

令和元年6月3日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15726

研究課題名(和文) 自然免疫調節機構におけるHuRの機能の解明及び新規調節因子の探索

研究課題名(英文) Elucidating the importance of HuR and identifying novel regulatory factor in innate immune system-regulating mechanisms

研究代表者

織 大祐 (ORI, Daisuke)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：70709287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、HuRが抗ウイルス応答を正に制御していることは明らかになっていたが、その機構は不明であった。本研究では、HuRがPIK2 mRNAの3'非翻訳領域に存在する4箇所のAUリッチ配列の4番目を介してPIK2 mRNAを安定化し、間接的にIRF3の核内移行を調節し、抗ウイルス応答を促進していることを明らかにした。

また、CRISPR/Cas9システムを用い、RNA結合タンパク質に焦点を当てたスクリーニングを行うことで、自然免疫応答の新規調節因子の候補として2種のタンパク質を同定した。現在、これらのタンパク質の生理的機能を明らかにするため、遺伝子改変マウスの作製および解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HuRの抗ウイルス応答調節機構の解析は、感染症に対する免疫機構の新たな一面を明らかにしたものである。また将来、感染症の治療あるいは免疫応答制御において、新たな標的メカニズムとして重要な意味を持つと考えている。

さらに、スクリーニングにより自然免疫応答の新規調節因子の候補として2種のタンパク質を同定できたが、当該タンパク質と免疫機構との関連を示す報告はほとんどない。そのため、これらのタンパク質の機能を詳細に明らかにすることで、自然免疫応答の未解明の調節機構の同定に繋がり、調節機構の包括的理解や自己炎症性疾患などの病態理解や予防などに繋がるのもであると確信している。

研究成果の概要(英文)：Although previous research in our laboratory indicated that HuR positively regulated anti-viral responses, detailed mechanisms have been still unknown. In this research, we revealed that HuR stabilized PIK2 mRNA through 4th one of four AU-rich element in PIK2 mRNA 3'-untranslated region, resulting in the promotion of anti-viral responses by indirectly and positively regulating nuclear translocation of IRF3.

Furthermore, we identified two candidate genes which may be involved in the regulation of innate immune responses by performing CRISPR/Cas9 system-based screening focusing on RNA-binding proteins. Currently, we are generating and analyzing genetically modified mice to clarify the physiological importance of these two genes.

研究分野：自然免疫

キーワード：自然免疫 炎症 RNA結合タンパク質 転写後調節

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自然免疫系はマクロファージや樹状細胞等の自然免疫担当細胞によって担われており、生体への病原体侵入時には、これら自然免疫系の細胞が Toll-like receptor (TLR)、RIG-I-like receptor (RLR)等の自然免疫系受容体を介して、病原体に特異的な構造を認識する。さらに、侵入を感知した細胞によって炎症性サイトカイン産生等が行われることにより、病原体の排除を行うための適切な炎症反応が惹起されるとともに(Kawai T and Akira S, Nat. Immunol., 2010; Immunity, 2011)、リンパ球への抗原提示等により獲得免疫系の活性化が行われる。しかしながら、これらの応答における調節機構の破綻は病原体の排除に支障をきたすばかりでなく、敗血症性ショックや自己炎症性疾患の発症を引き起こすことが明らかになっている。そのため、シグナル伝達調節や転写因子の活性調節、さらにはエピジェネティックな調節など、数多くの調節機構が存在していることが知られている。さらに近年では前述の機構に加え、転写後調節機構もまた炎症応答調節機構において重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。

ヒトやマウスにおいては、RNA に結合するタンパク質 (RNA-binding protein; RBP) が 400 種以上同定されているが (Cook KB et al., Nucleic Acids Res, 2011)、炎症応答調節機構との関連が示されているものは少数であり、RBP による炎症応答調節機構には未同定の機構が数多く存在していると考えられている。そのため、炎症応答調節機構の全容の解明、さらには免疫応答および疾患の包括的理解のためには、これらの機構の解明は必須の課題である。

2. 研究の目的

まず我々のグループは、IFN-βプロモーターにより発現が誘導されるルシフェラーゼレポータープラスミドおよびcDNAライブラリーを用いて炎症応答調節機構に關与する新規因子の探索を行い、RNA 認識モチーフを有し、標的 mRNA を安定化する RBP である Hu Antigen R (HuR) を候補遺伝子として同定していた。また、細胞株および発現ベクターを用いた解析において、HuR は NF-κB の活性化には關与せず、IFN-βの発現にのみ關与していた (図 1)。また、HuR を欠損させた RAW264.7 細胞の解析を行ったところ、HuR は抗ウイルス応答において、IRF3 の活性化に關与していることが報告されている Polo-Like Kinase 2 (PLK2) の発現を正に調節している可能性が示唆された。以上の結果から、抗ウイルス応答における HuR の機能の一端を明らかにできつつあるものの、その詳細は未だ明らかとなっていない。そのため、HuR の抗ウイルス応答調節機構における詳細を明らかにすることを一点目の目的として設定した。

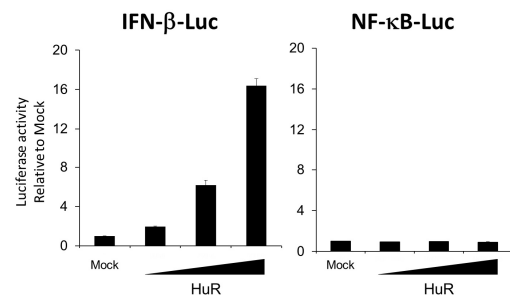


図 1、IFN-βプロモーター特異的および、HuR 濃度依存的な発現誘導

また一方、前述の通り、RBP による炎症応答調節機構には未同定の機構が数多く存在していると考えられていることから、これらの機構に關与する可能性のある新規因子の同定を試みることを二点目の目的として設定した。

また一方、前述の通り、RBP による炎症応答調節機構には未同定の機構が数多く存在していると考えられていることから、これらの機構に關与する可能性のある新規因子の同定を試みることを二点目の目的として設定した。

3. 研究の方法

- (1) Plk2 は IRF3 の核移行を正に調節している可能性が示唆されていることから、我々はまず、HuR 欠損細胞において観察された抗ウイルス応答の低下が、Plk2 の発現低下によるものであるかを評価した。
- (2) HuR は標的 mRNA に結合して安定化することが報告されており、HuR 欠損細胞において Plk2 mRNA 発現が低下していたことから、さらに、Plk2 mRNA 発現はウイルス感染を模した刺激によって誘導されるという知見が得られていることから、当該刺激後の Plk2 mRNA と HuR 関連を評価した。
- (3) HuR 欠損が Plk2 mRNA の安定性に影響を与えるかを評価した。
- (4) HuR が Plk2 mRNA を安定化するメカニズムについて評価した。
- (5) 炎症応答調節に關与する新規因子を、RBP に焦点を当てて同定を行った。
- (6) 候補遺伝子で観察された炎症性サイトカイン産生の亢進あるいは低下が、シグナル伝達経路における変化に因るのかを評価した。
- (7) 上記で同定された候補遺伝子の生理的機能を明らかにするため、各遺伝子を欠損した遺伝子改変マウスの作製を行った。

4. 研究成果

- (1) 我々のグループはこれまで、HuR を欠損させることで Plk2 mRNA の発現が低下するという知見を得ており、さらに、Plk2 は IRF3 の核移行を正に調節しているという報告があることから、まず、HuR 欠損細胞で観察された抗ウイルス応答の低下が Plk2 発現レベル

の低下によるものかどうかを評価した。CRISPR/Cas9 システムにより新たに Plk2 を欠損した RAW264.7 細胞を作製したうえで、HuR 欠損細胞および Plk2 欠損細胞を、ウイルス感染を模した刺激である poly(I:C) のトランスフェクション

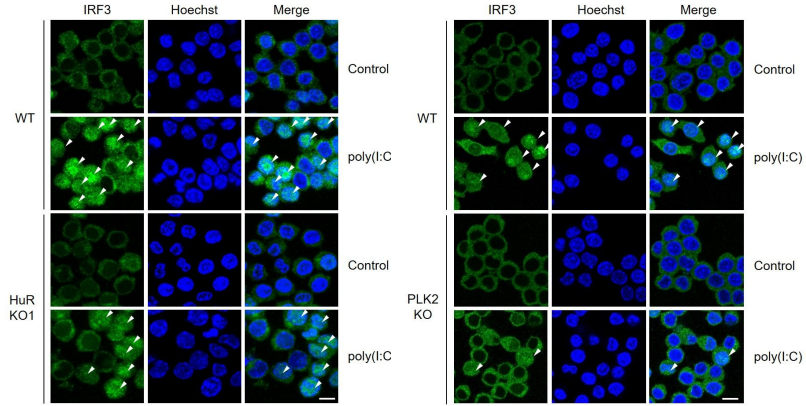


図 2、HuR 欠損 (左図) および Plk2 欠損 (右図) 細胞において IRF3 の核移行が低下していた。

により刺激を行い、NF- κ B および IRF3 の核移行の評価を行った。そうしたところ、両細胞において、コントロール細胞と比較して poly(I:C) トランスフェクション後の IRF3 の核移行は低下していた (図 2)。一方、NF- κ B (p65) の核移行はコントロール細胞と同様に観察された (data not shown)。これらの結果は、HuR 欠損細胞で観察された抗ウイルス応答の低下は、Plk2 の発現低下に起因している可能性を示唆している。

- (2) 次に、HuR は標的 mRNA に直接結合して安定化することが知られているため、RAW264.7 細胞を poly(I:C) のトランスフェクションにより刺激を行った後に、HuR と Plk2 mRNA との結合を RNA 免疫沈降法により評価した。そうしたところ、poly(I:C) のトランスフェクションにより、HuR と Plk2 mRNA との結合が誘導されることが明らかになった (図 3)。一方、Plk2 以外の Plk ファミリーである Plk1、3 あるいは 4 と HuR との結合は刺激前後で変化はみられなかった (data not shown)。これらの結果から、HuR はウイルス感染時において、Plk2 mRNA 特異的に結合して安定化することで Plk2 発現を正に調節し、結果として抗ウイルス応答を正に調節していることが示唆された。

- (3) 過去の報告および前項の結果を受け、次に、HuR が実際に Plk2 mRNA を安定化しているかどうかを評価した。コントロール細胞および HuR 欠損細胞を、転写を停止させる薬剤であるアクチノマイシン D で処置したところ、HuR 欠損細胞において、Plk2 mRNA の半減期は有意に短縮していた (図 4)。これらの結果から、HuR はウイルス感染時に Plk2 mRNA に特異的に結合して mRNA を安定化することで Plk2 発現を正に調節し、結果的に抗ウイルス応答を促進していることを示唆している。

- (4) 過去の報告から、HuR は主に標的 RNA の AU リッチ配列に結合することが知られているため、Plk2 mRNA の安定化にも同様のメカニズムが作用していると仮定し、Plk2 mRNA の 3'UTR の検索を行ったところ、4 箇所の AU リッチ配列が存在する可能性が示唆された (Plk2 mRNA において、2183-2214 塩基、2626-2655 塩基、2687-2711 塩基、2744-2760 塩基)。さらに、HuR

による Plk2 mRNA 安定化効果とこれらの配列との関係を明らかにするため、それぞれの配列を欠損した Plk2 mRNA 3'UTR を組み込んだレポータープラスミド (Δ 1-4) の構築をおこなった後、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて評価を行った。そうしたところ、2744-2760 塩基を欠損したプラスミド (Δ 4) を導入した細胞において、HuR 過剰発現による mRNA 安定化効果は低下していた (図 5)。この結果から、HuR はウイルス感染時に、Plk2 mRNA に AU リッチ配列を介して結合することで mRNA を安定化し、間接的に抗ウイルス応答を促進している可能性を示唆している。

- (5) 近年、炎症応答調節における転写後調節機構の重要性が明らかになってきている。ヒトやマウスでは 400 種以上ものタンパク質が RBP であるという報告があるものの、現在のところ、Regnase-1 や Roquin、TTP など、一部のタンパク質の重要性および標的遺伝子し

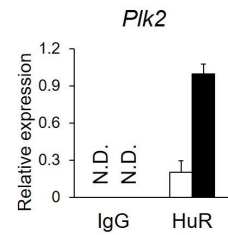


図 3、ウイルス感染時、HuR は Plk2 mRNA 特異的に結合する。

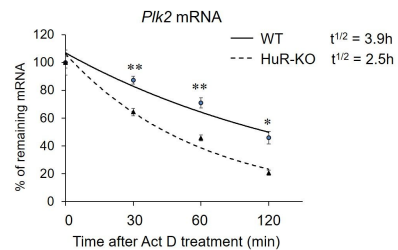


図 4、HuR は Plk2 mRNA を安定化する。

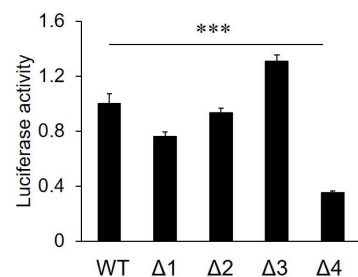


図 5、HuR は Plk2 mRNA の 3'UTR 上の 4 番目の AU リッチ配列を介して mRNA を安定化する。

か示されていない。そのため、未だ解明されていない機構が数多く存在し、緻密に炎症応答の制御を行っていると考えられる。そこで、これまで行ってきた HuR の機能解析を皮切りに、炎症応答制御に関与する新規 RBP の同定を行った。まず、RBP のデータベース (RBPDB、<http://rbpdb.cabr.utoronto.ca/index.php>) を利用し、マウスにおける RBP をリスト化した (413 種)。これらの中にも含まれる CCCH 型の zinc finger ドメインを持つタンパク質の中には、前述の 3 種のタンパク質が含まれるとともに、機能未知の分子が数多く存在するため、まず CCCH 型 zinc finger タンパク質に焦点を当て、スクリーニングを行うこととした。

方法としては、マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 をモデル細胞として用い、CRISPR/Cas9 システムによるスクリーニングを行うため、当該細胞において Cas9 タンパク質を恒常的に発現させた (RAW264.7-Cas9 細胞)。次に、各 CCCH 型 zinc finger タンパク質に対して 2 種のガイド RNA (gRNA) をデザインし、レンチウイルスベクターを用いて gRNA の導入を行った後、シーケンスにより遺伝子型の解析を行い、フレームシフトが起きることによってタンパク質発現が失われていると考えられる各細胞 (変異細胞) を選別した。その後、各変異細胞に対し LPS で刺激を行い、IL-6 産生を指標として候補遺伝子を探索した。

その結果、欠損させることによって IL-6 産生が顕著に亢進する遺伝子、あるいは産生が低下する遺伝子として、2 遺伝子を同定した (遺伝子 X4 および遺伝子 X6) (図 6)。一方、TNF 産生はともにコントロールと比較して変化は観察されなかった (data not shown)。

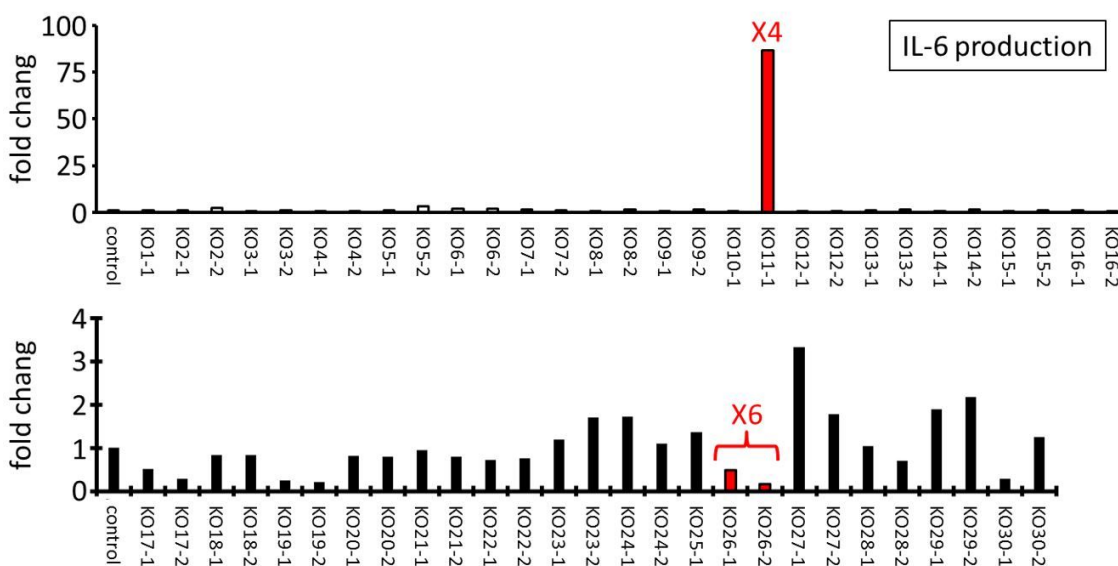


図 6、遺伝子 X4 変異細胞において IL-6 産生が顕著に増加した。一方、遺伝子 X6 変異細胞においては IL-6 産生が低下していた。

- (6) 次に、上記の候補遺伝子変異細胞における表現型が、シグナル伝達経路あるいはそれ以前の機能不全が原因であるかどうかを評価するため、変異細胞を LPS で刺激を行った後、NF- κ B (p65)および IRF3 のリン酸化を、ウェスタンブロッティングにより評価した。その結果、NF- κ B (p65)および IRF3 のリン酸化はコントロール細胞と同程度に観察された (data not shown)。現在、両候補遺伝子の機能の詳細を明らかにするため、より詳細な作用点の同定およびメカニズムの解析を進めている。
- (7) 上記に解析に加え、両遺伝子の生理的な重要性を明らかにするため、各遺伝子を欠損した遺伝子改変マウスの作製を行った。X6 遺伝子においては、CRISPR/Cas9 システムを用いて作製を終えており、既にノックアウトマウス (KO) が得られているため、現在個体を用いた解析を進めている。一方、X4 遺伝子においては、胎生致死である可能性が示唆されているため、従来の ES 細胞を用いた方法でコンディショナル KO マウスの作製を行うこととした。現在、組換え ES 細胞の樹立を終え、キメラマウスの作製を行っている。キメラマウスが得られた後は、RAW264.7 細胞がマクロファージ細胞株であることを鑑み、LysM-Cre マウスと交配することでマクロファージで X4 を欠損させ、個体を用いた解析を進めていく。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Dyaningtyas Dewi Pamungkas Putri, Takumi Kawasaki, Motoya Murase, Takuya Sueyoshi, Tomoya Deguchi, Daisuke Ori, Shiro Suetsugu and Taro Kawai, PtdIns3P phosphatases MTMR3 and MTMR4 negatively regulate innate immune responses to

DNA through modulating STING trafficking, *The Journal of Biological Chemistry*, 査読有、294 巻、2019 年、8412-23

DOI: 10.1074/jbc.RA118.005731

Sophia P. M. Sok, [Daisuke Ori](#), Noor Hasima Nagoor and Taro Kawai, Sensing self and non-self DNA by innate immune receptors and their signaling pathways, *Critical Reviews in Immunology*, 査読有、38 巻、2018 年、279-301

DOI: 10.1615/CritRevImmunol.2018026540

Takuya Sueyoshi, Takumi Kawasaki, Yuichi Kitai, [Daisuke Ori](#), Shizuo Akira and Taro Kawai, Hu Antigen R Regulates Antiviral Innate Immune Responses through the Stabilization of mRNA for Polo-like Kinase 2, *The Journal of Immunology*, 査読有、200 巻、2018 年、3814-24

DOI: 10.4049/jimmunol.1701282

Masanori Yoshinaga, Yoshinari Nakaysuka, Alexis Vandenbon, [Daisuke Ori](#), Takuya Uehata, Tohru Tsujimura, Yutaka Suzuki, Takashi Mino and Osamu Takeuchi, Regnase-1 Maintains Iron Homeostasis via the Degradation of Transferrin Receptor 1 and Prolyl-Hydroxylase-Domain-Containing Protein 3 mRNAs, *Cell Reports*, 査読有、19 巻、2017 年、1614-1630

DOI: 10.1016/j.celrep.2017.05.009

[Daisuke Ori](#), Motoya Murase and Taro Kawai, Cytosolic nucleic acid sensors and innate immune regulation, *International Reviews of Immunology*, 査読有、36 巻、2017 年、74-88

DOI: 10.1080/08830185.2017.1298749

[学会発表](計 7 件)

Sophia Ping Meow Sok, [Daisuke Ori](#), Noor Hasima Nagoor and Taro Kawai, Tropical ginger compound, 1'-acetoxychavicol acetate (ACA), inhibits NLRP3 inflammasome activation, EMBO Workshop [The inflammasomes], 2018 年 9 月

Haruna Okude, [Daisuke Ori](#), Takumi Kawasaki, Motoya Murase, Ken J Ishii and Taro Kawai, Elucidation of cell death pathway induced by imiquimod (R837), EMBO Workshop [The inflammasomes], 2018 年

Mizuka Nagayama, Takumi Kawasaki, [Daisuke Ori](#) and Taro Kawai, Elucidation of molecular mechanism of interleukin 33 release, 第 47 回日本免疫学会学術集会、2018 年

Sophia Ping Meow Sok, [Daisuke Ori](#), Noor Hasima Nagoor and Taro Kawai, Inhibition of NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β release by 1'-acetoxychavicol acetate (ACA), a ginger-derived compound, 第 47 回日本免疫学会学術集会、2018 年

Takuya Uehata, [Daisuke Ori](#), Masaki Miyazaki, Hiroshi Kawamoto and Osamu Takeuchi, Regnase-1 and Regnase-3 regulate cell fate of early lymphoid progenitors in the bone marrow, 第 47 回日本免疫学会学術集会、2018 年

Haruna Okude, [Daisuke Ori](#), Takumi Kawasaki, Motoya Murase and Taro Kawai, Analysis of cell death pathway induced by innate immune ligands, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年

Haruna Okude, Takumi Kawasaki, [Daisuke Ori](#), Motoya Murase, Ken Ishii and Taro Kawai, Induction of cell death by imiquimod (R837) and its role in immune responses, 第 46 回日本免疫学会学術集会、2017 年

[図書](計 2 件)

熊ノ郷淳 編集、南山堂、免疫・炎症病態 x 治療 Update、2019 年、2-10

熊ノ郷淳 編集、羊土社、免疫ペディア、2017 年、84-116

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。