

## 32. 抗ウイルス自然免疫応答を制御する分子機構の解析

河合 太郎

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

Key words : 自然免疫, ウイルス感染, サイトカイン, シグナル伝達, RNA

### 緒言

インフルエンザウイルスなどの RNA 型ウイルス感染に対して生体は I 型インターフェロンや炎症性サイトカインを分泌することでウイルス増殖を阻止する。これらのサイトカインは引き続き T 細胞や B 細胞などにより担当される獲得免疫の誘導に重要な役割を果たす。ウイルス由来の RNA を認識し、こうした自然免疫応答を惹起する細胞質内センサーとして RIG-I-like receptor (RLR) ファミリーが知られている。RLR は、RIG-I と MDA5 と呼ばれる RNA ヘリカーゼであり、ウイルス RNA と直接結合することで下流シグナル伝達経路を活性化する。RIG-I はウイルス感染に伴い細胞質からストレス顆粒と呼ばれる細胞質内構造体にリクルートされることが知られている。ストレス顆粒は、ストレス刺激やウイルス感染によって形成され、顆粒内には mRNA、RNA 結合蛋白質、リボソーム等が含まれており、ストレス時における翻訳抑制に関与すると考えられている。ウイルス RNA もストレス顆粒に局在することが報告されていることから、ウイルス RNA が認識される場としての役割も示唆される。しかしながら、RLR のストレス顆粒内における役割についてまだ知られていない。我々は、ウイルスに対する自然免疫応答の詳細を理解するため、I 型インターフェロンの発現誘導可能な分子の発現スクリーニングを行い、その中の一つとして HuR (別名 ELAV1) を見いだした。HuR は、RNA 結合ドメインを持つ細胞内タンパク質であり、これまでの研究から AU リッチ配列をもつ mRNA を細胞質において安定化する機能を持つことなどが知られている。しかしながら、ウイルス RNA に対する自然免疫応答における HuR の役割は不明である。興味深いことに、HuR はウイルス感染に伴い、細胞質からストレス顆粒へと移行すること、さらにストレス顆粒内においてウイルス RNA と共局在していた。これらのことから HuR と RLR の機能的関連が示唆され、今回さらなる解析を行った。

### 方法および結果

#### 1. Hu antigen R (HuR) の同定

I 型インターフェロンの転写誘導に関わる分子を同定するため、様々な RNA 結合タンパク質に着目しスクリーニングを行った。RNA 結合タンパク質に対する発現ベクターを構築し、それをヒト胎児腎臓由来細胞である HEK293 細胞にインターフェロン  $\beta$  遺伝子プロモーターにより発現制御されるルシフェラーゼレポータープラスミドとともに導入し、ルシフェラーゼの発現を指標にスクリーニングを行った結果、HuR を得た (図 1A)。HuR は 3 つの RNA 結合ドメインを持つ細胞内分子であり、AU リッチ配列をもつ mRNA を細胞質において安定化する機能を持つことなどが知られている<sup>1)</sup> (図 1B)。また、抗 HuR 抗体を用いた免疫染色により HuR の細胞内局在を調べたところ、マウス胎児線維芽細胞において未刺激状態では核内に局在し、RLR の合成アゴニストである合成二本鎖 RNA Poly (I:C) 刺激により一部細胞質内へと移行しドット状の形状を示した (図 1C)。このドットはストレス顆粒のマーカーと一部共局在していたことからストレス顆粒を含むものと考えられる。

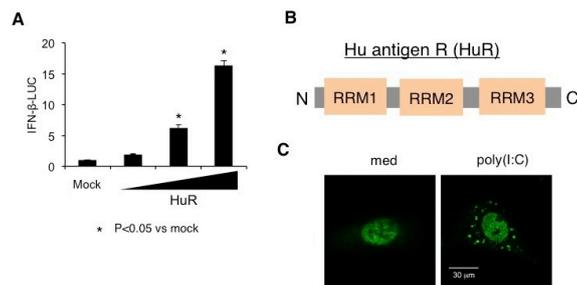


図1. HuR の同定

- A) HuR の過剰発現によるインターフェロン  $\beta$  プロモーターの活性化。有意差は t 検定により判定した。
- B) HuR の模式図 (RRM: RNA recognition motif)
- C) HuR の細胞内局在。poly (I:C) 刺激後、核内と細胞質内ドット状の局在を示す。

## 2. HuR 欠損細胞の樹立と解析

HuR の機能を理解するため、Cas9/CRISPR システムによるゲノム編集技術を用いて HuR を欠損したマウスマクロファージ細胞 RAW264.7 細胞を 2 ライン樹立した (図 2A)。この細胞を用いて、Poly (I:C) に対する応答を解析したところ、HuR 欠損細胞では Poly (I:C) 刺激後のインターフェロン  $\beta$  遺伝子の発現が野生型細胞と比べ顕著に限弱していた (図 2B)。

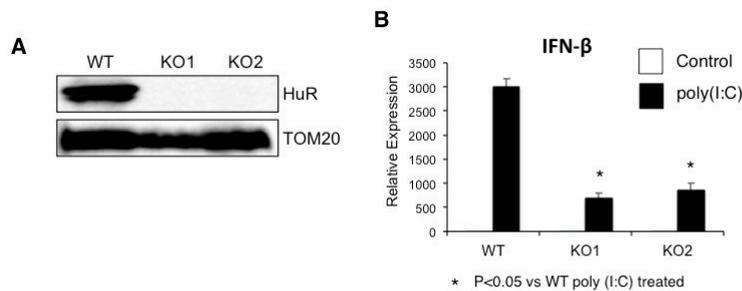


図2. HuR 欠損細胞の樹立と機能解析

- A) HuR 欠損細胞の樹立 (WT: 野生型, KO1, KO2: HuR 欠損株)。それぞれの細胞可溶化物を抗 HuR、抗 TOM20 抗体でウェスタンブロットを行った。
- B) 細胞を Poly (I:C) で刺激後、インターフェロン  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) 遺伝子の発現量を qPCR で測定した。有意差は t 検定により判定した。

## 3. HuR の標的遺伝子 *Plk2* の解析

野生型と HuR 欠損細胞間で遺伝子発現の差をマイクロアレイにより解析を行ったところ、ケモカインを始め、様々な遺伝子の発現に差が認められた。その中の一つ、Polo-Like Kinase 2 (PLK2) はインターフェロン  $\beta$  遺伝子の転写を制御する転写因子 IRF3 の活性化に関与していることが示唆されているキナーゼである<sup>2)</sup>。PLK2 の発現を野生型と HuR 欠損細胞で比較したところ、マイクロアレイ解析のデータ通り、欠損株で発現が限弱していた (図 3)。

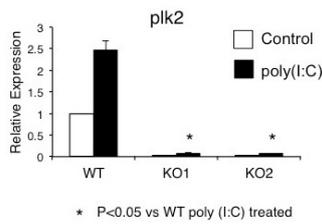


図3. HuR 欠損細胞における *PLK2* 遺伝子の発現低下

細胞を Poly (I:C) で刺激し、*Plk2* mRNA の発現を qPCR で測定した。有意差は t 検定により判定した。

さらに、PLK2 は Poly (I:C) 刺激により発現が上昇するが、野生型では刺激後の発現も抑制されていた。次に、PLK2 による抗ウイルス応答のメカニズムを解析するため、PLK の阻害剤である BI2536 を用いた。この阻害剤は Poly (I:C) 刺激によるインターフェロン  $\beta$  遺伝子の発現を抑制した (図4)。

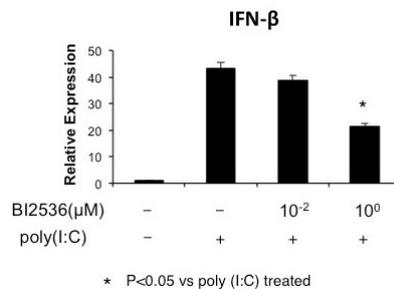


図4. PLK2 による IFN- $\beta$  発現制御

BI2536 で前処理を行った HEK293 細胞を Poly (I:C) で刺激後、IFN- $\beta$  遺伝子の発現を測定した。有意差は t 検定により判定した。

HuR が mRNA の安定性に関与していることから、HuR と *PLK2* mRNA の結合を検討した。RAW264.7 細胞を Poly (I:C) で刺激後、細胞可溶化物をコントロール及び抗 HuR 抗体で免疫沈降を行い、沈降物に含まれる RNA を回収した。その後、PLK2 に対する特異的プライマーを用いて RT-PCR を行い、*Plk2* mRNA が含まれるかを電気泳動により確認したところ、Poly (I:C) 刺激後に HuR 沈降物中に *Plk2* mRNA が検出された (図5)。これらのことから、HuR は *PLK2* mRNA の安定化を誘導することでインターフェロン  $\beta$  の産生に関与する可能性が示唆された。

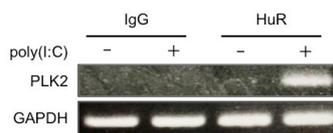


図5. HuR と *Plk2* mRNA の結合

HEK293 細胞を Poly (I:C) で刺激前後の可溶化物を抗 HuR 抗体で免疫沈降を行い、沈降物に含まれる RNA を回収後、RT-PCR により *Plk2* 及び *Gapdh* mRNA 量を測定した。

## 考 察

今回、抗ウイルス自然免疫応答を制御する因子として HuR を同定した。HuR は RNA 結合タンパク質でありこれまでストレス顆粒に局在することが示されてきた。一方、ストレス顆粒にはウイルスセンサーである RIG-I が局在しており、ウイルス認識のプラットフォームとして機能していることが示唆されている。我々も、ストレス顆粒に局在し RING ドメインと RNA 結合ドメインを有する MEX3C が RIG-I と結合し K63 型ユビキチン化を誘導し活性化するユビキチンリガーゼとして機能することを見いだした<sup>3)</sup>。一方、今回見いだした HuR にはユビキチン関連ドメインを有しておらず、MEX3C とは異なった機構により抗ウイルス自然免疫応答を制御していることが示唆される。

今回、HuR の標的 mRNA の候補として PLK2 を見いだした。PLK2 ならびにそのファミリー分子 PLK4 は IRF3 の活性化を制御する分子として機能することが報告されている<sup>2)</sup>。IRF3 は RLR アゴニストで刺激後、TBK1 と呼ばれるキナーゼにより細胞質内でリン酸化を受け二量体を形成後核内へと移行し、標的配列へ結合し標的遺伝子の転写を誘導する<sup>4)</sup>。PLK2/4 は IRF3 の核内移行を制御することが示されている<sup>2)</sup>。我々の解析から PLK2 は Poly (I:C) 刺激後に発現誘導されること、HuR 欠損細胞では PLK2 mRNA の発現が障害されていることから、HuR は PLK2 の安定化を誘導することで IRF3 活性化に寄与することが考えられた。

今後は、HuR の細胞内局在の詳細を、特に RIG-I との共局在を中心に解析していく予定である。また、*Plk2* mRNA に結合する配列の決定や、PLK2 以外の標的 mRNA の網羅的解析を行うことで、HuR による自然免疫制御の包括的理解を目指したい。

本研究に対するご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Papadopoulou C, Ganou V, Patrino-Georgoula M, Guialis A. HuR-hnRNP interactions and the effect of cellular stress. *Mol Cell Biochem.* 2013 Jan;372(1-2):137-47. doi: 10.1007/s11010-012-1454-0. PMID: 22983828
- 2) Chevrier N, Mertins P, Artyomov MN, Shalek AK, Iannaccone M, Ciaccio MF, Gat-Viks I, Tonti E, DeGrace MM, Clauser KR, Garber M, Eisenhaure TM, Yosef N, Robinson J, Sutton A, Andersen MS, Root DE, von Andrian U, Jones RB, Park H, Carr SA, Regev A, Amit I, Hacohen N. Systematic discovery of TLR signaling components delineates viral-sensing circuits. *Cell.* 2011 Nov 11;147(4):853-67. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.022. PMID: 22078882
- 3) Kuniyoshi K, Takeuchi O, Pandey S, Satoh T, Iwasaki H, Akira S, Kawai T. Pivotal role of RNA-binding E3 ubiquitin ligase MEX3C in RIG-I-mediated antiviral innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Apr 15;111(15):5646-51. doi: 10.1073/pnas.1401674111. PMID: 24706898
- 4) Pandey S, Kawai T, Akira S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Oct 9;7(1):a016246. doi: 10.1101/cshperspect.a016246. PMID: 25301932