

核内 long non-coding RNA による自然免疫応答制御機構の解析と題する本論文は、哺乳動物細胞における自然免疫系における長鎖非コード RNA の新たな生理機能について論じたものである。自然免疫系とは、昆虫からほ乳類まで高度に保存され、感染防御の第一線として多様な免疫応答を制御している。この多様な免疫応答が協調して働くためには、細胞間で情報を伝達するサイトカインの存在が必要不可欠であることが知られるが、今村亮俊はウイルス感染に応答したサイトカインの転写制御において長鎖非コード RNA の NEAT1v2 が分子スイッチとして重要な役割を果たしていることを示した。長鎖非コード RNA とは、20 世紀後半から 21 世紀初頭にかけての大規模ゲノム解析から、タンパク質をコードしない非コード RNA として新たに同定された RNA 分子種である。しかしながら、大部分の長鎖非コード RNA の生理機能は依然として不明なままであった。

本論文の主要な部分は三章から構成され、第一章では、ウイルス感染によって非コード RNA の NEAT1v2 が誘導されることを示した。第二章では、NEAT1v2 がサイトカイン類の産生において重要な役割を果たすことを示した。第三章では、NEAT1v2 がサイトカイン類遺伝子の転写誘導のメカニズムを細胞生物学的手法、分子生物学的手法、ならびに生化学的手法で調べた。

第一章では、ウイルス感染を模擬する 2 本鎖 RNA poly I:C、ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルスが NEAT1v2 の発現上昇を引き起こしていることを、培養細胞及び個体感染モデルを用いて見出した。さらに、NEAT1v2 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼ活性を用いたレポーターアッセイを行うことで、poly I:C 刺激による NEAT1v2 の発現上昇が転写段階によるものであることを見出した。また、そのメカニズムとして TLR3-p38 経路が関与していることを遺伝学的手法、ならびに阻害剤を用いることで明らかとした。次に、NEAT1v2 を基本骨格とする核内構造体パラスペックルが poly I:C 刺激やウイルス感染でどのような形態変化になるかを、RNA-FISH 法、免疫染色法を用いて示した。すなわち、顕微鏡観察によってパラスペックルが肥大化していることを明らかとした。一方で、パラスペックル構成タンパク質である SFPQ や NONO は poly I:C 刺激やウイルス感染では発現変動しないことを見出した。

第二章では、ウイルス感染で発現上昇する NEAT1v2 にどのような役割を持つかを調べるため、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子プロファイリング解析を行った。その結果、NEAT1v2 が IL8 を含む複数のサイトカイン遺伝子の発現制御を行っていることを明らかにした。さらに、NEAT1v2 をノックダウンした細胞においては、ウイルス感染によるサイトカイン産生が実際に低下していることを ELISA 法で示した。

第三章では、NEAT1v2 による遺伝子発現制御メカニズムについて、IL8 遺伝子をモデルとして分子生物学的手法、生化学的手法を用いて解析を行った。具体的には、パラスペックル構成タンパク質である SFPQ が転写抑制因子として働いており、poly I:C 刺激やウイルス感染で NEAT1v2 が増えることで、SFPQ の局在が IL8 遺伝子プロモーター領域からパラスペックルへと移動し、その結果、IL8 遺伝子の転写抑制の解除が引き起こされることを明らかにした。具体的には、以下の通りである。まず、パラスペックル構成タンパク質を網羅的にノックダウンし、IL8mRNA の発現が変動し、転写活性が誘導される因子について探索したところ、SFPQ が IL8mRNA の転写抑制因子として働いていることを見出した。つぎに、SFPQ が IL8 プロモーター領域と結合しているか否かについてモチーフ検索を行った結果、これまで知られていた配列と一致する配列を IL8 プロモーター領域中に見出した。そこで、SFPQ とこの配列が結合するか否かをゲルシフトアッセイを用いて、*in vitro* で検証した。また、細胞内でも SFPQ が IL8 プロモーター領域と結合しているかを調べる目的で、クロマチン免疫沈降法を行った、その結果、通常 SFPQ は IL8 プロモーター領域と結合しているが、poly I:C 刺激時や NEAT1v2 過剰発現細胞においては SFPQ と IL8 プロモーター領域との結合が抑制されていた。また、RNA 免疫沈降法によって、poly I:C 刺激時において、SFPQ と結合している NEAT1v2 が多くなることを明らかにした。

最終章では、本研究で得られた結果を元に、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について考察している。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述べている。そして、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をしている。さらに、なぜ長鎖非コード RNA がこのようなウイルス感染応答に寄与しているかという疑問にまで踏み込んで考えている。ウイルスは自己複製出来ないため、宿主細胞の翻訳系を乗っ取ることで増殖している。このようなウイルス増殖過程において、宿主翻訳系は阻害されているが、そのような条件下でも、ウイルスに抵抗するために宿主はサイトカインを産生し、抵抗する必要がある。しかしながら転写因子のようなタンパク質を介した反応は、翻訳系が乗っ取られているため不利であると考えられる。一方で、宿主翻訳系が乗っ取られてしまうウイルス感染時において、タンパク質をコードしない非コード RNA によるサイトカイン産生制御は翻訳系を介さないため、大変有利であると考えられている。

以上の研究により、非コード RNA の NEAT1v2 が自然免疫応答におけるサイトカイン転写誘導において重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究成果は、免疫応答機構の研究において重要な貢献を果たしていることから、この研究を行った今村亮俊は博士（薬学）の学位を与えるのに相応しいと判断した。

[別紙3]

最 終 試 験 の 結 果 の 要 旨

いまむら かつとし
氏 名 今村 亮俊

試験担当者全員は 今村 亮俊 に対し、論文の内容およびその関連事項に関し、
種々試問を行った結果、合格 と判定した。