

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790457

研究課題名（和文） 細胞外二重鎖 RNA の取り込み機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of the uptake mechanism for double stranded RNA

研究代表者

渡部 綾子 (WATANABE AYAKO)

北海道大学・大学院医学研究科・博士研究員

研究者番号：00533423

研究成果の概要（和文）：細胞質内に存在する Raftlin は HeLa 細胞とヒト単球由来樹状細胞において、合成二重鎖 RNA である poly(I:C) の細胞内取り込みと細胞質内拡散に必須な分子であることを明らかにした。また、マウスにおいても raftlin ファミリーである raftlin-2 が poly(I:C) の細胞内取り込みと細胞質内拡散に必須な分子であることも明らかにした。以上のことから、ヒトとマウスの両者において Raftlin は poly(I:C) の細胞内輸送に関わる分子の一つであると考えられる

研究成果の概要（英文）：we show that the cytoplasmic lipid raft protein, Raftlin, is essential for poly(I:C) cellular uptake in human myeloid DCs and epithelial cells. When Raftlin was silenced, poly(I:C) failed to enter cells and induction of IFN-beta production was inhibited. In addition, cellular uptake of B-type oligodeoxynucleotide that shares its uptake receptor with poly(I:C) was suppressed in Raftlin knockdown cells. Upon poly(I:C) stimulation, Raftlin was translocated from the cytoplasm to the plasma membrane where it colocalized with poly(I:C), and thereafter moved to TLR3-positive endosomes. Thus, Raftlin cooperates with the uptake receptor to mediate cell entry of poly(I:C), which is critical for activation of TLR3.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：二重鎖 RNA 膜受容体 Toll-like receptor 3

1. 研究開始当初の背景

(1)1990 年代の後半、病原体特有の構造を認識し自然免疫を誘導する **Toll-like receptor (TLR)** が発見された。TLR の発見によりヒトの免疫研究において自然免疫が再び脚光を浴びることになった。現在までに、

ヒトでは 10 種類の TLR が発見されている。

侵入病原体の一種であるウィルスは自己で増殖せず、動物、細菌、真菌、植物などの侵入した生細胞の代謝機能を借りることで自己の複製を行っている。ウィルスに侵入された細胞は、ウィルス特有の保存された構造

(2) 2006 年 Lee らによりマウス骨髓由来マクロファージ (BMDMs ; bone marrow-derived macrophages) において CD14 が dsRNA の取り込みおよびサイトカイン誘導に関与していると報告された (Immunity, 24, 153-163, 2006)。その中で、CD14 はライソゾームに移行した TLR3 に dsRNA を輸送する役割を担っていることを明らかにし、細胞内への dsRNA の取り込みは細胞表面分子を介して行われることを示唆した。CD14 は直接合成二本鎖 RNA である poly(I:C) に結合することが示され、さらに CD14 ノックアウトマウス BMDMs で poly(I:C) による炎症性サイトカイン生成量が 25-50% に低下することが示された。また、CD14 に poly(I:C) が結合することによって TLR3 はライソゾームに移行し、CD14 および poly(I:C) と共局在することも示されている。

本研究では、「細胞外 dsRNA を細胞内に取り込む受容体が細胞表面に存在し、TLR3 を介した生体防御機構に関与している」ことを示し、「細胞表面に存在する細胞外 dsRNA を取り込む受容体によって TLR3 を介した生体防御機構がはたらき、dsRNA の生体内からの排除という重要な生体防御機構の一端」を明らかにすることができる。

(1) 細胞表面に存在すると予想される dsRNA 受容体をヒト細胞から単離し、遺伝子配列、アミノ酸配列を明らかにする。すなわち、ヒト胎児腎細胞由来の HEK293 細胞の細胞膜タンパク質を精製分離し、dsRNA 受容体と推測されるタンパク質の dsRNA に結合するという性質を利用し、合成 dsRNA である poly(I:C)を用いて Affinity 精製を行い単離する。単離した新規 dsRNA 受容体のアミノ酸配列を質量分析計(MS)によって明らかにする。また、明らかになった dsRNA 受容体アミノ酸配列を用いて既存のアミノ酸配列と比較し構造の予測及び、dsRNA 結合以外の機能に関して推測する。

A HEK293/TLR3 (IFN- β)

IFN- β luc. fold induction

poly(I:C) (10 μ g/ml)

siRNA

cont. TICAM LYRIC 4F2 Ratt1

vector

TLR3

N.S.

x

B HEK293/TLR3 (NF- κ B)

NF- κ B luc. fold induction

poly(I:C) (10 μ g/ml)

siRNA

cont. TICAM LYRIC 4F2 Ratt1

vector

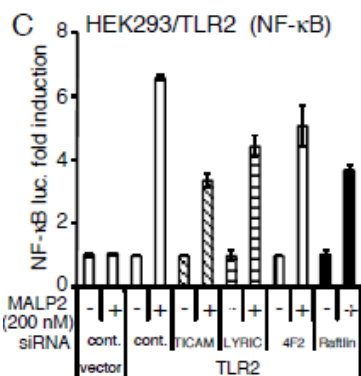
TLR3

x

②Toll-like receptor 2 と Raftlin

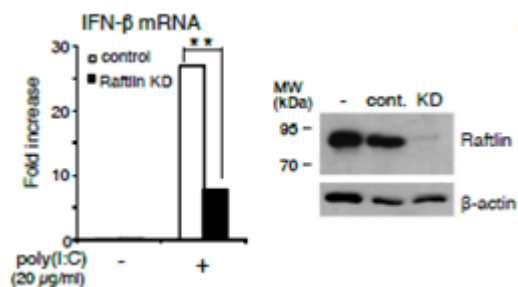
HEK293 細胞に Toll-like receptor2 を過剰発現させ Raftlin をノックダウンし、poly(I : C) 刺激による炎症性サイトカインの誘導への影響をルシフェラーゼアッセイで解析した。

その結果、Raftlin をノックダウンさせても TLR2 を介した MALP2 刺激による炎症性サイトカインである NF- κ B の誘導を抑制しなかった(C)。

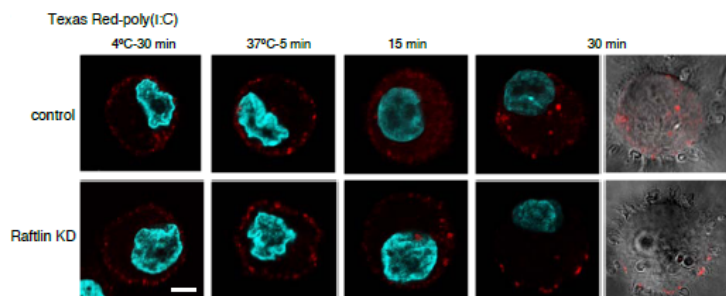


b) ヒト単球由来樹状細胞

①ヒト単球由来樹状細胞において定常状態において Raftlin は発現しており、Raftlin をノックダウンさせると合成二重鎖 RNA である poly(I : C) 刺激による IFN- β の誘導は抑制された。



②そこで、Texas-Red を用いてラベルした poly(I : C) の取り込みを共焦点顕微鏡を用いて経時的に観察した。その結果、コントロールに比べてノックダウン細胞では明らかに poly(I : C) の取り込みが抑制された。

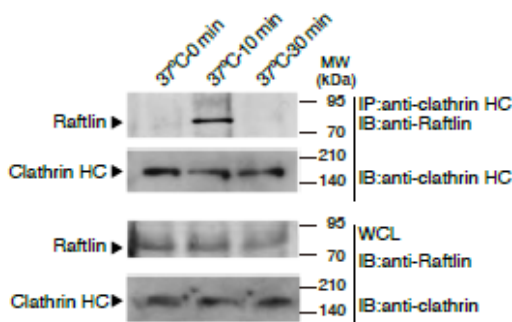


C) Raftlin 取り込み機序の解析

①Raftlin の膜結合部位の特定

研究者らが既に poly(I : C) は Clathrin 依存的に取り込まれることを明らかにしている(J. Immunology, 2008, 181, 5522-5529)。そこで、Raftlin と Clathrin が poly(I : C) 刺激によって結合するのかを免疫沈降法を用いて解析を行った。

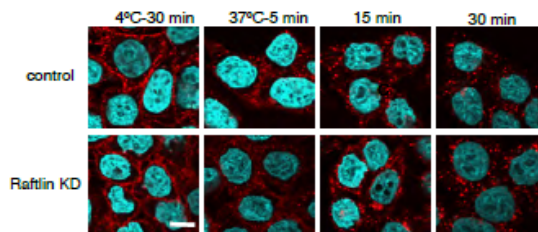
その結果、37°C 10 分 poly(I : C) 刺激を与えた場合、Raftlin と Clathrin が結合していることが明らかとなった。



②Clathrin 依存的取り込みに関与する Raftlin の機能

C) の①で示したように、Raftlin は poly(I:C) 刺激によって Clathrin と結合し、poly(I : C) を細胞内に取り込んでいることが明らかとなった。そこで、Clathrin 依存的に取り込まれる Transferrin も Raftlin が関与しているのかを明らかにするために Raftlin をノックダウンさせた HeLa 細胞を用いて赤色にラベルされた Transferrin の取り込みを経時的に観察をした。

その結果、コントロール細胞と Raftlin ノックダウン細胞では、取り込みには差は見られなかった。



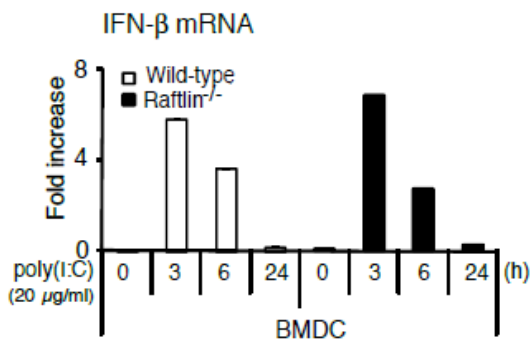
以上のことから、ヒト細胞において Raftlin は poly(I : C) の取り込みに重要な役割を果たしていると考えられる。

(2) Mouse Raftlin

a) マウス骨髄単球由来樹状細胞 (Raftlin ノックアウト)

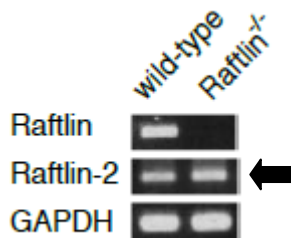
Raftlin をノックアウトしたマウスの骨髄から単球を分離し樹状細胞へと分化させた。Wild type と Raftlin KO の細胞を比較しこれらの細胞を用いて poly(I:C) 刺激を行い定量 PCR によって誘導された I 型インターフェロンを測定した。

その結果、Raftlin がノックアウトされていてもマウスにおいて poly(I:C) 刺激による IFN- β の誘導を阻害しなかった。



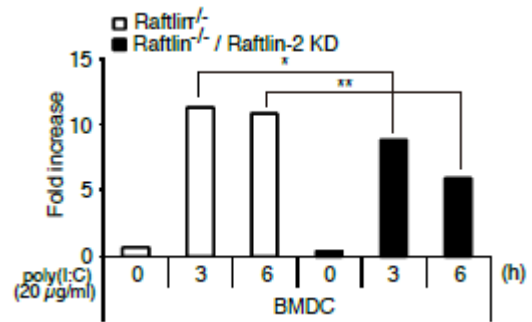
b) マウス骨髄単球由来樹状細胞 (Raftlin ノックアウト / Raftlin-2 ノックダウン)

マウス細胞はヒト細胞と異なり Raftlin と 78% の相同性を有する Raftlin-2 が発現している。



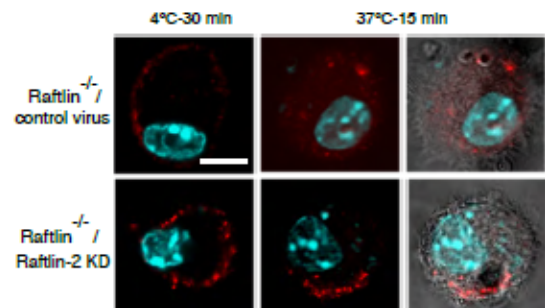
そこで、Raftlin ノックアウトマウス由来の細胞に Raftlin-2 をノックダウンさせ a) と同様の条件で poly(I:C) 刺激による I 型インターフェロンを定量 PCR を用いて測定した。

その結果、Raftlin ノックアウト細胞にさらに Raftlin-2 ノックダウンさせることによって有意に IFN- β の誘導を抑制した。



そこで、Raftlin ノックアウト / Raftlin-2 ノックダウン細胞を用いて Texas-Red ラベルした poly(I:C) の取り込みを経時的に観察した。

その結果、Raftlin-2 をノックダウンした場合、ヒト細胞と同様に poly(I:C) の取り込みが阻害された。



以上のことから、マウス細胞において Raftlin-2 が poly(I:C) の取り込みに重要なのはたらしめていると考えられる。

本研究において、Raftlin が poly(I:C) の取り込みに関与しているという新規機能を明らかにすることに成功した。

さらに、細胞外の二重鎖 RNA の未知の取り込み機構を解明するにあたり、本研究は起爆剤になりうると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

1. Ayako Watanabe, Megumi Tatematsu, Kazuko Saeki, Sachiko Shibata, Hiroaki Shime, Akihiko Yoshimura, Chikashi Obuse, Tsukasa Seya, and Misako Matsumoto

RAFTLIN IS INVOLVED IN THE NUCLEOCAPTURE COMPLEX TO INDUCE POLY(I:C)-MEDIATED TLR3 ACTIVATION. *J. Biol. Chem.*, 2011, 286: 10702-10711. 査読あり

2. Oshiumi. H., M. Ikeda, M. Matsumoto, A. Watanabe, O. Takeuchi, S. Akira, N. Kato, K. Shimotohno, and T. Seya. 2010. Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN-beta induction. *Plos ONE* Dec. 8; 5(12):e14258. 査読あり

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Watanabe A., Seya T., Matsumoto M.: Identification of a novel protein that participates in poly(I:C) cellular uptake. **14th International Congress of Immunology.** (Kobe) 2010.8.22-27. (Workshop)
2. 渡部綾子、瀬谷司、松本美佐子: Analysis of the uptake protein for double-stranded RNA、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）、2009. 12. 2-4（口頭）

6. 研究組織

(1) 研究代表者 渡部 綾子

(WATANABE AYAKO)

北海道大学・大学院医学研究科・博士研究員
研究者番号：00533423