

博士論文を要約したもの

博士論文第目 Zc3h6 遺伝子の自然免疫系における機能の解明

Elucidation of Zc3h6 gene function in the regulation of innate immune responses

氏名 牛島直哉

(要約)

自然免疫系は、初期炎症応答の惹起および獲得免疫系の誘導に必須の免疫機構であり、マクロファージや樹状細胞などの自然免疫細胞が細菌やウイルス等の病原体を自然免疫受容体により認識することで、炎症性サイトカインやケモカイン、I型インターフェロン(IFN)発現が誘導され、炎症応答が惹起される。しかしながら、このような炎症応答は病原体の排除に有利に働く一方、その破綻は生体にとって有害なものとなることから、様々な機構によって厳密に制御されている。これらの調節機構の中でも、RNAポリメラーゼや転写因子といった転写に関わるタンパク質や、リボソームを中心とする翻訳因子群といった多数の核酸結合タンパク質 (nucleic acid-binding proteins; NBPs) の重要性は広く知られているが、近年、炎症性サイトカインmRNAの安定性や翻訳を制御する転写後制御機構の重要性が示されるなど、免疫応答の開始や終結におけるNBPsの機能の重要性がますます高まっている。また、スプライシングの過程でバックスプライシングと呼ばれる特殊なスプライシング反応により生成されるCircular RNA(CircRNA)は、miRNAやNBPと結合することで遺伝子発現を制御していることが明らかとされてきた。これらのことから、自然免疫応答におけるNBPs及びCircRNAの機能の詳細を理解することは、自然免疫応答の理解のみならず、炎症性疾患や自己免疫疾患発症メカニズムの理解、さらには新たな免疫療法の開発に繋がることが期待される。

本研究では、RAW264.7(マウスマクロファージ細胞株)を用いたCRISPR/Cas9システムを利用したスクリーニングにより、自然免疫応答調節に関与する新規分子としてZinc finger CCCH domain-containing protein 6 (Zc3h6)を独自に同定した。Zc3h6変異細胞では、細菌のリポ多糖 (LPS) 刺激による*Ii6* mRNA量と産生量で共に減少が見られたことから、LPS刺激に対する自然免疫応答において、*Ii6*の発現を正に調節している可能性が示唆された。その一方で、LPS受容体であるTLR4下流のシグナル伝達分子や転写因子NF- κ Bの活性化に変化が見られなかったことから、Zc3h6は*Ii6* mRNA発現を制御することにより自然免疫応答を制御していることが考えられた。また、LPS刺激により誘導される*Tnf*や*Cxcl10*の発現に影響を与えないことが明らかとなった。

ZC3H6はCCCH型のZnfドメインを3つ有しており、RNAと結合することが示唆されたことから、*Il6* mRNAとの相互作用の検討をルシフェラーゼアッセイおよび転写阻害剤を用いた実験により検討した。その結果、いずれの実験系においても顕著な差は見られなかった。このことから、Zc3h6は3'-UTRを介した既知のmRNA安定性制御機構とは独立した機構で、LPS刺激依存的に*Il6*の発現を制御している可能性が示唆された。

興味深いことに、*Zc3h6* 変異細胞に Zc3h6 を過剰発現させても、LPS 刺激による *Il6* の発現量は回復しなかったことから、*Zc3h6* 変異細胞で見られた表現型は ZC3H6 タンパク質の機能以外による可能性が考えられた。そこで、Zc3h6 の CircRNA に着目し、Zc3h6 の CircRNA が LPS 刺激により誘導されるかどうかを調べた結果、Zc3h6 は、既知の CircRNA である Exon2、Exon2-3 及び新規の CircRNA として同定した Exon2-4、Exon3 の上流 Intron (31bp 目) から下流 Intron (94bp 目) の計 4 種類の CircRNA を形成することがわかった。これら同定した Zc3h6 の CircRNA を *Zc3h6* 変異細胞に恒常発現させたところ、Exon2-4 で構成される CircRNA を恒常発現させた場合、*Il6* mRNA の発現量は WT と同程度まで回復した。さらに興味深いことに、Exon2-3 で構成される CircRNA を恒常発現させると *Il6* mRNA の発現量は WT と比べ、3 倍程度上昇した。以上のことから、Zc3h6 の CircRNA は LPS 刺激時において、*Il6* mRNA の発現制御における重要な役割を果たしていると考えられた。

これらのことより、Zc3h6 はマクロファージにおける LPS 刺激時に、CircRNA を形成することで、*Il6* mRNA の 3' -UTR を標的とする miRNA や *Il6* mRNA の転写後制御に関わる RNA 結合タンパク質を吸着し、*Il6* mRNA の発現制御を行なっている可能性が示唆された。