



Title	Regulation of inflammatory responses by dynamic subcellular localization of RNA binding protein Arid5a
Author(s)	比嘉, 光
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69657
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士論文

題目

Arid5a の動的細胞内局在による炎症応答の制御
(Regulation of inflammatory responses by dynamic
subcellular localization of RNA binding protein
Arid5a)

比嘉 光

大阪大学大学院 生命機能研究科

2018 年度 3 月修了

目次

1. 要旨

2. 序論

- 2-1 *Irf6* mRNA の制御機構
- 2-2 ARID ファミリー
- 2-3 Arid5a
- 2-4 Regnase-1
- 2-5 RNA 品質管理機構
- 2-6 核内外輸送経路
- 2-7 目的

3. 実験方法と材料

- 3-1 マウス
- 3-2 Arid5a 過剰発現マウス
- 3-3 腹腔マクロファージの誘導
- 3-4 細胞培養
- 3-5 トランスフェクション
- 3-6 定量 RT-PCR 法
- 3-7 全細胞抽出液の調製
- 3-8 免疫沈降
- 3-9 ウェスタンブロッティング
- 3-10 抗体
- 3-11 ELISA
- 3-12 発現用プラスミド
- 3-13 免疫染色
- 3-14 核と細胞質の分画
- 3-15 核および細胞質の分離と RNA 免疫沈降
- 3-16 統計解析

4. 結果

- 4-1 CAG プロモーターを用いた Flag-Arid5a 過剰発現マウスの作製
- 4-2 健常時において、過剰発現させた Arid5a は炎症性サイトカインの産生に影響しない
- 4-3 Arid5a 過剰発現マウスでは野生型と比較して、炎症応答における IL-6 や TNF の産生量が増加し、敗血症性ショックが悪化する
- 4-4 Arid5a 過剰発現は LPS 刺激後の腹腔マクロファージにおける炎症性サイトカインの産生を増加させる
- 4-5 内在性の Arid5a は主に核内、Regnase-1 は細胞質に局在する
- 4-6 Arid5a は Importin- α/β 1 経路を介して核内移行する
- 4-7 Arid5a は LPS 刺激依存的に核内で減少し、細胞質で増加する
- 4-8 細胞質と核の Arid5a はそれぞれ LPS 刺激後に *Il6* mRNA と結合する
- 4-9 レプトマイシン B は LPS 刺激後に起こる Arid5a の核外移行を阻害する
- 4-10 レプトマイシン B は LPS 刺激後の IL-6 の産生を抑制する
- 4-11 Arid5a は UPF1 と相互作用する
- 4-12 モデル図

5. 考察と結論

6. 参考文献

7. 謝辞

8. 業績

略語一覧

3' UTR: 3' untranslated region

Arid5a: AT-rich interactive domain 5a

AT: adenine-thymine

CRM1: chromosomal region maintenance 1

DAPI: 4, 6-diamidino-2-phenylindole

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ER: estrogen receptor

IL-6: Interleukin 6

JNK: c-Jun N-terminal kinase (JNK)

LMB: leptomycin B

LPS: Lipopolysaccharide

NES: nuclear export signal

NF- κ B: nuclear factor- κ B

NLS: nuclear localization signal

NMD: nonsense-mediated mRNA decay

NPC: nuclear pore complex

NPM: nucleophosmin

Regnase-1: regulatory RNase-1

ROR γ T: retinoic acid receptor related orphan nuclear gamma t

ROS: reactive oxygen species

Sox9: SRY-box 9

TDP43: Tat activating regulatory DNA binding protein 43

TLR: Toll-like receptor

UPF1: up-frameshift protein 1

1. 要旨

Adenine–thymine (AT)–rich interactive domain 5a (Arid5a) is an RNA-binding protein found in the cytoplasm and nucleus of normally growing cells. Although Arid5a is known to play an important role in immune regulation, whether and how Arid5a subcellular localization impacts immune regulation remained unclear. In this study, we generated Arid5a transgenic (TG) mice to address this question. While ectopic Arid5a overexpression did not affect expression of inflammatory cytokines under unstimulated conditions, significantly higher levels of inflammatory cytokines such as IL-6 were produced in response to lipopolysaccharide (LPS) stimulation. Consistent with this, TG mice were more sensitive to LPS treatment than wild-type mice. We also show that Arid5a is imported into the nucleus via a classical importin- α/β 1-mediated pathway. Upon stimulation, nuclear Arid5a levels were decreased while there was a concomitant increase in cytoplasmic Arid5a. Arid5a is associated with up-frameshift protein 1 (UPF1), and its nuclear export is regulated by the nuclear export receptor, chromosomal region maintenance 1 (CRM1). Taken together, these data indicate that Arid5a is a dynamic protein that translocates to the cytoplasm from the nucleus so as to properly exert its dual function in mRNA stabilization and transcriptional regulation during inflammatory conditions.

免疫細胞は病原体を排除するために、炎症性サイトカインを分泌し、これが周りの免疫細胞を活性化させることで炎症を誘導させる。しかしながら、過剰の、もしくは慢性化した炎症は様々な病気の原因となるため、生体内には炎症をコントロールする機構が存在する。炎症を制御する分子としては炎症を促進する AT-rich interactive domain 5a (Arid5a) や抑制する regulatory RNase1 (Regnase-1) などが存在し、これらの分子のバランスが炎症応答において重要であると考えられている。

これまでの先行研究で、Arid5a は Regnase-1 の RNA 分解作用を阻害することで、*Il6* mRNA を安定化することが分かっている。また、Arid5a 欠損マウスに LPS 刺激を施した場合、野生型と比較して、血中の Interleukin-6 (IL-6) の産生量は減少し、敗血症性ショックに抵抗性を示すことが分かっている。しかしながら、Arid5a を過剰に発現させるだけで IL-6 の産生量が増加するのかは不明であった。

この点を明らかにするために、私は、Arid5a を全身に過剰発現するマウスを作製した。健常時でも、Arid5a 過剰発現マウスでは IL-6 の産生量が上昇すると予想したが、炎症性サイトカインである *Il6* や *Tnf* の mRNA 量への影響は確認できなかった。しかしながら、Lipopolysaccharide (LPS) 刺激による敗血症性ショック誘発後に、Arid5a 過剰発現マウスでは、野生型と比較して、有意に血中の IL-6 産生量が増加し、48 時間以内に生存率が 50% まで低下することが判明した。つまり、Arid5a は刺激依存的に IL-6 産生量をより増加させ、過剰な免疫応答を引き起こしていることが判明した。そこで、私は炎症応答時において Arid5a の細胞内動態がどのように制御されているのかを解析した。

まず、内在性の Arid5a と Regnase-1 の細胞内局在を調べた結果、Arid5a は主に核内に局在し、Regnase-1 は細胞質に局在することがわかった。次に、どのような経路で Arid5a が核内移行をするのかを調べた。その結果、Arid5a は核輸送因子 Importin- α/β 1 依存的に核内移行することが示された。次に、LPS 刺激後の Arid5a の核-細胞質局在を調べた。その結果、Arid5a は LPS 刺激後に、核内で減少し、細胞質で増加することが判明した。また、LPS 刺激後に、細胞質と核のそれぞれで Arid5a は *Il6* mRNA と結合することが示された。さらに、LPS 刺激後に起こる Arid5a の核外移行について調べた。その結果、LPS 刺激後に起こる Arid5a の核外輸送は、核外輸送因子 chromosomal region maintenance 1 (CRM1) 阻害剤であるレプトマイシン B によって阻害されることが分かった。同時に、IL-6 の産生量も強く抑制されることが示された。以上のことから、本研究では、Arid5a は Importin- α/β 1 を介した経路で核内に移行し、炎症応答後に、*Il6* mRNA と結合し、CRM1 を介した核外輸送経路で細胞質に移行することが示された。Arid5a の細胞質への移行が炎症の促進において重要であり、Arid5a の核外輸送に重要な CRM1 の阻害剤が IL-6 の産生量を強く抑えることから、新たな創薬標的になり得る可能性が示唆された。

2. 序論

2-1 *Il6* mRNA の制御機構

免疫細胞は細菌やウイルスなどの病原体を排除するために、IL-6 や TNF を代表とする炎症性サイトカインというタンパク質を分泌し、これが周りの免疫細胞を活性化させることで炎症が誘導される。病原体の排除のためには、先ず免疫細胞が病原体を認識する必要があるが、病原体を認識する受容体として Toll 様受容体 (TLR: Toll-like receptor) が存在する。TLR のリガンドとして、細菌の外膜表面にある Lipopolysaccharide (LPS) や、細菌のべん毛構成成分であるフラジェリン、細菌やウイルス由来の非メチル化された CpG DNA や 1 本鎖 RNA、2 本鎖 RNA 等がある。それぞれの受容体は各種のリガンドに異なる親和性を持つ。ヒトでは 10 種類の TLR (TLR1-10)、マウスでは 12 種類 (TLR1-9, 11-13) の TLR が同定されている。その中でも、LPS は TLR4 受容体により認識される。LPS が TLR4 受容体に結合すると、下流のシグナル伝達が活性化され、転写因子の NF- κ B を活性化し *Il6* mRNA 等の転写が誘導される。IL-6 の産生は免疫細胞を活性化させるために重要なものである。しかし、過剰に産生された IL-6 は関節リウマチやキャスルマン病などの免疫性疾患を誘発する。従って、IL-6 の産生量を制御することは生体内において極めて重要なことである。IL-6 産生機構は転写の活性化や不活性化で制御されるのみではなく、転写後調節機構においても制御される。転写後調節とは、選択的スプライシング、5' 末端側のキャッピング修飾、3' 末端側のポリ A 鎖の付加、RNA 修飾や RNA 安定性などが制御されることである。転写後調節分子として、RNA 安定化分子 Arid5a や RNA 分解分子 Regnase-1 などが存在する。Regnase-1 は RNA と結合し、RNA を分解する。しかし、Arid5a が存在することで、Regnase-1 は RNA との結合が阻害されることが示されている。これらの多様な制御因子により、IL-6 の産生量は緻密に制御されている (1-6) (図 1)。

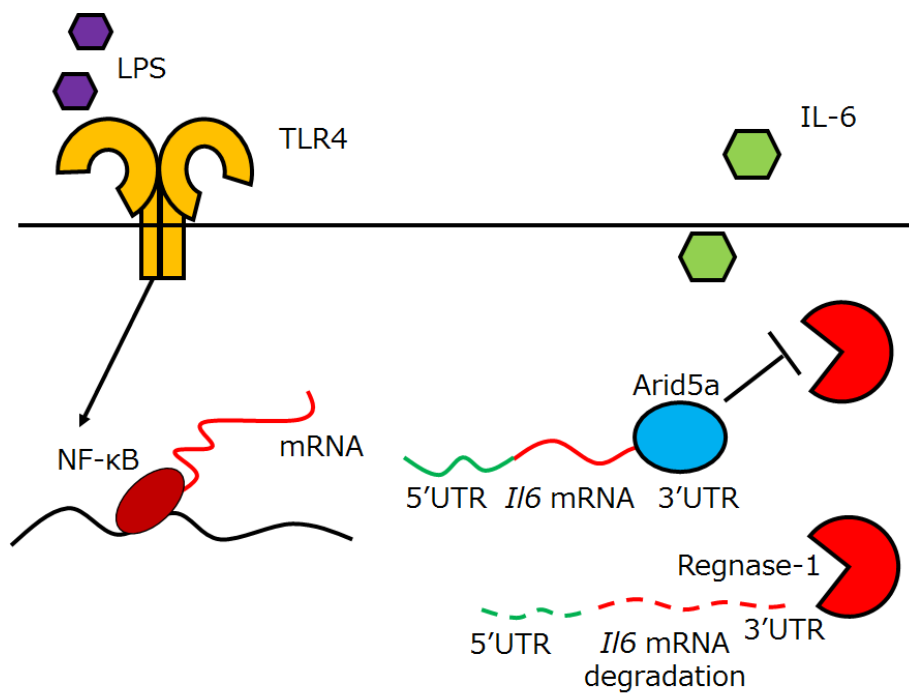


図1 *IL6* mRNA の制御機構

2-2 ARID ファミリー

ヒトではこれまで 15 種類の ARID ドメインを含むタンパク質が ARID ファミリーとして同定されている。図 2 では、ARID ファミリータンパク質の ARID ドメインを黄色で示した。ARID ドメインは DNA 結合能を有する。ARID ファミリーは DNA に結合することで、転写を制御していると考えられている。また、ARID ファミリーと疾患との関連として、癌との関係が報告されている。例えば、ARID1A の減少により、癌抑制遺伝子である p53 が不活性化され、アポトーシスが抑制されることが報告されている。また、炎症との関係性は ARID5A でのみ報告されている (7)。

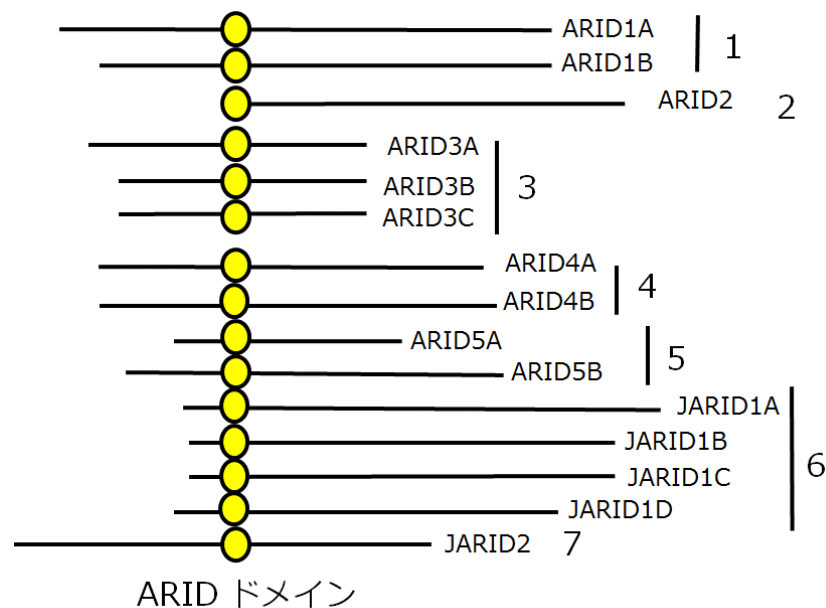


図2 ARID ファミリー

2-3 Arid5a

ARID ファミリーは ARID ドメインを有する DNA 結合タンパク質として知られているが、Arid5a は RNA の 3' UTR のステムループのステムに結合することが出来る RNA 結合タンパク質でもある。Arid5a が同定された研究の中で、5-ブロモウラシルでラベルされた *Il6* や *Tnf* mRNA の 3' UTR を 5-ブロモウラシル抗体で RNA 免疫沈降した際に、*Tnf* mRNA の 3' UTR には結合せず、*Il6* mRNA の 3' UTR に選択的に結合するタンパク質として同定された(1)。Arid5a の研究が進む中で、Arid5a は炎症性サイトカイン *Il6* mRNA の 3' UTR だけでなく、その下流の *STAT3*、インターフェロン γ を制御する *T-bet* や T 細胞の増殖や生存を促進させる *OX40* mRNA の 3' UTR に結合することが明らかになった(1, 8-10)。また、炎症誘導時に野生型よりも Arid5a 欠損マウスでは血中における IL-6 の産生量が減少することが明らかになった(1, 9)。また、野生型と Arid5a 欠損マウスを用いた LPS 刺激による敗血症性ショックの生存率では、LPS により過剰に産生された炎症性サイトカインにより、多臓器不全が起こり、野生型では 4 日目までにすべて死亡するが、Arid5a 欠損マウスでは抵抗性を示すことが明らかになっている(9)。また、ブレオマイシンという DNA を損傷する薬剤を用いてマウスに肺の線維化を誘導する実験では、野生型と比較して、Arid5a 欠損マウスでは IL-6 の産生やミトコンドリアが産生する Reactive Oxygen Species (ROS) が減少し、肺の線維化に対し抵抗性を示すことが明らかになった(11)。Arid5a が *Il6* mRNA の発現を制御するメカニズムとして、RNA 分解分子 Regnase-1 の分解作用を抑制することが示されている。Arid5a と Regnase-1 の拮抗実験において、Regnase-1 単独では RNA と結合し、分解する。しかし、そこに Arid5a

が存在することで、Regnase-1 と RNA との結合が抑制されることが示されている (1、3)。従って、Arid5a は *Il6* mRNA に対する Regnase-1 の RNA 分解機能を抑制すること、つまり、Arid5a と Regnase-1 のバランスが *Il6* mRNA の産生に重要な役割を果たすことが示されている (1)。

2-4 Regnase-1

Regnase-1 は RNase 領域と、CCH 型 Zinc finger 領域を持つタンパク質で細胞質に局在し、*Il6* mRNA などの 3' UTR に存在するステムループを介して RNA を分解する。Regnase-1 欠損マウス由来のマクロファージは LPS 刺激により、IL-6 や IL-12 のサイトカイン産生量が増加する。また、Regnase-1 欠損マウスでは肺へのリンパ球の浸潤が起こり、IgG や IgA 産生細胞が増加する。また、脾臓腫を伴う自己免疫疾患、リンパ節腫脹を自然発症し、生後 12 週までにほぼ前例死亡することが示されている (5)。RNA を分解する際のメカニズムとして、Regnase-1 は RNA 品質管理機構の分子 UPF1 と結合することで制御されていることが示されている (6)。

2-5 RNA 品質管理機構

癌や遺伝性疾患などを引き起こす異常な mRNA をナンセンス mRNA と呼び、ナンセンス mRNA を分解する機構が生体内には存在する。NMD (nonsense-mediated mRNA decay) はナンセンス変異をもつ mRNA を分解する機構である。分解メカニズムとして、リボソームが未成熟終止コドンで翻訳を終結することで、NMD に必須な因子である UPF1、UPF2 や UPF3 の複合体が mRNA 上で形成され、5' 端のキャップ構造が除去されることで、5' → 3' エキソヌクレアーゼによって mRNA が分解される機構である。また、UPF1 と Regnase-1 が相互作用することで RNA を分解する機構も存在する。RNA 分解は細胞質で行われるのだが、UPF1 は核と細胞質間をシャトリングすることが知られている。UPF1 の核内における役割として、テロメアの維持や細胞周期の促進、DNA 複製に関与することが報告されている (6, 13-15)。

2-6 核内外輸送経路

タンパク質は細胞質において合成され、核内タンパク質は細胞質から核へ輸送される。細胞質と核間の輸送は核膜孔複合体 (nuclear pore complexes : NPCs) を介して行われる。核に運ばれるタンパク質には核局在シグナル (nuclear localization signal : NLS) が存在する。代表的な NLS である classical NLS の配列には Importin- α が結合し、さらに Importin- β と三者複合体を形成することで核内に輸送される。逆に、核から細胞質へタンパク質を移行させるためのシグナル配列は核外輸送シグナル (nuclear export signal : NES) と呼ばれる。核外輸送因子 CRM1 は Importin- β ファミリーの 1 つで核から細胞質へのタンパク質や mRNA の両方を輸送する (16-20) (図 3)。

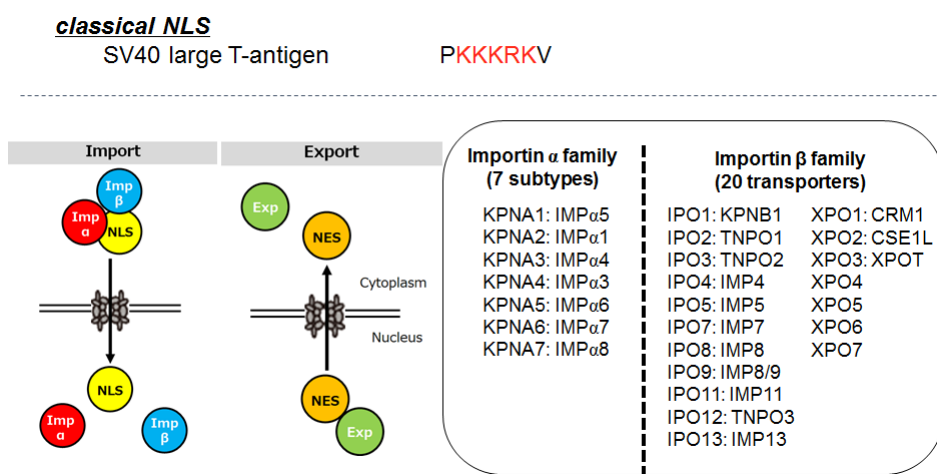


図3 核内移行シグナルと輸送担体

また、レプトマイシン B は CRM1 阻害剤であり、核から細胞質への輸送を阻害する。多くの疾病には核-細胞質間の輸送の異常が関わっていると考えられており、NPC の欠陥と自己免疫疾患や癌との関係が報告されている (21)。

2-7 目的

Arid5a の欠損マウスでは、LPS 刺激や DNA に損傷を与えるブレオマイシンによる炎症を誘導させたにも関わらず、炎症性サイトカインの IL-6 産生量の減少や、敗血症性ショックや肺の線維化に抵抗性を示すことが明らかになった。この結果を踏まえ、本研究の目的は Arid5a を過剰発現することで、IL-6 が過剰に産生されるのか、また、産生された IL-6 により疾患を自然発症するのかを調べることである。また、今だ不明な刺激前と刺激後における Arid5a の核-細胞質間局在について、明らかにすることである。

3. 材料・実験方法

3-1 マウス

C57BL/6J 野生型マウス (6-8 週令) は日本クレアより購入した。また、すべての動物実験は大阪大学の生命機能研究科の規則に則り適切に行われた。

3-2 Arid5a 過剰発現マウス

Arid5a 過剰発現マウスを作製するために、Flag タグを 5' 末端に付加した Arid5a cDNA を pCAGGS ベクターの Not I と Xba I の間に挿入した。pCAGGS ベクターにはサイトメガロウイルスエンハンサーとチキン β -アクチンプロモーターをつなげた構造と、ウサギ β -グロビン遺伝子の polyA 鎖が含まれる。Sac I と Kpn I で切断された Cag-Flag-Arid5a-polyA 鎖を含む DNA 断片 (4.2 kb) を 233 個のマウス由来の受精卵に挿入した。次の日、偽妊娠雌マウスにその受精卵を移植し、64 匹のマウスが生まれた。その中から外来の Arid5a cDNA が挿入された Arid5a 過剰発現マウスを同定するために、それぞれの尾から調製した DNA をテンプレートとして Flag タグと Arid5a を認識するプライマーセット (Forward: ACGATGATGACAAGGGCGAAT, Reverse: TGGCTTGGGGGATACAGGAA) を用いて PCR を行った。その結果、64 匹中 11 匹が Flag-Arid5a 過剰発現マウスとして樹立された。

3-3 腹腔マクロファージの誘導方法

腹腔マクロファージを誘導させるために、オートクレーブ滅菌された 4 % チオグリコレート培地を 26G ニードル及びシリンジを用いてマウスの腹腔に 2 mL 注射した。3 日後に冷 PBS をマウスの腹腔に 26G ニードル及びシリンジを用いて 5 mL を注射し、30 回腹をマッサージした後、26G ニードル及びシリンジを用いて細胞が含まれる PBS を 15 mL チューブに回収した。細胞を 4°C、1000 rpm で 10 分間遠心により分離し、10 % FCS 入りの RPMI 培地で 1 時間仮培養を行った。その後、10 % FCS 入りの RPMI 培地を用いて培地交換を行い 24 時間後実験に用いた。

3-4 細胞培養および試薬

マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 とヒト胎児腎細胞 HEK293T は 37 °C、5 % CO₂ 存在下で 10 % FCS 入りの DMEM を用いて培養した。LPS (SIGMA) は PBS、レプトマイシン B (SIGMA) はエタノールにそれぞれ溶解して使用した。

3-5 トランスフェクション

HEK293T 細胞にトランスフェクションする際は、その前日に、50 %の細胞密度になるよう培養皿に細胞を播種し、一晚培養した。その後、トランスフェクション試薬である Eugene HD (Promega) を用いて、プラスミド DNA を細胞内に導入した。RAW264.7 細胞にトランスフェクションする際は、 5.0×10^5 の細胞に対し、1 μ g のプラスミド DNA を Nucleofector system (Lonza) のプロトコールに従って細胞内に導入した。

3-6 定量 RT-PCR

全 RNA を単離するために、回収した細胞を TRIzol (Invitrogen) で溶解した。その後、21G ニードルとシリンジを用いて、細胞内の DNA を断面化した。室温で 5 分間静置後、TRIzol の半分量のクロロホルムを加え、1 分間振とうした。その後、室温で 3 分間静置し、4°C、12000 rpm で 15 分間遠心により分離後、上層溶液を回収し、上層溶液と等量の 2-イソプロパノールを加え、攪拌した。その後、室温で 10 分間静置し、4°C、12000 rpm で 15 分間遠心により分離を行い、分離後の上清を除き、DEPC 処理水により調整した 75% エタノールを 900 μ L 加えた。その後、4°C、7500 rpm で 5 分間遠心により分離を行った後、上清を取り除き、RNA を含む沈殿を風乾させ、DEPC 水に溶解した。

逆転写酵素として ReverTra Ace (Toyobo) を使用した。回収した RNA (300 ng) を用い、プロトコールに従い反応液を調製した。反応は 37°C で 15 分、続いて 50°C で 5 分、98°C で 5 分、4°C で 10 分、サーマルサイクラー (Applied Biosystems) で実施した。

定量 RT-PCR は、KOD-SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いて ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems) で DNA 断片を増幅した。反応条件は、98°C で 2 分、続いて 98 °C で 10 秒、60°C で 10 秒、68°C で 30 秒のサイクルを 40 サイクル行った。Arid5a, Il6, Tnf は $\Delta \Delta$ Ct (Δ Ct 標的 - Δ Ct 対照) 法で解析した。PCR プライマーの配列を表 1 に示す。

Name	Forward	Reverse	Species
Arid5a	CTGTCCTACGCAACAGACTGG	GAAGTGAGGTGCCGCATAGG	Mouse
Il6	CCAGTTGCCTTCTTGGGACT	GTCTCCTCTCCGGACTTGTG	Mouse
Tnf	ATGGCCTCCCTCTCATCAGT	ATAGCAAATCGGCTGACGGT	Mouse
GAPDH	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	Mouse

表 1 定量 RT-PCR 法で使したプライマー

3-7 全細胞抽出液の調製

回収した細胞を NETN 緩衝液 (50 mM Tris-HCl [pH7.6]、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 % NP-40、1 mM DTT、Complete protease inhibitor cocktail (Roche)) に懸濁可溶化し、氷上で 30 分間静置した。懸濁液を 4°C、15000 rpm で 10 分間遠心により分離し、上清を全細胞抽出液とした。

3-8 免疫沈降

抗-Flag M2 agarose (SIGMA) を NETN 緩衝液で 2 回洗浄し、50 % 懸濁液として使用した。3-7 で調製した全細胞抽出液に上記の 50 % 懸濁液を添加し、4 °C で 2 時間回転混和した。7000 rpm で 1 分間遠心して上清を除去した後、Agarose ビーズを NETN 緩衝液で洗浄した。次に、Agarose ビーズに NETN 緩衝液に溶解した抗原ペプチド溶液 (0.2 mg/mL Flag ペプチド (SIGMA)) を等量加えて結合した Flag タグをもつタンパク質を溶出させた後、4°C、7000 rpm で遠心し、上清を回収した。

3-9 ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE を行った後のゲルをトランスファー緩衝液 (48 mM Tris, 39 mM glycine, 20 % メタノール) に浸け、30 分間振とうした。PVDF membrane (Millipore) は、メタノールで 1 分間振とう後、トランスファー緩衝液で 15 分以上振とうした。Filter paper (Bio-RAD) もトランスファー緩衝液に浸けた。その後、Trans-Blot SD semi-dry electrophoretic transfer cell (Bio-RAD) を用いて、メンブレンにタンパク質を転写させた後、5 % スキムミルク (Gibco) - PBST (PBS+0.1 % Tween20) で 1 時間ブロッキングした。その後、メンブレンを 1 % スキムミルク-PBST で希釈した一次抗体の溶液中で 1 時間振とうさせた。PBST で洗浄後、1 % スキムミルク-PBST で希釈した二次抗体の溶液中で 1 時間振とうさせた。そして、PBST で洗浄後、Chemi-Lumi One Ultra (Nacalai Tesque) で検出を行った。

3-10 抗体

抗-Flag (F1804; Sigma-Aldrich), 抗-Arid5a (customized antibody; Sigma-Aldrich), 抗-Regnase-1 (sc-515275; Santa Cruz Biotechnology), 抗-nucleophosmin (ab15440; Abcam), 抗-KPNA2 (ab84440; Abcam), 抗-Lamin B (PM064; MBL), 抗- α -tubulin (M175; MBL), 抗-UPF1 (sc-166092; Santa Cruz Biotechnology), 抗-UPF2 (D3B10; Cell Signaling Technology), 抗-UPF3a (MBS712426; My Bio Source), 抗-UPF3b (HPA001882; Atlas), 抗-c-Myc (Nacalai Tesque) を一次抗体として使用した。また、goat 抗-rabbit IgG-HRP (sc-2054; Santa Cruz Biotechnology) と goat 抗-mouse IgG-HRP (sc-2005; Santa Cruz Biotechnology) を二次抗体として使用した。

3-11 ELISA

血液中のサイトカインを ELISA 法で用いて計測するために、回収した血液を、4℃、2000rpm で 15 分間遠心により分離し、上清を回収した。マウス IL-6 (Cat #M6000B) と TNF (MTA00B) を R&D システムのプロトコールに従って計測した。

3-12 発現用プラスミド

pmcherry-C1 ベクター (Takara) に Importin- α の NLS 認識部位に結合するアミノ酸配列 (RRRRPRKROLEWDEEPPRKRRLW) (22) が組み込まれている pmcherry-C1-bimax プラスミドを使用した。Arid5a 全長 (1-589) と 1-293、1-450、150-589 アミノ酸残基領域をコードする cDNA の両端に BamH I と Xho I の認識配列をそれぞれ付加し、切断後に pcDNA3.1 プラスミドベクターに組み入れた。Arid5a の N 末端には Flag タグが付くように構築した。UPF1 全長 cDNA の両端に BamH I と Xho I の認識配列をそれぞれ付加し、pcDNA3.1 プラスミドベクターに組み入れた。UPF1 の N 末端には Myc タグが付くように構築した。それぞれのプラスミドは、DH5 α (NIPPON gene) に導入して単離した。

3-13 免疫染色

3.7 %ホルムアルデヒド-PBS で細胞を 10 分間固定した後、PBS で洗浄した。抗体が膜透過できるようにするために 0.5 % Triton-PBS で 5 分間処理した。その後、3 %スキムミルク (Nacalai Tesque) -PBS で 30 分間ブロッキングした。ブロッキング後、3 %スキムミルク-PBS で希釈した一次抗体の溶液中で 24 時間、4 °C で静置した。PBS で洗浄後、3 %スキムミルク-PBS で希釈した二次抗体の溶液中で 1 時間、暗室内室温で静置した。続いて、PBS で洗浄し、100 nM 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 溶液中で 10 分間、静置後、スライドガラスにマウントし、Microsystems TCS SP8 顕微鏡 (Leica) で観察した。

3-14 核と細胞質の分画

NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagent kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。細胞に溶出液 I を 100 μ L、プロテアーゼ阻害剤 (Nacalai Tesque) を 0.1 μ L 加えた。氷上で 10 分間静置した後、溶液 II を 5.5 μ L 加え、撹拌した。その後、懸濁液を 4℃、15000 rpm で 5 分間遠心により分離した。遠心後の上清を細胞質画分とした。上清を取り除いたサンプルに核溶出液を 50 μ L、プロテアーゼ阻害剤 0.05 μ L を加えて懸濁して氷上で静置し、10 分毎に撹拌を 4 回繰り返した。その後 4℃、15000 rpm で 5 分間遠心により分離を行い、その上清を核画分とした。それぞれの画分に 2×サンプルバッファーを等量加え、95 °C で 5 分間、熱処理後、ウェスタンブロッティングにより解析した。

3-15 核および細胞質の分離と RNA 免疫沈降

核および細胞質画分を得るために、細胞を 100 U / mL RNase OUT (Invitrogen) およびプロテアーゼ阻害剤を加えた分画緩衝液 (10 mM Tris-HCl [pH7.6]、10 mM NaCl、3 mM MgCl₂、0.5% NP40) に懸濁し 4℃、10 分間静置した。細胞懸濁液を 4℃、3300 rpm で 5 分間遠心により分離し、上清 (細胞質画分) を回収した。核を含む沈殿を TSE 緩衝液 (10 mM Tris [pH7.6]、300 mM スクロース、1 mM エチレンジアミン四酢酸、0.1% NP-40) で 1 回洗浄した。100 U / mL RNase OUT およびプロテアーゼ阻害剤を加えた TSE 緩衝液を氷上で 20 分間静置した後、4℃、15000 rpm で 10 分間遠心により分離し、上清を核分画とした。分画後のサンプルに、Protein G sepharose と抗体を加え、4℃で 12 時間回転混和させた。その後、それぞれの緩衝液で 1 度洗浄し、RNA を TRIzol で分離した。

3-16 統計解析

データは Student' s t-test を用いて有意差検討を行った。アスタリスク(*)1 つは $p < 0.05$ で、2 つは $p < 0.01$ である。また、LPS 刺激後の野生型および Arid5a 過剰発現マウスの生存率のデータは Log-rank test を用いて有意差検定を行った。

4. 結果

4-1 CAG プロモーターを用いた Flag-Arid5a 過剰発現マウスの作製

過剰に産生された IL-6 は関節リウマチやキャッスルマン病などの炎症性疾患と関係することが知られており (23)、Arid5a の過剰発現が IL-6 の過剰産生を誘導し、炎症性疾患を誘発するのかを調べるために、Arid5a 過剰発現マウスを作製した。まず、上流に CAG プロモーターを持つ Flag-Arid5a 発現プラスミドを設計した (図 4 A)。CAG プロモーター、Flag-Arid5a と polyA 鎖が含まれる Sac I と Kpn I により切断された DNA 断片を受精卵に挿入し、偽妊娠雌マウスに移植した。その後、64 匹のマウスが生まれた。その中から Arid5a 過剰発現マウスを同定するために、Flag タグと Arid5a を認識するプライマーセットを用いて PCR を行った。PCR には DNA テンプレートとして 64 匹から採取した尾を使用した。その中で、64 匹中 11 匹に Flag-Arid5a が導入されていた。樹立された TG マウスで Arid5a が過剰発現しているかを調べるために、Arid5a を認識するプライマーで定量 RT-PCR を行った。その結果、Arid5a mRNA の発現は、野生型の Arid5a の mRNA 発現量を 1 としたとき、TG マウス 1 で 32 倍、TG マウス 2 で 28 倍上昇していることを確認した (図 4 B, C)。さらに、TG マウスの心臓、腎臓、肝臓、リンパ節、脳、脾臓、大腸、小腸、肺の各組織で Arid5a が過剰に発現していることを確認するために、野生型と TG マウスより組織を採取し Arid5a mRNA の発現を定量 RT-PCR 法で解析した。野生型マウスから回収した腎臓の Arid5a mRNA の発現を 1 とし、野生型や TG マウスより回収した組織の Arid5a mRNA の発現量を比較した。その結果、野生型と比較して、TG マウスより採取した組織では Arid5a mRNA の発現が増加していることを確認した (図 4 D)。次に、炎症性サイトカインの産生に重要なマクロファージで Flag-Arid5a が過剰発現しているかを調べた。野生型や TG マウスに 4 %チオグリコレート培地を注射して、マウスの腹腔内に炎症を誘導し、3 日後に腹腔マクロファージを回収した。回収した腹腔マクロファージの一部を LPS で 6 時間刺激した。それぞれの細胞より細胞抽出液を調製後、Flag-agarose ビーズで免疫沈降を行い、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、LPS 刺激後の TG マウス由来のサンプルのみ、Flag-Arid5a のバンドを検出することが出来た (図 4 E)。以上の結果より、Arid5a 過剰発現マウスの樹立を確認することができた。

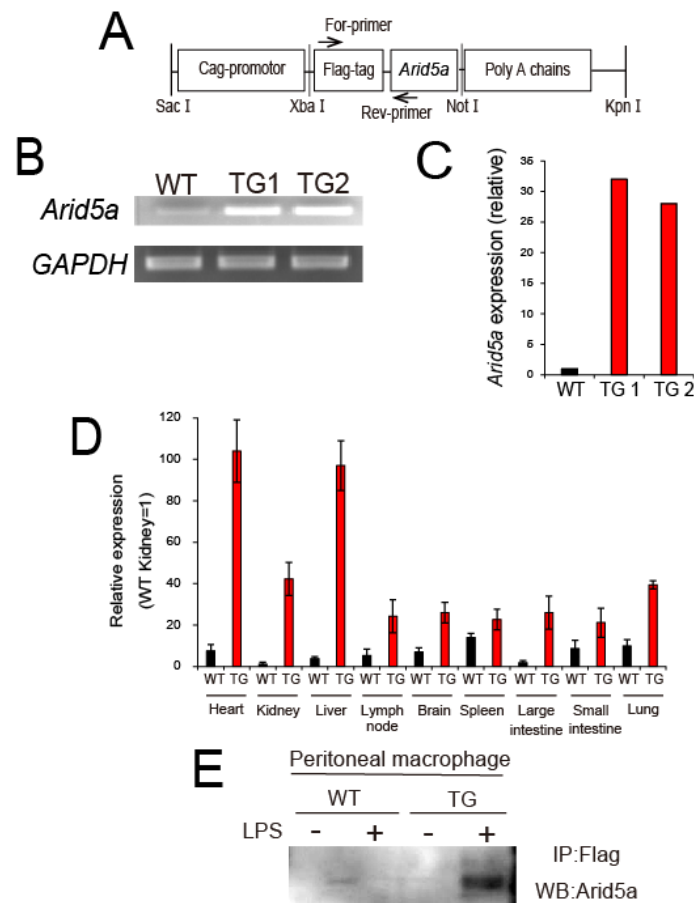


図4 CAG プロモーターを用いた Flag-Arid5a 過剰発現マウスの作製

(A) Flag-Arid5a 過剰発現マウス作製のコンストラクト。CAG プロモーターはサイトメガロウイルスエンハンサー、チキン β -アクチンプロモーターとウサギ β -グロビン遺伝子の polyA 鎖を含むベクターである。Flag と Arid5a を認識するプライマーを矢印で示した。(B, C) *Arid5a* の mRNA を認識するプライマーを用いて、定量 RT-PCR を行った。標準化は *GAPDH* mRNA の発現量で行った。(D) 野生型と TG マウスの各組織を採取し、*Arid5a* の mRNA 発現量を定量 RT-PCR 法で解析した。標準化は *GAPDH* mRNA の発現量で行い、野生型腎臓での発現を 1 とした。エラーバーは標準誤差で示した。(E) 野生型と TG マウスからチオグリコレート培地で誘導した腹腔マクロファージを回収した。その後、LPS (100 ng/mL) で刺激を 6 時間行った。それぞれの細胞を NETN 緩衝液で懸濁可溶化し細胞抽出液を調製した後、Flag-agarose ビーズで免疫沈降を行い、Arid5a の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

4-2 健常時において、過剰発現させた *Arid5a* は炎症性サイトカインの産生に影響しない

病原体排除に重要な免疫細胞であるマクロファージを用いて *Arid5a* 過剰発現による炎症性サイトカイン *Il6* や *Tnf* の mRNA 発現量への影響を調べた。6-8 週令の野生型および TG マウスに 4 %チオグリコレート培地を注射し、誘導された腹腔マクロファージを用いて定量 RT-PCR を行った。その結果、TG マウスから回収した腹腔マクロファージでは野生型と比較して、約 35 倍の *Arid5a* mRNA の発現がみられた(図 5 A)。しかしながら、当初の予想に反し、炎症性サイトカインである *Il6* や *Tnf* の mRNA 量の差は確認できなかった(図 5 B, C)。また、血中の炎症性サイトカイン量に変化があるのかを調べるために ELISA 法を用いて計測を行った。その結果、血中に分泌される IL-6 と TNF のタンパク質量も野生型と TG マウスの間で差が見られなかった(図 5 D, E)。以上の結果より、健常時において、過剰発現させた *Arid5a* は炎症性サイトカインの産生に影響しないことが明らかになった。

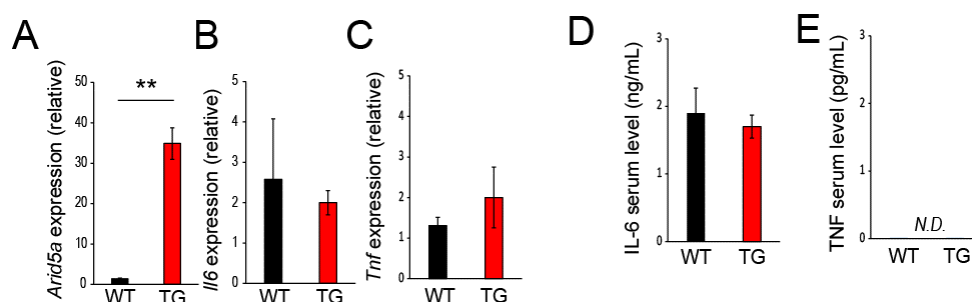


図 5 健常時において、過剰発現させた *Arid5a* は炎症性サイトカインの産生に影響しない

(A-C) 6-8 週令の野生型および TG マウスに 4 %チオグリコレート培地を注射し、誘導された腹腔マクロファージを用いて、(A) *Arid5a*、(B) *Il6*、(C) *Tnf* の mRNA を定量 RT-PCR 法で計測した。標準化は *GAPDH* mRNA の発現量で行った。それぞれ 3 回独立して実験を行い、エラーバーは標準偏差で示した。また、有意差検定として Student's t-test を行い、 $p < 0.01$ を**で示した。(D、E) 野生型や TG マウスの血中の (D) IL-6 と (E) TNF を ELISA 法により計測した。それぞれ 3 回独立して実験を行い、エラーバーは標準偏差で示した。N. D. は not detected である。

4-3 Arid5a 過剰発現マウスでは野生型と比較して、炎症応答における IL-6 や TNF の産生量が増加し、敗血症性ショックが悪化する

Arid5a の過剰発現が LPS 刺激による炎症性サイトカインの産生量を増加させるのかを調べた。6-8 週令の野生型および TG マウスの腹腔に LPS を注射し、0、2、6、12、24 時間後の血液を採取した。その後、血清を回収し、炎症性サイトカイン濃度を ELISA 法により計測した。その結果、野生型マウスと比較して、TG マウスでは LPS 刺激 2 時間後の血中の IL-6 や TNF が有意に増加していた(図 6 A, B)。炎症性サイトカインが過剰産生されることで敗血症性ショックが引き起こされることが知られている。そこで、Arid5a の過剰発現が敗血症性ショックに影響を及ぼすのか調べた。6-8 週令の野生型および TG マウスの腹腔に LPS を注射すると、TG マウスでは 48 時間以内に生存率が 50 % まで低下したが、野生型マウスには変化が見られなかった(図 6 C)。以上の結果より、TG マウスでは野生型と比較して LPS 刺激による IL-6 や TNF の産生が増加し、敗血症性ショックが悪化することが判明した。

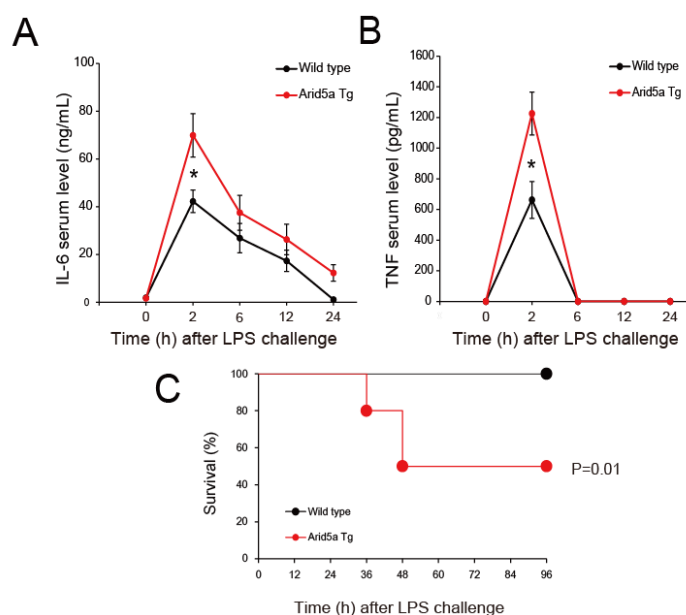


図 6 Arid5a 過剰発現マウスでは、野生型と比較して、炎症応答における IL-6 や TNF の産生量が増加し、敗血症性ショックが悪化する

(A, B) 6-8 週令の野生型 (n=3) と TG マウス (n=3) の腹腔に LPS (5 mg/kg) を注射し、血中の炎症性サイトカイン (A) IL-6 と (B) TNF を ELISA 法により計測した。それぞれ 3 回独立して実験を行い、エラーバーは標準偏差で示した。また、有意差検定として Student's t-test を行い、 $p < 0.05$ を*で示した。(C) 6-8 週令の野生型 (n=10) と TG マウス (n=10) の腹腔に LPS (12.5 mg/kg) を注射し、生存率を計測した。グラフは Kaplan-Meier 曲線で示し、有意差検定は Log-rank test で行い、p 値は 0.01 であった。

4-4 Arid5a の過剰発現は LPS 刺激後、腹腔マクロファージにおける炎症性サイトカインの産生を増加させる

TG マウスではどのように炎症性サイトカインが増加するのか調べるため、野生型および TG マウスから 4 %チオグリコレート培地で誘導された腹腔マクロファージを調製して実験を行った。腹腔マクロファージを LPS で 0、1、2、4、8 時間刺激し、mRNA を回収した。*Arid5a*、*Il6*、*Tnf* の mRNA 量を定量 RT-PCR 法を用いて計測した。その結果、野生型と比較して、Arid5a 過剰発現腹腔マクロファージでは LPS 刺激後の *Arid5a* の mRNA 発現量は 0、1、2、4、8 時間後で有意に増加することが示された。一方、*Il6* の mRNA 発現量は 4 時間後で有意に増加が見られ、*Tnf* の mRNA 発現量は 2、4 時間後で有意に増加することがわかった(図 7 A-C)。

また、野生型、Arid5a 過剰発現腹腔マクロファージが産生する炎症性サイトカイン量を調べるために、それぞれの細胞を LPS で 8 時間刺激した後、細胞培養上清中の IL-6 と TNF 量を ELISA 法で計測した。その結果、*In vivo* の結果と一致して、TG マウスから回収した腹腔マクロファージでは *Il6* と *Tnf* の濃度が有意に増加していた(図 7 D、E)。以上の結果より、Arid5a 過剰発現腹腔マクロファージでは、炎症性サイトカインである *Il6* と *Tnf* の mRNA ならびに IL-6 と TNF のタンパク質量が増加することがわかった。

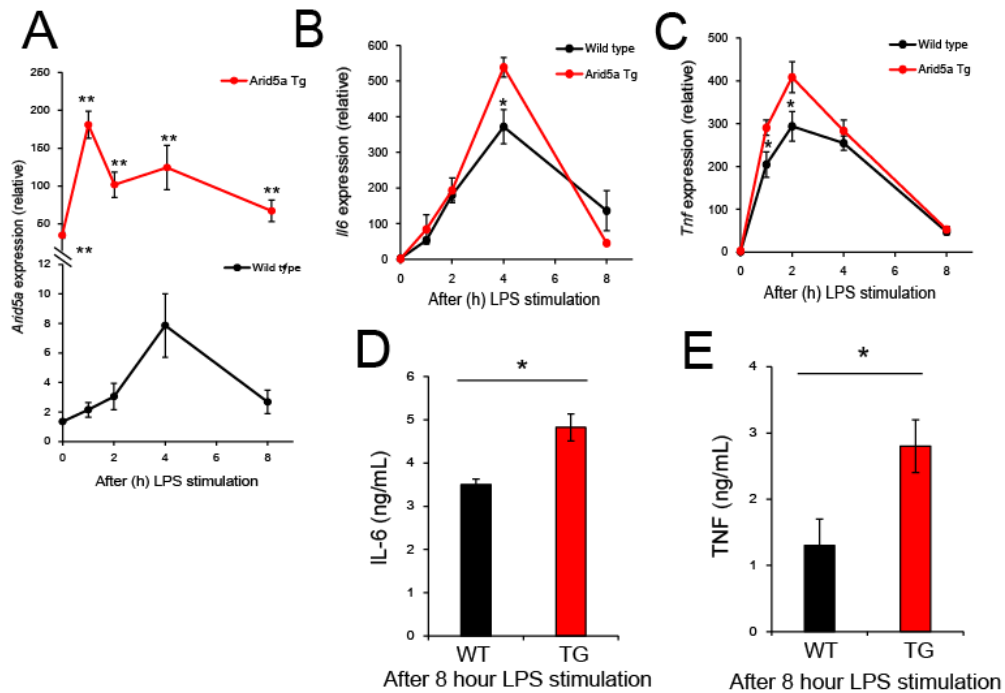


図7 Arid5a の過剰発現はLPS 刺激後の腹腔マクロファージにおける炎症性サイトカインの産生を増加させる

(A-C) 6-8 週令の野生型および TG マウスより回収した腹腔マクロファージに LPS 刺激(100 nM)を行った。その後、(A) *Arid5a*、(B) *Il6*、(C) *Tnf* の mRNA 量を定量 RT-PCR 法で解析した。標準化は *GAPDH* mRNA の発現量で行った。それぞれ 3 回独立して実験を行い、エラーバーは標準偏差で示した。また、有意差検定として Student' s t-test を行い、 $p < 0.05$ を*、 $p < 0.01$ を**で示した。(D、E) LPS 刺激 8 時間後の細胞培養上清中の (D) IL-6 と (E) TNF の量を ELISA 法で計測した。それぞれ 3 回独立して実験を行い、エラーバーは標準偏差で示した。また、有意差検定として Student' s t-test を行い、 $p < 0.05$ を*で示した。

4-5 内在性の Arid5a は主に核内、Regnase-1 は細胞質に局在する

先行研究で、Arid5a が核内タンパクと結合すること(24-26)、Regnase-1 は細胞質に局在すること(6)が分かっている。しかしながら、これらの研究では、タグ付きタンパク質を細胞に発現させて確認を行っており、内在性の Arid5a の局在は未だ報告がない。また、病原体排除に重要であるマクロファージにおける Arid5a や Regnase-1 の局在はこれまで調べられていない。そこでまず、マウスマクロファージ由来の RAW264.7 細胞を用いて、内在性の Arid5a と Regnase-1 のタンパク質局在を免疫染色により調べた。その結果、Arid5a は主に核内に局在し、Regnase-1 は細胞質に局在することを明らかにした(図 8A)。また、図 8A より、Arid5a が核小体に局在することが示唆されたため、核小体の外郭を形成する nucleophosmin(NPM) と共局在するのを調べた。その結果、NPM の内側に Arid5a が強く局在することが示された(図 8B)。以上の結果より、内在性の Arid5a は主に核内の核小体部分に局在し、Regnase-1 は細胞質に局在することが示された。

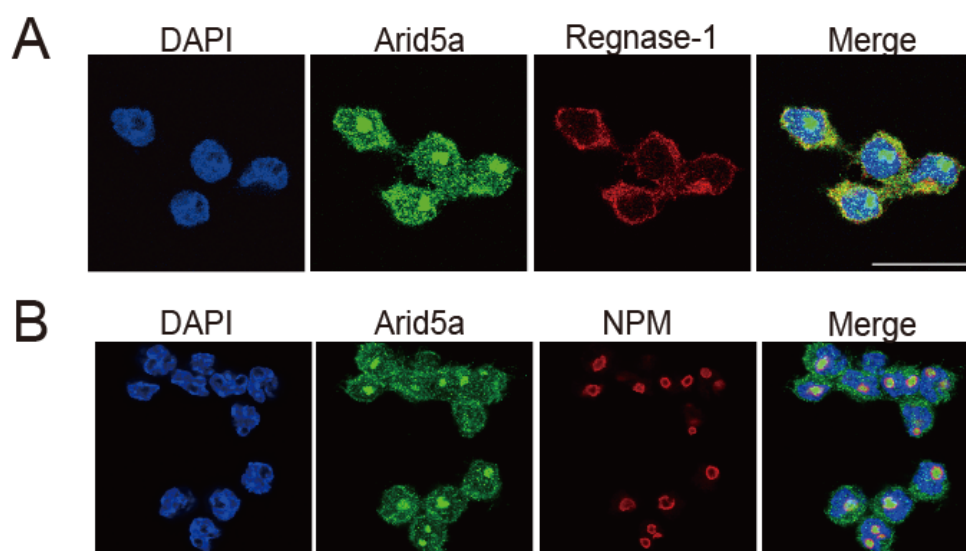


図 8 内在性の Arid5a は主に核内、Regnase-1 は細胞質に局在する

(A) RAW264.7 細胞をホルムアルデヒドで固定し、細胞膜透過処理後、各抗体を用いて、免疫染色を行った。核は DAPI で染色した。抗体は Arid5a(緑)、Regnase-1(赤)に対する抗体を用いた。スケールバーは 10 μ m である。
(B) RAW264.7 細胞をホルムアルデヒドで固定し、細胞膜透過処理後、各抗体を用いて、免疫染色を行った。核は DAPI で染色した。抗体は Arid5a(緑)、nucleophosmin(赤)に対する抗体を用いた。スケールバーは 10 μ m である。

4-6 Arid5a は Importin- α / β 1 経路を介して核内移行する

Arid5a が核内に局在することが図 8 で示されたので、次にどのような経路で Arid5a が核内に移行するのかを調べた。Arid5a のアミノ酸配列中に古典的核局在シグナル (nuclear localization signal:cNLS) が含まれているかを cNLS mapper を用いて予測した。その結果、ヒトやマウスの Arid5a で cNLS が予測され、さらにその配列は保存されていることがわかった(表 2)。

Species	Predicted bipartite NLS		
	Position	Sequence	Score
<i>Homo sapiens</i>	497	SKRSLEEEGAAHSGKRLRA	11.3
<i>Mus musculus</i>	438	SKRGLEEEGFAHGGKKLRA	8.5

Score>7

表 2 Arid5a 内の cNLS mapper による検索の結果

次に、Importin- α の NLS 認識部位に結合するペプチドを発現させることが出来る bimax ベクター (22) を細胞内に強制発現させることで、Arid5a の核内移行に影響があるのかを検討した。RAW264.7 細胞に、bimax 発現ベクターを導入した後、ウエスタンブロッティングを行うことで Arid5a の核内輸送が阻害されるかを調べた。その結果、Importin- α 結合阻害ペプチドを発現させることにより、核内の Arid5a は減少した(図 9 A)。また、独立した実験を 3 回行い、核内 Arid5a のバンドを Image J で定量した。その結果、空ベクターを発現させた RAW264.7 細胞と比較して、bimax ベクターを発現させた RAW264.7 細胞の核内の Arid5a は有意に減少していた(図 9 B)。次に、bimax ベクターの発現は KPNA2 (Importin- α ファミリーの 1 つ) を介した核内への輸送を阻害するという報告があるので (21)、Arid5a が KPNA2 と相互作用するのかを確かめた。HEK293T 細胞に、Flag-Arid5a を発現させ、細胞抽出液を調製した。その後、Flag-agarose ビーズで免疫沈降を行い、ウエスタンブロッティングを行った。Flag-Arid5a を発現させた細胞の抽出液を用いた時に KPNA2 が共沈したことから Flag-Arid5a は KPNA2 と相互作用することが明らかになった(図 9 C)。以上の結果より、Arid5a は Importin- α / β 1 経路を介して核内に輸送されていることが示唆された。

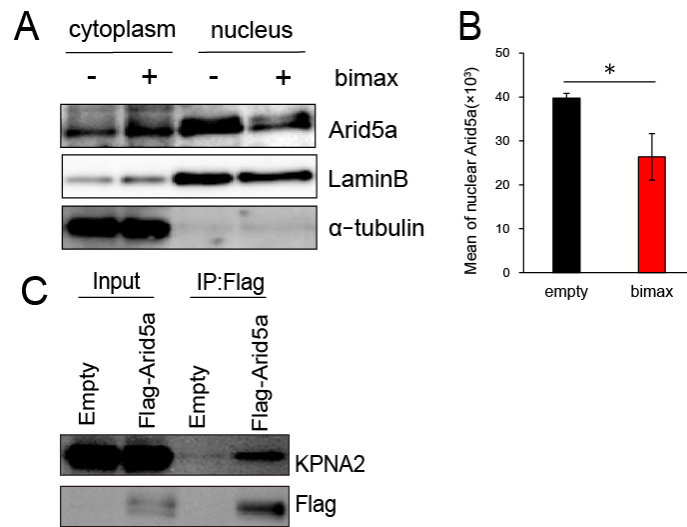


図 9 Arid5a は Importin- α/β 1 経路を介して核内移行する

(A,B) RAW264.7 細胞に、bimax (Importin- α の NLS 認識部位に結合するペプチド) を発現させることが出来るベクターあるいは空ベクターを導入した。24 時間後、細胞質画分と核画分に分画し、ウエスタンブロッティングを行った。Lamin B と α -tubulin をそれぞれ核と細胞質のマーカータンパク質として用いた。3 回独立した実験を行い、核の Arid5a のバンドを Image J で定量した。エラーバーは標準偏差で示した。有意差検定として Student's t-test を行い、 $p < 0.05$ を*で示した。(C) HEK293T 細胞に、Flag-Arid5a 過剰発現ベクターを導入した。24 時間後、細胞を NETN 緩衝液で懸濁可溶化し、細胞抽出液を Flag-agarose ビーズで免疫沈降後、Flag 抗体と KPNA2 抗体を用いて、ウエスタンブロッティングを行った。

4-7 Arid5a は LPS 刺激依存的に核内で減少し、細胞質で増加する

これまで Arid5a は核内に局在していることが報告されていたが、図 9 A の結果から、実際は細胞質にも存在していることが判明した。このことは、Arid5a が核と細胞質の間を行き来している可能性を示唆している。そこで、LPS 刺激における Arid5a の局在変化について調べた。まず、RAW264.7 細胞に LPS 刺激を行い、4 時間後、免疫染色を行ったところ、核内の Arid5a の減少が観察された(図 10 A)。また、細胞質および核内 Arid5a の蛍光強度を定量することで核-細胞質比を計測した結果、LPS 刺激前は Arid5a の核内の比率が高かったが刺激後では比がほぼ 1 になった(図 10 B)。次に RAW264.7 細胞と上記の方法で誘導した腹腔マクロファージをそれぞれ LPS で各時間刺激し、その細胞を核と細胞質に分画した後、ウエスタンブロッティングを行った。Lamin B は核タンパク質で、 α -tubulin は細胞質タンパク質でそれぞれコントロールタンパク質として

用いた。RAW264.7 細胞の核内 Arid5a は LPS で刺激 2 時間後より減少し始め、細胞質では増加し始めた。また、マウスの腹腔マクロファージでは 6 時間後より減少し始め、細胞質では増加し始めた。(図 10 C, D)。以上の結果より、Arid5a は LPS 刺激依存的に核内で減少し、細胞質で増加することが判明した。

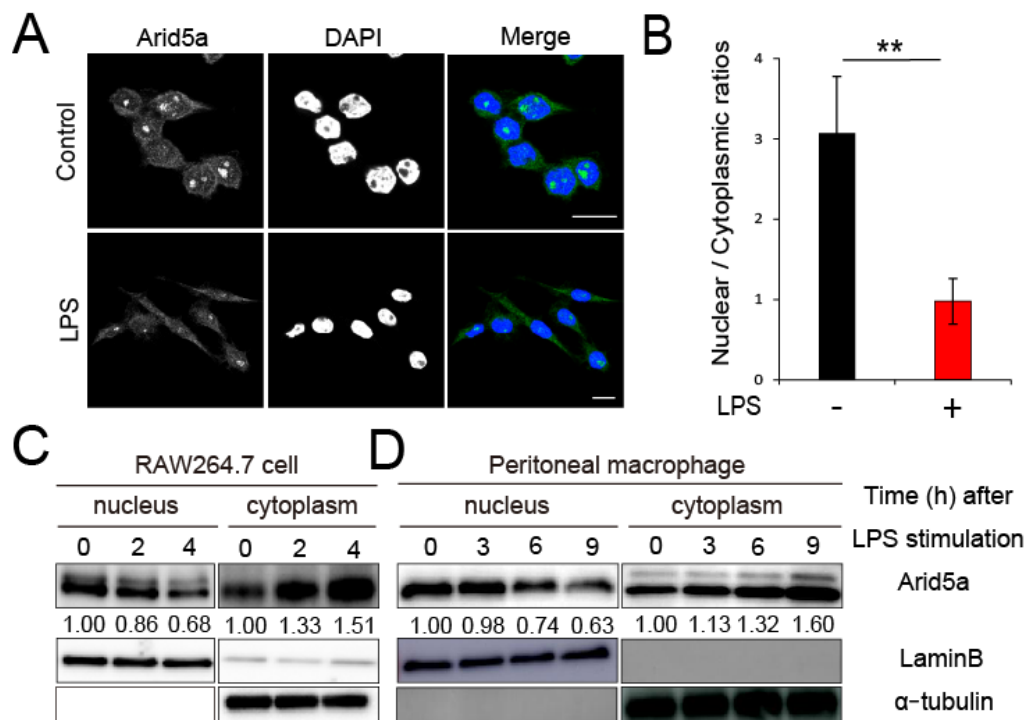


図 10 Arid5a は LPS 刺激依存的に核内で減少し、細胞質で増加する

(A) RAW264.7 細胞に LPS (500 nM) 刺激を 4 時間行い、その後、細胞はホルムアルデヒドで固定し、細胞膜透過処理後、Arid5a の抗体を用いて、免疫染色を行った。核は DAPI で染色した。スケールバーは 10 μ m である。(B) 未刺激と LPS 刺激後の細胞質と核内の Arid5a の蛍光強度を定量し、核-細胞質比を計測した (n=50)。エラーバーは標準誤差で示した。また、有意差検定として Student's t-test を行い、 $p < 0.01$ を**で示した。(C) RAW264.7 細胞は LPS (500 nM) 刺激を 2 時間あるいは 4 時間行い、その後、核と細胞質画分を調製し、ウエスタンブロッティングを行った。Arid5a のバンドを Image J で定量し、0 時間の Arid5a の値を 1.00 として、それぞれタンパク質量を示した。(D) マウス腹腔マクロファージ細胞は LPS (100 nM) 刺激を 3 時間、6 時間、9 時間行い、その後、核と細胞質画分を調製し、ウエスタンブロッティングを行った。また、Arid5a のバンドを Image J で定量し、0 時間の Arid5a の値を 1.00 として、それぞれタンパク質量を示した。

4-8 細胞質と核の Arid5a はそれぞれ LPS 刺激後に *I/6* mRNA と結合する

次に、LPS 刺激後に *I/6* mRNA がどのように変化するかを調べた。RAW264.7 細胞に LPS 刺激を行い、その後、核と細胞質画分を調製し、その細胞分画液より mRNA を抽出し、定量 RT-PCR 法を用いて、*I/6* mRNA 量を調べた。その結果、核画分では、LPS 刺激 1 時間後で *I/6* mRNA が検出され、4 時間後では増加していた。細胞質では 4 時間後に初めて検出された(図 11 A)。次に、Arid5a と *I/6* mRNA が結合するのかを RNA 免疫沈降法で調べた。RAW264.7 細胞に LPS 刺激を 4 時間行い、その細胞を核と細胞質に分画した。その細胞分画液に Arid5a 抗体あるいはコントロールとして IgG 抗体を加えて免疫沈降を行った。その後、沈降した複合体から RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法を用いて *I/6* mRNA 量を計測した。その結果、細胞質と核の Arid5a はそれぞれ刺激後に *I/6* mRNA と結合することが明らかになった(図 11 B)。

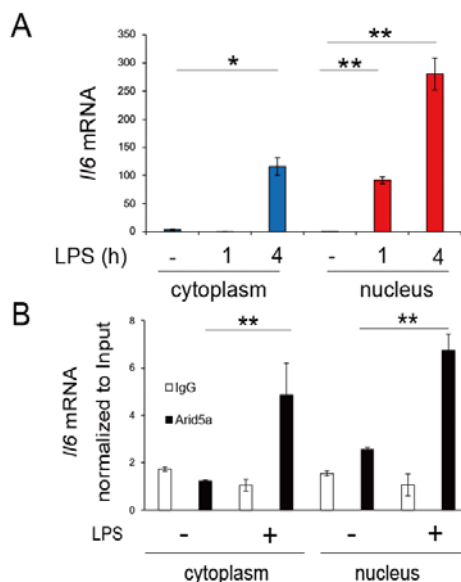


図 11 細胞質と核の Arid5a はそれぞれ LPS 刺激後に *I/6* mRNA と結合する

(A) RAW264.7 細胞を LPS (100 ng/mL) で 1、4 時間刺激した。その後核と細胞質画分を調製し、その中の *I/6* mRNA 量を定量 RT-PCR 法で解析した。標準化は *GAPDH* mRNA の発現量で行った。それぞれ 3 回独立して実験を行い、エラーバーは標準誤差で示した。また、有意差検定として Student's t-test を行い、 $p < 0.05$ を*、 $p < 0.01$ を**で示した。(B) 未刺激、LPS (100 ng/mL) 刺激 4 時間後の RAW264.7 細胞を細胞質と核に分画し、Arid5a 抗体あるいはコントロール IgG を用いて免疫沈降を行った。それぞれの免疫沈降産物から分離された RNA を定量 RT-PCR 法により解析した。それぞれ 3 回独立して実験を行い、エラーバーは標準誤差で示した。また、有意差検定として Student's t-test を行い、 $p < 0.01$ を**で示した。

4-9 レプトマイシン B は LPS 刺激後に起こる Arid5a の核外移行を阻害する

図 10 の C と D より、LPS 刺激後に Arid5a が細胞質で増加することがわかった。次にその増加がどのようにして起こるかを調べた。先行研究で核外移行分子 CRM1 の阻害剤であるレプトマイシン B (LMB) は IL-6 の産生を抑制することが知られていた (27)。したがって、Arid5a は CRM1 依存的に核外移行するのではないかと考えた。しかしながら、Arid5a のアミノ酸配列中には核外輸送シグナル (NES) が見いだされなかった。そこで、Arid5a は別のタンパク質と結合することで核外輸送される可能性があると考えた。その中で、RNA 品質管理に係る UPF1 には NLS や NES の存在が確認されており、CRM1 を介してシャトリングしていること (9, 10)、UPF1 は Regnase-1 と結合すること (7) が分かっている。そこで Arid5a が UPF1 と結合することで細胞質に移行するのではないかと仮定し、まず LPS 刺激後に起こる Arid5a の核外移行がレプトマイシン B により阻害されるのかを検討した。

RAW264.7 細胞を LPS で 4 時間刺激、LMB で 2 時間処理、あるいは LPS 刺激 2 時間後に LMB を 2 時間加え、それらの細胞の免疫染色を行った。まず、UPF1 がこれまでの報告と一致して、LMB 処理により核外に移行しにくくなっていることを確認した。Arid5a は LPS の刺激で核外に移行しやすくなるが、LPS 刺激 2 時間後に LMB を加えることで核外に移行しにくくなっていることが明らかになった (図 12 A)。また、核内の Arid5a の蛍光強度を計測することで、Arid5a の定量を行った。この結果においても、LPS 刺激後の核内 Arid5a の減少が LPS 刺激後に LMB で処理することで抑えられることが分かった。また、LMB 処理だけでは核内 Arid5a の量には変化がなかった (図 12 B)。以上の結果より、LMB は Arid5a の刺激後に起こる核外移行を阻害することが分かった。

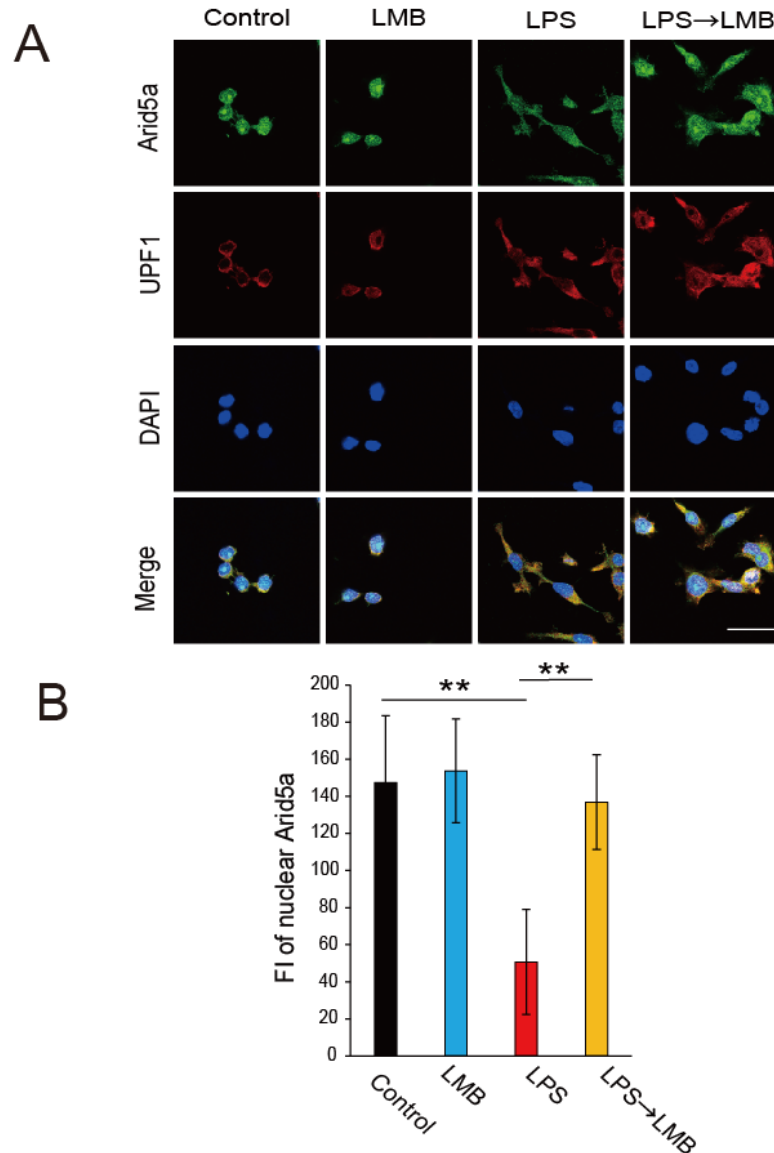


図 12 レプトマイシン B は LPS 刺激後に起こる Arid5a の核外移行を阻害する

(A) RAW264.7 細胞を LPS (500 nM) で 4 時間、LMB (10 nM) で 2 時間、あるいは LPS (500 nM) で 2 時間処理した後 LMB (10 nM) で 2 時間処理した。その後、細胞をホルムアルデヒドで固定し、細胞膜透過処理後に Arid5a 抗体 (緑) と UPF1 抗体 (赤) を用いて免疫染色を行った。核は DAPI で染色した。スケールバーは 10 μ m で示す。(B) 核内の Arid5a の蛍光強度を計測した (n=50)。エラーバーは標準誤差で示した。また、有意差検定として Student's t-test を行い、 $p < 0.01$ を**で示した。

4-10 レプトマイシン B は LPS 刺激後の IL-6 の産生を抑制する

つぎに、LMB 処理が LPS 刺激後の IL-6 の産生を減少させるのかを調べた。RAW264.7 細胞を LPS 刺激 4 時間、あるいは LPS 刺激 2 時間後に LMB を 2 時間加えた後の細胞培養上清中の IL-6 産生量を ELISA 法で計測した。LMB を加えた細胞上清中では加えない細胞と比較して、IL-6 の産生が有意に減少していた(図 13)。以上の結果より、RAW264.7 細胞において、LMB は LPS 刺激による IL-6 の産生を抑制することが判明した。

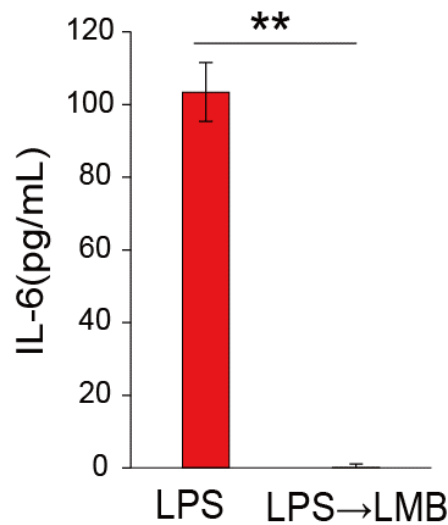


図 13 レプトマイシン B は LPS 刺激後の IL-6 の産生を減少させる

RAW264.7 細胞を LPS (500 nM) で 4 時間、あるいは LPS (500 nM) で 2 時間処理した後、LMB (10 nM) で 2 時間処理した後、細胞上清中の IL-6 産生量を ELISA 法で計測した。また、有意差検定として Student's t-test で行い、 $p < 0.01$ を**で示した。

4-11 Arid5a は UPF1 と相互作用する

図 12 より、レプトマイシン B は LPS 刺激後に起こる Arid5a の核外移行を阻害することが判明した。次に Arid5a が UPF1 と結合することで細胞質に移行するのではないかと仮定し、Arid5a が UPF1 と相互作用をするのかを検討した。

まず、RAW264.7 細胞中で内在性の Arid5a と UPF1 が相互作用しているかを調べた。NETN 緩衝液を用いて RAW264.7 細胞抽出液を調製し、Arid5a 抗体あるいはコントロール IgG 抗体と protein G Sepharose を加えて免疫沈降を行った後、ウエスタンブロッティングを行った。Arid5a の抗体により Arid5a が沈降することが確認された。UPF1 はコントロール IgG 抗体では検出されなかったが、Arid5a 抗体では共沈降した。また、UPF1 は UPF2 や UPF3a、UPF3b と複合体を形成することが知られていたので、Arid5a の抗体での共沈降を調べると、それらのタンパク質も共沈降していることが分かった(図 14 A)。以上の結果から、Arid5a は UPF ファミリー (UPF1、UPF2、UPF3a と UPF3b) と相互作用することが示された。

次に、Flag-Arid5a と Myc-UPF1 を細胞内に共発現させることで相互作用を調べる実験を行った。HEK293T 細胞に、Flag-Arid5a と Myc-UPF1 を単独、もしくは共発現させた。それらの細胞から NETN 緩衝液で細胞抽出液を調製し、FLAG-agarose ビーズで免疫沈降し、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、Flag-Arid5a を発現させたサンプルではそれぞれ Flag-Arid5a の沈降を確認することが出来た。Myc-UPF1 は Flag-Arid5a と共発現させたサンプルのみバンドが検出された(図 14 B)。以上の結果より、Flag-Arid5a と Myc-UPF1 は相互作用することが確認できた。次に Arid5a と UPF1 の結合領域を調べるために、Flag-Arid5a あるいは欠損した Arid5a(1-293、1-450、150-589) (図 14C) と Myc-UPF1 を HEK293T 細胞に発現させ、NETN 緩衝液で細胞抽出液を調製し、FLAG-agarose ビーズで免疫沈降した後ウエスタンブロッティングを行った。その結果、1-450、1-293 アミノ酸領域の Flag-Arid5a では全長 Flag-Arid5a と同様に Myc-UPF1 の共沈降が検出できたが、150-589 アミノ酸領域の Flag-Arid5a では Myc-UPF1 の共沈降が検出できなかった(図 14 D)。したがって、Arid5a は 1-150 アミノ酸領域を介して UPF1 と相互作用していることが明らかになった

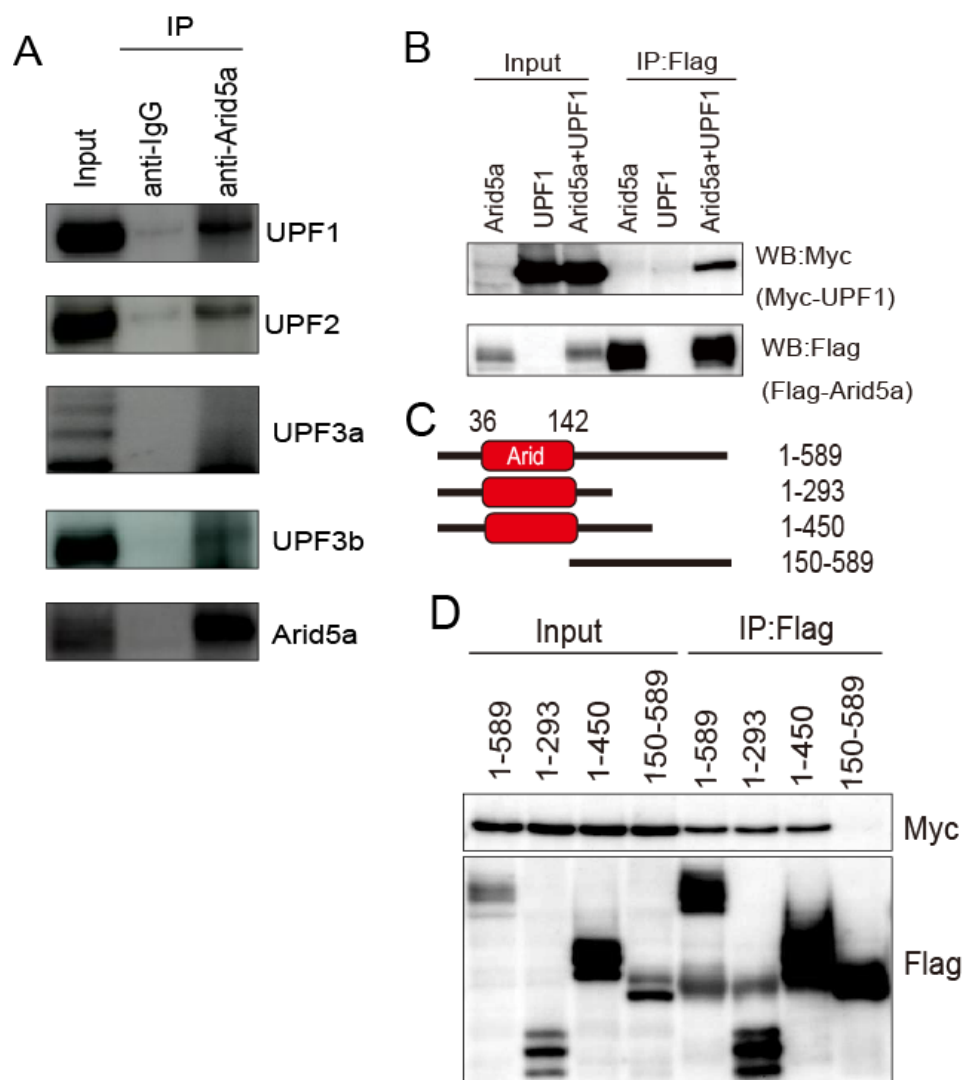


図 14 Arid5a は UPF1 と相互作用する

(A) RAW264.7 細胞を NETN 緩衝液で可溶化し、細胞抽出液を調製した。さらに Arid5a 抗体あるいは IgG 抗体をそれぞれ加え、免疫沈降を行った。その後、ウエスタンブロッティングを行い、それぞれの抗体で検出した。(B) HEK293T 細胞に Flag-Arid5a と Myc-UPF1 を単独もしくは共発現させた。トランスフェクション 24 時間後に細胞抽出液を調製し、Flag-agarose ビーズを加え、免疫沈降を行った。その後、ウエスタンブロッティングを行い、それぞれの抗体で検出した。(C) Arid5a 欠損変異体の模式図を示した。赤いボックスは Arid ドメインである。(D) HEK293T 細胞に種々の Flag-Arid5a (1-589 [全長]、1-293、1-450、150-589) と Myc-UPF1 を共発現させた。その後、NETN 緩衝液を用いて細胞抽出液を調製し、Flag-agarose ビーズで免疫沈降を行った。ウエスタンブロッティングには FLAG 抗体と Myc 抗体を用いた。

4-12 モデル図

図 15 に、LPS 刺激前と後における IL-6 の産生機構の制御機構に関するモデルを示した。未刺激状態では RNA 分解分子である Regnase-1 は細胞質に局在し、RNA 安定化分子 Arid5a は Importin- α/β 経路を介して核内に移行し、核局在している。一方、UPF1 は細胞質と核内をシャットリングしている。この安定化分子と分解分子が核—細胞質間にそれぞれ分かれて局在することで不要な IL-6 の産生が抑えられていると考えられる。しかし、病原体が侵入すると、その排除のためには免疫細胞自身がまず病原体を認識する必要がある。病原体を認識する受容体として TLR が同定されており、細菌の外膜成分である LPS は TLR4 によって認識される。LPS と TLR4 が結合することで、その下流のシグナル伝達系が活性化され、炎症応答が起こる。その後、活性化された転写因子 NF- κ B により、*Il6* の mRNA が誘導され、誘導された *Il6* mRNA は核内で Arid5a と結合する。その後、UPF1 と結合し、CRM1 を介して核外に移行すると考えられる。細胞質では、*Il6* mRNA に Arid5a が結合しているため、Regnase-1 が RNA と結合することが阻害されて mRNA を分解できないので IL-6 が産生される。LPS 刺激後に、Arid5a が細胞質に移行することで、Arid5a の核—細胞質比が変化する。この変化が IL-6 の産生を促進させると考えられる。

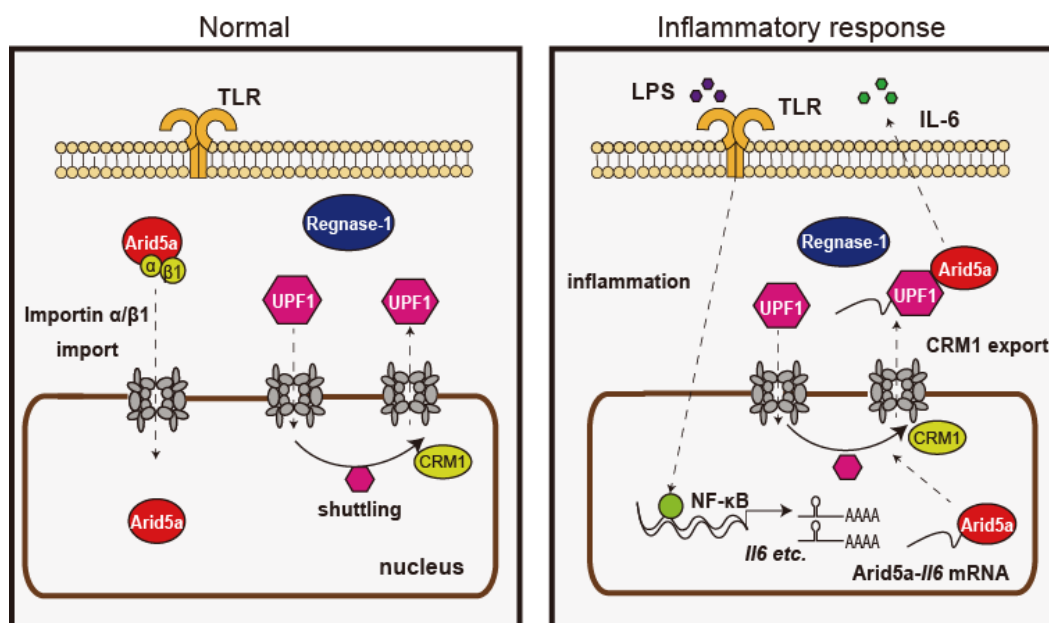


図 15 モデル図

詳細は本文参照。

5. 考察と結論

TG マウスの実験より、Arid5a は LPS 刺激後に炎症性サイトカインの産生に影響を及ぼすことが明らかになった。したがって、私は炎症応答における Arid5a の細胞内局在の動的变化について調べた。これまで、核に局在する Arid5a がなぜ細胞質に局在する Regnase-1 に対し、競合反応を示すのかは解明されていなかった。そこでまず私がまず着目したことは Arid5a と Regnase-1 の細胞内局在メカニズムである。その中で、炎症応答により Arid5a が核から細胞質に移行することを発見した。核内に移行するメカニズムを調べるために、Arid5a と Regnase-1 に cNLS が含まれているかを cNLS mapper を用いて予測した。その結果、Arid5a では cNLS が予測され、Regnase-1 では予測されなかった。この結果より、Arid5a は Importin- α/β 1 経路により核内輸送されるのではないかと考えた。本研究の中で、Arid5a と Importin- α の結合阻害実験や Importin- α ファミリーである KPNA2 の相互作用実験より、Arid5a は Importin- α/β 1 経路で輸送されることが示唆された。未刺激の状態では、不要に *Il6* mRNA が産生されない分子機構が重要である。Arid5a は核内に局在し、Regnase-1 は細胞質に局在する。細胞質に局在する Regnase-1 は、炎症応答を促進する c-Jun N-terminal kinase (JNK) や nuclear factor-kappa B (NF- κ B) シグナルを抑制的に制御することや(28)、転写後調節として RNA の分解に寄与する(29)。しかしながら、病原体が侵入すると、病原体を排除するために、免疫細胞を活性化させる IL-6 の働きが必要になる。そのために、*Il6* mRNA は RNA 分解機構を免れる必要がある。以上のことから、Regnase-1 による RNA 分解機構を阻害するために Arid5a が核から細胞質に移行し *Il6* mRNA の RNA 分解機構が抑制されると考えている。

Arid5a の mRNA 安定化とは異なる機能として、Arid5a は核内タンパク質である SRY-box 9 (Sox9) と結合することで、軟骨細胞における Sox9 の活性を上昇させることが知られている(19)。さらに、Arid5a は T 細胞の 1 つである Th17 細胞の分化に重要な転写因子である retinoic acid receptor related orphan nuclear receptor γ t (ROR γ T) や細胞増殖や細胞分化に関与する遺伝子を制御する estrogen receptor (ER) α と結合することが知られている。加えて、Arid5a が ROR γ T や ER α と結合することでその機能を抑制する(24-26)。つまり、核内に局在する Arid5a は転写因子を制御する働きがあることが明らかになっている。本研究の図 14-D で、Arid5a の N 末端 (Arid ドメインを含む) は UPF1 と相互作用するのに必要であることを示した。1 つの仮説として、Arid5a の機能は局在に依存して機能が異なることが考えられる。つまり、細胞質の Arid5a は UPF1 の機能を抑制することで mRNA の安定性を制御する一方、核内の Arid5a は転写因子の機能を制御することが示唆される。刺激後に細胞質に移行することで生じる Arid5a と結合していた核内タンパク質の影響については、今後さらなる検討が必要である。

UPF1 は NMD と Regnase-1 を介した mRNA 分解に必須な分子であり、CRM1 を介して核と細胞質の間をシャトリングしている。UPF1 は NLS と NES を含むタンパク質で、CRM1 阻

害剤であるレプトマイシン B は UPF1 のシャトリング機構を阻害する(13-14)。UPF1 のみが CRM1 を介して核外輸送されるのではなく、CRM1 は 230 種類以上の炎症性サイトカイン関連タンパク質や抗アポトーシスタンパク質などを輸送している(31)。その中で、NF- κ B/I κ B 複合体は cNLS 依存的に核内輸送され、CRM1 依存的に核外輸送されることで、核と細胞質の間をシャトリングすることが示されている。加えて、レプトマイシン B は核内に NF- κ B/I κ B 複合体を蓄積させ、NF- κ B を不活性化することが示されている(32)。

LPS 刺激 1 時間後では、*Il6* mRNA が産生されていることを図 11-A で確認している。図 12-A の実験で、LPS 刺激 2 時間後、レプトマイシン B は LPS 刺激後に起こる Arid5a の核外輸送が阻害することを見出した。Arid5a-*Il6* mRNA が形成されるにもかかわらず、UPF1 の核外輸送が阻害されたため、Arid5a の核外輸送も阻害されたと考えている。従って、LPS 刺激後に UPF1-Arid5a-*Il6* mRNA 複合体は CRM1 依存的に核外輸送されることが示された。

これまでの研究の中で、RNA 結合タンパク質と疾患の関係性が報告されている(33)。例えば、Tat activating regulatory DNA binding protein 43(TDP43)は *Il6* mRNA のプロセッシングに関わり、イントロンの中に含まれるステムループに結合するタンパク質である(34)。このタンパク質は核内の RNA 結合タンパク質だが、細胞質に移行し、ユビキチン分解されずに蓄積すると筋萎縮性側索硬化症に似た症状を示すことが報告されている(35)。また、Arid5a のリン酸化修飾部位やユビキチン化修飾部位を同定した研究の中で、細胞に野生型 Arid5a やユビキチン化修飾部位変異型 Arid5a を強制発現させ、その後、LPS で刺激を行った結果、野生型発現細胞と比較して、ユビキチン化変異を阻害された Arid5a 発現細胞では IL-6 がより多く産生される結果が得られている(36)。私は、Arid5a の核内局在のもうひとつの意義として、細胞質での蓄積を抑えることで、不要な RNA の蓄積を起こさせないためであると考えている。今回の研究の中で、Arid5a が LPS 刺激依存的に細胞質に移行することを示した。Arid5a の細胞質での蓄積と疾患の関係性については今後検討が必要である。

結論として、Arid5a は炎症応答におけるサイトカイン制御に関わることが明らかになった。TG マウスでは、LPS 刺激後に炎症性サイトカインの産生量を増加し、敗血症性ショックが悪化する。また、LPS 刺激依存的に Arid5a が LPS 刺激後に核から細胞質に移行すること、さらに、Arid5a は Importin- α/β 1 経路を介して核内輸送され、CRM1 を介して核外輸送されることを明らかにした。また、Arid5a の核外輸送の阻害は IL-6 の産生を抑制することから、新たな創薬のターゲットになることが期待される。

6. 参考文献

1. Masuda, K et al (2013) Arid5a controls IL-6 mRNA stability, which contributes to elevation of IL-6 level in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 9409-9414.
2. Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Ce//* 140(6):805-820.
3. Carpenter S, Ricci EP, Mercier BC, Moore MJ, Fitzgerald KA (2014) Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 14(6):361-376.
4. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T (2014) IL-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(10). doi:10.1101/cshperspect.a016295.
5. Matsushita, K et al. (2009) Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature* 458: 1185-1190.
6. Mino, T et al. (2015) Regnase-1 and roquin regulate a common element in inflammatory mRNAs by spatiotemporally distinct mechanisms. *Ce//* 161: 1058-1073.
7. Lin, C et al (2014) Recent advances in the ARID family: Focusing on roles in human cancer. *Onco Targets Ther* 7: 315-324.
8. Masuda, K et al (2016) Arid5a regulates naive CD4⁺ T cell fate through selective stabilization of Stat3 mRNA. *J Exp Med* 213: 605-619.
9. Zaman, MM-U et al (2016) Arid5a exacerbates IFN- γ -mediated septic shock by stabilizing T-bet mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 11543-11548.
10. Hanieh H, Masuda K, Metwally H, Chalise JP, Mohamed M, Nyati KK, Standley DM, Li S, Higa M, Zaman MM-U, Kishimoto T. (2017) Arid5a stabilizes *OX40* mRNA in murine CD4⁺ T cells by recognizing a stem-loop structure in its 3' UTR, *European Journal of Immunology*. doi:10.1002/eji.201747109
11. Dubey, PK et al. (2017) Arid5a-deficient mice are highly resistant to bleomycin-induced lung injury. *Int Immunol* 29: 79-85.
12. Kashima, I et al. (2006) Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 20: 355-367.
13. Mendell, JT, Ap Rhys, CM & Dietz, HC (2002) Separable roles for rent1/hUpf1 in altered splicing and decay of nonsense transcripts. *Science* 298: 419-422.
14. Ajamian, L et al. (2015) HIV-1 recruits UPF1 but excludes UPF2 to

- promote nucleocytoplasmic export of the genomic RNA. *Biomolecules* 5: 2808-2839.
15. Varsally W, Brogna S (2012) UPF1 involvement in nuclear functions. *Biochem Soc Trans* 40(4):778-783.
 16. Wentz, SR & Rout, MP (2010) The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 2: a000562.
 17. Fornerod, M, Ohno, M, Yoshida, M & Mattaj, IW (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90: 1051-1060.
 18. Fukuda, M et al. (1997) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390: 308-311.
 19. Ossareh-Nazari, B, Bachelier F, & Dargemont C. (1997) Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science* 278: 141-144.
 20. Stade, K, Ford, CS., Guthrie, C & Weis, K (1997) Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 90: 1041-1050.
 21. Kudo, N et al. (1998) Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res* 242: 540-547.
 22. Tsujii, A et al. (2015) Retinoblastoma-binding protein 4-regulated classical nuclear transport is involved in cellular senescence. *J Biol Chem* 290: 29375-29388.
 23. Kishimoto, T (2005) Interleukin-6: from basic science to medicine – 40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 23: 1-21.
 24. Saito, Y et al. (2014) AT-rich interactive domain-containing protein 5a functions as a negative regulator of ROR gamma t-induced Th17 cell differentiation. *Arthritis Rheum* 66: 1185-1194.
 25. Amano, K et al. (2011) Arid5a cooperates with Sox9 to stimulate chondrocyte-specific transcription. *Mol Biol Cell* 22: 1300-1311.
 26. Georgescu, SP et al. (2005) Modulator recognition factor 1, an AT-rich interaction domain family member, is a novel corepressor for estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 19: 2491-2501.
 27. Ghosh, CC et al. (2010) Gene-specific repression of proinflammatory cytokines in stimulated human macrophages by nuclear I κ B α . *J Immunol* 185, 3685-93.
 28. Liang, J et al. (2010) MCP-induced protein 1 deubiquitinates TRAF proteins and negatively regulates JNK and NF- κ B signaling. *J Exp Med* 207: 2959-2973.
 29. Iwasaki, H et al. (2011) The I κ B kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR-IL-1R by controlling degradation of

regnase-1. *Nat Immunol* 12: 1167-1175.

30. Ivanov, II et al. (2006) The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126: 1121-1133.

31. Ishizawa, J, Kojima, K, Hail, N, Tabe, Y & Andreeff, M (2015) Expression, function, and targeting of the nuclear exporter chromosome region maintenance 1 (CRM1) protein. *Pharmacol Ther* 153: 25-35.

32. Huang, T. T., Kudo, N., Yoshida, M. & Miyamoto, S (2000) A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I κ B α controls cytoplasmic localization of inactive NF- κ B/I κ B α complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1014-1019.

33. Cooper, TA, Wan, L & Dreyfuss, G (2009) RNA and disease. *Cell* 136: 777-793.

34. Lee, S et al. (2015) Identification of a subnuclear body involved in sequence-specific cytokine RNA processing. *Nat Commun* 6: 5791.

35. Neumann, M et al (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314: 130-133.

36. Nyati, KK et al. (2017) TLR4-induced NF- κ B and MAPK signaling regulate the IL-6 mRNA stabilizing protein Arid5a. *Nucleic Acids Res* 45: 2687-2703.

7. 謝辞

御指導を賜りました免疫学フロンティア研究センター 岸本忠三特任教授、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト 岡正啓プロジェクトリーダー、指導教官である長澤丘司教授に謝意を表します。

8. 業績

1. Higa M, Oka M, Fujihara Y, Masuda K, Yoneda Y, Kishimoto T. (2018) Regulation of inflammatory responses by dynamic subcellular localization of RNA binding protein Arid5a. *Proc Natl Acad Sci* doi.org/10.1073/pnas.1719921115
2. Masuda K, Ripley B, Nyati KK, Dubey PK, Zaman MM-U, Hanieh H, Higa M, Yamashita K, Standley DM, Mashima M, Okamoto T, Matsuura Y, Takeuchi O, Kishimoto T. (2016) Arid5a regulates naive CD4⁺ T cell fate through selective stabilization of Stat3 mRNA. *J Exp Med* 213(4):605-619.
3. Zaman MM-U, Masuda K, Nyati KK, Dubey PK, Ripley B, Wang K, Chalise JP, Higa M, Hanieh H, Kishimoto T (2016) Arid5a exacerbates IFN- γ -mediated septic shock by stabilizing T-bet mRNA. *Proc Natl Acad Sci* 113(41):11543-11548.
4. Nyati KK, Masuda K, Zaman MM, Dubey PK, Millrine D, Chalise JP, Higa M, Li S, Standley DM, Saito K, Hanieh H, Kishimoto T. (2017) TLR4-induced NF- κ B and MAPK signaling regulate the IL-6 mRNA stabilizing protein Arid5a. *Nucleic Acids Res* 45(5):2687-2703.
5. Hanieh H, Masuda K, Metwally H, Chalise JP, Mohamed M, Nyati KK, Standley DM, Li S, Higa M, Zaman MM-U, Kishimoto T. (2017) Arid5a stabilizes OX40 mRNA in murine CD4⁺ T cells by recognizing a stem-loop structure in its 3' UTR, *European Journal of Immunology*. doi:10.1002/eji.201747109

(2-5) 新たな実験試薬の調製、実験系の構築に貢献した。