

博士論文

RNA 結合タンパク質 HuR による
ウイルスに対する自然免疫制御機構の解明

末吉 拓也

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子免疫制御研究室

(河合 太郎 教授)

2018 年 3 月 14 日

目次

| | |
|---|----|
| 第 1 章 序論 | 4 |
| 自然免疫と獲得免疫..... | 4 |
| 自然免疫とパターン認識受容体..... | 5 |
| Toll-like receptors (TLRs) | 5 |
| RIG-I-like receptors (RLRs)..... | 6 |
| 細胞質内 DNA センサー | 10 |
| インターフェロンと抗ウイルス応答..... | 11 |
| RNA の分解制御と RNA 結合タンパク質..... | 12 |
| RNA 結合タンパク質 Hu antigen R (HuR) | 12 |
| 自然免疫と RNA 結合タンパク質 | 14 |
| 本研究の目的..... | 15 |
| 第 2 章 材料と方法 | 16 |
| 使用した実験材料..... | 16 |
| Hu ファミリー発現プラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイ..... | 16 |
| 蛍光顕微鏡観察..... | 19 |
| 骨髄由来マクロファージ (BMDMs) における HuR 遺伝子のノックダウン..... | 20 |
| THP-1 細胞における HuR 遺伝子のノックダウン | 22 |
| MEF 細胞における HuR 遺伝子のノックダウン..... | 23 |
| CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子欠損細胞株の樹立..... | 24 |
| HuR 欠損細胞における HuR 遺伝子の戻し実験 | 29 |
| マイクロアレイ解析..... | 29 |
| PLK2 発現プラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイ | 30 |
| WST-1 アッセイ | 31 |
| PLK ファミリー阻害剤 BI2536 投与後のサイトカイン計測..... | 31 |
| PLK ファミリー阻害剤 BI2536 処理後の細胞質分画及び核分画の抽出とウエスタン ブロット..... | 31 |
| HuR 欠損細胞における細胞質分画および核分画のウエスタンブロット | 32 |
| HuR 及び PLK 2 欠損細胞における IRF3 の核への移行の蛍光顕微鏡による観察 .. | 32 |
| リボヌクレオタンパク質免疫沈降法 (ribonucleoprotein immunoprecipitation : RNP- IP) | 33 |
| mRNA 分解速度の計測..... | 33 |
| pGL3-Plk2-3'UTR プラスミドを用いた解析 | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 統計解析..... | 35 |
| 第3章 結果 | 36 |
| HuR は IFN- β の転写活性を誘導する | 36 |
| HuR はウイルス様刺激後にストレス顆粒に局在する | 36 |
| HuR 遺伝子ノックダウン細胞においては抗ウイルス性サイトカインの発現が減少する..... | 39 |
| CRISPR/Cas9 システムによる HuR 欠損 RAW264.7 細胞の樹立 | 43 |
| HuR 欠損 RAW264.7 細胞においては抗ウイルス応答が減弱する | 44 |
| HuR 欠損 RAW264.7 細胞においては Plk2 の発現量が減少している | 50 |
| PLK2 は IFN- β の発現を制御する | 53 |
| PLK ファミリー阻害剤 BI2536 は IRF3 の核移行を抑制する | 58 |
| HuR 欠損細胞においては IRF3 の核移行が抑制される | 59 |
| HuR タンパク質は Plk2 mRNA と結合し、その安定性を向上させる | 62 |
| 第4章 考察 | 67 |
| 第5章 謝辞 | 73 |
| 第6章 参考文献 | 74 |

第1章 序論

自然免疫と獲得免疫

私たちの身体は侵入してくるウイルスや細菌などの病原体を排除するために、自然免疫と獲得免疫と呼ばれる免疫機構を備えている。自然免疫は、侵入してきた病原体を迅速に察知し、I型インターフェロンや炎症性サイトカインを産生することで、獲得免疫を誘導する。このような自然免疫は主にマクロファージや樹状細胞といった自然免疫細胞によって担われている。自然免疫細胞は病原体の侵入をパターン認識受容体（pattern-recognition receptors：PRRs）によって迅速に察知すると、ウイルスや細菌、真菌といった侵入してきた病原体の種類に応じた適切なサイトカインの産生を誘導する。ウイルスや細菌、真菌などそれぞれの病原体に特徴的な自然免疫を誘導する分子パターンは病原体関連分子パターン（pathogen associated molecular patterns：PAMPs）と呼ばれており、PRRsはPAMPsを認識することで下流のシグナル伝達を開始させる。現在までに、数多くのPRRsが同定されてきており、私たちの身体に侵入してきた病原体を認識するPRRsとしてToll様受容体（Toll-like receptors：TLRs）、リグ様受容体（RIG-I-like receptors：RLRs）、cGAS（cyclic GMP-AMP synthase）、NOD様受容体（NOD-like-receptors）、C型レクチン受容体（C-type lectin receptors）などが同定されている（Kawai et al., 2010; Iwasaki et al., 2015; Chen et al., 2016）。これら多様な受容体がそれぞれの病原体を特異的に認識することで、その後のT細胞やB細胞によって担われる獲得免疫を適切に誘導している。自然免疫細胞は、PRRsによって病原体を認識することでサイトカインの産生を誘導すると同時に、病原体を貪食することで分解し、抗原ペプチドとして獲得免疫細胞へと提示する抗原提示と呼ばれる役割も担っている。樹状細胞やマクロファージは膜タンパク質であるMHCクラスII分子（MHCII）を発現しており、抗原ペプチドはこのMHCクラスII分子上に乗せられ、T細胞へと提示される。MHCIIはT細胞上のCD4分子と結合することで、抗原ペプチドをT細胞に発現している抗原特異的なT細胞受容体（T-cell receptor：TCR）へと提示し、T細胞を活性化する。CD4分子を発現し、MHCIIからの抗原提示を受けるT細胞はヘルパーT細胞へと分化し、マクロファージの活性化やB細胞による抗体産生を促すことで細胞内外の病原体を排除する。抗原提示細胞に貪食された病原体の抗原ペプチドはMHCIIへと提示される一方で、細胞内に侵入してきた病原体のタンパク質は細胞質においてプロテアソームにより分解され、MHCクラスI分子（MHCI）を介してT細胞へと提示される。MHCIはCD8を発現しているT細胞と結合し、TCRへと抗原提示を行うことで、CD8陽性T細胞を細胞傷害性T細胞（cytotoxic T lymphocyte：CTL）へと分化させる。CTLはウイルス感染細胞やがん細胞などの排除に非常に重要な役割を果たしている。また、抗原提示を受けヘルパーT細胞へと分化するCD4陽性T細胞は、侵

入してきた病原体に対応した機能を発揮する様々なヘルパーT細胞サブセットへと分類される。よく知られているものとして細菌や真菌の排除に寄与する Th1 細胞や Th17 細胞、寄生虫の排除やアレルギーの誘導に関与する Th2 細胞などのサブセットが存在しており、抗原提示を受けた T 細胞がどのサブセットへと分化するかは、抗原提示を担う自然免疫細胞が産生するサイトカインが方向づけているものと考えられている。自然免疫細胞は多様な PRRs を備えており、それぞれの PRRs が異なる病原体の構成成分を認識することで、それぞれの病原体に応じた適切なサイトカイン産生を誘導し、獲得免疫による応答を適切な方向へと導くことができる。この様に、自然免疫細胞は侵入してきた病原体に応じたサイトカインの産生と抗原提示により獲得免疫応答を適切に誘導するとともに、自身も積極的に病原体を排除することで宿主の恒常性を維持する上で非常に大きな役割を果たしている。

自然免疫とパターン認識受容体

Toll-like receptors (TLRs)

Toll-like receptors (TLRs) は PRRs として初めて同定された受容体である。TLRs は細胞外ドメインにロイシンリッチリピート、細胞質側に TIR (Toll-IL-1 receptor) ドメインを有する I 型膜貫通タンパク質である。TLRs は細胞膜上もしくはエンドソーム上に局在を示している。細胞膜上に発現している TLR1、2、4、5、6 は主に細菌の細胞壁成分を認識しており、エンドソームにその発現を示す TLR3、7、8、9 はウイルスや細菌に由来する核酸を認識する。それぞれの TLRs は、それぞれ異なる PAMPs を認識することで適切な自然免疫応答を誘導している。これまでに TLRs が認識する PAMPs は数多く明らかにされてきており、TLR2/1 や TLR2/6 はリポタンパク質を、TLR4 は LPS (Lipopolysaccharide) を、TLR5 はフラジェリンを、TLR3、7、8 は RNA を、TLR9 は DNA を主なリガンドとしていることが分かっている。エンドソームに発現を示し核酸を認識する TLRs は、貪食したウイルスや細菌、感染細胞に由来する核酸を小胞内において認識することで、自己核酸を誤認識するリスクを低減している。

TLRs はシグナル伝達のために用いるアダプター分子にも多くの共通点が見られ、TLR3 を除くすべての TLRs がアダプター分子として MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) を利用し、TLR3 と TLR4 はアダプター分子として TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) を用いている。MyD88 下流のシグナル伝達経路は主に NF- κ B や MAP キナーゼを活性化させることで炎症性サイトカインの産生を強く誘導する。その一方で、TRIF 下流のシグナル伝達は IRF3 と NF- κ B の活性化を誘導することで I 型インターフェロンと炎症性サイトカインの産生を促進する (図 1.1) (Kawai et al., 2010)。

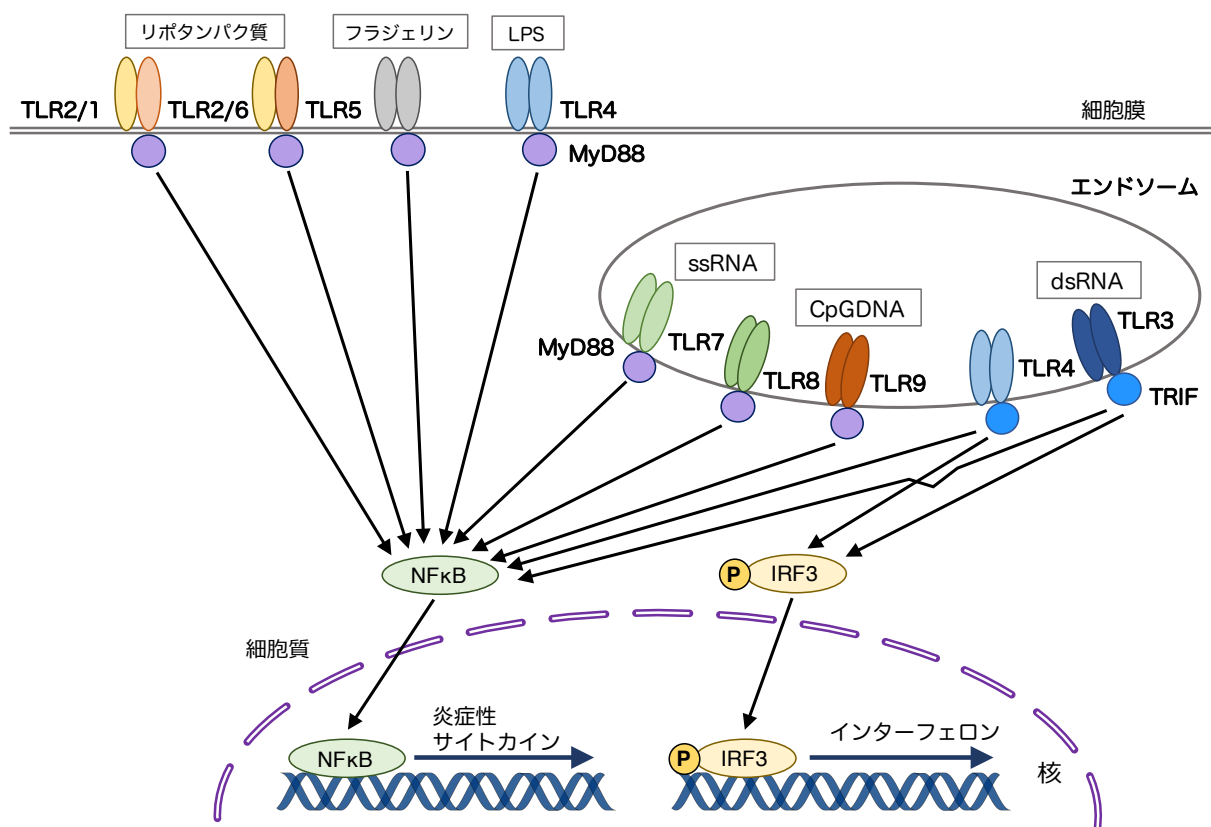


図 1.1 Toll-like receptors によるシグナル伝達の誘導

RIG-I-like receptors (RLRs)

細胞質内におけるウイルス RNA センサーとして RIG-I-like receptors (RLRs)が同定されている。RLRs は RIG-I (retinoic acid inducible gene- I)、MDA5 (melanoma differentiation associated gene 5)と LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2)の 3 種からなり、これら 3 つの RLRs は高く保存されたドメイン構造を示している

(Yoneyama et al., 2015)。RLRs は中心に 3 つの helicase ドメイン(Hel-1, Hel-2i, Hel-2) から成る DExD/H-box RNA helicase を、C 末端には C-terminal domain (CTD)を有している。N 末端に関しては、RIG-I と MDA5 は 2 つの CARD (caspase activation and recruitment domain)を持つ一方で、LGP2 は CARD を有していない (図 1.2)。RNA ヘリカーゼドメインと CTD は、ウイルス RNA の認識と ATP 依存的な構造の変化を担っており、CARD と下流のアダプター分子である IPS-1 (MAVS と呼ばれる) との相互作用を誘導する (Kawai., 2005; Seth., 2005; Civril et al., 2011)。IPS-1 はミトコンドリア外膜に局在を示し、N 末端の CARD ドメインに続いてプロリンリッチドメインを持ち、C 末端には膜貫通ドメインを有している。IPS-1 の CARD ドメインは活性化時にプリオン様の自己凝集を引き起こし、その相互作用が RLRs のシグナル伝達に必須であることが報告されている (Hou et al., 2011)。活性化した IPS-1 はミトコンド

リア周辺へ下流のシグナル伝達を誘導する様々なタンパク質を誘導する。そうして IPS-1 周辺へと誘導されるタンパク質の中には TRAF2、TRAF3、TRAF6、TRADD、TANK、FADD、RIP) などが含まれている。TRADD は TRAF3 や TANK を介して、TBK1/IKKi 複合体を誘導する一方で、TRAF2、TRAF6、FADD、RIP1 を介して IKK α / β / γ 複合体を誘導する。IKK α / β / γ 複合体は I κ B α のリン酸化と分解を通して NF- κ B を活性化することで炎症性サイトカインの発現を誘導する。また、TBK1/IKKi 複合体は IRF3 をリン酸化する。リン酸化された IRF3 は二量体を形成し、核へと移行することで I 型インターフェロンの産生を誘導する (Chiang et al., 2014; Quicke et al., 2017)。

IRF3 は I 型インターフェロンの産生を誘導する上で非常に重要な役割を果たしているため、IRF3 の活性化は複雑に制御されている (図 1.3)。IRF3 の活性化を正に制御する因子として、HERC タンパク質ファミリーのひとつである HERC5 やリン酸化酵素 PIKfyve、TRIM21、PTEN などが報告されている (Yang et al., 2009; Shi et al., 2010; Kawasaki et al., 2013; Li et al., 2015) HERC5 は IRF3 への ISG15 と呼ばれるユビキチン様分子の付与を触媒することで IRF3 の安定性を向上させている。また、PIKfyve はホスファチジルイノシトール 5-リン酸の産生を誘導し、産生されたホスファチジルイノシトール 5-リン酸は IRF3 と結合することで TBK1 と IRF3 の相互作用を促進する。PTEN は IRF3 の核への移行を抑制する 97 番目のセリンの脱リン酸化を通して、抗ウイルス応答を促進する。その一方で、IRF3 の活性化を負に制御する因子についても PIN1、YAP、PP2A、MAPK phosphatase 5 (MKP5)、TRIM26、FoxO1、Rubicon、ERR α など数多くのものが同定されており、それぞれ IRF3 のプロテアソームによる分解、脱リン酸化、脱 SUMO 化、他のシグナル分子との相互作用の阻害などを通して IRF3 の活性化を抑制している (James et al., 2015; Wang et al., 2015a; Wang et al., 2017; He et al., 2017; Heaton et al., 2016; Liu et al., 2016b; Kim et al., 2017)。

RIG-I と MDA5 は共通してウイルス RNA と結合する一方で、RIG-I と MDA5 が認識するウイルスは異なることが報告されている (Kato et al., 2006; Yoneyama et al., 2015)。RIG-I はパラミクソウイルス科のセンドライウイルスやニューカッスル病ウイルス、オルトミクスウイルス科のインフルエンザウイルス、フラビウイルス科の日本脳炎ウイルス、ラブドウイルス科の水疱性口炎ウイルスなどを認識する。それに対して、MDA5 はピコルナウイルス科のポリオウイルスや脳心筋炎ウイルスなどを認識する。また、レオウイルス、デングウイルス、ウエストナイルウイルスなどは RIG-I、MDA5 双方によって認識されることが知られている。このように RIG-I と MDA5 の間で認識するウイルスが異なるのは、RIG-I と MDA5 がそれぞれ特徴的な RNA のパターンに結合するからであると考えられている。

これまでの研究から RIG-I と MDA5 による RNA 認識の差異に關与する特徴として、RNA のサイズ、配列、修飾、二次構造などが知られている (Schlee et al., 2016)。人工二本鎖 RNA である poly(I:C)を用いた実験から、MDA5 は 300bp 以上の長い二本鎖 RNA により活性化され、RIG-I は 300bp 以内の短い二本鎖 RNA により活性化されることが報告された (Kato et al., 2008)。また、RIG-I は平滑末端でアデノシン三リン酸を有する 19bp 以上の二本鎖 RNA を強く認識する (Hornung et al., 2006; Schlee et al., 2009)。宿主の RNA は核において転写され 5'末端にキャップ構造が付加されるため、細胞質に存在するアデノシン三リン酸をもつ二本鎖 RNA の断片は主にウイルスや細菌に由来する。このことから、RIG-I がアデノシン三リン酸を有する RNA に対して高い結合能を示すことは、RIG-I による自己 RNA と非自己 RNA の弁別に重要であると考えられている。RIG-I による RNA の認識には 5'末端修飾が重要であるのに対して、MDA5 による RNA の認識には RNA の二次構造や配列が寄与していることが示唆されている (Pichlmair et al., 2009)。

先行研究から、RIG-I と MDA5 を直接修飾することでそのシグナル伝達を制御する因子も数多く報告されている (図 1.3)。RIG-I の活性化においては、様々な E3 ユビキチンリガーゼが関与している。これまでに TRIM25、Riplet、MEX3C、RNF125 などが RIG-I をユビキチン化する因子として当研究室を含め報告されている

(Arimoto et al., 2007; Gack et al., 2007; Oshiumi et al., 2009; Kuniyoshi et al., 2014)。TRIM25、Riplet、MEX3C はそれぞれ K63 型ポリユビキチン鎖を RIG-I に付与することで、RIG-I によるシグナル伝達を促進する。それに対して、RNF125 は RIG-I に K48 型ポリユビキチン鎖を付与することで、RIG-I の分解を促す負の制御因子として機能している。また、興味深いことに、MEX3C はストレス顆粒とよばれる細胞質内構造体において RIG-I やウイルス核酸と共局在を示すことが報告されており、シグナル伝達における RIG-I の局在の重要性が示唆される。また、RIG-I と MDA5 自身のセリン・スレオニンのリン酸化状態がシグナル伝達に關与していることも報告されている。RIG-I の 8 番目のセリン残基や 170 番目のスレオニン残基、MDA5 の 88 番目のセリン残基がリン酸化されていると、これらのセンサーは非活性化状態となりシグナル伝達が誘導されない。これらリン酸化した RLRs のフォスファターゼとして同定されたのが PP1 α と PP1 γ であり、シグナル伝達に必須の役割を果たしている (Wies et al., 2013)。ユビキチン化やリン酸化を介した制御以外にも、直接的な相互作用により RLRs のシグナル伝達を制御する因子も知られている。Arl ファミリータンパク質のひとつである Arl5B は、MDA5 の CTD に結合することで MDA5 と二本鎖 RNA の相互作用を抑制し、シグナル伝達を負に制御している (Kitai et al., 2015)。

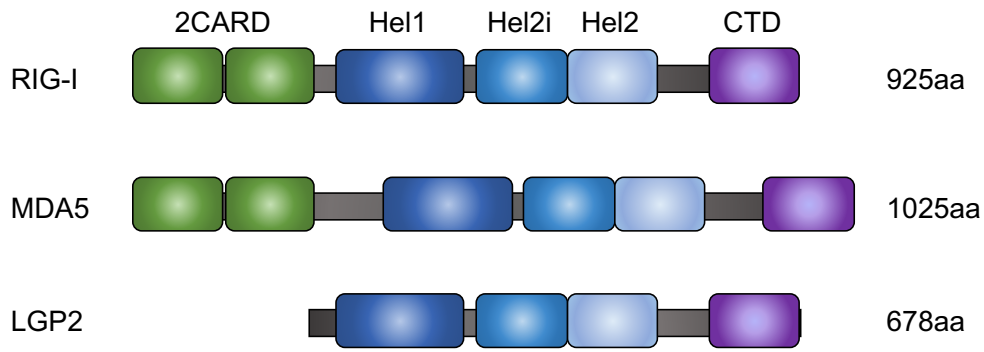


図 1.2. RLRs の模式図

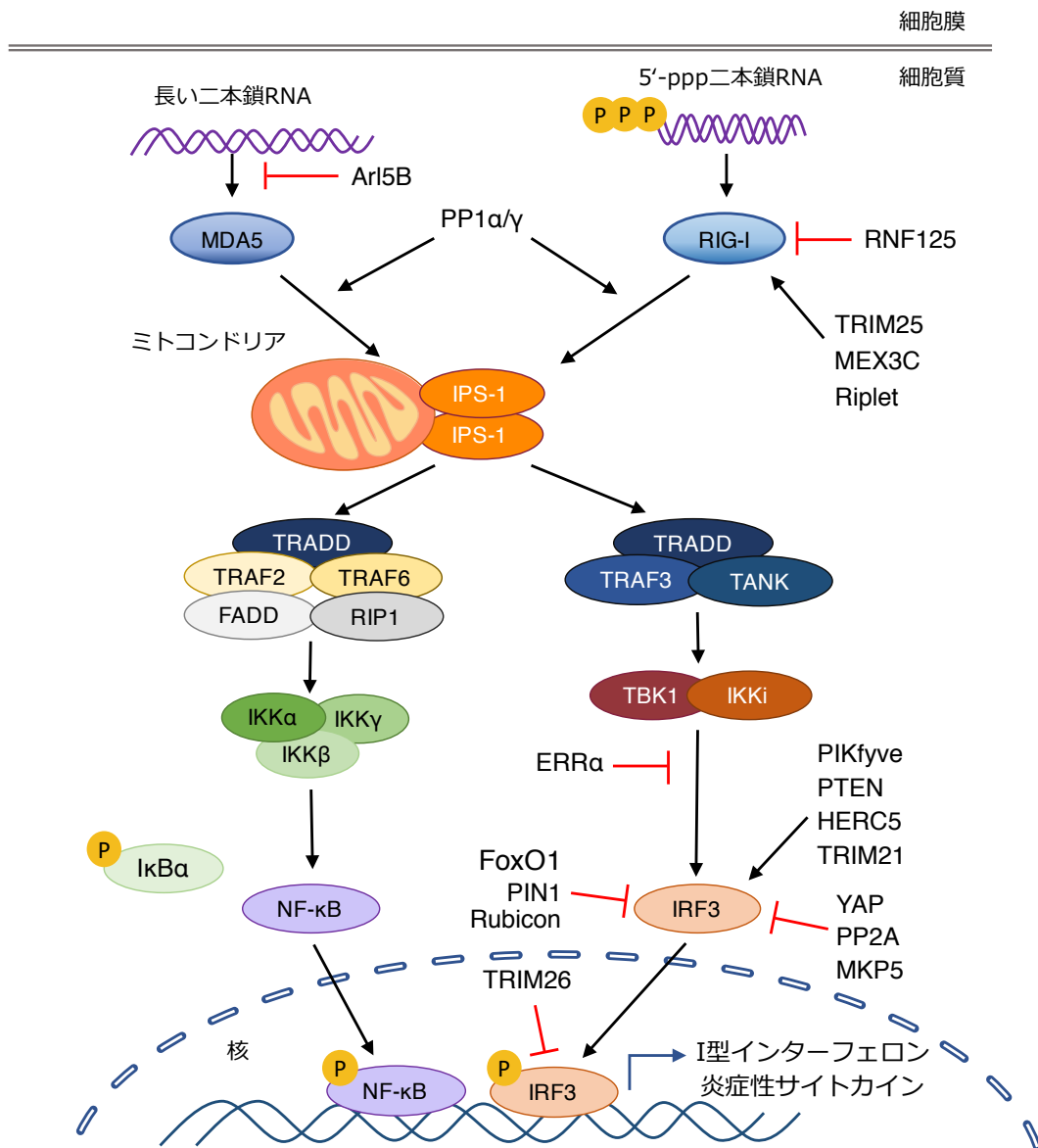


図 1.3. RIG-I と MDA5 のシグナル伝達経路

細胞質内 DNA センサー

DNA は遺伝情報の運び手として知られる以前から、貪食細胞の遊走などの免疫応答を引き起こすことが知られていた。しかし、どのような分子が DNA を認識し、免疫応答を誘導しているのかについては明らかとなっていなかった。2000 年になるとエンドソームに局在している TLR9 が非メチル化 CpGDNA を認識することが示されたが、2006 年には細胞質内に導入された DNA が TLRs 非依存的にインターフェロンの産生を誘導することが報告され、細胞質内にも DNA センサーが存在することが示唆された (Ishii et al., 2006; Stetson and Medzhitov., 2006)。その後、DAI、DDX41、IFI16、Sox2 といった分子が細胞質内 DNA センサーであるとする報告がなされたが、それらの分子が DNA 配列や細胞種に特異的でない DNA センサーであることの確証は得られなかった。そのような中で、2013 年に cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) が DNA 刺激により ATP と GTP から cGAMP (cyclic GMP-AMP) を産生する分子として同定された (Li et al., 2013; Ablasser et al., 2013)。cGAS が DNA 配列や細胞種に関係なく DNA と結合し cGAMP を合成すること、そうして合成された cGAMP が小胞体に局在するアダプター分子 STING を介してインターフェロンの産生を誘導すること、cGAS ノックアウトマウスは DNA ウイルスの感染に対して抵抗性を失うことなどから、細胞質内 DNA センサーとしての cGAS の役割が確立されるに至った (Ishikawa et al., 2008; Ishikawa et al., 2009)。

cGAS により産生された cGAMP は小胞体膜状に局在するアダプター分子 STING に結合し、STING を活性化させる。活性化状態をとった STING は小胞体から ERGIC (ER-Goldi intermediate compartment) を経てゴルジ体へと移行していく中で、TBK1、IKKs を活性化させ、IRF3 や NF- κ B による遺伝子発現を誘導する。STING の小胞体からの移行を阻害すると下流のシグナル伝達が阻害されることから、局在の変化は STING の機能に必須であることが示唆される (Chen et al., 2016) (図 1.4)。

数多くの DNA ウイルスが cGAS によって認識されることが報告されており、その中にはヒトパピローマウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、B 型肝炎ウイルスなどが含まれている。また、中間産物に DNA 鎖を生じる HIV-1 などのレトロウイルスの感染も cGAS により認識されることが報告されている (Ma and Damania., 2016)。

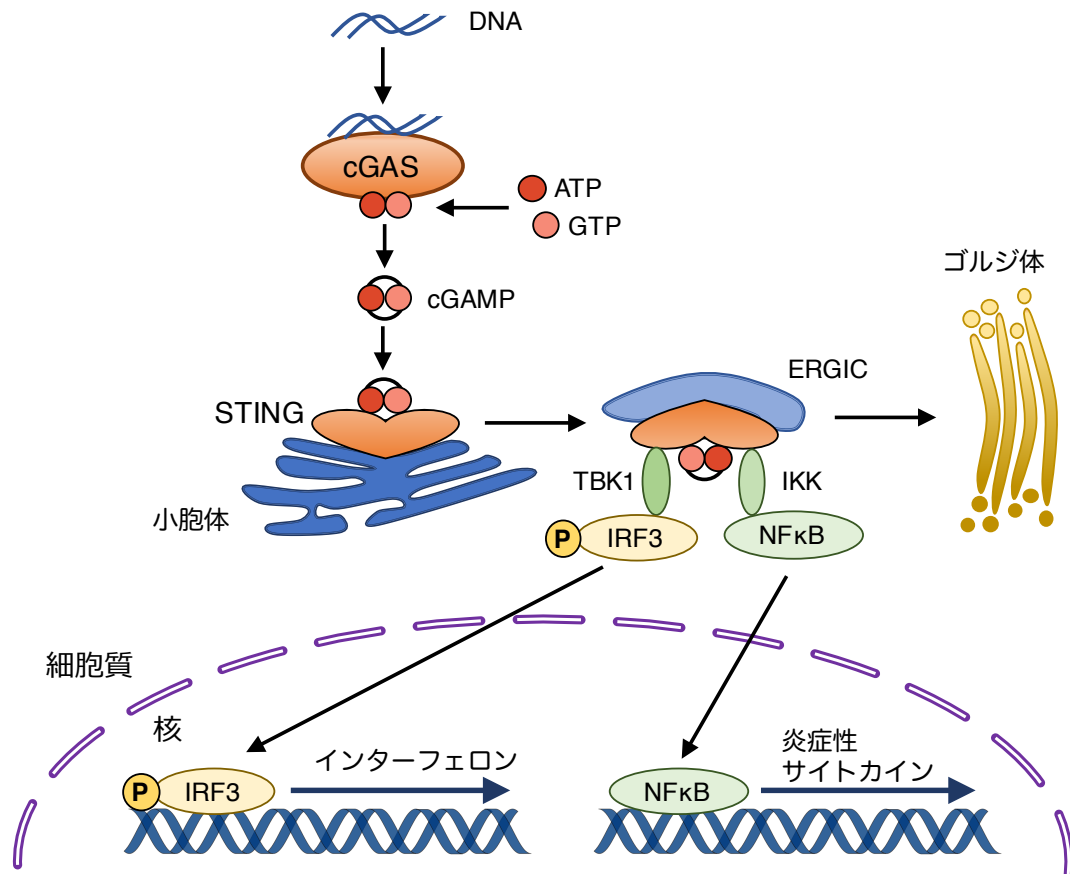


図 1.4. cGAS のシグナル伝達経路

インターフェロンと抗ウイルス応答

インターフェロン (IFN) には3つのファミリー (I型、II型、III型インターフェロン) が存在する。I型 IFN はヒトで13種、マウスで14種のサブタイプが存在する IFN- α とサブタイプの存在しない IFN- β から構成されている。II型 IFN は IFN- γ のみから成り、主に T細胞や NK細胞から産生される。III型 IFN は IFN λ 1、IFN λ 2、IFN λ 3、IFN λ 4 の4種から成り、I型 IFN と類似した働きを見せるが、その機能は限定的なものである (McNab et al., 2015)。

I型 IFN はほぼすべての細胞から産生され、病原体の感染が PRRs により認識されることが引き金となる。PRRs が病原体の感染を認識すると、下流のシグナル伝達因子が活性化し、IRF3、IRF7、NF- κ B などのリン酸化を誘導する。リン酸化したこれらの転写因子は核へと移行し、I型 IFN の発現を促進する。産生された I型 IFN は、感染細胞とその周辺細胞の IFNAR1/IFNAR2 のヘテロ二量体から構成される IFN 受容体により認識され、JAK-STAT 経路の活性化を介して IFN-stimulated genes (ISGs) の発現を誘導する。IFN により誘導される ISGs は数百種に及ぶことが知られており、これらの因子は様々な段階におけるウイルスの複製を抑制している。

RNA の分解制御と RNA 結合タンパク質

mRNA の分解は生体内の恒常性を適切に維持するために非常に重要な役割を果たしている。細胞質における mRNA 分解は、脱アデニル化依存的分解と脱アデニル化非依存的分解のふたつに分けられ、哺乳類細胞においては脱アデニル化依存的分解経路が主に用いられている。mRNA の脱アデニル化は脱アデニル化酵素である CCR4-NOT や Pan2/3 によって誘導される (Goldstrohm et al., 2008; Wahle et al 2013)。脱アデニル化によって mRNA からポリ A 尾部が取り除かれると、それに引き続き 5'-3'または 3'-5'方向の mRNA 分解が引き起こされる。5'-3'方向の mRNA 分解はキャップ構造除去から始まる。デキャッピング酵素である Dcp1/2 が mRNA の 5'末端から m7G を取り除くと、5'-3'エキソリボヌクレアーゼである Xrn1 が mRNA を分解する (Houseley and Tollervey., 2009)。それに対して、3'-5'方向の mRNA 分解は、RNA の分解を担うタンパク質の複合体であるエキソソームが標的 mRNA を認識、分解する。また、エキソソームによる 3'-5'方向の分解に続いてデキャッピング酵素 DCPS が 5'末端に残る核酸を分解することも知られており、5'-3'方向と 3'-5'方向の mRNA 分解は協調的に機能しているものと考えられている (Borbolis and Syntichaki., 2015)。

mRNA の分解を誘導する因子は明確には明らかとなっていないが、mRNA 上の Adenylate/Uridylate (AU) リッチ配列 (AU-rich element; : ARE) が重要な役割を果たしていることが知られている。ARE は様々な RNA 結合タンパク質により認識されることが報告されており、ARE 配列に結合するタンパク質を指して AU リッチ配列結合タンパク質 (AU-rich element binding proteins; : AUBPs) と呼称することもある。ARE に結合する RNA 結合タンパク質の中には、mRNA の分解を促進するものと抑制するものの双方が存在することが報告されている。mRNA の分解を促進する RNA 結合タンパク質としては、tristetraprotin (TTP)、KH-domain-splicing regulatory protein (KSRP)、ARE/poly-(U) binding degradation factor 1 (AUF1) などが知られている (Winzen et al., 2008; Lu et al., 2006)。これらは標的 mRNA に結合すると、標的 mRNA と RNA 分解を誘導する酵素群との相互作用を誘導することにより mRNA の分解を促進する。その一方で、mRNA の分解を抑制する RNA 結合タンパク質としては Hu antigen R (HuR、または ELAVL1) が存在する。

RNA 結合タンパク質 Hu antigen R (HuR)

HuR (Hu antigen R) は RNA 結合タンパク質の ELAV (Embryonic lethal abnormal vision) ファミリー遺伝子によってコードされる Hu ファミリータンパク質のひとつである。哺乳類の Hu ファミリータンパク質には、HuR の他にも HuB、HuC、HuD が存在している。HuR は全身の組織において発現が確認されている一方、HuB、

HuR および HuD は神経細胞特異的に発現が確認されている (Hinman et al., 2008; Simone et al.; 2013)。

HuR は 3 つの RNA 認識モチーフ (RNA recognition motif : RRM) を持つ RNA 結合タンパク質である。HuR は定常状態においては主に核に局在しているが、病原体の感染、ヒートショック、UV といった様々な刺激に応答して、細胞質においても局在が観察される。細胞質に局在する HuR は、ストレス顆粒と呼ばれる細胞質内構造体に含まれることが報告されている (Liu et al., 2014; Ansari et al., 2016)。ストレス顆粒において HuR は標的 mRNA と結合し、主にその安定性の維持や翻訳に関与している。HuR が標的 mRNA の安定性を向上させるメカニズムとしては、標的 mRNA への他の RNA 結合タンパク質や miRNA の結合と競合することによるものと考えられている (図 1.5)。

現在までに、HuR の標的となる mRNA の探索が RIP-ChIP、PAR-CLIP、iCLIP などの網羅的解析手法により行われてきた。iCLIP や PAR-CLIP による解析の結果からは、HuR は AU リッチ配列よりも U リッチ配列に多く結合する傾向があることが確認された。(Uren et al., 2011; Mukherjee et al., 2011)。また、興味深いことに、HuR は mRNA の 3'UTR のみではなくイントロンにも結合している傾向が見られたことから、HuR が mRNA のスプライシングにも寄与している可能性が示唆された。

HuR 遺伝子をノックアウトしたマウスは胎盤形成の異常により胎生致死となることが報告されている (Katsanou et al., 2009)。そのため、HuR 遺伝子の *in vivo* における解析は主にコンディショナルノックアウトマウスを用いて行われてきた。tamoxifen を投与することによりマウスの HuR を全身性で欠損させた誘導型ノックアウトマウスにおいては、生殖系列細胞の細胞死が引き起こされることにより 1 週間程度で死亡することが報告されている (Ghosh et al., 2009)。また、胸腺細胞特異的に HuR を欠損させたマウスモデルにおいては、T 細胞のポジティブセレクションによる成熟や、胸腺から抹消への移動、抹消における T 細胞の正常な細胞死が阻害されることなどが示されている (Papadaki et al., 2009)。B 細胞特異的に HuR 遺伝子を欠損させた研究も行われており、HuR を欠損した B 細胞においてはエネルギー代謝に関する遺伝子の発現が変動することが原因で B 細胞の活性化に異常が生じることが報告されている (Diaz-Muñoz et al., 2015)。また、興味深いことに、骨髓細胞系で HuR を欠損したマウスモデルにおいては、TLR4 リガンドである LPS により誘導される炎症が増悪化することで敗血症における生存率が減少することが報告されている (Yiakouvaki et al., 2012)。HuR の標的となりうる mRNA の種類の多さから、HuR の欠損や過剰発現が発生、細胞増殖、免疫応答といった幅広い減少に影響を与えることが報告されている。

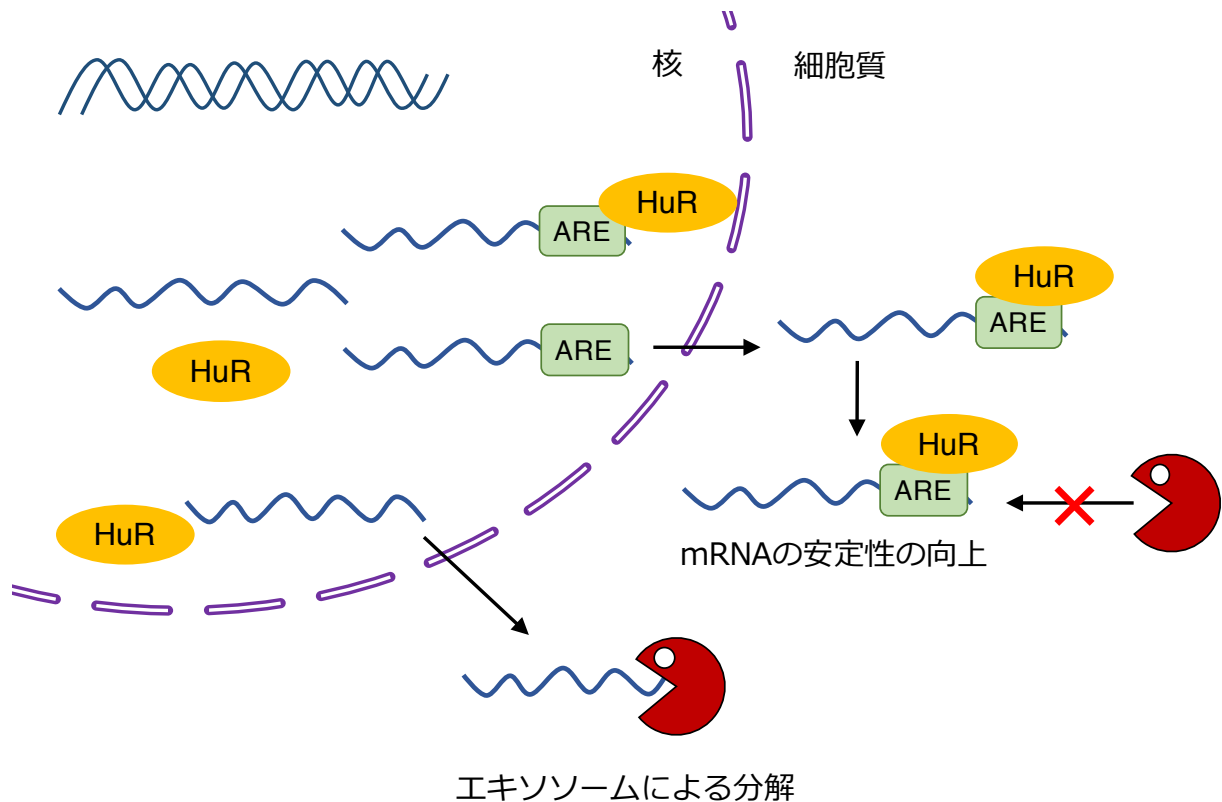


図 1.5. HuR の細胞内局在とその機能

自然免疫と RNA 結合タンパク質

自然免疫応答においては、シグナル伝達分子による制御以外にも、mRNA の制御を含む転写後調節も重要な役割を果たしている (Carpenter et al., 2014; Kafasla et al., 2014)。サイトカインやシグナル伝達分子をコードする mRNA の翻訳と分解のバランスが適切な応答に関与することが報告されている。mRNA の安定と分解を通して炎症応答を制御する RNA 結合タンパク質として Regnase-1、Roquin、Arid5a などが報告されている。これらの RNA 結合タンパク質は炎症性サイトカインをコードする mRNA に結合する一方で、mRNA の制御に関しては異なる役割を担っている。Regnase-1 と Roquin は標的 mRNA の 3'UTR 上のステムループ構造に結合することでその分解を促進する (Leppek et al., 2013; Mino et al., 2015)。それに対して、Arid5a は標的 mRNA 上の 3'UTR に結合することでその安定性を向上させる (Masuda et al., 2013)。自然免疫における mRNA 制御の重要性はマウスモデルにおいても示されており、Regnase-1 のノックアウトマウスは炎症性サイトカインの mRNA が適切に分解されないことが原因で過剰な炎症が誘導され、生後 12 週以内に死亡することが報告されている (Matsushita et al., 2009)。

本研究の目的

これまで本研究室で行われてきた発現スクリーニングの結果から、RNA 結合タンパク質である Hu antigen R が IFN- β の転写活性を誘導することを見出した。そこで本研究では、RNA 結合タンパク質 HuR のウイルスに対する自然免疫における機能の解明を目的とした。

第2章 材料と方法

2.1 使用した実験材料

マウス

6-10 週齢の C57BL/6 マウスを用いた。マウスは、日本クレアより購入後、奈良先端科学技術大学院大学の動物実験施設 SPF において飼育管理した。動物実験を行う際は、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する法律」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、奈良先端科学技術大学院大学の動物実験委員会が定める規程に従い実験を行った。

培養細胞

HEK293T 細胞（ヒト胎児由来腎臓癌細胞）、Mouse embryonic fibroblast (MEF、マウス胎児由来線維芽細胞)、および RAW264.7 細胞（マウスマクロファージ細胞株）は、10%ウシ胎児血清（FBS）（Life Technologies）含有の Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM）培地（Nacalai）を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養を行った。細胞剥離剤には 10 mM Ethylene diaminetetraacetic acid（EDTA）（Nacalai）含有 2.5 mg/l トリプシン溶液（Nacalai）を用いた。

THP-1 細胞（ヒト単球系細胞株）は 10% FBS 含有の RPMI 1640 培地（L-グルタミン含有、Nacalai）を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養を行った。

マウスより採取した造血幹細胞は 2 ng/ml M-CSF（BioLegend）、100 units/ml ペニシリン・100 µg/ml ストレプトマイシン（Nacalai）および 10% FBS を含んだ RPMI1640 培地（Nacalai）を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養を行った。細胞の剥離には 10 mM EDTA 含有 PBS を用いた。

菌株

プラスミド作成時の形質転換には大腸菌（DH5α 株、TOYOBO）を用いた。大腸菌は、37°C 条件下で LB 液体培地（Nacalai）または LB 平板培地（Nacalai）で培養した。

2.2 Huファミリー発現プラスミドを用いたレソフェラーゼアッセイ

発現プラスミドの作成

Hu ファミリー遺伝子（HuR、HuB、HuC、HuD）の発現プラスミドを作成するために、マウス由来の各遺伝子の塩基配列情報を NCBI より入手し、CDS 配列を増幅するプライマーを設計した（表 1）。これらのプライマーを用いてマウス由来 cDNA を鋳型として、KOD FX (TOYOBO)、2×FX Buffer (TOYOBO)、2.5 mM dNTP Mix (TOYOBO) を用いて PCR を行った。PCR 産物を illustra GFXTM PCR DNA and GelBand Purification Kit (GE Healthcare) を用いて精製し、インサート産物とした。その後、pFlag-CMV-2

とインサート産物を制限酵素により処理した。制限酵素処理産物を精製後、2×Ligation Mix (TOYOBO) を用いて、pFlag-CMV-2 とインサート産物を 16°C で 30 分間ライゲーション反応を行った。ライゲーション産物を形質転換用大腸菌 (*Escherichia coli* DH5α 株、TOYOBO) を用いて形質転換した後、50 µg/ml Ampicillin 含有 LB 平板培地に塗抹し、37°C で一晩培養した。得られたコロニーを 50 µg/ml Ampicillin 含有 LB 液体培地に植菌し、37°C、180 rpm で一晩振盪培養した。その後、FastGene Plasmid Mini Kit (NIPPON Genetics) を用いてプラスミド抽出を行った。

表 1. Hu ファミリー発現プラスミド構築用プライマー

| 名前 | 配列 (5'-3') | 制限酵素 |
|------------------|-----------------------------------|--------|
| pFlagCMV_HuR_fwd | ATGGGAATTCTATGTCTAATGGTTATGAAGA | EcoR I |
| pFlagCMV_HuR_rev | ATCGTCGAGTATTTGTGGGACTTGTTGGT | Sal I |
| pFlagCMV_HuB_fwd | ATGGGAATTCTATGACAAAGCAATATGAGGTTG | EcoR I |
| pFlagCMV_HuB_rev | ATCGTCGAGTAGGCTTTGTGCGTTTTGTTTG | Sal I |
| pFlagCMV_HuC_fwd | ATGGGAATTCTATGGTCACTCAGATACTGGGGG | EcoR I |
| pFlagCMV_HuC_rev | ATCGTCGAGTCAGGCCTTGCTGCTTGC | Sal I |
| pFlagCMV_HuD_fwd | ATCGCGGCCGCTATGGAGTGAATGGCTTGAAG | Not I |
| pFlagCMV_HuD_rev | ATCGTCGAGTCAGATTTGTGGGCTTTGTTG | Sal I |

シーケンス解析

プラスミド溶液に、Big Dye Terminator Ready Reaction Mix、5×Big Dye Sequencing Buffer、対応するシーケンスプライマー (表 2) を加え、95°C で 1 分間反応させた後、95°C で 10 秒、50°C で 5 秒、60°C で 4 分間の反応を 25 サイクル行った。PCR 産物をエタノール沈殿し、HiDi Formamid (Applied Biosystem) を加え、DNA を溶解した。得られた DNA 溶液を 95°C で 5 分間熱処理を行い、キャピラリーシーケンサー (Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer) を用いて塩基配列のデータを得た。得られた塩基配列データは、GENETYX Ver.12 を用いて解析し、得られたプラスミドに目的の配列が挿入されていることを確認した。

表 2. 本研究で用いたシーケンス解析用プライマー

| 名前 | 配列 (5'-3') | 標的プラスミド |
|------------------------------|-------------------------|---------------|
| pFlagCMV_seqeence_forward | CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG | pFlag-CMV-2 |
| pFlagCMV_seqeence_reverce | GCACTGGAGTGGCAACTTCC | pFlag-CMV-2 |
| px330_sequence_forward | TGGACTATCATATGCTTACC | px330 |
| pCAG-EGxxFP_sequence_forward | GCCTTCTTCTTTTCTACAGC | pCAG-EGxxFP |
| pGL3promoter_Xba1_sequence | CGTGGATTACGTCGCCAGTCAAG | pGL3-promoter |
| M13_Reverse_primer | CAGGAAACAGCTATGAC | TOPO |

各 RRM 欠損 HuR 発現プラスミドの作成

HuR 配列上の RRM1、RRM2、RRM3 に対応する領域をまたぐプライマーを設計した(表 3)。上記で作成した pFlag-CMV-2 HuR を鋳型とし、これらのプライマーと KOD FX を用いて PCR 反応を行った。その後、PCR 産物を精製した。精製した PCR 産物から鋳型を取り除くために、大腸菌由来産物を消化する DpnI により処理を行った。その後、制限酵素処理産物を精製し、大腸菌へと形質転換を行い、プラスミドを抽出することでそれぞれ pFlag-CMV-2 HuR Δ RRM1、pFlag-CMV-2 HuR Δ RRM2、pFlag-CMV-2 HuR Δ RRM3 を得た。

表 3. 各 RRM 欠損プラスミド構築用プライマー

| 名前 | 配列(5'-3') |
|-------------------------|--|
| pflagmHuR_ΔRRM1_forward | ATTGGGAGAACGAATGTGTCATATGCTCGCCCAAGCTCAG |
| pflagmHuR_ΔRRM1_reverse | ATTCGTTCTCCCAATGTCATCCC |
| pflagmHuR_ΔRRM2_forward | ATCAAAGATGCCAACGAGCCCATCACAGTGAAGTTTGC |
| pflagmHuR_ΔRRM2_reverse | GTTGGCATCTTTGATGACCTC |
| pflagmHuR_ΔRRM3_forward | TCCTCGGGCTGGTGCGTTTCCTTCAAACCAACAAG |
| pflagmHuR_ΔRRM3_reverse | GCACCAGCCCCGAGGAAGCATTGCCG |

ルシフェラーゼアッセイ

Dual-Luciferase Reporter assay (Promega)を用いて解析した。レポータープラスミドとして、IFN- β プロモーター下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む pGL3-IFN- β -Luc、ISRE プロモーター下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む pGL3-ISRE-Luc、NF- κ B プロモーター下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む pGL3-NF- κ B-Luc、恒常的にプロモーター活性を示す pTK プロモーター下流にウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を含む pTK-Luc を使用した。

24 well プレートに播種した HEK293T 細胞に、各種 pGL3 プラスミドを 100 ng、pTK-Luc を 10 ng とともに、各種発現プラスミドを 500 ng トランスフェクションした。発現プラスミドを濃度勾配をつけてトランスフェクションした条件においては、それぞれ 100 ng、250 ng、500 ng のプラスミドを用いた。また Mock として pFlag-CMV-2 を用いた。トランスフェクションには、溶液として Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) を、トランスフェクション試薬として Polyethylenimine (Polysciences) を用いた。プラスミドを加えた Opti-MEM に、プラスミド濃度の 3 倍量となるように Polyethylenimine を添加した Opti-MEM を混ぜ合わせ 15 分間静置した。15 分後、細胞に混合液を加え、6 時間後に培地を交換した。その翌日に、培地を取り除き、100 μ l の 5 \times Passive Lysis Buffer (Promega) により細胞を溶解した。この細胞溶解液を 96 well プレートに 10 μ l ずつ添加した。各 well を 50 μ l の Luciferase Assay Reagent II (Promega)、50 μ l の Stop

& Glo Reagent (Promega) で反応させ、ホタルルシフェラーゼ及びウミシイタケルシフェラーゼの発光を Multi-mode plate reader TriStar LB942 (Berthold) により計測した。ウミシイタケルシフェラーゼの発光量を内部標準とし、それぞれのホタルルシフェラーゼの発光量を相対的に比較した。また、それぞれのプラスミドの発現を抗 Flag 抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した。ローディングコントロールとして Actin を用いた。ウエスタンブロットは 2.4 に記載の通りに行い、用いた抗体とその希釈倍率を下表に示した (表 4)。

表 4. プラスミドの発現確認に用いた一次抗体及び二次抗体とその希釈倍率

| 抗体 | 企業名 | 希釈倍率 |
|---|------------|----------|
| anti-FLAG M2 mouse monoclonal antibody | Sigma | 1/5,000 |
| anti-Actin goat polyclonal antibody (I-19) | Santa Cruz | 1/1,000 |
| HRP-conjugated anti-Mouse IgG monoclonal antibody | Sigma | 1/30,000 |
| HRP-conjugated anti-Goat IgG monoclonal antibody | Sigma | 1/30,000 |

2.3 蛍光顕微鏡観察

Poly-L-lysine solution (Sigma) により処理したカバーガラスを 24 well プレート上に布置し、そのカバーガラス上に MEF 細胞を播種した。それらの細胞を poly(I:C) HMW (1 µg/ml)、poly(I:C) LMW (1 µg/ml) を lipofectamine 2000 を用いて刺激した。6 時間後、細胞を PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒド (Nacalai) により室温で 20 分間固定した。0.02% triton PBS で 3 回洗浄後、100mM グリシン 0.02% triton PBS を加え室温で 30 分間反応させた。30 分後、0.02% triton PBS で 3 回洗浄し、10% FBS 0.02% triton PBS を加え 4°C で一晩ブロッキング処理を行った。その後、10% FBS 0.02% triton PBS で一次抗体を希釈し、4°C で一晩反応させ、0.02% triton PBS で 3 回洗浄した。二次抗体を 10% FBS 0.02% triton PBS で希釈し、遮光しながら 1 時間反応させた。0.02% triton PBS で 3 回洗浄後、10% FBS 0.02% triton PBS で Hoechst33342 を希釈し、10 分間反応させた。Hoechst 33342 による処理のあと、0.02% triton PBS で 3 回洗浄後、Fluoro-KEEPER Antifade Reagent, Non-Hardening Type (Nacalai) とマニキュアによりスライドガラス上にサンプルを封入した。作成したサンプルは共焦点蛍光顕微鏡 LSM 700 (ZEISS) により観察し、ZEN software により画像の処理を行った。使用した一次抗体および二次抗体の希釈倍率を以下に示した (表 5)。

表 5. 蛍光顕微鏡観察に用いた一次抗体及び二次抗体とその希釈倍率

| 抗体 | 企業名 | 希釈倍率 |
|--|------------|----------|
| anti-HuR mouse monoclonal antibody (3A2) | Santa Cruz | 1/100 |
| anti-G3BP rabbit polyclonal antibody | Sigma | 1/100 |
| Alexa Fluor 488 Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody | Invitrogen | 1/30,000 |
| Alexa Fluor 568 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody | Invitrogen | 1/30,000 |

2.4 骨髄由来マクロファージ (BMDMs) における HuR 遺伝子のノックダウン

骨髄由来マクロファージの培養と siRNA の導入および自然免疫リガンドによる刺激

マウスの大腿骨及び脛骨から採取した骨髄細胞を 2 ng/ml M-CSF、100 units/mL ペニシリン・100 µg/ml ストレプトマイシンおよび 10 % FBS を含んだ RPMI1640 培地で培養することで BMDM への分化誘導を行った。培養開始から 3 日目に培地交換を行い、培養開始から 5 日目に 10 mM EDTA 含有 PBS により培養皿から BMDMs を回収し、Neon Transfection System (Life Technologies) を用いたエレクトロポレーション法により、1500 mA、20 ms、1 Pulse の条件で HuR を標的とする siRNA を導入した。コントロールとしては Firefly Luciferase を標的とする siRNA を用いた。siRNA の配列は下表に示した (表 6)。エレクトロポレーションにより siRNA を導入してから 2 日後に下記の通りウエスタンブロットと Real-time PCR を行なった。エレクトロポレーションにより siRNA を導入した BMDMs を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて poly(I:C) HMW (Invivogen) を細胞内に導入することで刺激した。刺激濃度と時間は下表の通りに行った (表 7)。

表 6. BMDMs のノックダウンに用いた siRNA の配列

| Gene name | Species | STRAND (+) | STRAND (-) |
|-------------------|---------|---------------------------|---------------------------|
| <i>Elavl1</i> | Mouse | AGGUUGAAUCUGCAAAGCUUAUUTT | AAUAAGCUUUGCAGAUUCAACCUTT |
| <i>Luciferase</i> | Firefly | CGUACGCGGAUACUUCGATT | UCGAAGUAUUCGCGUACGTT |

表 7. BMDMs の刺激条件

| 受容体 | リガンド試薬 | 刺激濃度 | 刺激時間 |
|------|------------------------------------|---------|------|
| MDA5 | poly(I:C) HMW + Lipofectamine 2000 | 1 µg/mL | 8h |

ウエスタンブロットによる HuR ノックダウンの確認

上記の過程で siRNA を導入した BMDM を適量の RIPA Buffer (50 mM Tris HCl、150 mM NaCl、0.5% Sodium deoxycholate、1% Nonidet P-40、0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS)) を加えることで溶解した。その後、3,000 rpm で 10 分間遠心して得られた上清を全細胞溶解液とした。全細胞溶解液と 4×SDS sample buffer (0.125 M Tris-HCl、

4% SDS、20% Glycerol、0.01% Bromophenol blue、0.2 M Dithiothreitol) を混合し、95°C で 5 分間、熱処理を行った。その後、5-20% SDS ポリアクリルアミドゲル (ATTO) および電気泳動緩衝液である SDS-PAGE Running buffer (0.25 M Tris、1% SDS、1.92 M Glycine) を用いて 20 mA、90 分間の条件で電気泳動を行った。

SDS-PAGE により分離したタンパク質を PVDF メンブレン (Bio-Rad) および Transfer buffer (25 mM Tris、20% Methanol、1.92 mM Glycine) を用いて 200 mA、70 分間の条件で転写を行った。転写後、メンブレンを 5% スキムミルク含有 TBST buffer に室温で 1 時間インキュベートすることで、ブロッキングを行った。ブロッキング後、TBST buffer (0.5 M Tris、1.38 M NaCl、0.027 M KCl、0.05% tween20) で洗浄し、5% スキムミルク含有 TBST buffer で希釈した一次抗体を 4°C で一晩反応させた。再度 TBST buffer で洗浄後、5% スキムミルク含有 TBST buffer で希釈した二次抗体を加えて室温で 30 分間インキュベートした。その後、TBST buffer で洗浄し、メンブレンを発光試薬 Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) の Enhanced Luminol Reagent および Oxidizing Reagent の等量混合溶液で反応させ、Image Quant LAS-4000 (GE Healthcare) で検出した。使用した一次抗体及び二次抗体とその希釈倍率を以下に示した (表 8)。

表 8. BMDM のノックダウンの検証に用いた一次抗体及び二次抗体とその希釈倍率

| 抗体 | 企業名 | 希釈倍率 |
|---|------------|----------|
| anti-HuR mouse monoclonal antibody (3A2) | Santa Cruz | 1/1,000 |
| anti-Actin goat polyclonal antibody (I-19) | Santa Cruz | 1/1,000 |
| HRP-conjugated anti-Mouse IgG monoclonal antibody | Sigma | 1/30,000 |
| HRP-conjugated anti-Goat IgG monoclonal antibody | Sigma | 1/30,000 |

RNA 抽出と cDNA の合成

上記の条件でリガンド刺激を行った後、TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc.) を加え細胞を溶解した。TRI Reagent に対して 5 分の 1 量のクロロホルムを加えボルテックスで混和した後、4°C、14000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清に 100 µl のクロロホルムを加え、再度同様の操作でクロロホルム抽出を行った。その後、回収した上清に 500 µl のイソプロパノール (Nacalai) を加え、4°C、14000 rpm で 15 分間遠心を行った。上清を除去した後、800 µl の 70% エタノールを加え、4°C、14000 rpm で 5 分間遠心を行った。上清を除去し、37°C に設定したヒートブロックにより 70% エタノールを飛ばし、10-50 µl の Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 処理済み滅菌水 [0.1% DEPC] に溶解することで total RNA を得た。その後、RNA の濃度を NanoDrop One / One^C (Thermo Fisher Scientific) により計測した。そして、0.5 から 1 µg の RNA をテンプレートとして、ReverTraAce (TOYOBO) を用いて cDNA を合成した。cDNA 反応溶液は ReverTraAce のプロトコルに従い、10

μl の反応溶液として調製し、30°C で 10 分間、42°C で 60 分間、99°C で 5 分間の逆転写反応を行った。

Real-time PCR

上記の方法により合成した cDNA をサンプルとして、Power SYBR Green PCR Master Mix (Life technologies)、および Light Cycler 96 (Roche) を用いて Real-time PCR を行った。Power SYBR Green PCR Master Mix のプロトコルに従い 20 μl の反応溶液を調製した。PCR 条件は、1 サイクル目は 95°C で 10 分間反応させ、その後 95°C で 10 秒間、60°C で 1 分間の反応を 50 サイクル行った。内部標準遺伝子として GAPDH 遺伝子を使用し、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いてサンプル中の mRNA 量を相対的に評価した。使用したプライマーの配列を以下に示した (表 9)

表 9. Real-time PCR に用いたプライマー

| Gene name | Species | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (5'-3') |
|-------------------|---------|--------------------------|-------------------------------|
| <i>Irfb1</i> | Mouse | ATGGTGGTCCGAGCAGAGAT | CCACCACTCATTCTGAGGCA |
| <i>Cxcl10</i> | Mouse | CCATCAGCACCATGAACCCAAGT | CACTCCAGTTAAGGAGCCCTTTTAAGACC |
| <i>Il6</i> | Mouse | GGAAATCGTGGAATGAG | GCTTAGGCATAACGCACT |
| <i>Il10</i> | Mouse | TGGCCAGAAATCAAGGAGC | CAGCAGACTCAATACACACT |
| <i>Elavl1</i> | Mouse | ATGAAGACCACATGGCCGAAGACT | AGTTCACAAAGCCATAGCCCAAGC |
| <i>Plk1</i> | Mouse | TTGTAGTTTTGGAGCTCTGTCTG | CAGTGCCTTCCTCCTCTTGT |
| <i>Plk2</i> | Mouse | GCAGACACAGTGGCAAGAGT | CTGGTACCCAAAGCCGTATT |
| <i>Plk3</i> | Mouse | GGCTGGCAGCTCGATTAG | GTTGGGAGTGCCACAGATG |
| <i>Plk4</i> | Mouse | GAAACCAAAAAGGCTGTGG | CCTCAGACGCACACTCTCTC |
| <i>Map3k7</i> | Mouse | AGAGGTTGTCGGAAGAGGAGCTT | ACAACTGCCGAGCTCCACAA |
| <i>Mapk14</i> | Mouse | ACATCGTGAAGTGCCAGAAG | CTAGGTTGCTGGGCTTTAGG |
| <i>Traf2</i> | Mouse | CACCGTACTGCTCCTTCTG | TGAACACAGGCAGCACAGTT |
| <i>Traf6</i> | Mouse | AAAGCGAGAGATTCTTTCCCTG | ACTGGGGACAATTCAGTAGAGC |
| <i>Ticam1</i> | Mouse | ATGGATAACCCAGGGCCTT | TTCTGGTCACTGCAGGGGAT |
| <i>Mavs</i> | Mouse | GCAACTCCTCCAGACCAACTC | GGAGACACAGGTCCATAGGTT |
| <i>Tmem173</i> | Mouse | CATTGGGTACTTGCGGTT | CTGAGCATGTTGTTATGTAGC |
| <i>Tbk1</i> | Mouse | ACTGGTGATCTCTATGCTGTCA | TTCTGGAAGTCCATACGCATTG |
| <i>Gapdh</i> | Mouse | TGACGTGCCGCTGGAGAAA | AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG |
| <i>IFNB1</i> | Human | AAACTCATGAGCAGTCTGCA | AGGAGATCTTCAGTTTCGGAGG |
| <i>CXCL10</i> | Human | AGGAACCTCCAGTCTCAGCA | CAACACGTGGACAAAATTGG |
| <i>ELAVL1</i> | Human | GAGGCTCCAGTCAAAAACCA | GAGGCTCCAGTCAAAAACCA |
| <i>PLK2</i> | Human | GAGCAGCTGAGCACATCATT | CATGTGAGCACCATTGTTGA |
| <i>GAPDH</i> | Human | AATCCCATCACCATCTTCCA | TGGACTCCACGACGTACTCA |
| <i>Luciferase</i> | Firefly | CTCACTGAGACTACATCAGC | TCCAGATCCACAACCTTCGC |

2.5 THP-1 細胞における HuR 遺伝子のノックダウン

THP-1 細胞を 100 ng/ml PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma) および 10% FBS 含有培地 RPMI 1640 培地で培養することでマクロファージ様細胞へと分化させた。24 時間培養後、PBS で 3 度洗浄し、PMA を含まない 10% FBS 含有 RPMI 1640

培地にて2日間培養することで細胞を休息させた。その後、エレクトロポレーション法により、1400 mA、20 ms、1 Pulse の条件で HuR を標的とする siRNA (表 10) を導入した。コントロールとしては Firefly Luciferase を標的とする siRNA を用いた。siRNA を導入から2日後、細胞を実験に用いた。細胞の刺激濃度および時間は下表の通りに行った (表 11)。

表 10. THP-1 細胞のノックダウンに用いた siRNA の配列

| Gene name | Species | STRAND (+) | STRAND (-) |
|-------------------|---------|-----------------------|-----------------------|
| <i>ELAVL1</i> | Human | GCUCAGAGGUGAUCAAAGATT | UCUUUGAUCACCUCUGAGCTT |
| <i>Luciferase</i> | Firefly | CGUACGCGGAUACUUCGATT | UCGAAGUAUUCGCGUACGTT |

表 11. THP-1 細胞の刺激条件

| 受容体 | リガンド試薬 | 刺激濃度 | 刺激時間 |
|------|------------------------------------|---------|------|
| MDA5 | poly(I:C) HMW + Lipofectamine 2000 | 1 µg/mL | 8h |

2.6 MEF 細胞における HuR 遺伝子のノックダウン

pSUPER.retro.puro プラスミドの作成と MEF 細胞における HuR ノックダウン

レトロウイルスを産生するためのプラスミドとして pSUPER.retro.puro を用いた。プロトコルに従い、マウス HuR mRNA CDS の 134-156、484-506 を標的とした配列を含むオリゴヌクレオチドを合成し (表 12) アニーリングした。pSUPER.retro.puro を BglIII で処理後、アニーリングしたオリゴを挿入した。また、ネガティブコントロールとして本研究室で所有していた pSUPER.retro.puro に Scramble shRNA 配列をインサートしたものを用いた。6 well プレートに播種した Platinum E 細胞に、作成したプラスミドを 5 µg トランスフェクションした。6 時間後、2 ml の DMEM へと培地を交換し2日間培養した。その後、5 ml シリンジ (TERUMO) を用いて 1.5 ml のレトロウイルス含有培地を採取した。6 well プレートに播種しておいた MEF 細胞の培地を取り除き、ウイルス含有培地を 0.22 µm Millex-GV Filter Unit (Merck Millipore) でろ過しながら加えた。2日間培養した MEF 細胞からウイルス含有培地を取り除き、Puromycin (Invivogen) を 2 µg/ml 含んだ DMEM で2日間培養することでウイルス感染細胞のみを選別した。それらの細胞を再び DMEM により培養後、上記と同様の条件でウエスタンブロットを行った。

表 12. pSUPER.retro.puro プラスミド作成に用いたオリゴヌクレオチド配列

| 名前 | 配列 (5'-3') |
|-------------------------------|--|
| pSUPER.retro.puro_HuR_sh1_fwd | gatccccAGGTTGAATCTGCAAAGCTTATTtcaagagaAATAAGCTTTGCAGATTCAACCTtttta |
| pSUPER.retro.puro_HuR_sh1_rev | agcttaaaaaAGGTTGAATCTGCAAAGCTTATTtctcttgaaAATAAGCTTTGCAGATTCAACCTggg |
| pSUPER.retro.puro_HuR_sh2_fwd | gatccccGAGGCAATTACCAGTTTCAATGGttcaagagaCCATTGAAACTGGTAATTGCCTCtttta |
| pSUPER.retro.puro_HuR_sh2_rev | agcttaaaaaGAGGCAATTACCAGTTTCAATGGtctcttgaaCCATTGAAACTGGTAATTGCCTCggg |

自然免疫リガンドによる MEF 細胞の刺激と Real-time PCR

HuR 遺伝子をノックダウンした MEF 細胞を各 PRRs リガンドを用いて以下のとおりに刺激した (表 13)。poly(I:C) HMW、LPS はそれぞれ Invivogen より購入した。また、Interferon stimulatory DNA (ISD、配列:5'-TACAGATCTACTAGTGATCTATGACTGATCTGTACATGATCTACA-3') のオリゴ合成を Greiner bio-one に委託し、アニーリングすることで二本鎖 DNA とした。細胞を刺激後、RNA 抽出・cDNA 合成を行い、2.4 と同様に Real-time PCR により遺伝子の発現量を評価した。

表 13. MEF 細胞の刺激条件

| 受容体 | リガンド試薬 | 刺激濃度 | 刺激時間 |
|------|------------------------------------|---------|------|
| MDA5 | poly(I:C) HMW + Lipofectamine 2000 | 1 µg/mL | 8h |
| cGAS | ISD + Lipofectamine 2000 | 1 µg/mL | 6h |
| TLR4 | LPS | 1 µg/mL | 2h |

2.7 CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子欠損細胞株の樹立

標的特異的 pX330 の作製

切断部位の標的配列は、HuR エキソン 4 配列内の PAM 配列上流 20 bp とした。この標的配列 20 bp に *BbsI* の制限酵素サイトを付加した相補的なオリゴヌクレオチド (表 14) を作製し、10×T4 Kination Buffer (New England Biolabs)、および T4 PNK (New England Biolabs) を用いて、37°C で 30 分、95°C で 5 分、65°C で 15 分、60°C で 15 分、55°C で 15 分、50°C で 15 分、45°C で 15 分、40°C で 15 分の条件でアニーリング反応を行い、アニーリング産物を得た。pX330 は、*BbsI*、10×Fast digest Buffer (Thermo Fisher Scientific)、Fast AP (Thermo Fisher Scientific) を用いて 37°C で 1 時間、制限酵素処理を行った。その後、illustra GFX™ PCR DNA and GelBand Purification Kit を用いてプラスミドを精製した。アニーリング産物と *BbsI* 処理済み pX330 をライゲーションし、形質転換を行った。得られたコロニーからプラスミドを抽出後、pX330_sequence_Forward (表 2) を用いてシーケンス解析を行った。

表 14. HuR 標的 px330 構築用オリゴ配列

| 名前 | 配列 (5'-3') |
|-------------------|--------------------------|
| px330-HuR_forward | CACCGAAGACATGTTTTCTCGGTT |
| px330-HuR_reverce | AAACAACCGAGAAAACATGTCTTC |

pCAG-EGxxFP-HuR の作製

HuR 配列内の CRISPR/Cas9 標的配列の前後を含めた約 500 bp を増幅するように、pCAG-EGxxFP-HuR_Forward および pCAG-EGxxFP-HuR_Reverse を設計した (表 15)。KOD FX を用いて PCR を行い、pCAG-EGxxFP-HuR のインサートを得た。その後、pCAG-EGxxFP および、インサート DNA を制限酵素で処理し、上記と同様にライゲーション、形質転換、プラスミド抽出、および塩基配列の解析を行った。塩基配列の解析には pCAG-EGxxFP_Forward (表 2) を用いた。

表 15. pCAG-EGxxFP-HuR 構築用プライマー

| 名前 | 配列 (5'-3') | 制限酵素 |
|-------------------------|-----------------------------------|---------------|
| pCAG-EGxxFP-HuR_Forward | AGTCGAATTCGAGCAATCAGCACACACTGAACG | <i>EcoR</i> I |
| pCAG-EGxxFP-HuR_Reverse | AGTCGGATCCCTGCAAACCTTCACTGTGATGG | <i>Bam</i> HI |

RAW264.7 細胞へのエレクトロポレーションと細胞のソーティング

RAW264.7 細胞を 1×10^7 cells/100 μ l で 1.5 ml チューブに準備し、pX330-HuR、pCAG-EGxxFP-HuR を 3 μ g ずつ細胞懸濁液に加え、混合した。続いて、Neon Transfection System を用いたエレクトロポレーション法により、1680 mA、20 ms、1 Pulse の条件でプラスミドを導入した。10cm ディッシュに播種し 2 日間培養後、培地を除去して PBS で洗浄、回収し 200 μ l の FACS buffer で懸濁した。その後、FACS Aria (BD) の Cell Sorting System により EGFP 陽性細胞を 96 well プレートにシングルセルソーティングを行い、培養した。96 well プレートの RAW264.7 細胞の細胞密度が約 70% に達したところでそれらを 24 well プレートに移し、培養した。その後、24 well プレートから 6 well プレート、10cm ディッシュへと移す過程で、細胞の一部を回収し、ウェスタンブロットにより HuR 遺伝子の欠損を確認した。HuR 遺伝子の欠損が確認できた細胞の培養を続けるとともに、それらの細胞の遺伝子配列をシーケンス解析により決定した。

ウェスタンブロットによる HuR ノックアウトの確認

上記の過程で単離、培養した RAW264.7 細胞に対して、適量の RIPA Buffer を加え

ることで細胞を溶解し、2.4 と同様の条件で SDS-PAGE 及びウエスタンブロットを行なった。使用した一次抗体及び二次抗体とその希釈倍率を以下に示した（表 16）。

表 16. HuR ノックアウトの確認に用いた一次抗体及び二次抗体とその希釈倍率

| 抗体 | 企業名 | 希釈倍率 |
|--|------------|----------|
| anti-HuR mouse monoclonal antibody (3A2) | Santa Cruz | 1/1,000 |
| anti-TOM20 rabbit polyclonal antibody (FL-145) | Santa Cruz | 1/1,000 |
| HRP-conjugated anti-Mouse IgG monoclonal antibody | Sigma | 1/30,000 |
| HRP-conjugated anti-Rabbit IgG monoclonal antibody | Sigma | 1/30,000 |

HuR 遺伝子欠損細胞のシーケンス解析

上記のウエスタンブロットの結果から HuR タンパク質の発現が見られなかった細胞株を回収し、50 mM NaOH を加えて 95°C で 1 時間インキュベートした後、10 分の 1 量の 1 M Tris-HCl (pH 6.8) で中和することで、ゲノム DNA を得た。得られたゲノム DNA を鋳型として、HuR-genotyping_Forward、HuR-genotyping_Reverse（表 17）を用いて Ex Taq HS (TaKaRa) で PCR を行った。PCR 産物は、前述の方法でゲル精製した。得られた DNA 断片を、制限酵素処理し、pFlag-CMV-2 に挿入した。これを、形質転換、プラスミド抽出し、pFlagCMV_sequenece_forward プライマーを用いて目的の塩基配列のシーケンス解析を行った。

表 17. HuR 遺伝子欠損細胞のジェノタイピング用プライマー

| 名前 | 配列 (5'-3') | 制限酵素 |
|------------------------|--|--------|
| HuR-genotyping_Forward | AGTCGAATTCGTTGGCAAGGGTTATTGCAGCCAT- -TCTAAGAGTCTTTATC | EcoR I |
| HuR-genotyping_Reverse | AGTCGGATCCGAGTGCTGGGAGTAAAGGGAGGT- -GCCACTGTCTGTTGTGCAGATTTGTTTAATG | BamH I |

異なる gRNA を用いた HuR 欠損細胞株の樹立

上記で用いた gRNA とは異なる配列を標的とする gRNA を用いて同様に HuR 欠損細胞株の樹立を行なった。上記と同様に BbsI 配列を付与した相補的なオリゴヌクレオチド（表 18）を合成し、px330 へと挿入することで px330-HuR-gRNA#2 を作成した。また、px330-HuR_gRNA#2 により標的とされる配列を含む pCAG-EGxxFP-HuR-gRNA#2 を表 19 のプライマーを用いて作成した。これらのプラスミドを用いて上記と同様の方法で細胞を単離した。その後、ウエスタンブロットにより HuR タンパク質の発現が見られない細胞株を同定し、その細胞株を HuR 遺伝子欠損細胞株 (HuR KO gRNA#2) として用いた。

表 18. px330-HuR-gRNA#2 構築用オリゴヌクレオチド配列

| 名前 | 配列 (5'-3') |
|--------------------------|--------------------------|
| px330-HuR_gRNA#2_forward | CACCGACCATGACACAGAAGGATG |
| px330-HuR_gRNA#2_reverce | AAACCATCCTTCTGTGTCATGGTC |

表 19. pCAG-EGxxFP-HuR-gRNA#2 構築用プライマーの配列

| 名前 | 配列 (5'-3') | 制限酵素 |
|----------------------------|------------------------------------|----------------|
| pCAG-EGxxFP-HuR_gRNA#2_Fwd | ATGCGAATTCGCTTATTCGGGATAAAGTAGCAGG | <i>EcoR</i> I |
| pCAG-EGxxFP-HuR_gRNA#2_Rev | AGTCGGATCCGACCATTGAAACTGGTAATTGC | <i>Bam</i> H I |

PLK2 欠損 RAW264.7 細胞株の樹立

px330-PLK2 及び pCAG-EGxxFP-PLK2 を下記のオリゴヌクレオチド及びプライマーを用いて作成した (表 20)。作成したこれらのプラスミドを上記と同様に野生型 RAW264.7 細胞に導入後、細胞を単離した。細胞を培養し、96well プレートから 24well プレートへ播種すると同時に 1.5 ml チューブへと細胞の一部を回収し、ゲノムを抽出した。抽出したゲノムから、px330-PLK2 により標的とされる配列を含む 600 塩基程度の配列を PLK2_SLiCE_Forward、PLK2_SLiCE_Reverse プライマー (表 21) を用いて増幅した。増幅配列をゲル精製後、SLiCE を用いて増幅配列を TOPO ベクターへと挿入した。続いて、大腸菌へと形質転換し、青白選択により白コロニーを選択後、増幅配列を含む TOPO ベクターを FastGene Plasmid Mini Kit により抽出した。その後、M13_Reverse_primer を用いてシーケンス解析を行なった。シーケンス解析の結果から、PLK2 遺伝子にフレームシフト変異が生じていると考えられる細胞株を選択し、その後の実験に用いた。

表 20. px330-PLK2 及び pCAG-EGxxFP-PLK2 構築用オリゴヌクレオチド及びプライマーの配列

| 名前 | 配列 (5'-3') | 制限酵素 |
|--------------------------|-----------------------------------|----------------|
| px330-PLK2_Forward | CACCGCGGACTATCACCTACCAGC | |
| px330-PLK2_Reverse | AAACGCTGGTAGGTGATAGTCCGC | |
| pCAG-EGxxFP-PLK2_Forward | AGTCGAATTCGAGCAATCAGCACACACTGAACG | <i>Bam</i> H I |
| pCAG-EGxxFP-PLK2_Reverse | AGTCGGATCCCTGCAAACCTTCACTGTGATGG | <i>Eco</i> R I |

表 21. PLK2 遺伝子欠損細胞のジェノタイピング用プライマー

| 名前 | 配列 (5'-3') |
|--------------------|---|
| PLK2_SLiCE_Forward | CAGTGTGCTGGAATTCGGTATTTAAAGCTTCGCTGCTCGCTCTTG |
| PLK2_SLiCE_Reverse | GATATCTGCAGAATTCGCAGGAGAGGAACCCACGTCGATCGTTC |

自然免疫リガンドによる RAW264.7 細胞の刺激と Real-time PCR

6 well プレートまたは 24 well プレートに播種した野生型 RAW264.7 細胞及び HuR 欠損 RAW264.7 細胞、PLK2 欠損 RAW264.7 細胞を各自然免疫リガンドを用いて以下のとおりに刺激した (表 22)。poly(I:C) LMW は Invivogen より購入した。細胞を刺激後、RNA 抽出・cDNA 合成を行い、2.4 と同様に Real-time PCR により遺伝子の発現量を評価した。

表 22. RAW264.7 細胞の刺激条件 (Real-time PCR)

| 受容体 | リガンド試薬 | 刺激濃度 | 刺激時間 |
|-------|------------------------------------|---------|------|
| RIG-I | poly(I:C) LMW + Lipofectamine 2000 | 1 µg/mL | 8h |
| MDA5 | poly(I:C) HMW + Lipofectamine 2000 | 1 µg/mL | 8h |
| cGAS | ISD + Lipofectamine 2000 | 1 µg/mL | 6h |
| TLR4 | LPS | 1 µg/mL | 2h |

ELISA によるサイトカイン産生量の測定

96 well プレートに野生型 RAW264.7 細胞及び HuR 欠損 RAW264.7 細胞を 5.0×10^4 個播種し、自然免疫リガンドを用いて以下のとおりに刺激した (表 23)。刺激後のサンプルから上清を回収し、上清中の IFN-β、CXCL10、IL-10 のタンパク量をそれぞれ、LumiKine™ mIFN-β (InvivoGen)、Mouse CXCL10 DuoSet ELISA (R&D systems)、IL-10 Mouse ELISA Kit (Invitrogen) を用いて測定した。

表 23. RAW264.7 細胞の刺激条件 (ELISA)

| 受容体 | リガンド試薬 | 刺激濃度 | 刺激時間 |
|------|------------------------------------|---------|------|
| MDA5 | poly(I:C) HMW + Lipofectamine 2000 | 1 µg/mL | 24h |
| cGAS | ISD + Lipofectamine 2000 | 1 µg/mL | 24h |
| TLR4 | LPS | 1 µg/mL | 12h |

HuR 欠損細胞へのウイルスの感染

6 well プレートに播種した野生型 RAW264.7 細胞および HuR 欠損 RAW264.7 細胞に対して、ニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus; NDV) を 1MOI または 5MOI の力価で感染させた。感染から 12 時間後、上記と同様に RNA 回収、cDNA 合成、Real-time PCR を行った。また、NDV の転写産物の測定には下表のプライマーを用いた (表 24)。

表 24. ウイルスの転写産物測定用プライマー

| Virus | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (5'-3') |
|-------|------------------------|------------------------|
| NDV | AGTGATGTGCTCGGACCTTC | CCTGAGGAGAGGCATTTGCTA |

2.8 HuR 欠損細胞における HuR 遺伝子の戻し実験

pMRX-Flag-HuR プラスミドの作成

HuR 欠損細胞において HuR 遺伝子の戻し実験を行うために、マウス HuR の CDS 配列を本研究室で所有していた pMRX-IRES-puro プラスミドの制限酵素切断部位上流に Flag 配列を有する pMRX-Flag-puro プラスミドに挿入した。CDS 配列の増幅には以下のプライマーを用いた (表 25)。10 cm ディッシュに Platinum E 細胞を播種し、作成したプラスミドを 10 μ g、pVSV-G 発現プラスミドを 1 μ g を Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションした。6 時間後、10%FBS 含有 DMEM へと培地を交換し 2 日間培養した。続いて、10 ml シリンジ (TERUMO) を用いて上清を回収し、ウイルス含有培地を得た。10 cm ディッシュに播種しておいて HuR 遺伝子欠損 RAW264.7 細胞の培地を取り除き、ウイルス含有培地を 0.22 μ m Millex-GV Filter Unit で濾過しながら加えた。また、ウイルス含有培地を細胞に加える際に、ウイルス含有培地の 1000 分の 1 量のポリブレン溶液 (10 mg/ml、Nacalai) を培地中に投与した。ウイルス含有培地で 2 日間培養後、最終濃度が 4 μ g/ml となる様に Puromycin を加えた 10%FBS 含有 DMEM へと培地を交換し培養することでウイルス感染細胞のみを選別した。その後、Puromycin により選別された細胞をウエスタンブロット、Real-time PCR に用いた。また、コントロールとして、マウス HuR の CDS 配列を挿入していない pMRX-Flag-puro プラスミド由来のウイルスを感染させた野生型 RAW264.7 細胞を用いた。

表 25. pMRX-Flag-HuR プラスミド作成に用いたオリゴヌクレオチド配列

| 名前 | 配列 (5'-3') | 制限酵素 |
|--------------------------|----------------------------------|--------|
| pMRXIRESpuro_HuR_forward | AGTCGAATTCATGTCTAATGGTTATGAAGAC | EcoR I |
| pMRXIRESpuro_HuR_reverse | AGTCGCGGCCGCTTATTTGTGGGACTTGTTGG | Not I |

2.9 マイクロアレイ解析

10cm ディッシュに 70-80%の細胞密度に培養した WT RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞 (HuR-KO1) を poly(I:C) HMW (1 μ g/ml)をトランスフェクションすることで刺激し、8 時間後に RNA の回収を行った。回収した RNA は純度をより高めるために、RNeasy kit (Qiagen) を用いて再精製を行った。得られた RNA サンプルを Ovation RNA Amplification System V2 (NuGen) により cDNA として合成し、Quiaquick

PCR purification kit (Qiagen) により精製した。続いて、Encore Biotin Module (Nugen) を用いて 5 μ g の cDNA の断片化処理とラベリングを行った。そして、断片化・ラベリング処理した cDNA を GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix) を用いて GeneChip Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix) にハイブリダイゼーションし、GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) によりアレイの洗浄、染色を行った。その後、GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix) でアレイの解析を行った。

2.10 PLK2 発現プラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイ

PLK2 発現プラスミド及び変異体プラスミドの作成

PLK2 の発現プラスミドを作成するために、マウス由来の PLK2 遺伝子の塩基配列情報を NCBI より入手し、CDS 配列を増幅するプライマーを設計した (表 26)。これらのプライマーを用いてマウス由来 cDNA から PCR によりインサート配列を増幅した。これを制限酵素処理後、pFlag-CMV-2 プラスミドに挿入し、pFlag-CMV-2 PLK2 プラスミドを得た。続いて、PLK2 の酵素活性欠失変異体を作成するために、pFlag-CMV-2 PLK2 プラスミドを鋳型として pFlagPLK2_K108M_Fwd、pFlagPLK2_K108M_Rev プライマー (表 26) を用いた PCR により 108 番目のリシン (K) をメチオニン (M) に置換した pFlag-CMV-2 PLK2^{K108M} プラスミドを作成した。

表 26. PLK2 発現プラスミド及び変異体プラスミド構築用プライマーの配列

| 名前 | 配列 (5'-3') | 制限酵素 |
|---------------------|-------------------------------------|----------------|
| pFlag_mPLK2_Fwd | ACGTGAATTCtATGGAGCTCCTGCGGACTATCACC | <i>EcoR</i> I |
| pFlag_mPLK2_Rev | ACGTGGATCCTCAGTTACATCTCTGTAAGAGCATG | <i>Bam</i> H I |
| pFlagPLK2_K108M_Fwd | GTCTACGCTGCAATGATTATTCCTC | |
| pFlagPLK2_K108M_Rev | GAGGAATAATCATTGCAGCGTAGAC | |

PLK2 発現プラスミド及び変異体プラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイ

24 well プレートに播種した HEK293T 細胞に 100 ng の pGL3-IFN β プラスミド及び 10 ng の pTK-Luc プラスミドと同時に、500 ng の pFlag-CMV-2 PLK2 プラスミドまたは pFlag-CMV-2 PLK2^{K108M} をトランスフェクションした。Mock として pFlag-CMV-2 プラスミドを用いた。濃度勾配をつけて行なった条件では 100 ng または 250 ng の pFlag-CMV-2 PLK2 プラスミドを用いた。PLK ファミリーの阻害剤である BI2536 は AdooQ BioScience より購入し、Dimethyl Sulfoxide (DMSO、Nacalai) により溶解した。BI2536 (10⁻² μ M) はプラスミドをトランスフェクションする際に投与し、トランスフェクションから 6 時間後に培地を交換すると同時に再び加えた。トランスフ

エクシオンから 24 時間後、上記と同様にルシフェラーゼの発光を計測した。

自然免疫アダプター分子を用いたルシフェラーゼアッセイ

24 well プレートに播種した HEK293T 細胞に 100 ng の pGL3-IFN β プラスミド及び 10 ng の pTK-Luc プラスミドと同時に、本研究室で所有していた IPS-1、STING、TRIF の発現プラスミドをトランスフェクションした。Mock として pFlag-CMV-2 プラスミドを用いた。BI2536 (10^{-2} μ M) はトランスフェクションから 6 時間後に培地を交換すると同時に加えた。トランスフェクションから 24 時間後、上記と同様にルシフェラーゼの発光を計測した。

2.11 WST-1 アッセイ

3×10^4 cells/well の WT RAW264.7 細胞を 96 well プレートに播種し培養した。翌日、DMSO または BI2536 (10^{-2} μ M、 10^{-1} μ M、 10^0 μ M) を投与し、0、12、24 時間後に Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (TaKaRa) に含まれる Premix WST-1 を 1well につき 10 μ l 添加し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。その後、マイクロプレートリーダーにより 450 nm と 595 nm おける吸光度を測定し、450 nm の吸光度の値から 595 nm の吸光度を差し引き、生細胞数とした。

2.12 PLK ファミリー阻害剤 BI2536 投与後のサイトカイン計測

24 well プレートに播種した野生型 RAW264.7 細胞に対して BI2536 (10^{-2} μ M または 10^0 μ M) を投与すると同時に Lipofectamin 2000 を用いて poly(I:C) HMW (1 μ g/ml) による刺激を行った。8 時間後、上記と同様の条件で RNA 抽出、cDNA 合成、Real-time PCR を行った。

2.13 PLK ファミリー阻害剤 BI2536 処理後の細胞質分画及び核分画の抽出とウエスタンブロット

6 well プレートに野生型 RAW264.7 細胞を 1.0×10^6 個となるよう播種した。その後、BI2536 を 10^0 μ M/ml の濃度で投与し、3 時間後培地を交換するとともに、Lipofectamine 2000 を用いて poly(I:C) HMW (1 μ g/ml) による刺激を行った。1 時間、または 3 時間の刺激後、細胞を PBS で 3 度洗浄し、400 μ l の buffer A (10mM HEPES-KOH、10mM KCl、0.1mM EDTA (pH 8.0)、Protease Inhibitor Cocktail) を加え、スクレーパーを用いて細胞をエッペンチューブに回収した。最終濃度が 0.1% となるように 10% NP-40 を 4 μ l 加え、転倒混和により混ぜ合わせ、氷上で 5 分間静置した。その後、サンプルを 4 $^{\circ}$ C、5000rpm で 5 分間遠心し、得られた上清を細胞質分画とした。その後、残った沈殿に buffer C (50mM HEPES-KOH (pH 7.8)、420mM KCl、0.1mM EDTA (pH 8.0)、5mM MgCl $_2$ 、

2% Glycerol、Protease Inhibitor Cocktail)を 50 μ l 加え、ボルテックスにより混和し、氷上に 30 分間静置した。このとき 10 分ごとにボルテックスによりサンプルを混和した。30 分の静置後、サンプルを 4°C、14000rpm で 10 分間遠心し、得られた上清を核分画とした。そして、これらの細胞質分画、核分画を用いて上記と同様にウエスタンブロットを行った。使用した一次抗体および二次抗体と希釈倍率を以下に示す(表 27)。

表 27. 細胞質及び核分画におけるウエスタンブロットに用いた一次抗体及び二次抗体とその希釈倍率

| 抗体 | 企業名 | 希釈倍率 |
|--|---------------------------|----------|
| anti-IRF3 rabbit monoclonal antibody (D83B9) | Cell Signaling Technology | 1/1,000 |
| anti-Phospho-IRF3 (Ser396) rabbit monoclonal antibody (4D4G) | Cell Signaling Technology | 1/1,000 |
| anti-NF- κ B p65 rabbit monoclonal antibody (D14E12) | Cell Signaling Technology | 1/1,000 |
| anti-Phospho-NF- κ B p65 (Ser536) rabbit monoclonal antibody (93H1) | Cell Signaling Technology | 1/1,000 |
| anti-Actin goat polyclonal antibody (I-19) | Santa Cruz | 1/1,000 |
| anti-Lamin B goat polyclonal antibody (M-20) | Santa Cruz | 1/1,000 |
| HRP-conjugated anti-Rabbit IgG monoclonal antibody | Sigma | 1/30,000 |
| HRP-conjugated anti-Goat IgG monoclonal antibody | Sigma | 1/30,000 |

2.14 HuR 欠損細胞における細胞質分画および核分画のウエスタンブロット

6 well プレートに野生型 RAW264.7 細胞および HuR 欠損 RAW264.7 細胞を 1.0×10^6 個となるように播種した。それらの細胞を Lipofectamine 2000 を用いて poly(I:C) HMW (1 μ g/ml)により 1 時間と 3 時間の刺激を行った。その後、上記と同様の手法により細胞質分画と核分画を抽出し、ウエスタンブロットを行った。

2.15 HuR 及び PLK 2 欠損細胞における IRF3 の核への移行の蛍光顕微鏡による観察

Poly-L-lysine solution (Sigma)により処理したカバーガラスを 24 well プレート上に布置し、そのカバーガラス上に野生型 RAW264.7 細胞、HuR 欠損 RAW264.7 細胞または PLK2 欠損 RAW264.7 細胞を播種した。それらの細胞を Lipofectamine 2000 を用いて poly(I:C) HMW (1 μ g/ml)により 6 時間の刺激を行なった。その後、2.3 と同様の条件で処理し、一次抗体として anti-IRF3 抗体を二次抗体として Alexa Fluor 488 anti-Rabbit IgG を用いた (表 28)。また、核の染色には Hoechst 33342 を使用した。作成したサンプルは共焦点蛍光顕微鏡 LSM 700 (ZEISS) により観察し、ZEN software により画像の処理を行った。それぞれのサンプルから 200 個の細胞を観察し、Hoechst 33342 と IRF3 が重なり合っている細胞の割合を算出した。

表 28. IRF3 の蛍光顕微鏡観察に用いた一次抗体と二次抗体

| 抗体 | 企業名 | 希釈倍率 |
|--|------------|----------|
| anti-IRF3 rabbit polyclonal antibody (FL-425) | Santa Cruz | 1/50 |
| Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody | Invitrogen | 1/30,000 |

2.16 リボヌクレオタンパク質免疫沈降法 (ribonucleoprotein immunoprecipitation : RNP-IP)

IgG コントロール抗体または抗 HuR 抗体を、NT2 buffer (50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0.05 % Nonidet P-40)で 3 回洗浄した protein A-Sepharose beads と混合し、ローテータにより 4°C で 24 時間攪拌することで抗体を結合したビーズを調製した。10cm ディッシュに播種した野生型 RAW264.7 細胞を poly(I:C) HMW (1 µg/ml)で 8 時間刺激後、Polysome lysis buffer (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM Hepes (pH 7.0), 0.5 % Nonidet P-40, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 100 units/ml RNase OUT, protease inhibitor cocktail)により溶解した。細胞溶解液と事前に調製しておいた抗体結合ビーズを混合し、ローテータにより室温で 1 時間攪拌した。その後 beads を回収し、NT2 buffer で 5 回洗浄したあと、ビーズの一部を回収しウエスタンブロットを行なった。その他のビーズは TRI Reagent を加え上記の方法により RNA の抽出、cDNA の合成、Real-time PCR を行った。

2.17 mRNA 分解速度の計測

24 well プレートに播種した HEK293T 細胞に pFlag-CMV-2 プラスミドまたは pFlag-CMV2-HuR プラスミドを 500 ng トランスフェクションした。24 時間後、Lipofectamine 2000 を用いて poly(I:C) HMW (1 µg/ml)で 8 時間刺激を行った。その後、培地を交換し、転写阻害剤であるアクチノマイシン D (Sigma)を 5 µg/ml となるよう添加した。アクチノマイシン D 投与後、1、2、4 時間後に TRI Reagent によりサンプルを回収し、上記の方法で RNA の抽出、cDNA の合成、Real-time PCR を行った。ΔΔCt 法により、コントロール条件における標的 mRNA 存在量を算出後、その値を 100 とし、アクチノマイシン投与後の各時点における標的 mRNA 存在量を相対的に算出した。算出した値を散布図上にプロットし、近似曲線を描き、表示した数式に基づいて半減期を算出した。

2.18 pGL3-Plk2-3'UTR プラスミドを用いた解析

pGL3-Plk2-3'UTR プラスミド及びその変異体の作成

pGL3-promoter vector のルシフェラーゼ配列の 3'末端に Plk2 mRNA の 3'UTR 配列 (NCBI より取得した Plk2 mRNA 配列の 2183 番目から 2802 番目までの配列) を接

続したプラスミドを作成するために、Plk2_3UTR_Forward 及び Plk2_3UTR_Reverse (表 29) を用いてマウス cDNA テンプレートから Plk2 mRNA 3'UTR 配列を PCR により増幅した。pGL3-promoter vector と PCR 産物を *Xba* I により消化し、illustra GFX™ PCR DNA and GeLBand Purification Kit を用いて精製した。pGL3-promoter vector についてはセルフライゲーションを防ぐために Fast AP (Thermo Fisher Scientific) を用いて付属のプロトコルに従い脱リン酸化処理を行った。脱リン酸化処理した pGL3-promoter vector と PCR 産物を 2×Ligation Mix によりライゲーションすることで、pGL3-Plk2-3'UTR プラスミドを構築した。シーケンスの解析には、pGL3promoter_Xba1_sequence プライマーを用いた。その後、Plk2 mRNA 3'UTR 配列上の AU リッチ配列を欠損させた変異体を作成するために、pGL3-Plk2-3'UTR プラスミドを鋳型として Plk2_3'UTR_Δ1~Δ4 の Forward 及び Reverse プライマー (表 29) を用いて PCR を行なった。Δ1 から Δ4 の変異体はそれぞれ Plk2 mRNA の 3'UTR 配列上の 2183-2214、2626-2655、2687-2711、または 2744-2760 の配列を欠損したプラスミドである (図 2.1)。

表 29. pGL3-Plk2-3'UTR プラスミド及び変異体構築用プライマーの配列

| 名前 | 配列(5'-3') | 制限酵素 |
|----------------------|-----------------------------------|--------------|
| Plk2_3UTR_Forward | ACGCTCTAGAAAACATTATTATTATTATTA | <i>Xba</i> I |
| Plk2_3UTR_Reverse | ACGCTCTAGATTTCTATGTCATACTCTTTATTG | <i>Xba</i> I |
| Plk2_3UTR_Δ1_Forward | CGCCGTGTAATTCTAGACGAGCGGACC | |
| Plk2_3UTR_Δ1_Reverse | GAGTCCCATGAGGTCCGCTCG | |
| Plk2_3UTR_Δ2_Forward | CTGTGAACTATGGCCGAATACACTTG | |
| Plk2_3UTR_Δ2_Reverse | CTTTTCCAACCACAAGTGTATTC | |
| Plk2_3UTR_Δ3_Forward | GGTTGGAAAAGTGCATTCCCAGCCCCAAGAGC | |
| Plk2_3UTR_Δ3_Reverse | GATAATAAATACTGCTCTTGGGGCTG | |
| Plk2_3UTR_Δ4_Forward | GTATTTATTATCAAGATGGACCATTTCAAAC | |
| Plk2_3UTR_Δ4_Reverse | GCCAAGAGTTTGAAATGGTC | |

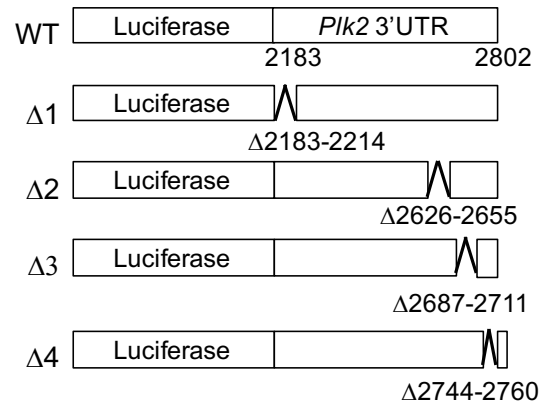


図 2.1. pGL3-PIK2-3'UTR プラスミド及びその変異体の模式図

2.19 統計解析

2 群間の比較は、Student の t 検定により行った。 $p < 0.05$ 及び $p < 0.01$ の場合を有意差有り と判定した。

第3章 結果

HuR は IFN- β の転写活性を誘導する

本研究室で行われた IFN- β 遺伝子の発現を誘導する遺伝子の発現スクリーニングの結果から、Hu ファミリータンパク質のひとつである RNA 結合タンパク質 Hu antigen R (HuR, また ELAVL1 とも呼称される) を同定した。HuR は Hu ファミリータンパク質のひとつであり、HuR の他に HuB、HuC、HuD が存在している (図 3.1A)。そこで、ルシフェラーゼアッセイにより HuR、HuB、HuC、HuD が IFN- β プロモーターの活性化を誘導するかを検証したところ、HuR が IFN- β プロモーターの活性化を誘導することが明らかとなった (図 3.1B)。また、HuR タンパク質は濃度依存的に IFN- β プロモーターの活性化を誘導した一方で、NF- κ B プロモーターの活性化は誘導しなかった (図 3.1C)。先行研究から、HuR は 3 つの RNA 認識モチーフ (RNA recognition motif: RRM) を有し、これらのモチーフを介して標的 mRNA に結合することが知られている (図 3.1D)。そこで、これらモチーフを欠損した変異体を作成し、IFN- β プロモーターの活性化の誘導を検証したところ、RRM1、RRM2、RRM3 のそれぞれを欠損した変異体は IFN- β プロモーターの活性化を誘導しなかった (図 3.1E)。この結果から、HuR による IFN- β プロモーターの活性化の誘導にはそれぞれの RNA 認識モチーフが重要であることが示唆された。

HuR はウイルス様刺激後にストレス顆粒に局在する

ウイルス感染時の HuR タンパク質の細胞内局在を観察するために、ウイルス感染と同様の刺激を誘導することができる人工二本鎖 RNA リガンドである poly(I:C) を用いて MEF 細胞 (Mouse embryonic fibroblast、マウス胚性繊維芽細胞) を刺激後、HuR タンパク質の細胞内局在を共焦点傾向顕微鏡により観察した。その結果、未刺激状態において HuR は核に局在を示す一方で、poly(I:C) による刺激に応答して細胞質内へとその局在を変化させた (図 3.2A)。また、HuR はストレス刺激によりストレス顆粒と呼ばれる細胞質内構造体に局在を示すことが報告されている (Liu et al., 2014; Ansari et al., 2016)。そのため、ウイルス様刺激後に HuR がストレス顆粒に局在しているかどうかを検証した。その結果、poly(I:C) HMW による刺激後、HuR はストレス顆粒マーカーとして知られる G3BP と共局在を示した (図 3.2B)。

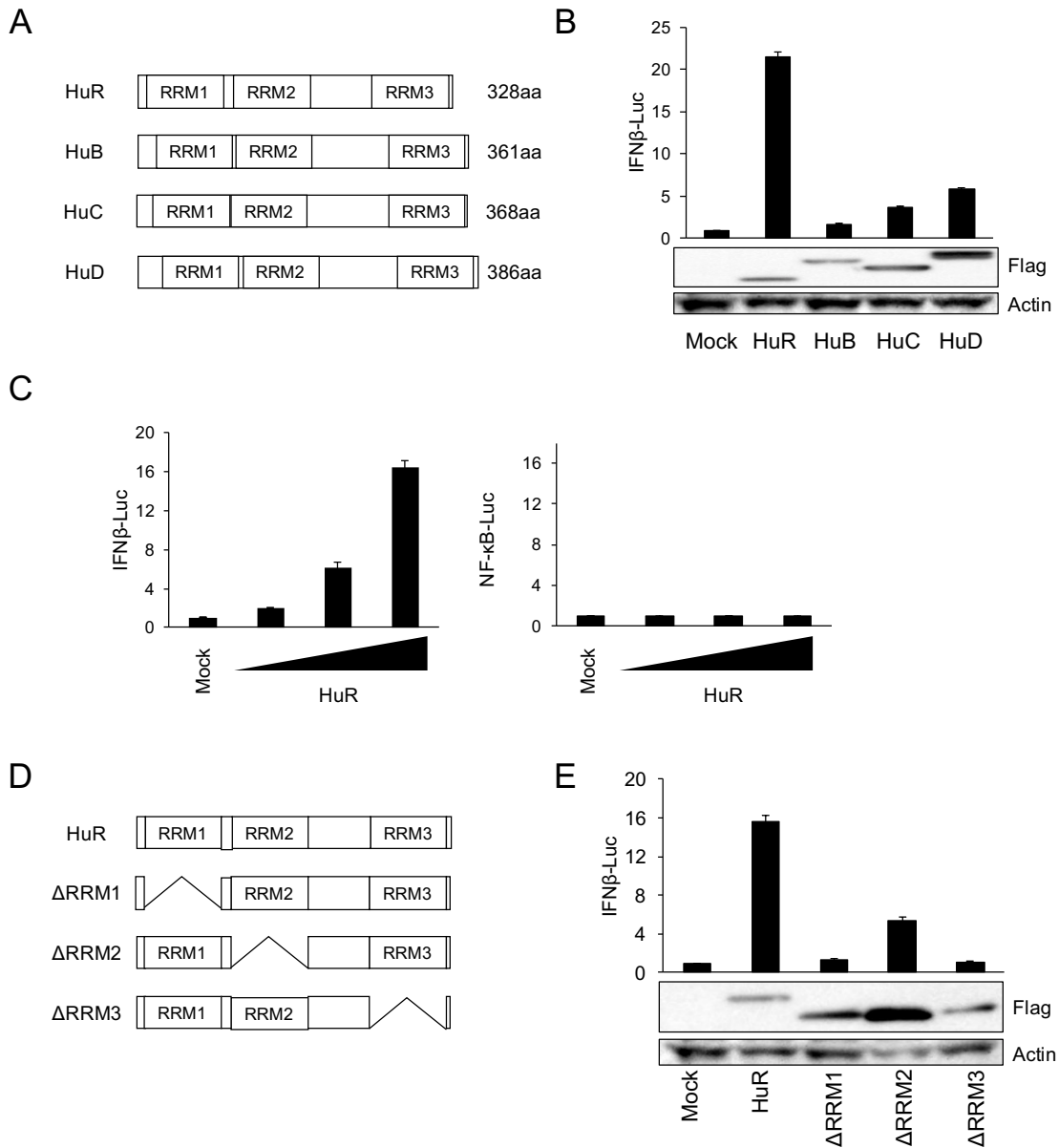


図 3.1 HuR 発現プラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイ

(A)Hu ファミリータンパク質はそれぞれ 3 つの RRM(RNA 認識モチーフ)を有している RNA 結合タンパク質ファミリーである。aa=amino acid。

(B)HEK293T 細胞に pGL3-IFNβ-Luc プラスミド、pTK-Luc プラスミドとともに pFlag-CMV-2 HuR、pFlag-CMV-2 HuB、pFlag-CMV-2 HuC、pFlag-CMV-2 HuD または Mock として pFlag-CMV-2 プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後、ルシフェラーゼの活性を測定した。また、各タンパク質の発現をウエスタンブロットにより確認した。

(C)HEK293T 細胞に pGL3-IFNβ-Luc または pGL3-NF-κB-Luc と pTK-Luc プラスミドを導入すると同時に、pFlag-CMV-2 HuR を 100 ng、250 ng、500 ng となるようにトランスフェクションした。Mock として pFlag-CMV-2 プラスミドを用いた。トランスフェ

エクシジョンすることで刺激し、6時間後に固定、蛍光顕微鏡により観察した。HuR (Green) と核 (Blue) を染色した。核の染色には Hoechst 33342 を用いた。

(B) MEF 細胞を poly(I:C) HMW (1 µg/ml) をトランスフェクションすることで刺激し、6時間後に固定、蛍光顕微鏡により観察した。HuR (Green)、G3BP (Red) と核 (Blue) を染色した。核の染色には Hoechst 33342 を用いた。

HuR 遺伝子ノックダウン細胞においては抗ウイルス性サイトカインの発現が減少する

初代培養細胞における HuR の機能を解析するために、骨髄細胞由来マクロファージ (BMDMs、Bone Marrow-Derived Macrophages) において siRNA による HuR 遺伝子のノックダウンを行なった。C57BL/6 マウスより造血幹細胞を採取後、M-CSF を用いて培養することでマクロファージへと分化させた。培養から 5 日目の細胞に、HuR を標的とする siRNA をエレクトロポレーションにより導入することで、HuR 遺伝子のノックダウンを行なった。コントロールとして Firefly Luciferase を標的とする siRNA を用いた。HuR 遺伝子がノックダウンされていることを Real-time PCR により確認したところ、HuR mRNA の発現量が 7 割程度減少していることが確認できた。また、ウエスタンブロットの結果から HuR タンパク質の産生量も減少していることを確認した (図 3.3 A, B)。続いて、poly(I:C) により刺激し、サイトカインの発現量を Real-time PCR により検証した結果、HuR 遺伝子をノックダウンした BMDMs において、IFN-β と ISG のひとつである CXCL10 の発現量が有意に減少していた (図 3.3C)。

また、ヒト細胞における HuR の関与を検証するために、ヒト単球系細胞株である THP-1 細胞においても siRNA による HuR 遺伝子のノックダウンを行った。THP-1 細胞における HuR 遺伝子のノックダウンを Real-time PCR により確認したところ、HuR mRNA の発現量が 9 割程度減少していることが確認できた (図 3.4 A)。次に、poly(I:C) により刺激後、サイトカインの発現量を Real-time PCR により計測したところ、HuR 遺伝子をノックダウンした条件において IFN-β と CXCL10 の発現量が有意に減少していた (図 3.4B)。

続いて、レトロウイルスを用いて MEF 細胞においても HuR 遺伝子のノックダウンを行った。HuR 遺伝子のノックダウン効率については、ウエスタンブロット法と Real-time PCR により確認したところ、コントロールと比較して HuR ノックダウン細胞においては HuR mRNA の発現が 8 割程度減少するとともにタンパク質の産生量も減少していた (図 3.5A, B)。続いて、HuR ノックダウン MEF 細胞を poly(I:C) HMW、人工二本鎖 DNA である ISD、グラム陰性細菌の細胞壁成分である LPS により刺激した。poly(I:C) HMW は MDA5 依存的に、ISD は cGAS 依存的に、LPS は

TLR4 依存的なシグナル伝達を誘導することが知られている。リガンドによる刺激後、サイトカインの発現を Real-time PCR により確認した結果、HuR ノックダウン MEF 細胞において、コントロール MEF 細胞と比較して、poly(I:C)刺激後の IFN- β と Cxcl10 の発現量が減少していたが、ISD と LPS 刺激後の IFN- β と Cxcl10 の発現量には変化が見られなかった (図 3.5C)。

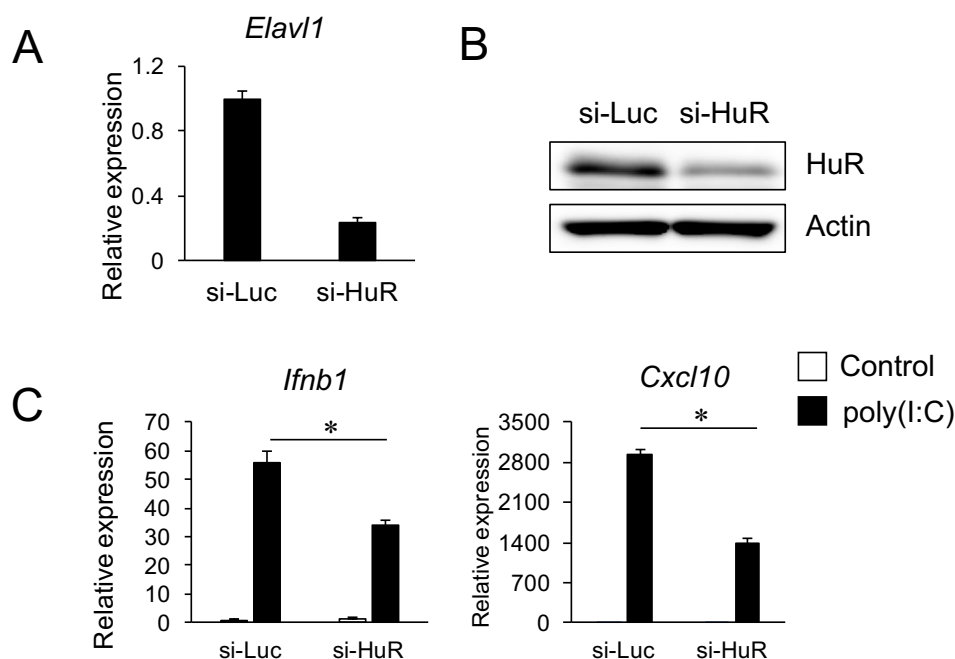


図 3.3. 骨髄細胞由来マクロファージにおける HuR 遺伝子のノックダウンとサイトカインの発現

(A)骨髄由来マクロファージ(BMDM)に si-Luc(Firefly Luciferase を標的とする siRNA) 及び si-HuR をエレクトロポレーションによって導入した。導入から 2 日後、コントロール (si-Luc) 及び HuR ノックダウン BMDM (si-HuR) における Elav1 遺伝子 (HuR) の発現を Real-time PCR により計測した。

(B)(A)と同様の細胞を用いて HuR タンパク質の発現をウエスタンブロットにより検出した。

(C)コントロール及び HuR ノックダウン BMDM を poly(I:C) HMW (1 μ g/ml)で 8 時間刺激後、Ifnb1、Cxcl10 の発現を Real-time PCR により定量した。* $p < 0.05$

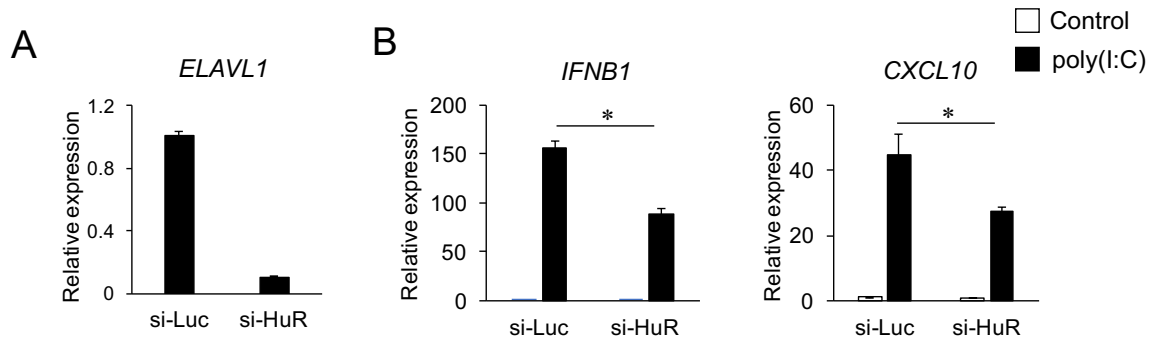


図 3.4. THP-1 (ヒト単球系細胞株) における HuR 遺伝子のノックダウンとサイトカインの発現

(A) THP-1 細胞に si-Luc (Firefly Luciferase を標的とする siRNA) 及び si-HuR をエレクトロポレーションによって導入した。導入から 2 日後、コントロール (si-Luc) 及び HuR ノックダウン BMDM (si-HuR) における ELAVL1 遺伝子 (HuR) の発現を Real-time PCR により計測した。

(B) コントロール及び HuR ノックダウン THP-1 細胞を poly(I:C) HMW (1 µg/ml) で 8 時間刺激後、IFNB1、CXCL10 の発現を Real-time PCR により定量した。* $p < 0.05$

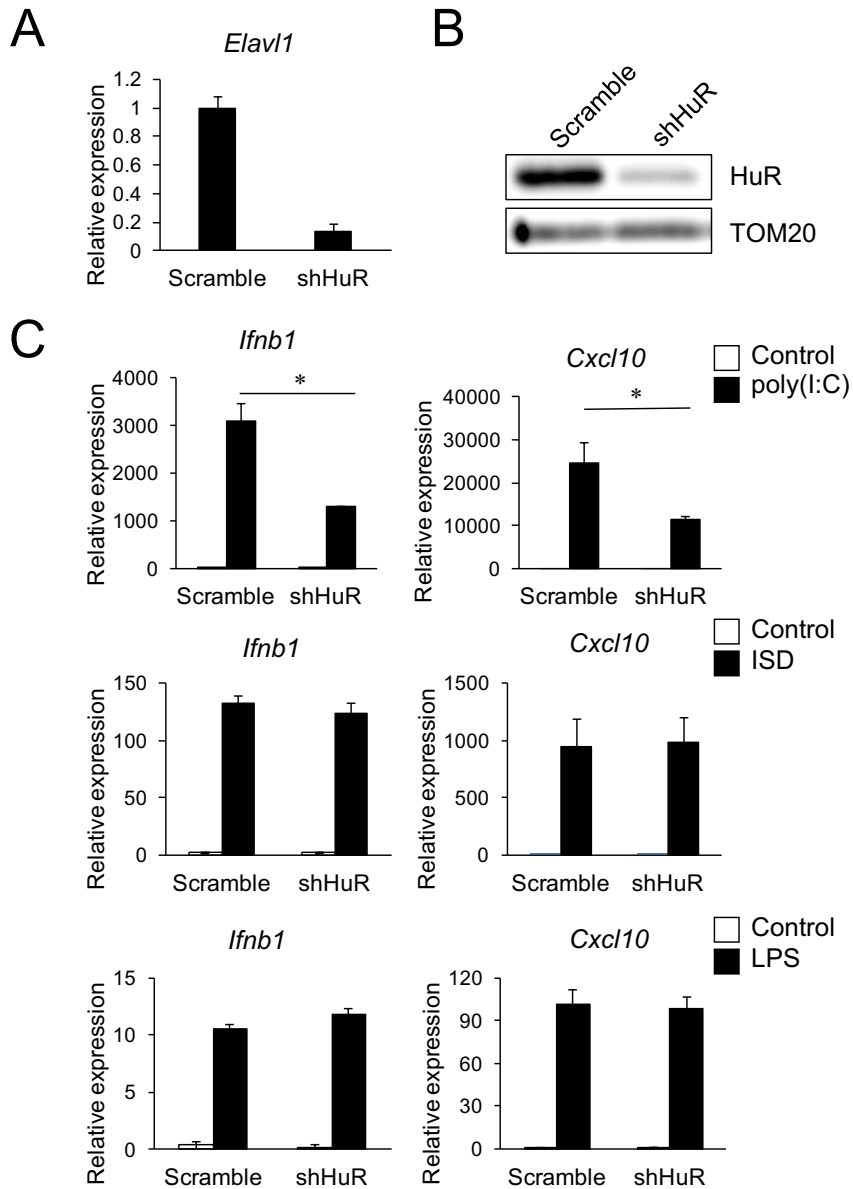


図 3.5. MEF 細胞における HuR ノックダウンとサイトカイン産生の測定

(A)コントロール (Scramble) 及び HuR ノックダウン MEF 細胞(shHuR)における *Elavl1* 遺伝子 (HuR) の発現を Real-time PCR により計測した。

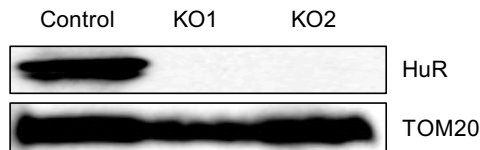
(B) (A) と同様の細胞を用いて HuR タンパク質の産生をウエスタンブロットにより検出した。

(C)コントロール MEF 細胞と HuR ノックダウン MEF 細胞を poly(I:C) HMW (1 μ g/ml)、ISD (1 μ g/ml)、LPS (1 μ g/ml) でそれぞれ 8 時間、6 時間、2 時間刺激後、*Ifnb1*、*Cxcl10* の発現を Real-time PCR により定量した。* $p < 0.05$

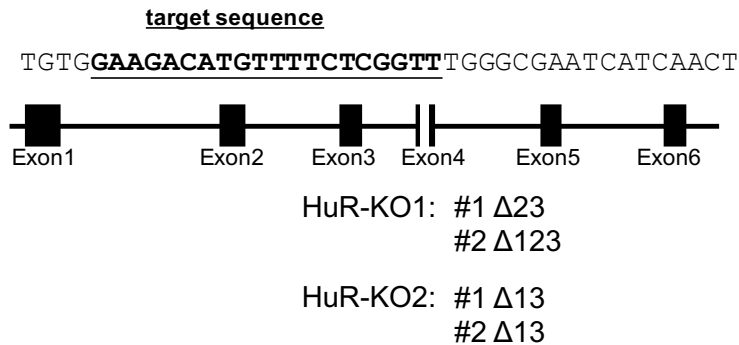
CRISPR/Cas9 システムによる HuR 欠損 RAW264.7 細胞の樹立

自然免疫細胞における HuR の機能を明らかにするために、マクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞を用いて HuR 欠損細胞株の樹立を行った。RAW264.7 細胞にエレクトロポレーション法により pX330-HuR および pCAG-EGxxFP-HuR を WT RAW264.7 細胞に導入した後、FACS Aria (BD) を用いたシングルセルソーティングにより、EGFP を発現している細胞を選別した。そして、得られた細胞株からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロットにより HuR タンパク質の発現が消失している細胞株を 2 株得た (図 3.6A)。また、これらの細胞株からゲノム DNA を抽出し、塩基配列を解析したところ、HuR 遺伝子をコードするゲノム配列中に 23bp と 123bp の欠失が見られる細胞株と 13bp と 13bp の欠失が見られる細胞株の 2 株を得ることができた (図 3.6B,C)。以上より、これら 2 つの細胞株を HuR 欠損細胞株 (以下 HuR 欠損細胞もしくは HuR 欠損 RAW264.7 細胞と呼称。また、それぞれの細胞株を HuR-KO1、HuR-KO2 と呼称) として実験に用いた。

A



B



C

```

HuR-WT      GTGTCATATGCTCGCCCAAGCTCAGAGGTCATCAAAGATGCCAACTTATACATCAGTGGGCTCC
Δ23 HuR-KO1-#1 GTGTCATATGCTCGCCCAAGCTCAGAGGTCATCAAAGATGCCAACTTATACATCAGTGGGCTCC
Δ123 HuR-KO1-#2 GTGTCATATGCTCGCCCAAGCTCAGAGGTCATCA-----

HuR-WT      CAAGGACCATGACACAGAAGGATGTGGAAGACATGTTTTCTCGGTTTGGGCGAATCATCAACTC
HuR-KO1-#1  CAAGGACCATGACACAGAAGGATGTGG-----CGAATCATCAACTC
HuR-KO1-#2  -----

HuR-WT      CAGGGTCCTTGTGGATCAGACCACAGGTACACACAGGAGCTAAGATAGGTCTCTCTGAGCCCTA
HuR-KO1-#1  CAGGGTCCTTGTGGATCAGACCACAGGTACACACAGGAGCTAAGATAGGTCTCTCTGAGCCCTA
HuR-KO1-#2  -----GAGCCCTA

HuR-WT      GACTAGGTGTTCTAGGGAAGATAGGGAG
HuR-KO1-#1  GACTAGGTGTTCTAGGGAAGATAGGGAG
HuR-KO1-#2  GACTAGGTGTTCTAGGGAAGATAGGGAG

HuR-WT      GTGTCATATGCTCGCCCAAGCTCAGAGGTCATCAAAGATGCCAACTTATACATCAGTGGGCTCC
Δ13 HuR-KO2-#1 GTGTCATATGCTCGCCCAAGCTCAGAGGTCATCAAAGATGCCAACTTATACATCAGTGGGCTCC
Δ13 HuR-KO2-#2 GTGTCATATGCTCGCCCAAGCTCAGAGGTCATCAAAGATGCCAACTTATACATCAGTGGGCTCC

HuR-WT      CAAGGACCATGACACAGAAGGATGTGGAAGACATGTTTTCTCGGTTTGGGCGAATCATCAACTC
HuR-KO2-#1  CAAGGACCATGACACAGAAGGATGTGGAAGACATG-----GGCGAATCATCAACTC
HuR-KO2-#2  CAAGGACCATGACACAGAAGGATGTGGAAGACA-----TGGGCGAATCATCAACTC

HuR-WT      CAGGGTCCTTGTGGATCAGACCACAGGTACACACAGGAGCTAAGATAGGTCTCTCTGAGCCCTA
HuR-KO2-#1  CAGGGTCCTTGTGGATCAGACCACAGGTACACACAGGAGCTAAGATAGGTCTCTCTGAGCCCTA
HuR-KO2-#2  CAGGGTCCTTGTGGATCAGACCACAGGTACACACAGGAGCTAAGATAGGTCTCTCTGAGCCCTA

HuR-WT      GACTAGGTGTTCTAGGGAAGATAGGGAG
HuR-KO2-#1  GACTAGGTGTTCTAGGGAAGATAGGGAG
HuR-KO2-#2  GACTAGGTGTTCTAGGGAAGATAGGGAG

```

図 3.6. CRISPR/Cas9 システムによる HuR 欠損 RAW264.7 細胞株の樹立

(A)野生型 RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞の全細胞溶解液を回収後、抗 HuR 抗体と抗 TOM20 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

(B)gRNA に用いた target sequence を示した。Exon4 上の白の四角は gRNA により標的とされる配列の位置を示す。また、A.のウエスタンブロットの結果得られた HuR 欠損細胞株 (KO1, KO2) のシーケンス解析の結果から、標的とした Exon 4 の配列に KO1 では 23bp と 123bp の欠失が、KO2 では 13bp と 13bp の欠失が確認された。

(C)野生型 RAW264.7 細胞と HuR-KO1、KO2 の標的配列を含むゲノム配列のシーケンスを示した。標的配列は太字と下線により示し、ELAVL1 遺伝子の Exon4 を太字で示した。

HuR 欠損 RAW264.7 細胞においては抗ウイルス応答が減弱する

HuR 欠損細胞におけるサイトカイン遺伝子の発現を検証するために、HuR-KO1、HuR-KO2 を poly(I:C) HMW、poly(I:C) LMW、ISD、LPS により刺激した。poly(I:C) LMW は RIG-I 依存的にシグナル伝達の活性化を誘導することが知られている。WT RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞をリガンドで刺激後、Real-time PCR によ

り IFN- β 、CXCL10、IL-10 の mRNA 量を計測した。その結果、poly(I:C) HMW、poly(I:C) LMW で刺激した場合、WT RAW264.7 細胞と比較して、HuR-KO1、HuR-KO2 において IFN- β と CXCL10 の発現量が有意に減少していた (図 3.7A, B)。一方、ISD、LPS で刺激した際には、HuR-KO1、HuR-KO2 における IFN- β と CXCL10 の発現量は WT RAW264.7 細胞との間で変化は見られなかった (図 3.6C, D)。また、IL-10 の発現量に関していずれの刺激に対しても WT RAW264.7 細胞と HuR-KO1、HuR-KO2 との間で変化は見られなかった。続いて、ELISA により各リガンド刺激後の IFN- β 、CXCL10、IL-10 のタンパク質量を計測した結果、Real-time PCR と同様に HuR 欠損細胞では poly(I:C) 刺激後の IFN- β と CXCL10 のタンパク質産生が抑制されていた (図 3.8 A) 一方、ISD と LPS による刺激後の IFN- β と CXCL10 のタンパク質量には変化は見られなかった (図 3.8 B, C) また、poly(I:C) 刺激後の HuR 欠損細胞におけるストレス顆粒マーカーである G3BP の細胞内局在を観察したところ、HuR 欠損細胞においても poly(I:C) 刺激後に G3BP が細胞室内顆粒を形成していた (図 3.9)。続いて、HuR-KO1、HuR-KO2 を樹立時に用いたものと異なる gRNA を用いて HuR 欠損細胞株を樹立(HuR KO gRNA#2)し、自然免疫リガンドによる刺激後のサイトカイン発現を確認したところ、HuR-KO1、KO2 と同様の表現型が見られた (図 3.10A-E)。

poly(I:C) による刺激後に HuR 欠損細胞において、抗ウイルス性サイトカインの発現量が減弱していたことから、RIG-I によって認識されることが報告されているニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus : NDV) を感染後のサイトカインの発現誘導について検証した。1MOI または 5MOI の NDV を WT RAW264.7 細胞と HuR 欠損細胞に感染後、サイトカイン mRNA の発現量と、NDV に由来する転写産物の存在量をそれぞれ Real-time PCR により確認した。その結果、感染時の IFN- β と CXCL10 の発現量は HuR 欠損細胞において減少していた (図 3.11A)。そして、抗ウイルス性サイトカインの発現量の減少と一貫して、宿主細胞内に存在する NDV に由来する転写産物の量は HuR 欠損細胞において WT RAW264.7 細胞と比較して上昇していた (図 3.11B)。これらの結果から、HuR 欠損細胞においてはウイルスに対する自然免疫応答が減弱していることが考えられた。

次に、HuR 欠損細胞において観察された表現型が HuR 遺伝子の欠損によるものであることを検証するためにレトロウイルスを用いて発現実験を行なった。Flag-HuR をコードするレトロウイルスを HuR 欠損細胞に感染させ、その後 Puromycin によりウイルス感染細胞のみを選別することで、Flag-HuR を発現する HuR 欠損細胞を得た。Flag-HuR の発現はウエスタンブロットにより確認した (図 3.12A)。この細胞を poly(I:C) により刺激後、IFN- β と CXCL10 の発現量を Real-time PCR により検証したところ、Flag-HuR を発現させた HuR 欠損細胞においてはコントロールと同様の

IFN-β と CXCL10 の発現が確認された (図 3.12B)。以上のことから、HuR はウイルスに対する自然免疫応答において重要な役割を果たしているものと考えられる。

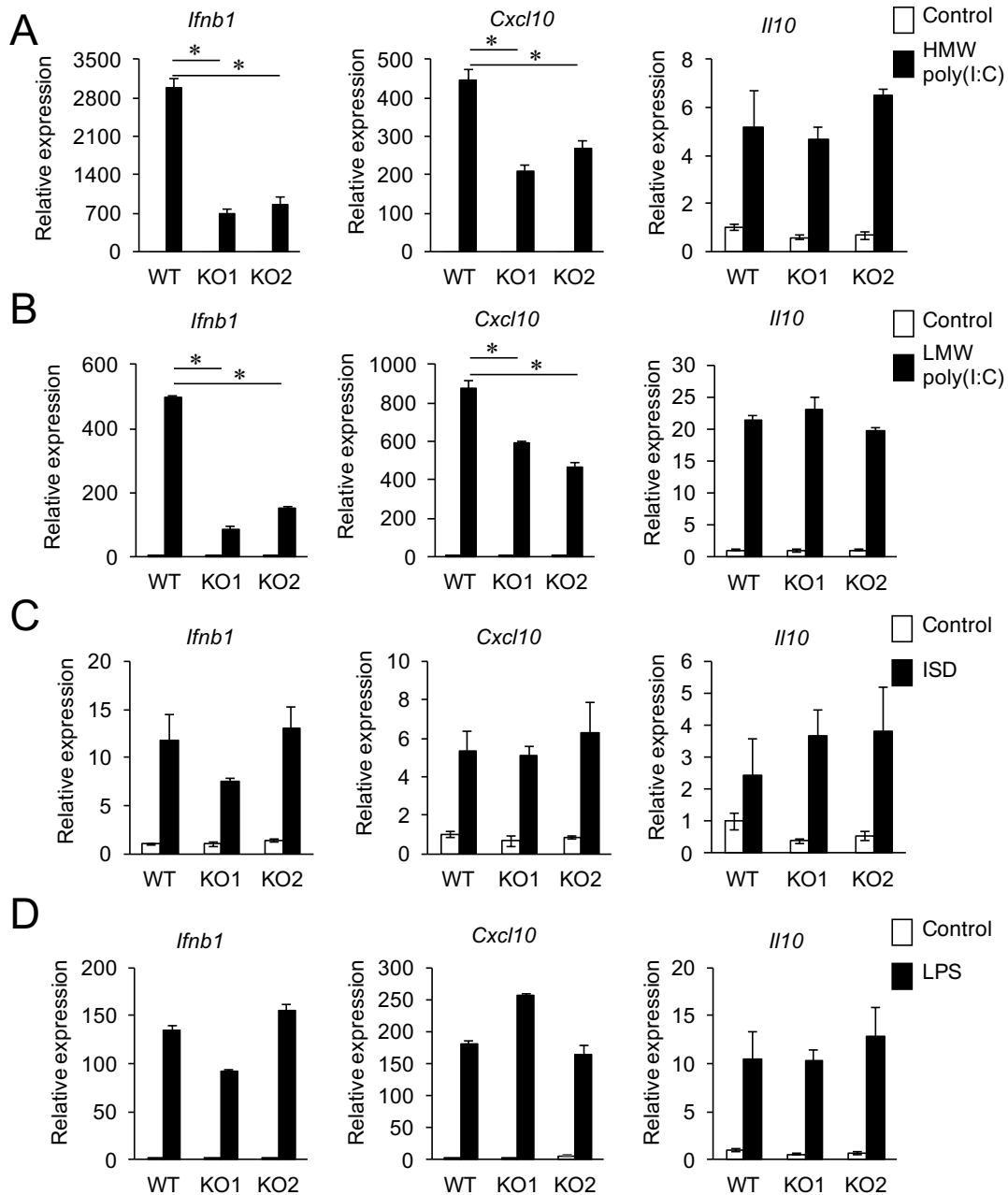


図 3.7. HuR 欠損細胞における自然免疫リガンド刺激後のサイトカイン遺伝子発現

(A-D)野生型 RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞(HuR-KO1, KO2)を poly(I:C) HMW (1 μg/ml)、poly(I:C) LMW (1 μg/ml)、ISD (1 μg/ml)、LPS (1 μg/ml)でそれぞれ 8 時間、8 時間、6 時間、2 時間刺激後、*Ifnb1*、*Cxcl10*、*Il10* の発現を Real-time PCR により定量した。* $p < 0.05$

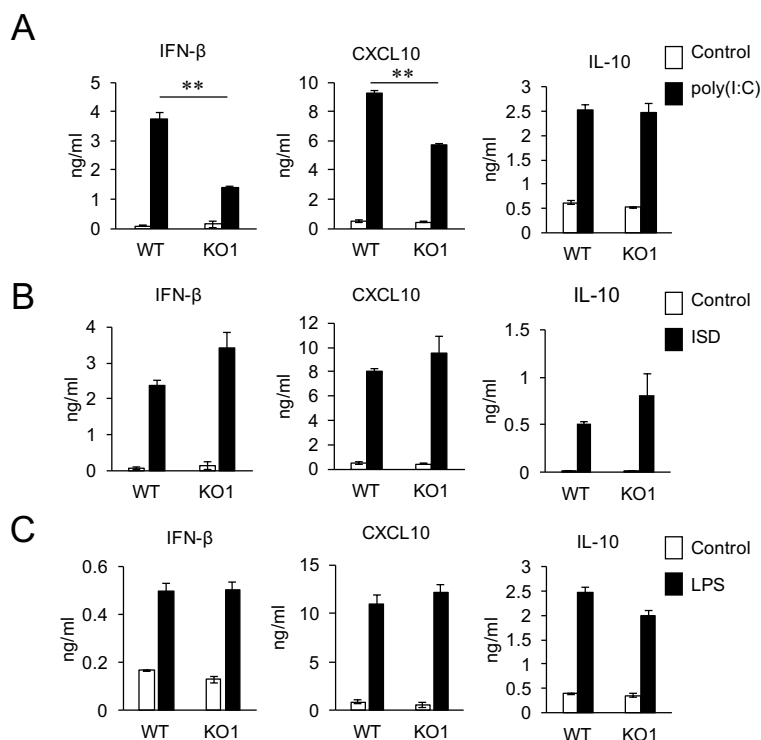


図 3.8. HuR 欠損細胞における自然免疫リガンド刺激後のサイトカイン産生

(A-C)野生型 RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞(HuR-KO1)を poly(I:C) HMW (1 μg/ml)、ISD (1 μg/ml)、LPS (1 μg/ml)でそれぞれ 24 時間、24 時間、12 時間刺激後、ELISA により上清中の各タンパク質の濃度を測定した。** $p < 0.01$

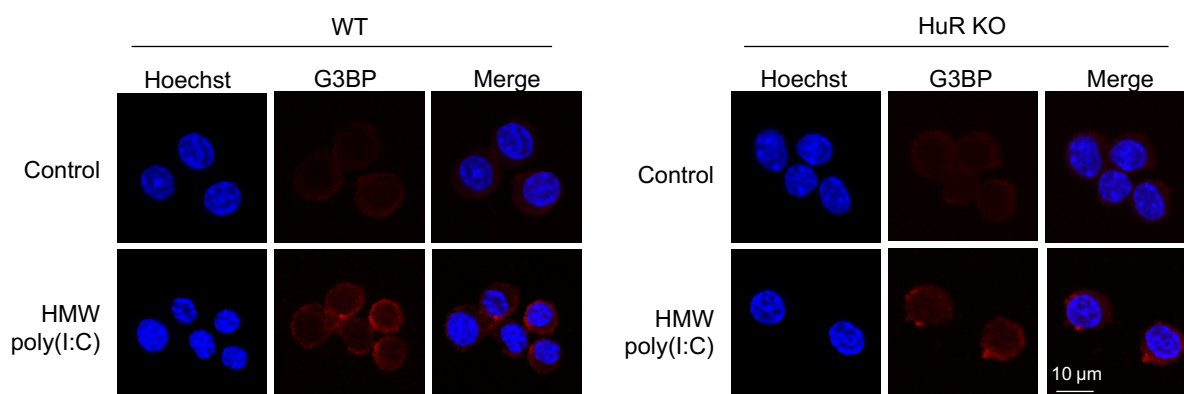


図 3.9. HuR 欠損 RAW264.7 細胞における G3BP の細胞内局在の観察

野生型 RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞を poly(I:C) HMW をトランスフェクションすることで刺激し、6 時間後に固定、蛍光顕微鏡により観察した。G3BP(Red)と核 (Blue) を染色した。核の染色には Hoechst 33342 を用いた。

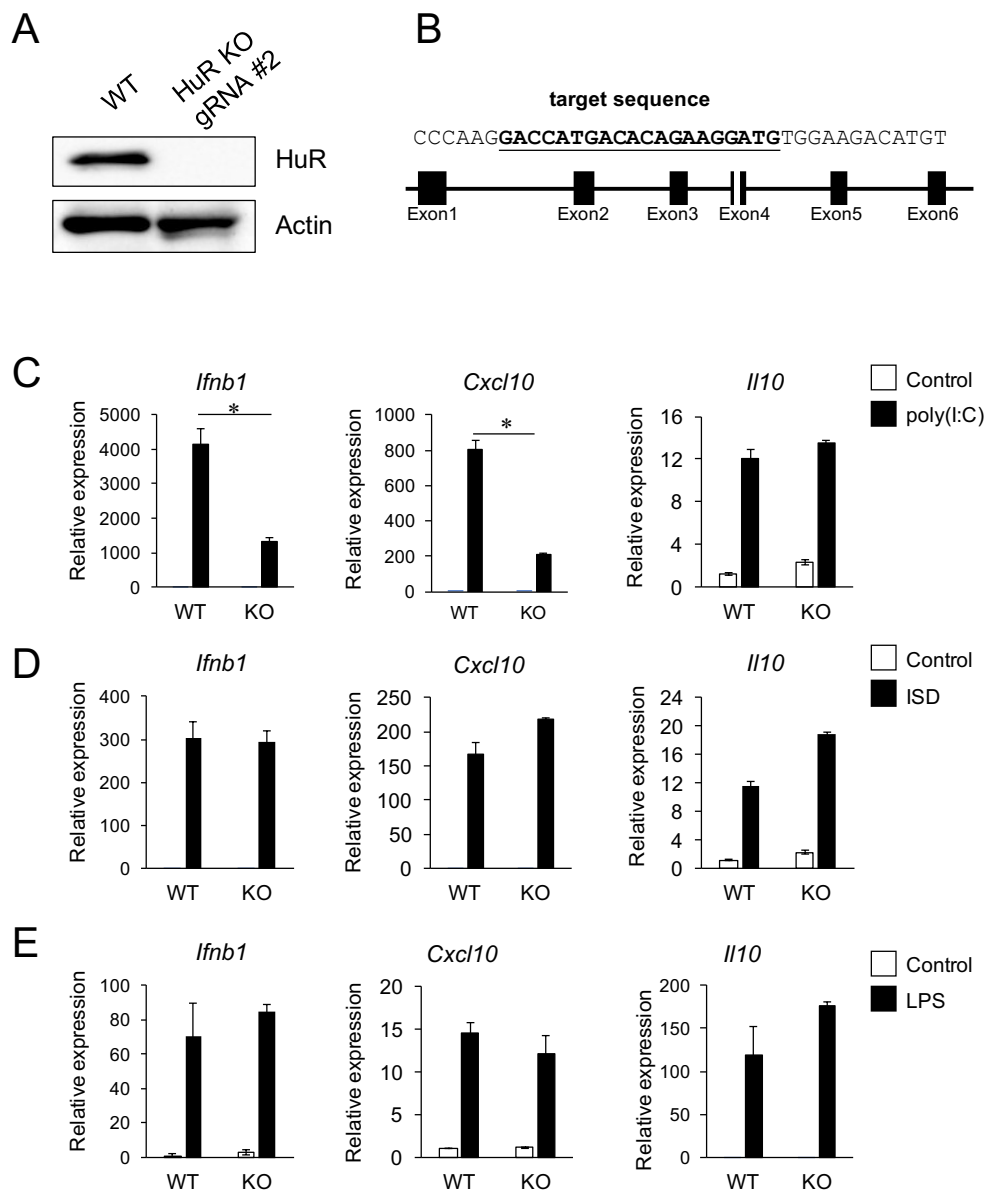


図 3.10. 異なる gRNA を用いて樹立した HuR 欠損細胞における自然免疫リガンド刺激後のサイトカインの発現

(A)野生型 RAW264.7 細胞と gRNA #2 により作成した HuR 欠損 RAW264.7 細胞(HuR-KO gRNA #2)の全細胞溶解液を回収後、抗 HuR 抗体と抗 Actin 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

(B)gRNA #2 が標的とする配列とその Exon 上の位置を白の四角で示した。

(C-E)野生型 RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞 (HuR KO gRNA #2)を poly(I:C) HMW (1 μ g/ml)、ISD (1 μ g/ml)、LPS (1 μ g/ml)でそれぞれ 8 時間、6 時間、2 時間刺激後、*Ifnb1*、*Cxcl10*、*Il10* の発現を Real-time PCR により定量した。* $p < 0.05$

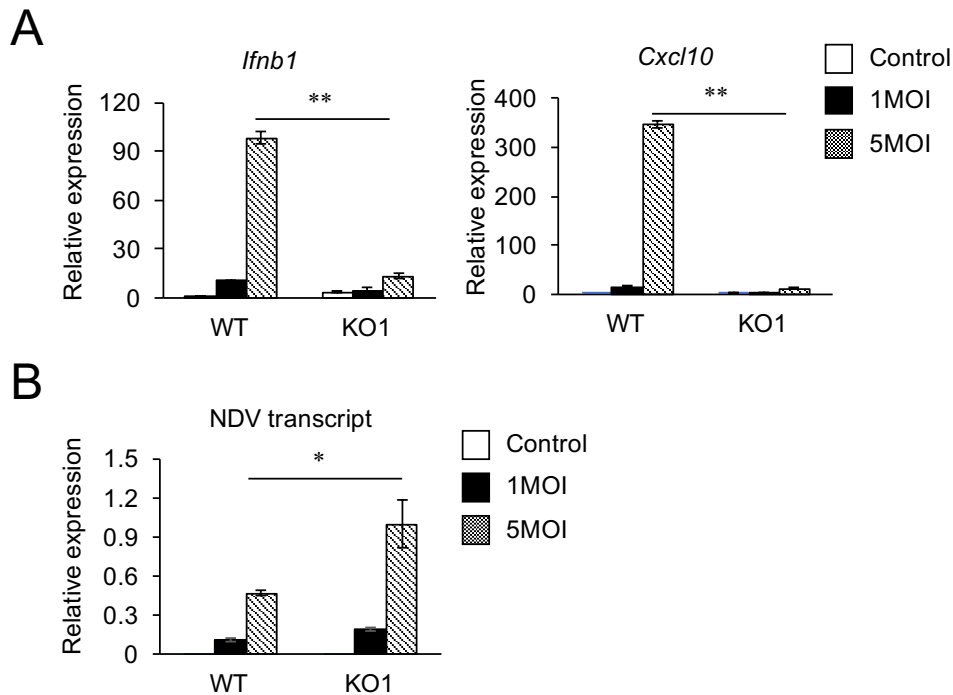


図 3.11. HuR 欠損細胞の RNA ウイルスに対する自然免疫応答

(A, B)野生型 RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞(HuR-KO1)に 1MOI または 5MOI のニューカッスル病ウイルス (NDV) を感染させた。感染から 12 時間後、*Ifnb1*、*Cxcl10* (A) 及び細胞内の NDV 転写産物 (B) を Real-time PCR により定量した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

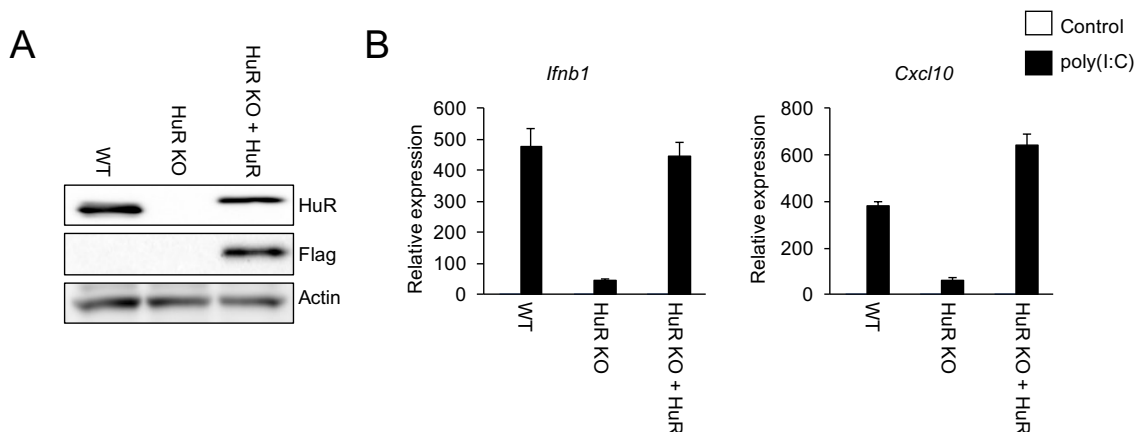


図 3.12. HuR 欠損細胞における HuR 遺伝子の発現実験

(A)野生型 RAW264.7 細胞、HuR 欠損 RAW264.7 細胞 (HuR-KO1)、Flag-HuR を発現させた HuR 欠損 RAW264.7 細胞 (HuR KO + HuR)から全細胞溶解液を回収し、抗 HuR、抗 Flag、抗 Actin 抗体を用いてウエスタンブロットを行い標的タンパク質を検出した。(B)上記の細胞を poly(I:C) HMW (1 $\mu\text{g/ml}$)で 8 時間刺激後、*Ifnb1*、*Cxcl10* の発現を Real-time PCR により定量した。

HuR 欠損 RAW264.7 細胞においては Plk2 の発現量が減少している

HuR 欠損 RAW264.7 細胞において、どのような遺伝子の発現量に変動が生じているのかを検証するために、TLR、RLR、cGAS 下流のシグナル伝達因子の発現量を Real-time PCR 法により測定した。その結果、Tbk1、Mavs、Tmem173、Mapk14、Map3k7、Traf2、Traf6、Ticam1 (タンパク質名はそれぞれ TBK1、IPS-1、STING、p38- α 、TAK1、TRAF2、TRAF6、TRIF) といったシグナル伝達因子の mRNA の発現量は WT RAW264.7 細胞と双方または片方の HuR 欠損 RAW264.7 細胞間で変化は見られなかった (図 3.13)。

シグナル伝達因子を標的とした Real-time PCR の結果からは HuR 欠損細胞において発現量が減少している因子を同定することができなかったことから、マイクロアレイによる網羅的な解析を行った。WT RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞を poly(I:C) HMW で刺激後、マイクロアレイ解析を行った。その結果、先行研究において報告されていた通り、HuR 欠損細胞においては CCL2 や CCL7、CCL12 といったケモカイン遺伝子の発現が減少していることが確認された (Fan et al., 2011)。加えて、HuR 欠損細胞においては、Polo-like kinase2 (PLK2) の発現量が減少していた (図 3.14A, B)。この結果と一致して、HuR 欠損細胞における Plk2 の発現量の減少は Real-time PCR によっても確認した (図 3.15A)。一方、PLK2 以外の PLK family メンバーである Plk1、Plk3、Plk4 の発現量は WT RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞間で有意な変化は見られなかった (図 3.15A)。Plk2 の発現量の減少は、HuR-KO gRNA#2 においても見られた (図 3.15B) また、HuR 欠損細胞に Flag-HuR を発現させた細胞においては、HuR 欠損細胞と比較して Plk2 の発現量が有意に向上した (図 3.15C)。

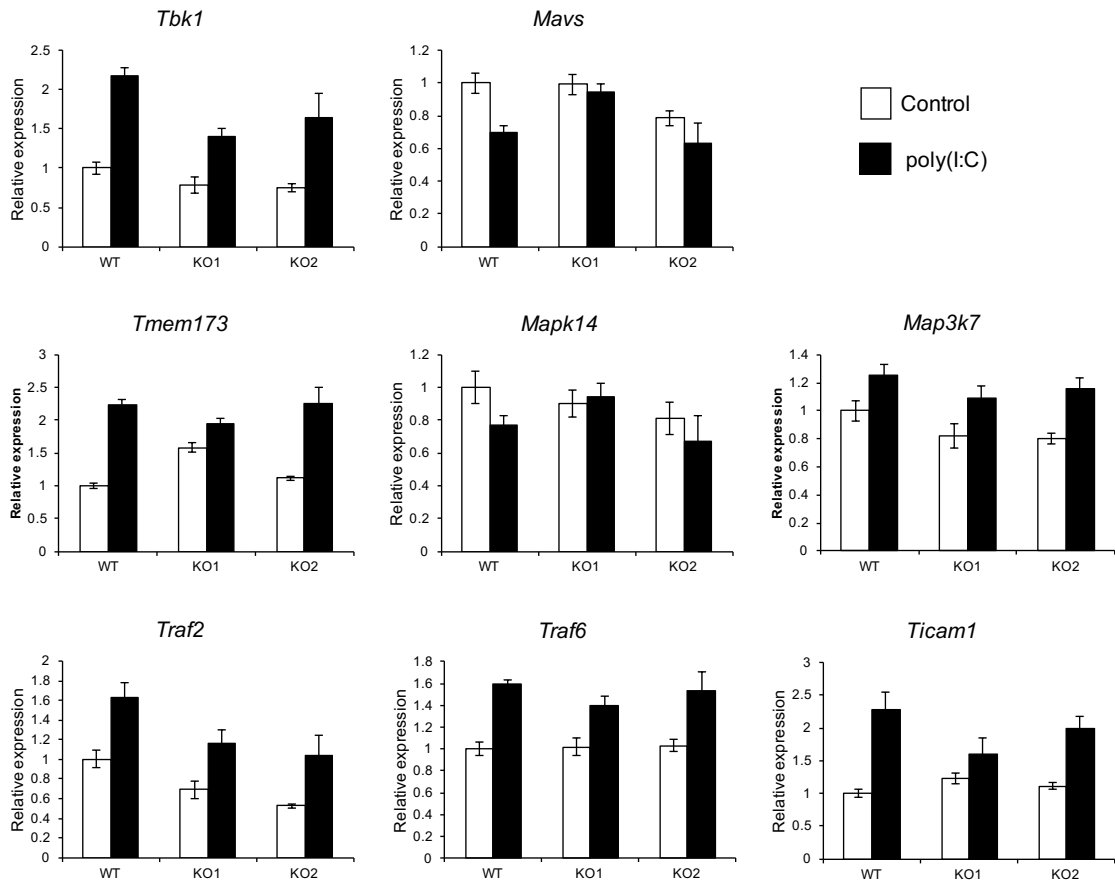


図 3.13. HuR 欠損細胞における自然免疫シグナル伝達分子の発現の解析

野生型 RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞 (KO1, KO2) を poly(I:C) HMW (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 8 時間刺激後、Real-time PCR により *Tbk1*、*Mavs*、*Tmem173*、*Mapk14*、*Map3k7*、*Traf2*、*Traf6*、*Ticam1* の発現量を計測した。

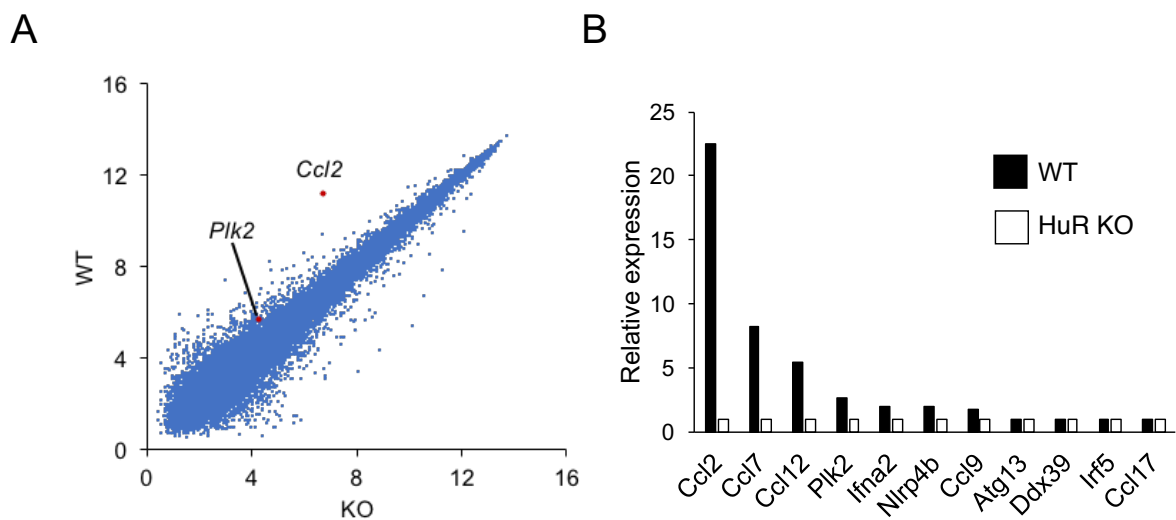


図 3.14. HuR 欠損細胞のマイクロアレイによる解析

(A, B)野生型 RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞 (HuR-KO1) を poly(I:C) HMW

(1 $\mu\text{g/ml}$)により 8 時間刺激したサンプルを用いてマイクロアレイによる解析を行った。散布図 (A) とケモカインなど免疫関連因子を抽出したグラフ (B) を示した。

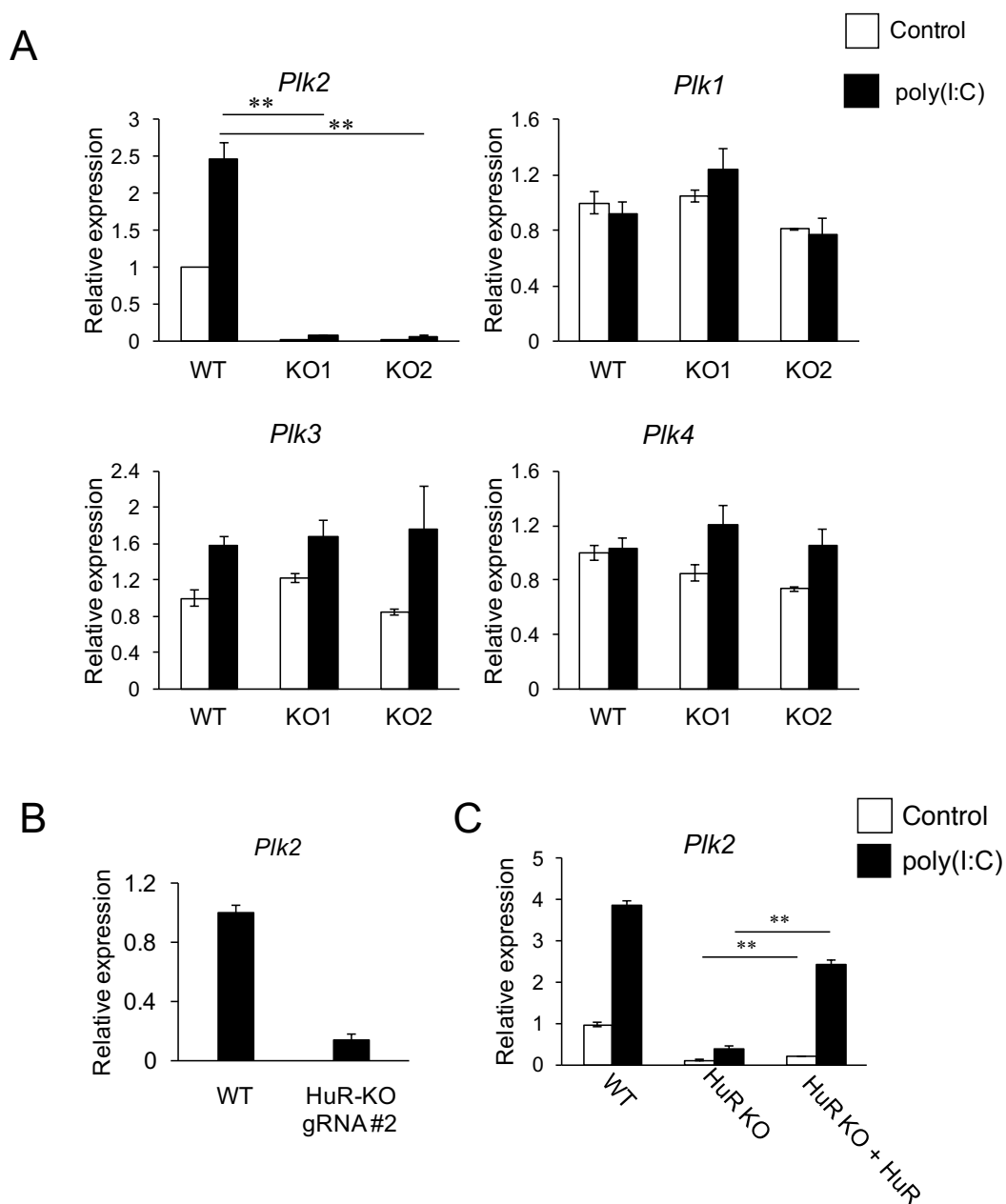


図 3.15. HuR 欠損細胞における Plk2 の発現の解析

(A)野生型 RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞 (HuR-KO1, KO2) を poly(I:C) HMW (1 $\mu\text{g/ml}$)で刺激後、Real-time PCR により Plk2、Plk1、Plk3、Plk4 の発現量を計測した。

(B)野生型 RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞 (HuR-KO gRNA #2)における Plk2 の発現量を Real-time PCR により計測した。

(C) 野生型 RAW264.7 細胞、HuR 欠損 RAW264.7 細胞 (HuR-KO1)、Flag-HuR を発現

させた HuR 欠損 RAW264.7 細胞 (HuR KO + HuR) を poly(I:C) HMW (1 $\mu\text{g/ml}$) で刺激後、Plk2 の発現量を Real-time PCR により定量した。 ** $p < 0.01$

PLK2 は IFN- β の発現を制御する

先行研究から、PLK2 は IRF3 の細胞質から核への移行を制御することで、IFN- β の産生に関与していることが示唆されている (Chevrier et al., 2011)。そこで、PLK2 に着目して検証することにした。まず、PLK2 の発現プラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行なったところ、PLK2 の濃度依存的に IFN- β のプロモーターの活性が上昇した (図 3.16A)。また、野生型 RAW264.7 細胞を poly(I:C) で刺激後、継時的に PLK ファミリーの発現量を Real-time PCR により計測したところ、PLK2 は poly(I:C) 刺激後に強くその発現が誘導された (図 3.16B)。その一方で、その他の PLK ファミリーの発現は誘導されなかった。

次に、PLK ファミリーの阻害剤である BI2536 を用いた実験を行った。まず、BI2536 の細胞増殖への影響を検討するために、BI2536 を 10^{-2} μM から 10^0 μM の濃度で 12 時間、24 時間投与後に生存細胞数を WST-1 アッセイにより確認した。その結果、BI2536 の投与は 10^{-2} μM 、 10^{-1} μM の濃度では 24 時間後においても生存細胞数に影響を与えず、また 10^0 μM の濃度で投与した場合においても 12 時間後の生存細胞数は DMSO 投与条件と変化はなかった (図 3.17A)。また、 10^{-2} μM の BI2536 の投与は PLK2 の発現により誘導される IFN- β のプロモーターの活性化を部分的に抑制した (図 3.17B)。PLK2 はセリンスレオニンキナーゼのひとつであることから、その酵素活性を失った変異体 (PLK2^{K108M}) を作成し、ルシフェラーゼアッセイを行なったところ、PLK2^{K108M} は IFN- β のプロモーター活性を誘導しなかった。そのため、PLK2 による IFN- β のプロモーターの活性の誘導には PLK2 の酵素活性が関与していることが示唆された (図 17.B)。

次に、野生型 RAW264.7 細胞を poly(I:C) HMW により刺激すると同時に BI2536 を投与し、IFN- β 、CXCL10、IL-6 の mRNA 発現量を Real-time PCR により測定した。その結果、BI2536 を 10^{-2} μM 投与した条件において、poly(I:C) 刺激後の IFN- β の発現量が有意に減少していた。また、 10^0 μM 投与した条件においては poly(I:C) 刺激後の IFN- β 、Cxcl10、IL-6 の mRNA 発現量が有意に抑制された (図 3.18A)。続いて、PLK ファミリー阻害剤である BI2536 が抑制する自然免疫シグナル伝達経路を検証するために、RLR のアダプター分子である IPS-1、cGAS のアダプター分子である STING、TLR3、4 のアダプター分子である TRIF の発現プラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行なった。その結果、BI2536 の投与は IPS-1 により誘導される IFN- β プロモーターの活性を抑制したが、STING、TRIF により誘導される IFN- β プロモーターの活性は抑制しなかった (図 3.18B)。

ここまでの結果から、PLK2 が RLR を介する抗ウイルス応答に関与していることが考えられた。そこで、PLK2 欠損細胞株の樹立を行なった。px330-PLK2 と pCAG-EGxxFP-PLK2 を導入した RAW264.7 細胞をシングルセルソーティング後培養し、PLK2 の Exon1 上に 2 塩基及び 1 塩基のフレームシフト変異の生じた細胞株を得た (図 3.19A, B)。この細胞株では、フレームシフト変異に伴い、Plk2 の mRNA 量が有意に減少していた (図 3.19C)。樹立した PLK2 欠損細胞を poly(I:C) HMW、LPS、ISD で刺激後、IFN- β 、CXCL10、IL-10 の発現量を Real-time PCR により測定したところ、poly(I:C) HMW 刺激後の IFN- β と CXCL10 の発現量が有意に減少していた (図 3.20A)。また、HuR 欠損細胞とは異なり、LPS 刺激後の IFN- β の発現量も有意に減少していた (図 3.19C)。一方で、ISD 刺激後の IFN- β 、CXCL10 の発現量は野生型 RAW264.7 細胞との間で変化は見られなかった (図 3.20B)。これらの結果から、PLK2 はウイルスに対する自然免疫応答に関与していることが考えられた。

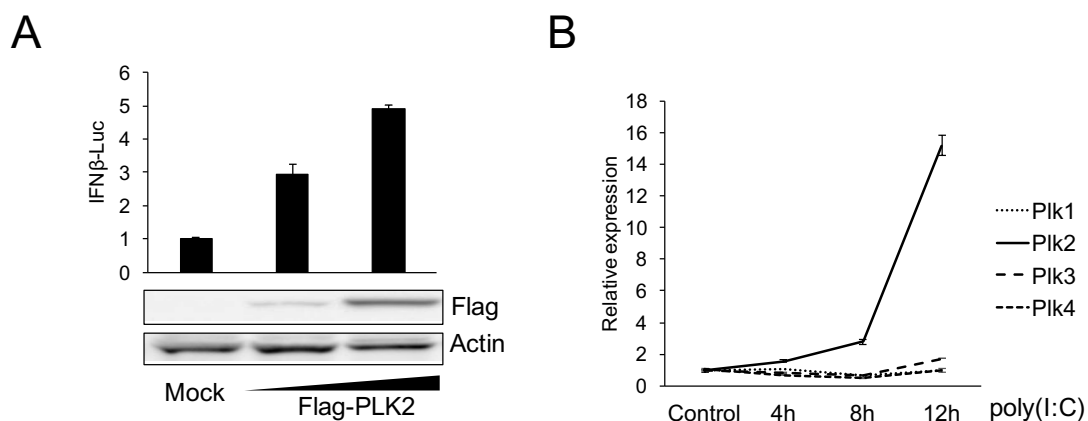


図 3.16. PLK2 の抗ウイルス応答への関与の解析

(A) HEK293T 細胞に pGL3-IFN β -Luc、pTK-Luc とともに pFlag-PLK2 をトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後、ルシフェラーゼの活性を計測した。また、プラスミドの発現量をウエスタンブロットにより確認した。

(B)野生型 RAW264.7 細胞を poly(I:C) HMW (1 μ g/ml) で 4、8、12 時間刺激後、Real-time PCR により Plk1、Plk2、Plk3、Plk4 の発現量を計測した。

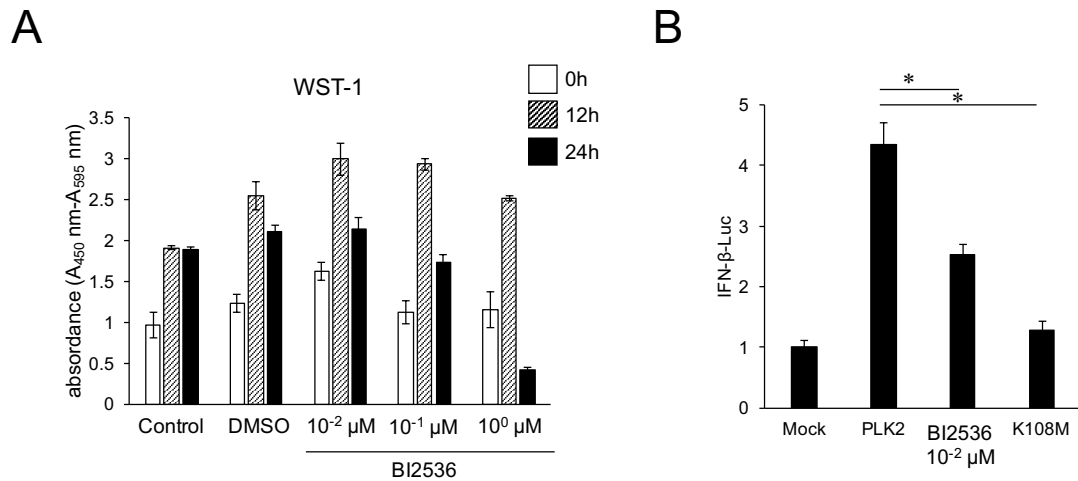


図 3.17. BI2536 による細胞増殖と PLK2 活性への影響の検討

(A)野生型 RAW264.7 細胞に DMSO または BI2536 (10^{-2} μ M、 10^{-1} μ M、 10^0 μ M)を投与後、12 時間、24 時間の時点における生細胞数を WST-1 アッセイにより確認した。

(B) HEK293T 細胞に pGL3-IFN β -Luc と pTK-Luc プラスミドを導入すると同時に、pFlag-PLK2 と PLK2 の酵素活性欠失体である pFlag-PLK2^{K108M} をトランスフェクションした。また、BI2536 を投与した条件においてはトランスフェクションと同時に BI2536 を投与した。トランスフェクションから 24 時間後、ルシフェラーゼの活性を測定した。* $p < 0.05$

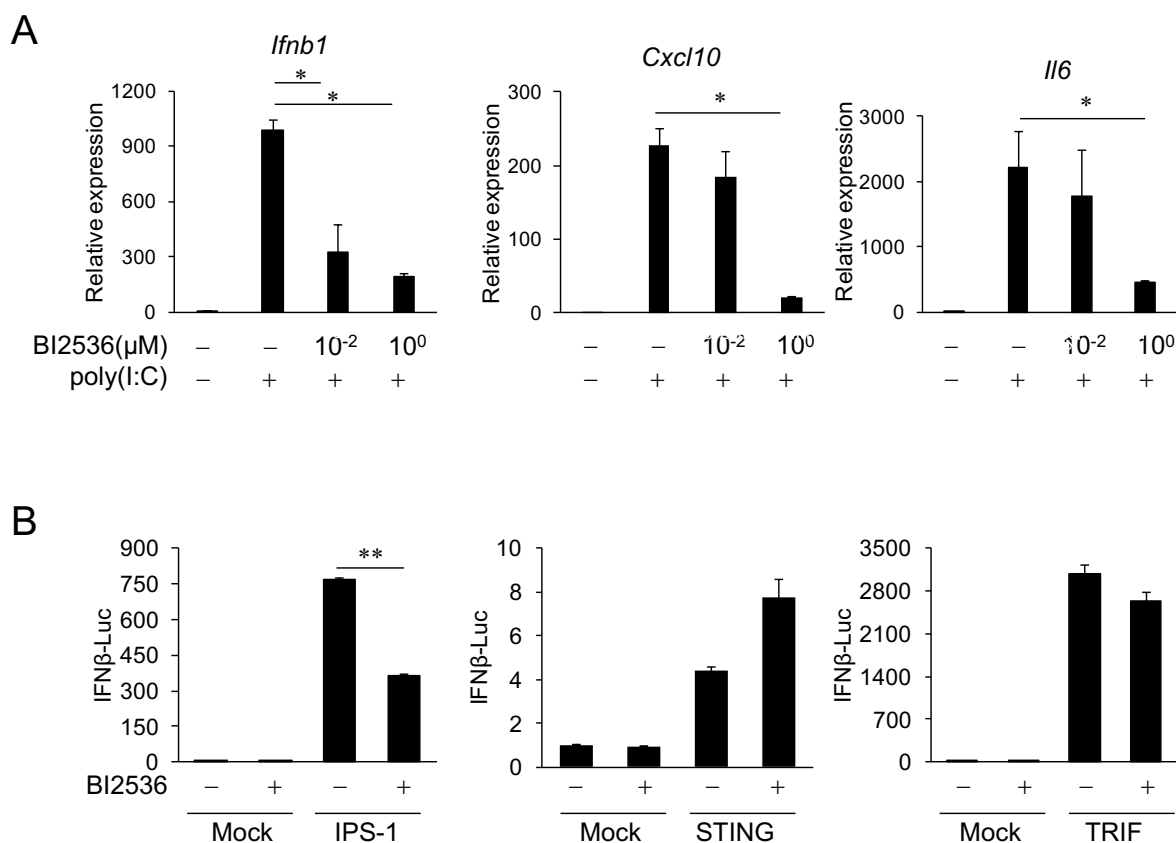


図 3.18. BI2536 の自然免疫シグナル伝達への影響

(A)野生型 RAW264.7 細胞に PLK ファミリーの阻害剤である BI2536 (10^{-2} , 10^0 μM) を投与すると同時に、poly(I:C) HMW (1 μg/ml)による刺激を行った。8 時間後、*Ifnb1*、*Cxcl10*、*Il6* の発現量を Real-time PCR により計測した。* $p < 0.05$

(B)HEK293T 細胞に pGL3-IFNβ-Luc、pTK-Luc とともに IPS-1、STING または TRIF の発現プラスミドをトランスフェクションした。6 時間後、培地を交換すると同時に BI2536 (10^{-2} μM)を投与した。24 時間後、ルシフェラーゼの活性を計測した。** $p < 0.01$

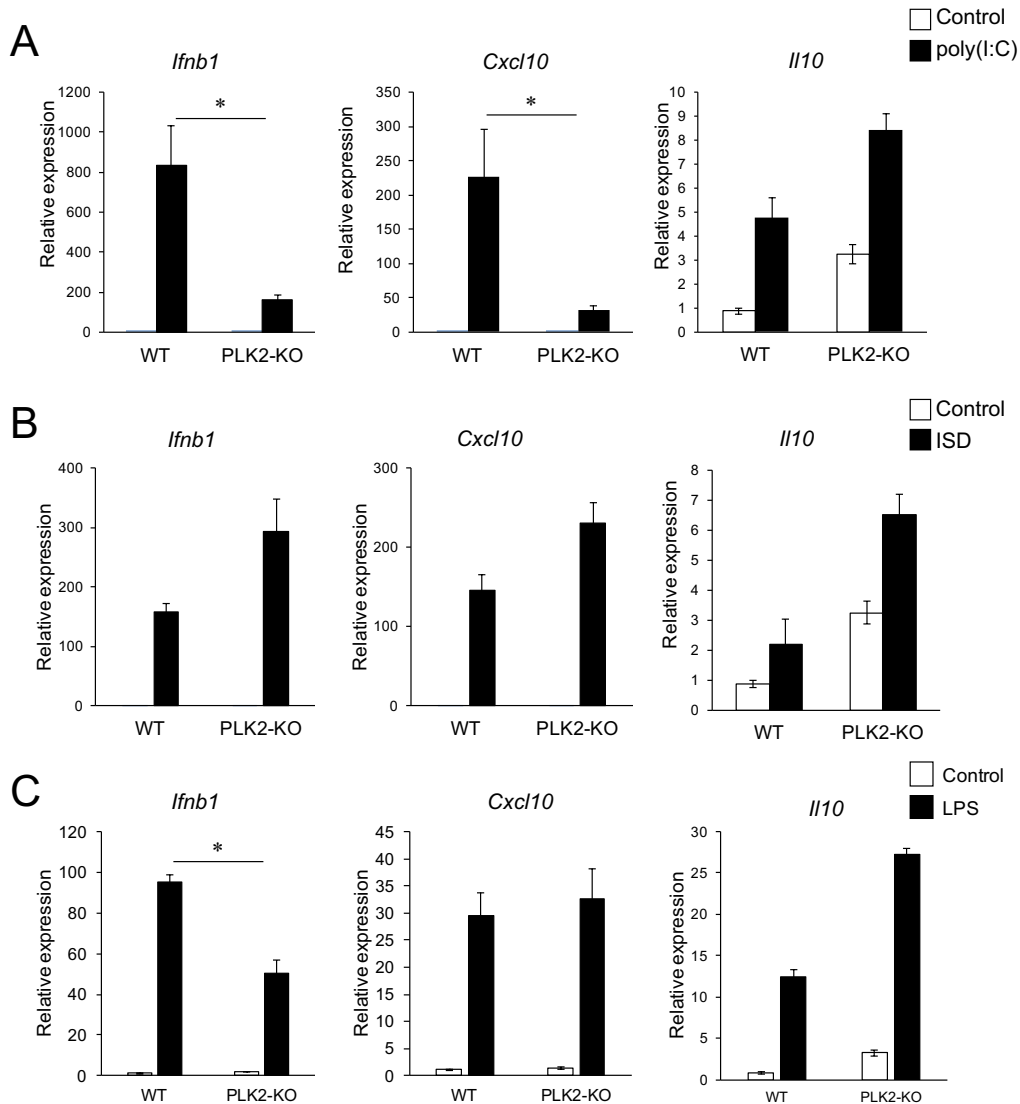


図 3.20. PLK2 欠損細胞における自然免疫リガンド刺激後のサイトカイン遺伝子発現
 (A-C)野生型 RAW264.7 細胞と PLK2 欠損 RAW264.7 細胞(PLK2-KO)を poly(I:C) HMW (1 μ g/ml) (A)、ISD (1 μ g/ml) (B)、LPS (1 μ g/ml) (C)でそれぞれ 8 時間、6 時間、2 時間刺激後、*Ifnb1*、*Cxcl10*、*Il10* の発現を Real-time PCR により定量した。* $p < 0.05$

PLK ファミリー阻害剤 BI2536 は IRF3 の核移行を抑制する

先行研究から、PLK2 は IRF3 の核への移行を制御することで IFN- β の産生に関与することが示唆されていた。そこで、PLK ファミリーの阻害剤である BI2536 投与時の IRF3 の活性化と核移行をウエスタンブロット法により検証した。はじめに、BI2536 を投与した WT RAW264.7 細胞を poly(I:C) HMW で刺激後、全細胞溶解液 (Whole cell lysate) を回収し、IRF3 と NF- κ B のリン酸化を観察した。その結果、全細胞溶解液においてはコントロール条件、BI2536 投与条件間で IRF3、NF- κ B の活性

化に変化は見られなかった (図 3.21A)。続いて、BI2536 を投与した WT RAW264.7 細胞を poly(I:C) HMW で刺激後、核分画と細胞質分画を抽出し、IRF3 と NF- κ B をウエスタンブロット法により観察した。その結果、細胞質分画における IRF3 にはコントロール条件、BI2536 投与条件間で変化は見られなかった (図 3.21B)。その一方で、核分画においては、BI2536 投与条件において IRF3 のタンパク量がコントロールと比較して減少していた (図 3.21C)。これらの結果から、BI2536 の投与により IRF3 の核への移行が抑制されている可能性が示唆された。

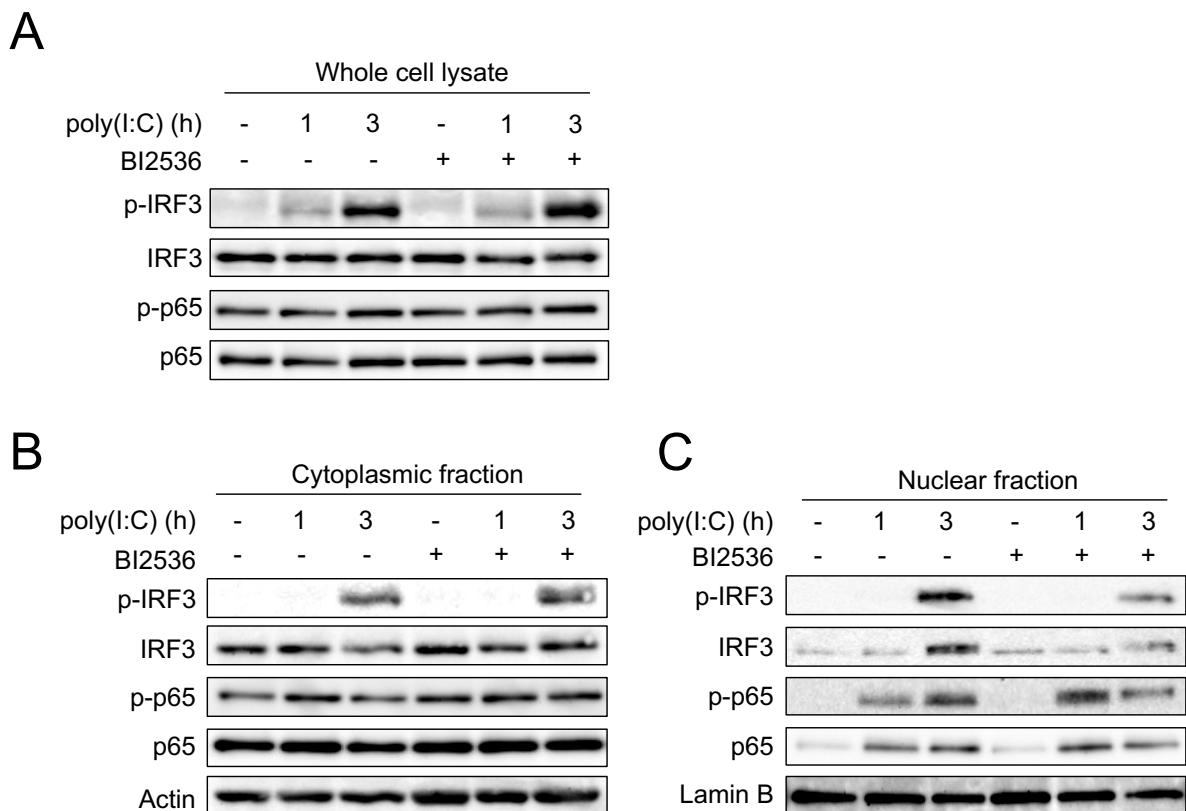


図 3.21. BI2536 投与時の転写因子の活性化と核移行の解析

(A-C)野生型 RAW264.7 細胞を BI2536 により 3 時間処理後、poly(I:C) HMW (1 μ g/ml) により刺激した。その後、全細胞溶解液 (A)、細胞質分画 (B)、核分画 (C) を抽出し、ウエスタンブロットにより各タンパク質を検出した。

HuR 欠損細胞においては IRF3 の核移行が抑制される

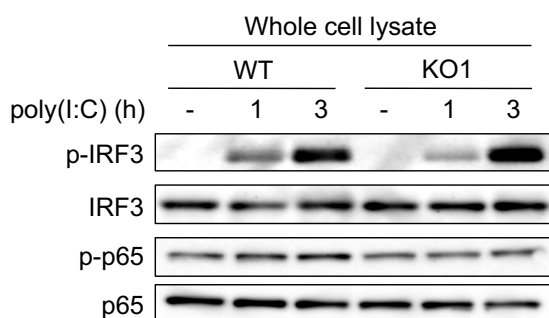
HuR 欠損細胞では Plk2 mRNA の発現量が顕著に減少していたことから、HuR 欠損細胞における IRF3 の核移行をウエスタンブロット法により検討した。WT RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞を poly(I:C) HMW で刺激後、全細胞溶解液を回収し、IRF3 と NF- κ B の活性化を観察した。その結果、WT RAW264.7 細胞と

HuR 欠損 RAW264.7 細胞間で、IRF3 と NF- κ B のリン酸化量に差は見られなかった (図 3.22A)。続いて、poly(I:C) HMW による刺激後、核分画と細胞質分画を抽出し、IRF3 と NF- κ B をウエスタンブロット法により観察した。その結果、細胞質における IRF3 の量は WT と HuR 欠損細胞の間で違いは見られなかった (図 3.22B)。その一方で、WT と比較して HuR 欠損細胞においては、核分画における IRF3 の量が減少していた (図 3.22C)。また、NF- κ B に関しては細胞質分画、核分画ともに野生型細胞と HuR 欠損細胞間で変化は見られなかった。

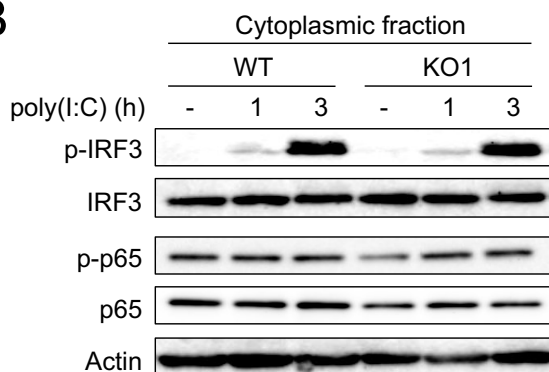
次に、poly(I:C)刺激後の HuR 欠損細胞における IRF3 の核への移行を免疫染色により検討した。顕微鏡位より得た画像から、IRF3 の核への移行が見られた細胞数を計測したところ、WT RAW264.7 細胞と比較して HuR 欠損細胞においては IRF3 の核への移行が有意に抑制されていた (図 3.23A,B)。また、PLK2 欠損細胞における IRF3 の核への移行も同様に検証したところ、PLK2 欠損細胞においても、poly(I:C)刺激後の IRF3 の核への移行が WT RAW264.7 細胞と比較して有意に減少していた (図 3.24A,B)

これらの結果から、HuR 欠損細胞における IFN- β 産生の減弱は IRF3 の核移行が抑制されることにその原因の一端があることが示唆された。

A



B



C

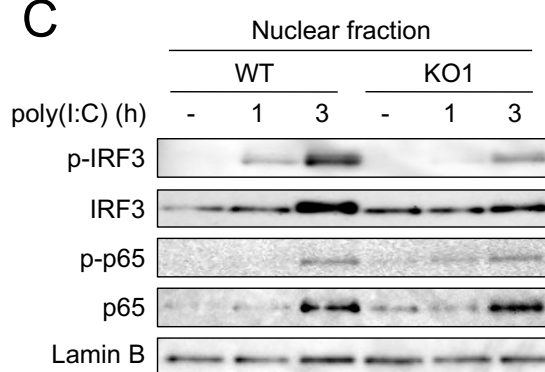


図 3.22. HuR 欠損細胞における転写因子の活性化と核移行の解析

(A-C)野生型 RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞を poly(I:C) HMW (1 μ g/ml)に

より刺激した。その後、全細胞溶解液 (A)、細胞質分画 (B)、核分画 (C) を抽出し、ウエスタンブロットにより各タンパク質を検出した。

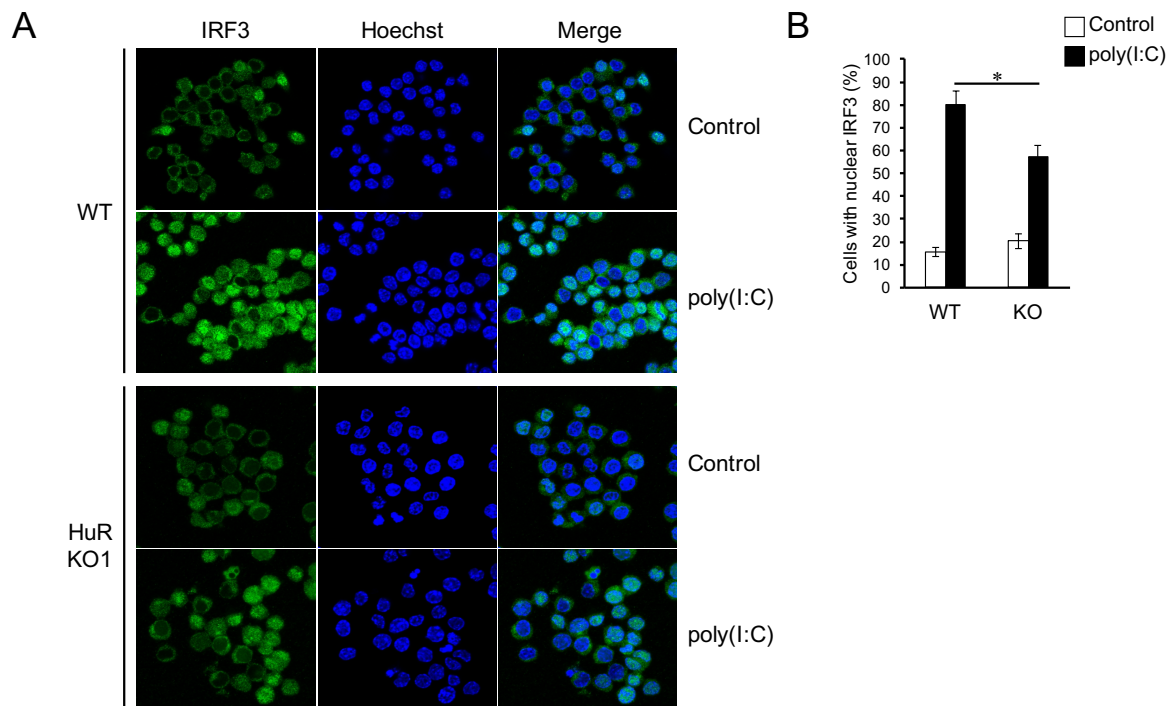


図 3.23. HuR 欠損細胞における IRF3 の核への移行の蛍光顕微鏡による観察

(A, B)野生型 RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞を poly(I:C) HMW (1 μ g/ml)により刺激し、6 時間後に固定、IRF3 (Green)と核 (Blue)を蛍光顕微鏡により観察した。核の染色には Hoechst33342 を用いた(A)。核と IRF3 の共局在が見られる細胞を計測し、その割合を示した (B)。* $p < 0.05$

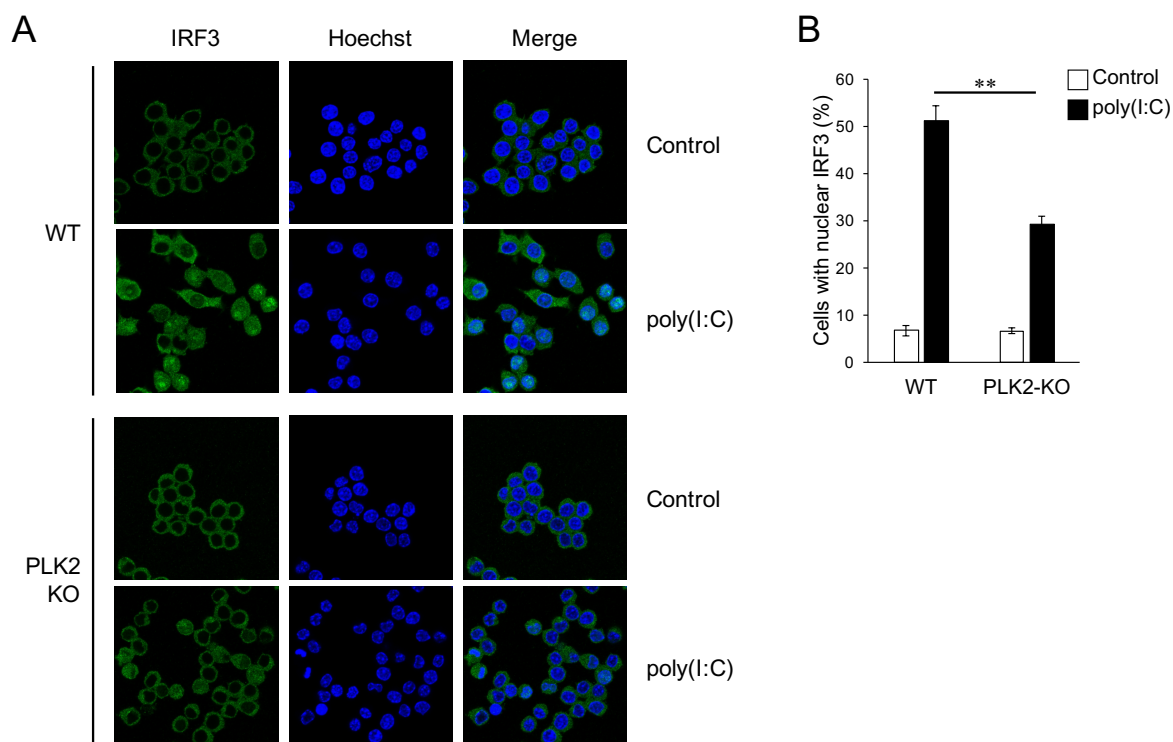


図 3.24. PLK2 欠損細胞における IRF3 の核への移行の蛍光顕微鏡による観察

(A, B)野生型 RAW264.7 細胞と PLK2 欠損 RAW264.7 細胞を poly(I:C) HMW (1 μ g/ml) により刺激し、6 時間後に固定、IRF3 (Green)と核 (Blue)を蛍光顕微鏡により観察した。核の染色には Hoechst33342 を用いた(A)。核と IRF3 の共局在が見られる細胞を計測し、その割合を示した (B)。** $p < 0.01$

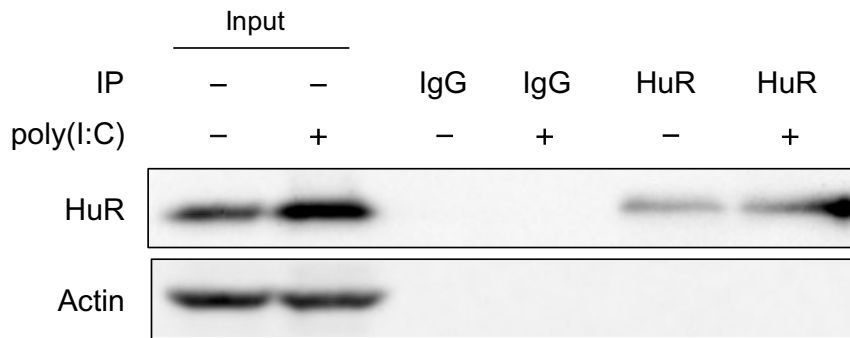
HuR タンパク質は Plk2 mRNA と結合し、その安定性を向上させる

HuR 欠損細胞において Plk2 の発現量が減少していたことから、HuR タンパク質が Plk2 mRNA と結合するかをリボヌクレオタンパク質免疫沈降法により検証した。WT RAW264.7 細胞と HuR 欠損 RAW264.7 細胞を poly(I:C) HMW で刺激後、回収した細胞溶解液を抗 HuR 抗体結合ビーズにより、HuR タンパク質と RNA の複合体 (RNP) を回収した。ウエスタンブロットにより HuR タンパク質を検出したところ、抗 HuR 抗体結合ビーズ条件において HuR タンパク質が検出された一方で、IgG コントロール抗体結合ビーズでは HuR タンパク質が検出されないことを確認した (図 3.25A)。回収した RNP より mRNA を抽出し、Real-time PCR により HuR タンパク質に結合する RNA を検討した結果、コントロール IgG と比べ抗 HuR 抗体においてより多くの Plk2 mRNA が結合していた。その一方で、Plk1、Plk3、Plk4、IPS-1 の mRNA 量はコントロール IgG 条件と抗 HuR 抗体条件間で変化は見られなかった (図 3.25B)。このことから、HuR タンパク質は Plk2 mRNA と結合することが示唆された。

次に、HuR タンパク質が PLK2 mRNA の安定性の向上に寄与しているかを明らかにするために、転写阻害剤アクチノマイシン D を用いた実験を行った。アクチノマイシン D は DNA の二本鎖に結合することで新規 mRNA の合成を阻害する。そのため、アクチノマイシン D を投与後に細胞内に蓄積している mRNA を継時的に回収し、細胞内に残存する mRNA 量を測ることで、分解速度を計測することができる。HEK293T 細胞に発現ベクターの鋳型である pFlag-CMV-2 (Mock) または HuR の発現ベクターである pFlag-CMV-2-HuR を導入し、24 時間後 poly(I:C) HMW で刺激した。刺激から 8 時間後、5 $\mu\text{g/ml}$ となるようにアクチノマイシン D を投与し、1、2、4 時間後に RNA を回収した。その後、Real-time PCR で各時間における PLK2 mRNA の残存量を定量した。その結果、HuR タンパク質を発現させた条件においては、Mock 条件と比較して PLK2 mRNA の半減期が有意に遅延していた (図 3.26)。このことから、HuR が PLK2 の mRNA の安定性を向上させる機能を有することが示唆された。

これまでの先行研究から、HuR は主に標的 mRNA の 3'UTR に結合することでその安定性を制御することが報告されていた。そこで、Plk2 mRNA の 3'UTR に着目し、Plk2 mRNA の安定性の維持に関与すると考えられる配列の同定を試みた。まず、pGL3-promoter vector の Luciferase 配列の下流に Plk2 3'UTR (Plk2 mRNA の 2183 から 2802 までの配列) を接続したプラスミド (pGL3-Plk2-3'UTR) と、Plk2 3'UTR の AU リッチ配列を欠損させた変異プラスミド (pGL3-Plk2-3'UTR $\Delta 1$ から $\Delta 4$ 、それぞれ Plk2 mRNA の 2183-2214、2626-2655、2687-2711、2744-2760 の配列を欠損させた) を作成した (図 3.27A)。HEK293T 細胞に pGL3-promoter vector または pGL3-Plk2-3'UTR とともに HuR の発現プラスミドを導入し、ルシフェラーゼアッセイを行なった結果、HuR は pGL3-Plk2-3'UTR に由来するルシフェラーゼの発現量を有意に上昇させた (図 3.27B)。その一方で、pGL3-promoter vector に由来するルシフェラーゼの発現量は上昇させなかったことから、HuR は Plk2 3'UTR を介して mRNA と相互作用しうることが示唆された。次に、pGL3-Plk2-3'UTR とその変異体である pGL3-Plk2-3'UTR $\Delta 1$ から $\Delta 4$ を HEK293T 細胞に導入後、ルシフェラーゼアッセイを行なったところ、Plk2 mRNA 3'UTR の 2744-2760 の配列を欠損した pGL3-Plk2-3'UTR $\Delta 4$ を導入した条件で、他のプラスミドと比較して有意にルシフェラーゼの発現量が減少していた (図 3.27C) ことから、この配列が Plk2 mRNA の安定性の維持に関与している可能性が考えられた。

A



B

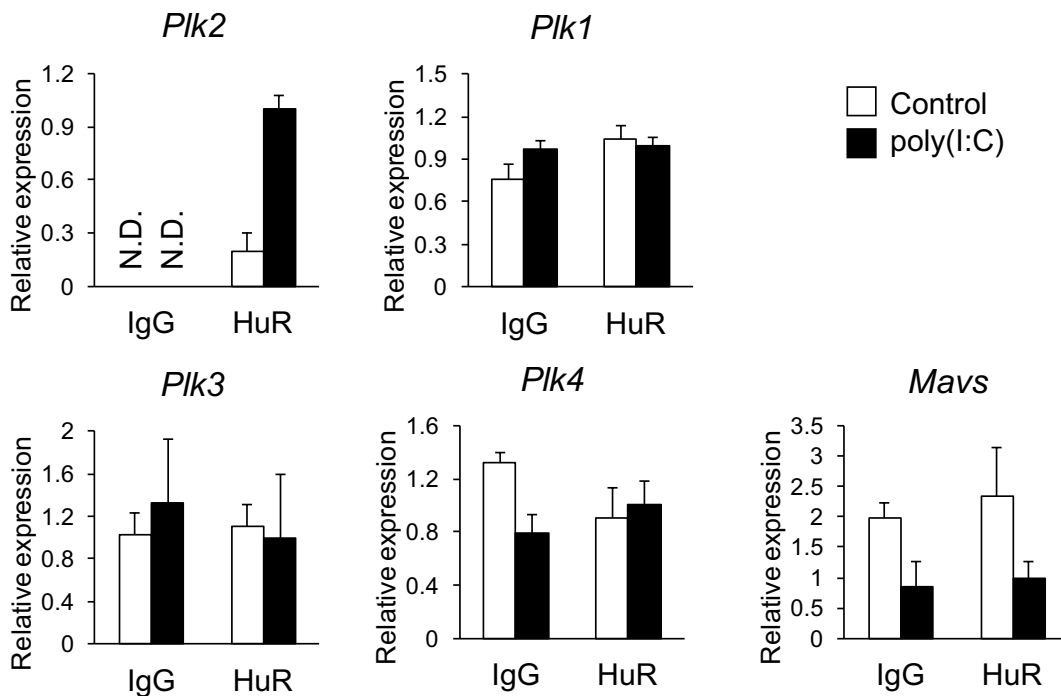


図 3.25. RNA 結合タンパク質 HuR と Plk2 mRNA の相互作用の解析

(A) IgG コントロール抗体結合ビーズまたは抗 HuR 抗体結合ビーズと野生型 RAW264.7 細胞から回収した細胞溶解液を反応させた。ビーズを 5 回洗浄後、ビーズの一部を回収し、ウエスタンブロットにより標的タンパク質を検出した。Input はビーズとの反応に用いた細胞溶解液である。

(B) リボヌクレオタンパク質免疫沈降法により HuR タンパク質と RNA の複合体を回収した。回収した RNA を cDNA へと逆転写し、Plk2、Plk1、Plk3、Plk4、IPS-1 (Mavs) の mRNA 量を Real-time PCR により定量した。

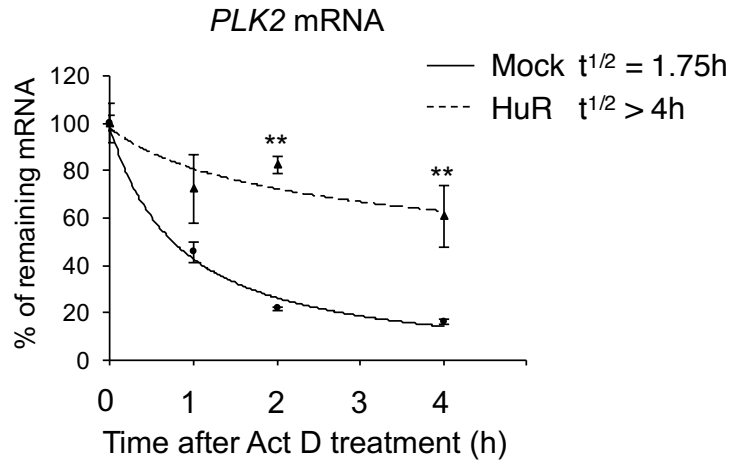
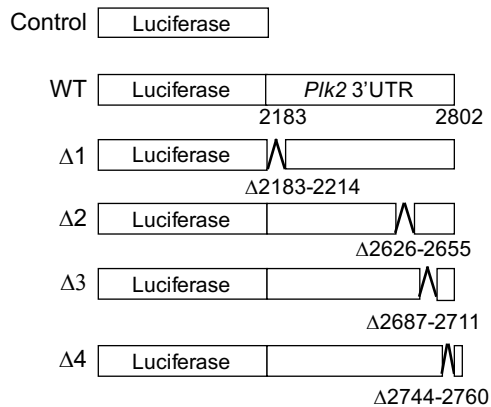


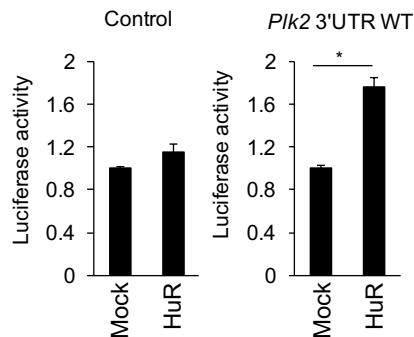
図 3.26. PLK2 mRNA の半減期の解析

HEK293T 細胞に Mock または pFlag-CMV-2 HuR をトランスフェクションした。24 時間後、poly(I:C) HMW (1 μ g/ml) により 8 時間刺激を行い、1、2、4 時間のタイムコースでアクチノマイシン D を投与することで転写を阻害した。その後、PLK2 mRNA の残存量を Real-time PCR により計測した。アクチノマイシン D 未処理のサンプルを 100 としたときの相対量を算出し、近似曲線を描き、近似式が 50 となる時間を半減期とした。** $p < 0.01$

A



B



C

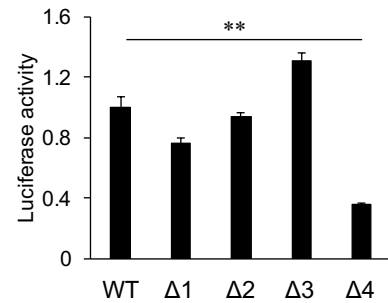


図 3.27. *Plk2* mRNA 3'UTR における HuR タンパク質相互作用部位の解析

(A) pGL3-promoter vector の Luciferase 配列下流に *Plk2* 3'UTR 配列を結合したプラスミド及びその変異体の模式図。

(B) pGL3-promoter vector または pGL3-*Plk2*-3'UTR を pTK-Luc と Flag-HuR の発現プラスミドとともに導入し、トランスフェクションから 24 時間後、ルシフェラーゼの発現量を測定した。

(C) (A) で示した pGL3-*Plk2*-3'UTR 及びその変異体 (Δ1-4) を pTK-Luc とともに HEK293T 細胞にトランスフェクションした。24 時間後、ルシフェラーゼの発現量を測定した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

第4章 考察

本研究の結果から、RNA 結合タンパク質である HuR がウイルスに対する自然免疫を制御することが示唆された。HuR の過剰発現により IFN- β のプロモーターの活性が誘導されたことから、HuR は IFN- β の産生に寄与するシグナル分子の制御を介して自然免疫応答を制御していることが考えられた (図 3.1)。実際に、CRISPR/Cas9 システムにより樹立した HuR 欠損細胞においては抗ウイルス性サイトカインの産生が減弱していることが確認できた (図 3.7, 8, 10) そこで、本研究では HuR 欠損細胞において発現量の減少がみられた PLK2 に着目して実験を行なった (図 3.14, 15)。その結果、PLK ファミリー阻害剤の投与や PLK 2 遺伝子の欠損により IFN- β の発現が減弱することが明らかとなった (図 3.18, 20)。また、PLK ファミリー阻害剤の投与により IRF3 の核への移行が抑制されることが確認された (図 3.21)。この結果と一致して、HuR 欠損細胞や PLK 2 欠損細胞においては poly(I:C)刺激後の IRF3 の核移行が野生型細胞と比較して抑制されていた (図 3.22-24)。また、HuR は Plk2 mRNA と直接結合し、その安定性を維持していることを示す結果を得た (図 3.25, 26)。これらの結果から、HuR は Plk2 mRNA の安定性制御を介して、IFN- β の産生を含む抗ウイルス応答に関与していることが考えられた (図 4.1)。

先行研究の結果から、HuR は様々な mRNA に結合し、その安定性の維持に寄与することが報告されている。HuR が標的 mRNA の安定性を維持するというその性質から、速やかな産生と分解が重要とされるサイトカインやケモカインの制御に HuR が関与している可能性について数多くの検証が行われてきた。これまでに HuR と IFN- β の相互作用を検証した研究も報告されている (Herdy et al., 2015)。Herdy らの研究においては、HuR が IFN- β mRNA に結合すること、HuR の阻害剤である MS-444 の投与により poly(I:C)刺激後の IFN- β の mRNA 量が減弱することから、HuR が IFN- β の mRNA を直接的に制御しているという考察を加えている。しかし、この研究においては、MS-444 の投与により IFN- β mRNA の半減期が減少するなどの報告はなされていないことから、MS-444 の投与による IFN- β mRNA の減少はどのようなメカニズムによるものかは明らかとはされていなかった。その一方で本研究の結果からは、HuR による IFN- β の産生制御は、PLK2-IRF3 のシグナル伝達系を介して行われているものと考えられる結果も得られている。この結果は、HuR が IFN- β の mRNA を直接的に制御するのではなく、シグナル伝達因子を介して間接的に制御していることを示している。

HuR 欠損細胞、PLK2 欠損細胞および PLK ファミリー阻害剤 BI2536 を用いた実験などの結果から、PLK2 が IFN- β の転写制御に関与していることが考えられた。これまでに、樹状細胞において TLR3 により誘導される IFN- β の産生に PLK2 および PLK4 が関与していることが報告されている (Chevrier, 2011)。本研究において樹立した HuR

欠損細胞においては Plk2 mRNA が顕著に減少していたが、Plk4 に関しては変化が見られなかった。しかし、RAW264.7 細胞においては poly(I:C)の刺激により Plk2 の発現が大きく誘導されるのに対して、Plk1、Plk3、Plk4 は発現の誘導が見られなかったことから、マクロファージでは PLK2 がウイルスへの自然免疫応答において重要な役割を果たしていることが考えられた (図 3.16B)。また、本研究において樹立した PLK2 欠損細胞においては、poly(I:C)および LPS 刺激後の IFN- β の発現が抑制されるという結果が得られたことから、マクロファージにおいては PLK2 が I 型インターフェロンの発現を制御する重要な因子であることが考えられた (図 3.20)。

RLRs や cGAS、TLRs は I 型インターフェロンの発現を誘導するために共通して転写因子 IRF3 を用いている。しかし、本研究における HuR 欠損細胞を用いた実験の結果から、poly(I:C)刺激に対しては IFN- β の産生が抑制される一方で、ISD や LPS 刺激に対してはその抑制が見られなかった (図 3.7)。この理由のひとつとして、RLRs と cGAS、TLRs が IRF3 を活性化させるまでに用いるアダプター分子の違いやその局在が関与していることが考えられる。RLRs によるシグナル伝達においては、アダプター分子である IPS-1 はミトコンドリア外膜に局在している。リガンドを認識し活性化した RLRs と IPS-1 が結合すると、IPS-1 はミトコンドリア外膜上で自己凝集し、リン酸化酵素である TBK1-Ikki 複合体や IRF3 と相互作用する。それに対して、cGAS のシグナル伝達においては、アダプター分子である STING は小胞体に局在している。cGAS によるシグナル伝達により STING が活性化されると、STING は小胞体からゴルジ体へと局在を移動することが知られており、STING はその移行の過程で TBK1 や IRF3 と相互作用すると考えられている。また、LPS の受容体である TLR4 は細胞膜上にて LPS を認識するとその局在をエンドソームへと変化させる。そして、エンドソーム上にて下流のアダプター分子である TRIF と相互作用することでシグナル伝達を惹起し、最終的に IRF3 の活性化を誘導する。このように RLRs や cGAS、TLRs のシグナル伝達におけるアダプター分子の局在は、RLRs ではミトコンドリア、cGAS では小胞体、TLRs ではエンドソームと大きく異なっており、これらアダプター分子の局在の違いがこれらのシグナル伝達経路の制御にかかわる分子群の違いに繋がっている。

本研究や先行研究から、HuR はウイルス様刺激によりその局在を核から細胞質へと変化させ、ストレス顆粒と呼ばれる細胞質内構造体に含まれることが示されている (図 3.2)。近年、ウイルス感染によりストレス顆粒の形成が促進されることや、ウイルス核酸や抗ウイルス応答に関与するタンパク質群がストレス顆粒にその局在を示すことなどから、ウイルス感染におけるストレス顆粒の役割が注目されている (Onomoto et al., 2014; Yoneyama et al., 2016)。また、ウイルスの中にはストレス顆粒の形成を阻害する因子を持つ種が存在することからも、宿主とウイルスの相互作用におけるストレス顆粒の重要性が示唆される (McCormick and Khapersky, 2017)。スト

レス顆粒の抗ウイルス免疫における役割は明らかにはなっていないが、ウイルスが感染すると、ウイルス核酸や RLRs がストレス顆粒に局在を示すことから、ストレス顆粒がシグナル伝達における中心点として機能しているのではないかと考えられている。実際に、ストレス顆粒の形成に必須の因子である PKR を欠損した細胞においては、ウイルス感染後のストレス顆粒の形成が見られないとともに、I 型インターフェロンの産生も抑制される (Onomoto et al., 2012)。また、ストレス顆粒には RIG-I をユビキチン化することでシグナル伝達を促進する MEX3C や TRIM25 も局在を示すことが報告されている (Kuniyoshi et al., 2014; Sánchez-Aparicio et al., 2017)。ウイルスの感染によりストレス顆粒へと RIG-I、MEX3C、TRIM25 などが移行してくることで、これら因子の相互作用が起りやすい環境が形成されているものと考えられている。このように、近年の研究からストレス顆粒は RLRs のシグナル伝達において非常に重要な役割を果たしていることが示唆されている。また、自然免疫リガンドによる刺激後初期の段階においては、poly(I:C)刺激により HuR の細胞質内における凝集が見られる一方で、ISD 刺激によっては HuR の細胞質内における凝集が見られないという結果も得ている。そのため、抗ウイルス応答における HuR の時空間的な局在の変化が、HuR による RLRs 依存的なシグナル伝達の誘導において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

本研究や先行研究の結果から、PLK2 が IRF3 の核移行を制御することを介して IFN- β の産生を制御していることが示唆されている (図 3.21-24)。しかし、PLK2 が IRF3 の核移行を制御するメカニズムは明らかとされていない。可能性のひとつとして、PLK2 が IRF3 の核移行を制御する因子の活性化に関与していることが考えられる。近年、FAF1 (Fas-associated factor 1)、Rubicon (RUN domain Beclin-1interating cysteine-rich domain containing)、PTEN や Importin β 1 などが IRF3 の核への移行を制御していることが報告されている (Song et al., 2016; Kim et al., 2017; Li et al., 2015; Gagne et al., 2017)。FAF1 は、IPO5/Importin- β 3 と IRF3 の相互作用を抑制することにより、IRF3 の核移行を負に制御している。また、Rubicon は IRF3 と直接相互作用することを介して、IRF3 の二量体化の形成を阻害する。そのため、Rubicon は IRF3 のリン酸化には影響を与えずに、IRF3 の核への移行を負に制御している。そして、PTEN は IRF3 の 97 番目のセリンを脱リン酸化することで IRF3 の核への移行を促進していることが報告された。近年の研究から IRF3 の核への移行の制御機構についていくつかの知見が明らかとされてきたが、いまだ不明な点も多く、今後より詳細な解析が必要とされている。

本研究で行なった RNP-IP と転写阻害剤アクチノマイシン D を用いた実験の結果から、HuR タンパク質が Plk2 mRNA に結合し、その安定性を向上させていることが考えられた (図 3.25, 26)。先行研究においては、iCLIP や RNAcompete メソッドといった網羅的な解析手法を用いて、HuR が結合する傾向のある配列の同定が行われてき

た。その結果から、HuR は”UUUUUUU”、”UUUAUUU”、”UUUGUUU”などの U リッチ配列に結合する傾向にあることが示された (Ray et al., 2009; Uren et al., 2011)。HuR 欠損細胞において顕著に存在量の減少が見られた Plk2 mRNA の 3'UTR の中には 4 つの U リッチ配列が含まれている。そこで、本研究では Luciferase 配列の下流に Plk2 3'UTR 配列を結合したプラスミドを用いて、Plk2 mRNA の安定性制御に重要な配列の解析に取り組んだ (図 3.27)。その結果からは、Plk2 3'UTR の 2744 番目から 2760 番目の配列が Plk2 mRNA の安定性制御に関与している可能性を示唆する結果を得た。ヒト PLK2 の 3'UTR においても、マウス Plk2 の 2744 番目から 2760 番目の配列と高い相同性を示す配列が見られることから、HuR は 2744 番目から 2760 番目の配列を介して Plk2 mRNA に結合し、その安定性を向上させている可能性が考えられる (図 4.2)。

HuR が結合する配列の同定に加えて、HuR が存在しない状況下において、Plk2 mRNA がどのような因子によって分解されているのかについても明らかにする必要がある。HuR は TTP や KSRP といった mRNA の分解を促進する RNA 結合タンパク質や miRNA と競合することで mRNA の安定性を向上させている。また、近年の研究において、PLK2 mRNA の制御に関与する miRNA として miR-27a、miR-27b、miR-146a が報告されている (Tian et al., 2014, Liu et al., 2016a, Deng et al., 2017)。miR-27a、miR-27b、miR-146a はそれぞれヒトまたはマウスの Plk2 3'UTR に結合することで PLK2 mRNA の分解を促進する。HuR は mRNA の分解を負に制御する RNA 結合タンパク質や miRNA と競合することで、mRNA の安定性の維持に関与していると考えられているので、TTP や KSRP、そして miR-27a、miR-27b、miR-146a といった因子と HuR との Plk2 mRNA に対しての競合関係を解析することで、Plk2 mRNA の分解機構についてより詳細な理解が進むものと考えられる。

I 型インターフェロンの産生はウイルスの感染に対する重要な防御応答である。その一方で、過剰に産生された I 型インターフェロンが自己免疫疾患や炎症性疾患の発症、細菌感染の増悪化、敗血症の亢進に寄与する可能性が示唆されている (Trinchieri., 2010; Funabiki et al., 2014)。自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus; SLE) の患者の血清中には健常者と比べて多くの I 型インターフェロンが検出される (Kim et al., 1987)。そのような高 I 型インターフェロン環境においては、単球が自己反応性 T 細胞に抗原を提示することで自己免疫疾患の誘導していることが報告されている (Blanco et al., 2001)。また、皮膚における慢性的な炎症が誘導される自己免疫疾患である乾癬においても、I 型インターフェロンが症状の悪化に関与している。乾癬の患者の真皮においては、I 型インターフェロンを多量に産生する形質細胞様樹状細胞が集積しており、真皮周辺における自己反応性 T 細胞の増殖と活性化を引き起こしていると考えられている (Nestle et al., 2005) 本研究の結果から、RNA 結合タンパク質 HuR がシグナル伝達分子である Plk2 mRNA の安定性の制御を

介して IFN- β の産生を制御することを明らかとした。近年、HuR と mRNA の結合を阻害する化合物が見出されている (Meisner et al., 2007, Wang et al., 2015b)。このような化合物を用いて免疫細胞における HuR の機能を制御することは、I 型インターフェロンが関与する様々な疾患に対する有用な治療法のひとつとなり得るものと考えられる。

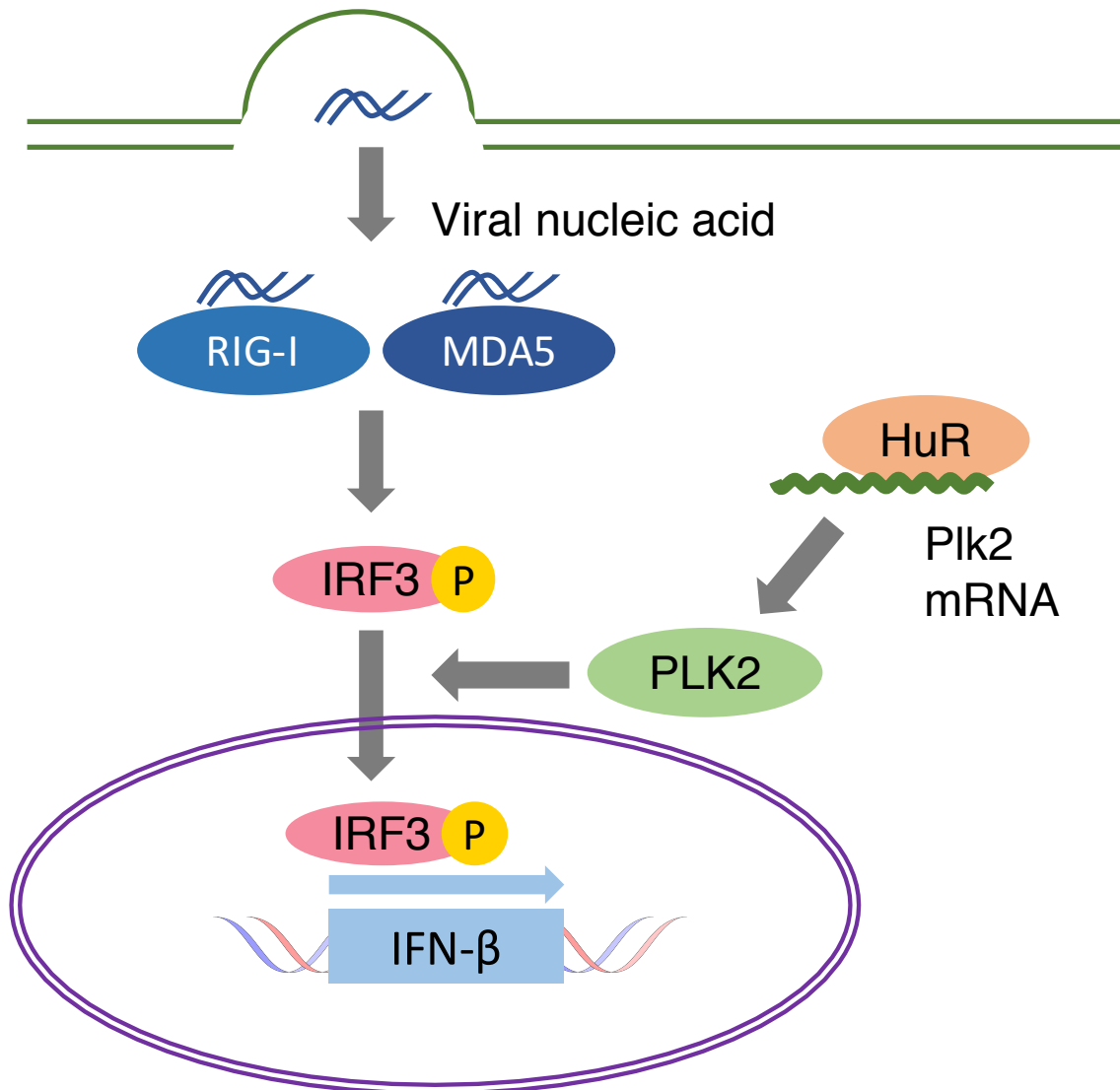


図 4.1 HuR は Plk2 mRNA の制御を介して抗ウイルス応答を制御する

細胞内へと感染したウイルス核酸は細胞内 RNA センサーである RIG-I や MDA5 により認識され IRF3 のリン酸化を誘導する。リン酸化された IRF3 は核へと移行してインターフェロン β の産生を促進する。PLK2 は IRF3 の核移行に関与する。HuR は Plk2 mRNA の安定性を維持することを介して、IFN- β の産生を制御する。

| | | | | | | | | | |
|-------------------------|-----|----------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|--------------------|-----------|---------------|-----|
| Mouse <i>Plk2</i> 3'UTR | 1 | AAACATTATTATTATTATTATTATAA | --- | TTAT | TTCGAGCGGACC | TC | ATGGGACTC | --- | 53 |
| Human <i>PLK2</i> 3'UTR | 1 | ----- | AA | GACTT | TTCGAATGGACC | CT | ATGGGACTC | CTC | 33 |
| | 54 | TTTTCCACTGTGAGATC | ACAGGGAAGCCA | GCGGAAAGA | ----- | TACAGAG | AATGTTAG | | 107 |
| | 34 | TTTTCCACTGTGAGATC | ACAGGGAAGCCA | ----- | AAAGA | NTGATCTA | GAG | AATGTT | 86 |
| | 108 | A-GAAG | TCGGACA | GTGGTGGTACGAAT | ACAATTCC | CTGTGGCCTGCTGGACTG | TT | G | 164 |
| | 87 | A-GAAG | TTGGACA | GTGGTGGTACGAAT | ACAATTCC | CTGTGGCCTGCTGGACTG | TTG | | 145 |
| | 165 | GAACCAGACCAGC | CTAAGGTGTA | CAGTT | --- | GACTTTGGACAATCC | CAGT | GTGCA | 220 |
| | 146 | GAACCAGACCAGC | CTAAGGCATA | CAGTTCT | GACTTTGGACAATCC | AGAGTGAA | CC | | 203 |
| | 221 | GA | TGCAGTTTTCC | GTGAGATACCTGT | CT | AAAAAGTTT | ATGGACA | TTTT | 280 |
| | 204 | GA | TGCAGTTTTCC | GTGAGATACCTGT | TT | AAAAAGTTT | TCAGACA | TTTT | 262 |
| | 281 | G | TGCATTGACTCT | AAATTCTCTCTGTTGAGAGC | CT | TTT | CAGTTGGA | GACTTT | 339 |
| | 263 | G | TGCATTGACTCT | AAATTCTCTCTGTTGAGAGC | AT | TT | CAGCCAGA | GACTTT | 321 |
| | 340 | TGTGAATACACTT | CTGAAGGGGAGGGAGAAGGGAGG | TTGCTCCC | TTG | TGTTTAAAGGC | | | 399 |
| | 322 | TGTGAATATACTT | CTGAAGGGGAGGGAGAAGGGAGG | AA | GCTCCC | ATGTTGTTTAAAGGC | | | 381 |
| | 400 | TACAAT | TCGAGCAGCTTTTGGCTGC | TTAACTGTGA | ACTATGGCCATA | TAT | TTTTTTTT | | 459 |
| | 382 | TGTAAT | TCGAGCAGCTTTTGGCTGC | TTAACTGTGA | ACTATGGCCATA | TAT | TTTTTTTT | | 441 |
| | 460 | TTTTGGTT | ATTTTTGAA | TA | ACTTGTGG | TGGAAAAGTG | CATTTCCTT | GTTAATAAACTTT | 519 |
| | 442 | CA | TTA | --- | ATTTTTGAA | TA | ACTTGTGG | TGGAAAAGTG | 498 |
| | 520 | TTATTTATTACAGCCC | AAGAGCAGTATTTATTATCAA | ATGT | CT | TTTTTTTTATGT | G | | 579 |
| | 499 | TTATTTATTACAGCCC | AAGAGCAGTATTTATTATCAA | ATGT | CT | TTTTTTTTATGT | G | | 557 |
| | 580 | ACCATT | TAAC | TC | TTGGCAATAAAGAGTATGA | ---- | CA | TAGAAA | 620 |
| | 558 | ACCATT | TAAC | TC | TTGGCAATAAAGAGTATGA | AA | CC | CA | 601 |

図 4.2 ヒトとマウスの PLK2 mRNA 3'UTR 配列

ヒト及びマウスの PLK2 mRNA 3'UTR 配列を Ensembl Genome Browser より取得し並列した。マウス Plk2 mRNA の 2744 番目から 2760 番目の配列を黄色で示した。

第5章 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご指導・ご助言を頂き、免疫学の奥深さを教えていただきました河合太郎教授に厚く御礼申し上げます。日頃の多岐に渡る実験の指導から論文作成に至るまで、丁寧にご指導くださいました川崎拓実助教に深く御礼申し上げます。織大祐助教には1年半という短い期間でしたが、実験に関する的確なアドバイスを頂きましたこと深く御礼申し上げます。入学当初の実験を一度もしたことがない私に、粘り強くかつ親切に毎日の実験指導をしてくださった鍛代悠一博士（現北海道大学助教）に深く感謝いたします。また、CRISPR/Cas9システムに使用するプラスミドをご提供頂きました大阪大学微生物病研究所の伊川正人教授に心より感謝致します。

そして、辛くも楽しい研究生活を入学当初からともに歩んだ同級生の村瀬本弥氏、木下雅崇氏には本当に感謝しております。二人のおかげでここまで到達できたと言っても過言ではありません。また、研究室の雰囲気をも明るく保ってくださった研究室の卒業生や後輩の皆様、日頃の研究生活を支えてくださった秘書の阿部香代氏、鈴木千裕氏にも本当に感謝しております。

アドバイザーとして貴重なご意見を頂きました伊東広教授、別所康全教授をはじめ、バイオロジーの面白さを教えていただいた先生方に深く御礼申し上げます。

また、5年間という長い期間にも関わらず、心身的にも経済的にも支え続けてくれた家族に何よりも深く感謝します。

第 6 章 参考文献

- Ablasser, A., Goldeck, M., Cavlar, T., Deimling, T., Witte, G., Röhl, I., Hopfner, K. P., Ludwig, J., and Hornung, V. (2013). cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* *498*, 380–384.
- Ansari, M.Y., and Haqqi, T.M. (2016). Interleukin-1 β induced Stress Granules Sequester COX-2 mRNA and Regulates its Stability and Translation in Human OA Chondrocytes. *Sci. Rep.* *6*, 27611.
- Arimoto, K., Takahashi, H., Hishiki, T., Konishi, H., Fujita, T., and Shimotohno, K. (2007). Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 7500–7505.
- Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. (2001). Induction of Dendritic Cell Differentiation by IFN- α in Systemic Lupus Erythematosus. *Science*. *294*(5546), 1540–1543.
- Borbolis, F., and Syntichaki, P. (2015). Cytoplasmic mRNA turnover and ageing. *Mech. Ageing Dev.* *152*, 32–42.
- Carpenter, S., Ricci, E.P., Mercier, B.C., Moore, M.J., and Fitzgerald, K.A. (2014). Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 361–376.
- Chen, Q., Sun, L., and Chen, Z.J. (2016a). Regulation and function of the cGAS–STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat. Immunol.* *17*, 1142–1149.
- Chen, Q., Sun, L., and Chen, Z.J. (2016b). Regulation and function of the cGAS–STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat. Immunol.* *17*, 1142–1149.
- Chevrier, N., Mertins, P., Artyomov, M.N., Shalek, A.K., Iannacone, M., Ciaccio, M.F., Gat-Viks, I., Tonti, E., DeGrace, M.M., Clauser, K.R., et al. (2011). Systematic discovery of TLR signaling components delineates viral-sensing circuits. *Cell* *147*, 853–867.
- Chiang, J.J., Davis, M.E., and Gack, M.U. (2014). Regulation of RIG-I-like receptor signaling

by host and viral proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 491–505.

Civril, F., Bennett, M., Moldt, M., Deimling, T., Witte, G., Schiesser, S., Carell, T., and Hopfner, K. P. (2011). The RIG-I ATPase domain structure reveals insights into ATP-dependent antiviral signalling. *EMBO Rep.* 12, 1127–1134.

Deng, S., Wang, H., Jia, C., Zhu, S., Chu, X., Ma, Q., Wei, J., Chen, E., Zhu, W., Macon, C.J., et al. (2017). MicroRNA-146a Induces Lineage-Negative Bone Marrow Cell Apoptosis and Senescence by Targeting Polo-Like Kinase 2 Expression Highlights. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 280–290.

Diaz-Muñoz, M.D., Bell, S.E., Fairfax, K., Monzon-Casanova, E., Cunningham, A.F., Gonzalez-Porta, M., Andrews, S.R., Bunik, V.I., Zarnack, K., Curk, T., et al. (2015). The RNA-binding protein HuR is essential for the B cell antibody response. *Nat. Immunol.* 16, 415–425.

Fan, J., Ishmael, F.T., Fang, X., Myers, A., Cheadle, C., Huang, S.-K., Atasoy, U., Gorospe, M., and Stellato, C. (2011). Chemokine transcripts as targets of the RNA-binding protein HuR in human airway epithelium. *J. Immunol.* 186, 2482–2494.

Funabiki, M., Kato, H., Miyachi, Y., Toki, H., Motegi, H., Inoue, M., Minowa, O., Yoshida, A., Deguchi, K., Sato, H., et al. (2014). Autoimmune disorders associated with gain of function of the intracellular sensor MDA5. *Immunity* 40, 199–212.

Gack, M.U., Shin, Y.C., Joo, C. H., Urano, T., Liang, C., Sun, L., Takeuchi, O., Akira, S., Chen, Z., Inoue, S., et al. (2007). TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 446, 916–920.

Gagné, B., Tremblay, N., Park, A.Y., Baril, M., and Lamarre, D. (2017). Importin β 1 targeting by hepatitis C virus NS3/4A protein restricts IRF3 and NF- κ B signaling of IFNB1 antiviral response. *Traffic* 18, 362–377.

Ghosh, M., Aguila, H.L., Michaud, J., Ai, Y., Wu, M. T., Hemmes, A., Ristimaki, A., Guo, C., Furneaux, H., and Hla, T. (2009). Essential role of the RNA-binding protein HuR in progenitor cell survival in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 3530–3543.

Goldstrohm, A.C., and Wickens, M. (2008). Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 337–344.

He, X., Ma, S., Tian, Y., Wei, C., Zhu, Y., Li, F., Zhang, P., Wang, P., Zhang, Y., and Zhong, H. (2017). $ERR\alpha$ negatively regulates type I interferon induction by inhibiting TBK1-IRF3 interaction. *PLoS Pathog.* *13*, e1006347.

Heaton, S.M., Borg, N.A., and Dixit, V.M. (2016). Ubiquitin in the activation and attenuation of innate antiviral immunity. *J. Exp. Med.* *213*, 1–13.

Herdy, B., Karonitsch, T., Vladimer, G.I., Tan, C.S.H., Stukalov, A., Trefzer, C., Bigenzahn, J.W., Theil, T., Holinka, J., Kiener, H.P., et al. (2015). The RNA-binding protein HuR/ELAVL1 regulates IFN- β mRNA abundance and the type I IFN response. *Eur. J. Immunol.* *45*, 1500–1511.

Hinman, M.N., and Lou, H. (2008). Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 3168–3181.

Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., et al. (2006). 5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I. *Science.* *314*(5801), 994–997.

Hou, F., Sun, L., Zheng, H., Skaug, B., Jiang, Q.-X., and Chen, Z.J. (2011). MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* *146*, 448–461.

Houseley, J., and Tollervey, D. (2009). The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell* *136*, 763–776.

Ishii, K.J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., et al. (2006). A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat. Immunol.* *7*, 40–48.

Ishikawa, H., and Barber, G.N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that

facilitates innate immune signalling. *Nature* *455*, 674–678.

Ishikawa, H., Ma, Z., and Barber, G.N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* *461*, 788–792.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* *16*, 343–353.

James, S.J., Jiao, H., Teh, H. Y., Takahashi, H., Png, C.W., Phoon, M.C., Suzuki, Y., Sawasaki, T., Xiao, H., Chow, V.T.K., et al. (2015). MAPK Phosphatase 5 Expression Induced by Influenza and Other RNA Virus Infection Negatively Regulates IRF3 Activation and Type I Interferon Response. *Cell Rep.* *10*, 1722–1734.

Kafasla, P., Skliris, A., and Kontoyiannis, D.L. (2014). Post-transcriptional coordination of immunological responses by RNA-binding proteins. *Nat. Immunol.* *15*, 492–502.

Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* *441*, 101–105.

Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., and Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med.* *205*, 1601–1610.

Katsanou, V., Milatos, S., Yiakouvaki, A., Sgantzis, N., Kotsoni, A., Alexiou, M., Harokopos, V., Aidinis, V., Hemberger, M., and Kontoyiannis, D.L. (2009). The RNA-binding protein Elavl1/HuR is essential for placental branching morphogenesis and embryonic development. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 2762–2776.

Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* *11*, 373–384.

Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I

interferon induction. *Nat. Immunol.* *6*, 981–988.

Kawasaki, T., Takemura, N., Standley, D.M., Akira, S., and Kawai, T. (2013). The Second Messenger Phosphatidylinositol-5-Phosphate Facilitates Antiviral Innate Immune Signaling. *Cell Host Microbe* *14*, 148–158.

Kim, J. H., Kim, T. H., Lee, H. C., Nikapitiya, C., Uddin, M.B., Park, M. E., Pathinayake, P., Lee, E.S., Chathuranga, K., Herath, T.U.B., et al. (2017). Rubicon Modulates Antiviral Type I Interferon (IFN) Signaling by Targeting IFN Regulatory Factor 3 Dimerization. *J. Virol.* *91*, e00248-17.

Kim, T., Kanayama, Y., Negoro, N., Okamura, M., Takeda, T., and Inoue, T. (1987). Serum levels of interferons in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* *70*, 562–569.

Kitai, Y., Takeuchi, O., Kawasaki, T., Ori, D., Sueyoshi, T., Murase, M., Akira, S., and Kawai, T. (2015). Negative regulation of melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)-dependent antiviral innate immune responses by Arf-like protein 5B. *J. Biol. Chem.* *290*, 1269–1280.

Kuniyoshi, K., Takeuchi, O., Pandey, S., Satoh, T., Iwasaki, H., Akira, S., and Kawai, T. (2014). Pivotal role of RNA-binding E3 ubiquitin ligase MEX3C in RIG-I-mediated antiviral innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 5646–5651.

Leppek, K., Schott, J., Reitter, S., Poetz, F., Hammond, M.C., and Stoecklin, G. (2013). Roquin promotes constitutive mRNA decay via a conserved class of stem-loop recognition motifs. *Cell* *153*, 869–881.

Li, S., Zhu, M., Pan, R., Fang, T., Cao, Y. Y., Chen, S., Zhao, X., Lei, C. Q., Guo, L., Chen, Y., et al. (2015). The tumor suppressor PTEN has a critical role in antiviral innate immunity. *Nat. Immunol.* *17*, 241–249.

Li, X. D., Wu, J., Gao, D., Wang, H., Sun, L., and Chen, Z.J. (2013). Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science* *341*, 1390–1394.

- Liu, Y., and Yu, W. (2014). Heat shock-mediated regulation of $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ at the post-transcriptional level by HuR. *Mol. Med. Rep.* *9*, 553–559.
- Liu, F., Zhang, S., Zhao, Z., Mao, X., Huang, J., Wu, Z., Zheng, L., and Wang, Q. (2016a). MicroRNA-27b up-regulated by human papillomavirus 16 E7 promotes proliferation and suppresses apoptosis by targeting polo-like kinase2 in cervical cancer. *Oncotarget* *7*, 19666–19679.
- Liu, J., Qian, C., and Cao, X. (2016b). Post-Translational Modification Control of Innate Immunity. *Immunity* *45*, 15–30.
- Lu, J. Y., Sadri, N., and Schneider, R.J. (2006). Endotoxic shock in AUF1 knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs. *Genes Dev.* *20*, 3174–3184.
- Ma, Z., and Damania, B. (2016). The cGAS-STING Defense Pathway and Its Counteraction by Viruses. *Cell Host Microbe* *19*, 150–158.
- Masuda, K., Ripley, B., Nishimura, R., Mino, T., Takeuchi, O., Shioi, G., Kiyonari, H., and Kishimoto, T. (2013). Arid5a controls IL-6 mRNA stability, which contributes to elevation of IL-6 level in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 9409–9414.
- Matsushita, K., Takeuchi, O., Standley, D.M., Kumagai, Y., Kawagoe, T., Miyake, T., Satoh, T., Kato, H., Tsujimura, T., Nakamura, H., et al. (2009). Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature* *458*, 1185–1190.
- McCormick, C., and Khapersky, D.A. (2017). Translation inhibition and stress granules in the antiviral immune response. *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 647–660.
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O’Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 87–103.
- Meisner, N. C., Hintersteiner, M., Mueller, K., Bauer, R., Seifert, J. M., Naegeli, H. U., Ottl, J., Oberer, L., Guenat, C., Moss, S., et al. (2007). Identification and mechanistic characterization of low-molecular-weight inhibitors for HuR. *Nat. Chem. Biol.* *3*, 508–515.

Mino, T., Murakawa, Y., Fukao, A., Vandebon, A., Wessels, H. H., Ori, D., Uehata, T., Tarte, S., Akira, S., Suzuki, Y., et al. (2015). Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct Mechanisms. *Cell* 161, 1058–1073.

Mukherjee, N., Corcoran, D.L., Nusbaum, J.D., Reid, D.W., Georgiev, S., Hafner, M., Ascano, M., Tuschl, T., Ohler, U., and Keene, J.D. (2011). Integrative Regulatory Mapping Indicates that the RNA-Binding Protein HuR Couples Pre-mRNA Processing and mRNA Stability. *Mol. Cell* 43, 327–339.

Nestle, F.O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y. J., and Gilliet, M. (2005). Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J. Exp. Med.* 202, 135–143.

Onomoto, K., Jogi, M., Yoo, J. S., Narita, R., Morimoto, S., Takemura, A., Sambhara, S., Kawaguchi, A., Osari, S., Nagata, K., et al. (2012). Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity. *PLoS One* 7, e43031.

Onomoto, K., Yoneyama, M., Fung, G., Kato, H., and Fujita, T. (2014). Antiviral innate immunity and stress granule responses. *Trends Immunol.* 35, 420–428.

Oshiumi, H., Matsumoto, M., Hatakeyama, S., and Seya, T. (2009). Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* 284, 807–817.

Papadaki, O., Milatos, S., Grammenoudi, S., Mukherjee, N., Keene, J.D., and Kontoyiannis, D.L. (2009). Control of thymic T cell maturation, deletion and egress by the RNA-binding protein HuR. *J. Immunol.* 182, 6779–6788.

Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Rehwinkel, J., Kato, H., Takeuchi, O., Akira, S., Way, M., Schiavo, G., and Reis e Sousa, C. (2009). Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J. Virol.* 83, 10761–10769.

Quicke, K.M., Diamond, M.S., and Suthar, M.S. (2017). Negative regulators of the RIG-I-like

receptor signaling pathway. *Eur. J. Immunol.* *47*, 615–628.

Ray, D., Kazan, H., Chan, E.T., Peña Castillo, L., Chaudhry, S., Talukder, S., Blencowe, B.J., Morris, Q., and Hughes, T.R. (2009). Rapid and systematic analysis of the RNA recognition specificities of RNA-binding proteins. *Nat. Biotechnol.* *27*, 667–670.

Sánchez-Aparicio, M.T., Ayllón, J., Leo-Macias, A., Wolff, T., and García-Sastre, A. (2017). Subcellular Localizations of RIG-I, TRIM25, and MAVS Complexes. *J. Virol.* *91*, e01155-16.

Schlee, M., and Hartmann, G. (2016). Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 566–580.

Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C.A., Wimmenauer, V., Barchet, W., Coch, C., Janke, M., Mihailovic, A., Wardle, G., et al. (2009). Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* *31*, 25–34.

Seth, R.B., Sun, L., Ea, C. K., and Chen, Z.J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* *122*, 669–682.

Shi, H.X., Yang, K., Liu, X., Liu, X.Y., Wei, B., Shan, Y.F., Zhu, L.H., and Wang, C. (2010). Positive Regulation of Interferon Regulatory Factor 3 Activation by Herc5 via ISG15 Modification. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 2424–2436.

Simone, L.E., and Keene, J.D. (2013). Mechanisms coordinating ELAV/Hu mRNA regulons. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *23*, 35–43.

Song, S., Lee, J. J., Kim, H. J., Lee, J.Y., Chang, J., and Lee, K. J. (2016). Fas-Associated Factor 1 Negatively Regulates the Antiviral Immune Response by Inhibiting Translocation of Interferon Regulatory Factor 3 to the Nucleus. *Mol. Cell. Biol.* *36*, 1136–1151.

Stetson, D.B., and Medzhitov, R. (2006). Recognition of Cytosolic DNA Activates an IRF3-Dependent Innate Immune Response. *Immunity* *24*, 93–103.

Tian, Y., Fu, S., Qiu, G.-B., Xu, Z. M., Liu, N., Zhang, X. W., Chen, S., Wang, Y., Sun, K. L., and Fu, W. N. (2014). MicroRNA-27a promotes proliferation and suppresses apoptosis by targeting PLK2 in laryngeal carcinoma. *BMC Cancer* *14*, 678.

Trinchieri, G. (2010). Type I interferon: friend or foe? *J. Exp. Med.* *207*, 2053–2063.

Uren, P.J., Burns, S.C., Ruan, J., Singh, K.K., Smith, A.D., and Penalva, L.O.F. (2011). Genomic analyses of the RNA-binding protein Hu antigen R (HuR) identify a complex network of target genes and novel characteristics of its binding sites. *J. Biol. Chem.* *286*, 37063–37066.

Wahle, E., and Winkler, G.S. (2013). RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes. *Biochim. Biophys. Acta* *1829*, 561–570.

Wang, P., Zhao, W., Zhao, K., Zhang, L., and Gao, C. (2015a). TRIM26 Negatively Regulates Interferon- β Production and Antiviral Response through Polyubiquitination and Degradation of Nuclear IRF3. *PLOS Pathog.* *11*, e1004726.

Wang, S., Xie, F., Chu, F., Zhang, Z., Yang, B., Dai, T., Gao, L., Wang, L., Ling, L., Jia, J., et al. (2017). YAP antagonizes innate antiviral immunity and is targeted for lysosomal degradation through IKK ϵ -mediated phosphorylation. *Nat. Immunol.* *18*, 733–743.

Wang, Z., Bhattacharya, A., and Ivanov, D.N. (2015b). Identification of Small-Molecule Inhibitors of the HuR/RNA Interaction Using a Fluorescence Polarization Screening Assay Followed by NMR Validation. *PLoS One* *10*, e0138780.

Wies, E., Wang, M.K., Maharaj, N.P., Chen, K., Zhou, S., Finberg, R.W., and Gack, M.U. (2013). Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PP1 is essential for innate immune signaling. *Immunity* *38*, 437–449.

Winzen, R., Thakur, B.K., Dittrich-Breiholz, O., Shah, M., Redich, N., Dhamija, S., Kracht, M., and Holtmann, H. (2007). Functional analysis of KSRP interaction with the AU-rich element of interleukin-8 and identification of inflammatory mRNA targets. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 8388–8400.

Yang, K., Shi, H. X., Liu, X. Y., Shan, Y. F., Wei, B., Chen, S., and Wang, C. (2009). TRIM21 Is Essential to Sustain IFN Regulatory Factor 3 Activation during Antiviral Response. *J. Immunol.* *182*, 3782–3792.

Yiakouvaki, A., Dimitriou, M., Karakasiliotis, I., Eftychi, C., Theocharis, S., and Kontoyiannis, D.L. (2012). Myeloid cell expression of the RNA-binding protein HuR protects mice from pathologic inflammation and colorectal carcinogenesis. *J. Clin. Invest.* *122*, 48–61.

Yoneyama, M., Onomoto, K., Jogi, M., Akaboshi, T., and Fujita, T. (2015). Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* *32*, 48–53.

Yoneyama, M., Jogi, M., and Onomoto, K. (2016). Regulation of antiviral innate immune signaling by stress-induced RNA granules. *J. Biochem.* *159*(3), 279-286.