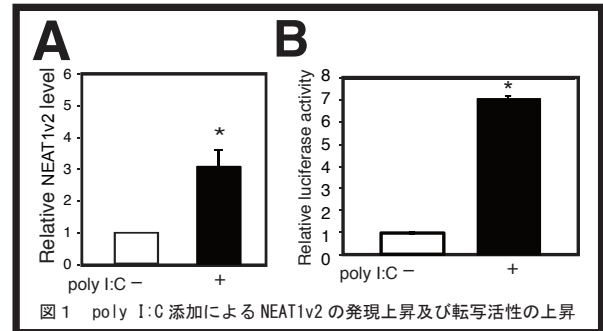


図1 poly I:C 添加による NEAT1v2 の発現上昇及び転写活性の上昇

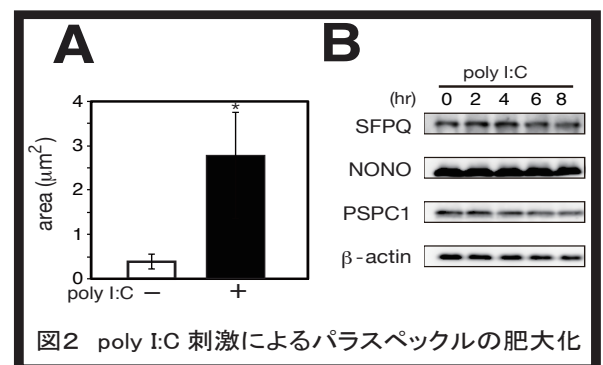


図2 poly I:C 刺激によるパラスペックルの肥大化

NEAT1v2 は核内構造体パラスペックル(転写調節因子等が局在化している核内に局在するタンパク質-RNA 複合体)の形成に必須な因子であることから、poly I:C 添加時における NEAT1v2 の発現上昇がパラスペックルにどのような影響を引き起こしているかを RNA-FISH 法及び免疫染色法によって顕微鏡観察した結果、poly I:C 添加によりパラスペックルの肥大化が観察された(図2A)。一方で、poly I:C を添加してもパラスペックル構成タンパク質である SFPQ や NONO の発現量に変化は見られなかった(図2B)。また、poly I:C 刺激におけるパラスペックル構成タンパク質である SFPQ の挙動について光褪色後蛍光回復法を用いて解析したところ、poly I:C 刺激の有無に関わらず、SFPQ の挙動の変化がなかったことから、SFPQ の質的変動はないと考えられた。以上の結果は、poly I:C 添加により NEAT1v2 の発現量が増え、その結果パラスペックル以外の核質に存在している SFPQ や NONO がパラスペックルへ集まっていることを示唆している。

2. NEAT1v2 及び SFPQ による抗ウイルスサイトカイン産生制御メカニズム

次に、自然免疫応答においての NEAT1v2 の発現上昇の重要性を解明する目的で、コントロール細胞と NEAT1 ノックダウン細胞において poly I:C 刺激によって発現変動する遺伝子群及び、mNeat1v2 を過剰発現させた細胞において発現変動する遺伝子群をマイクロアレイ及び RT-qPCR によって調べた。その結果、ウイルス感染抵抗において重要であると考えられる IL8 や CCL5 などのサイトカイン及びウイルスセンサータンパク質

である RIG-I や MDA5 の発現上昇に NEAT1v2 が関与していることが明らかとなった(図3A, B)。

また、*IL8* の 5'UTR 中には SFPQ 結合配列があることが TRANSFAC 解析より見つかった(図4C)。以上の結果から私は、*IL8* の発現に SFPQ が転写抑制因子として働いているのではないかと考えた。さらにこの考えを検証する目的で、SFPQ が *IL8* の 5'UTR に結合しているか、poly I:C 刺激及び mNeat1v2 過剰発現によってこの結合が抑制されるかをクロマチン免疫沈降法で検討行った。その結果、通常状態においては、SFPQ は *IL8* の 5'UTR に結合しており、poly I:C 刺激及び mNeat1v2 を過剰発現させた細胞では SFPQ と *IL8* の 5'UTR の結合が抑制されていた(図4D, E)。また、poly I:C 刺激によって SFPQ と NEAT1v2 との結合が上昇していることも明らかとした(図4F)。以上の結果から、通常 SFPQ は転写抑制因子として *IL8* の 5'UTR に結合しており、poly I:C 刺激により NEAT1v2 が増えることで結合が抑制されることが示唆された。

3. ウイルス感染時における NEAT1v2 の発現上昇及び抗ウイルスサイトカイン産生制御

最後に私は、これまで poly I:C で見られた現象が実際にウイルス感染時においても起きているか否かについて検証した。その結果、HSV-I とインフルエンザウイルス感染によって NEAT1v2 の誘導が引き起こされることが分かった(図5A)。また poly I:C の時と同様にウイルス感染時においてパラスペックルの肥大化が観察された。さらに、NEAT1 をノックダウンした細胞においては、インフルエンザウイルス感染時に発現する *IL8* が低下していた(図5B)。また、マウス個体に HSV-I とインフルエンザウイルスを感染させたところ、mNeat1v2 の発現上昇が見られた。以上の結果は実際、ウイルス感染においても NEAT1v2 の発現上昇が起きており、免疫応答制御に関与していることを示唆している。

【総括】

本研究により私は、lncRNA NEAT1v2 が転写抑制因子 SFPQ を介して、免疫応答制御に関与するという新しい知見を得た。NEAT1v2 は核内構造体パラスペックルの形成に必須であることは分かっていたが、哺乳類がなぜパラスペックル及び NEAT1v2 を有しているか、またその機能は

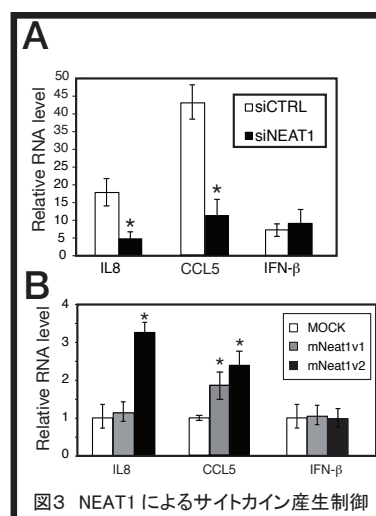


図3 NEAT1によるサイトカイン産生制御

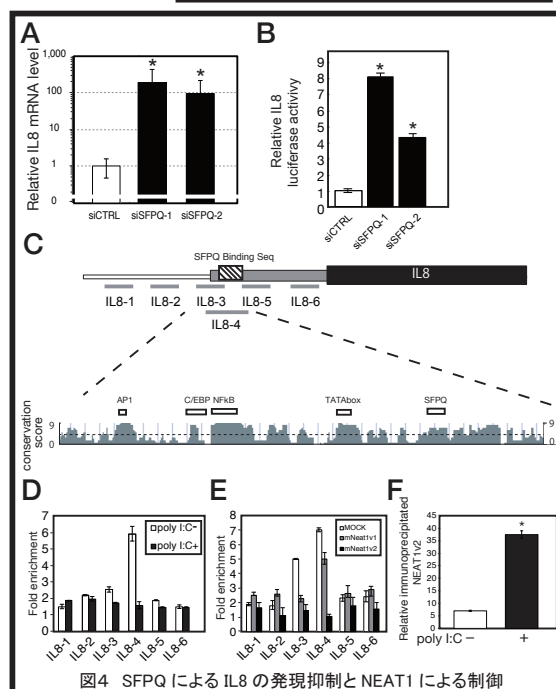


図4 SFPQによるIL8の発現抑制とNEAT1による制御

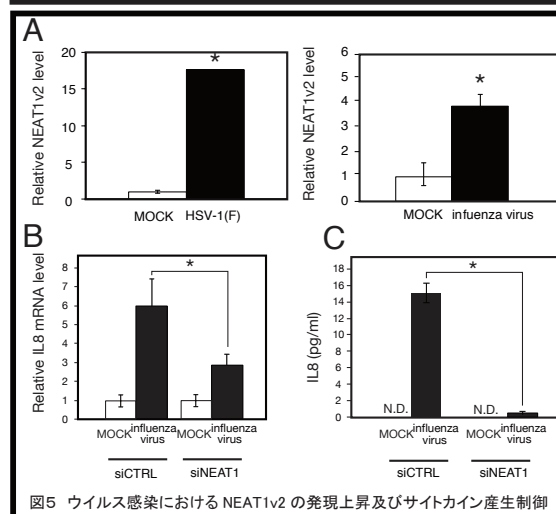


図5 ウイルス感染におけるNEAT1v2の発現上昇及びサイトカイン産生制御

不明であった。本研究遂行により、NEAT1 及びパラスペックルがウイルス感染における免疫制御に重要な役割を果たしていることを明らかに出来たと考えられる。さらにそのメカニズムの解析において、NEAT1v2 がパラスペックルを介して転写因子の時空間的制御を行っているという新たな概念の提唱が出来た。

ウイルスは宿主細胞内で宿主翻訳系を乗っ取り、複製・増殖を行っている結果、ウイルス感染時には宿主の翻訳が阻害される。そのため、宿主翻訳系を介さない遺伝子発現制御は利点があると考えられる。そこで私は、翻訳阻害剤添加時の poly I:C による NEAT1v2 の発現上昇を確認したところ、翻訳阻害時においても poly I:C による NEAT1v2 の発現上昇が見られた。以上の結果は、なぜタンパク質をコードしない lncRNA を生物は有しているのか、という疑問に対して理解を進めることが出来ると考えられる。

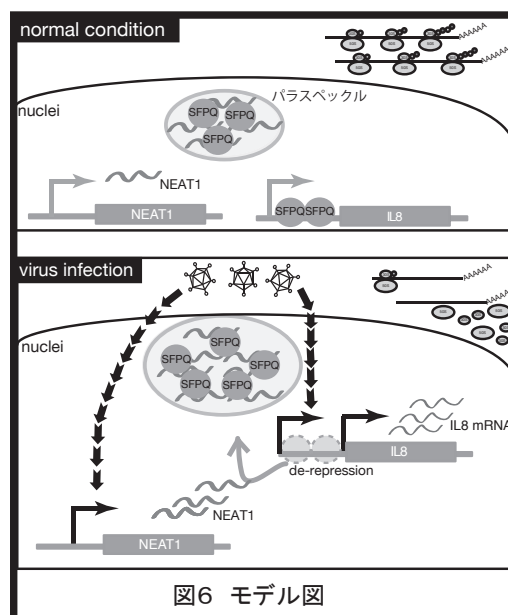


図6 モデル図

【参考論文】

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 PSF/SFPQ relocation between nuclear body paraspeckle and promoter region mediates IL8 expression in response to immune stimuli

Molecular Cell, in press