

炎症刺激時における
炎症関連 RNA 分解酵素 Regnase-1 の制御機構の解析

赤木 宏太郎

目次

目次.....	1
要旨.....	2
略語.....	3
第 1 章 序論.....	4
1.1. Regnase-1 による炎症制御メカニズム.....	4
1.2. β TRCP を介した Regnase-1 の分解メカニズム.....	5
1.3. 本研究の目的.....	6
第 2 章 実験材料と方法.....	7
第 3 章 結果.....	14
3.1. Regnase-1 と 14-3-3 の結合メカニズム.....	14
3.1.1. IL-1 β 刺激依存的に Regnase-1 と結合するタンパク質の同定.....	14
3.1.2. 14-3-3 は MyD88 依存型の刺激に依存して Regnase-1 と結合する.....	15
3.1.3. Regnase-1 の S494 と S513 のリン酸化が Regnase-1 と 14-3-3 との結合に必須である.....	16
3.1.4. IRAK1 の CSD は Regnase-1 と 14-3-3 の結合の誘導に必須である.....	18
3.2. Regnase-1 と 14-3-3 および β TRCP の関係.....	20
3.2.1. Regnase-1 と 14-3-3、Regnase-1 と β TRCP の結合はそれぞれ独立して引き起こされる.....	20
3.2.2. Regnase-1 の S513A 変異体は MyD88 刺激下で不安定である.....	21
3.3. 14-3-3 は Regnase-1 を機能的に抑制する.....	22
3.3.1. Regnase-1 の S513A 変異は IL6 の産生量には影響しない.....	22
3.3.2. 14-3-3 と β TRCP とともに結合できない Regnase-1 変異体は野生型よりも強く <i>Il6</i> mRNA を抑える.....	24
3.3.3. 14-3-3 と結合した Regnase-1 は標的 mRNA と結合できず分解できない.....	25
3.4. 14-3-3 は Regnase-1 の核-細胞質シャトリングを阻害する.....	27
3.4.1. Regnase-1 は核と細胞質をシャトルする.....	27
3.4.2. 14-3-3 は Regnase-1 の核-細胞質シャトリングを阻害する.....	29
第 4 章 考察.....	31
4.1. Regnase-1-14-3-3 複合体形成のメカニズム.....	31
4.2. 14-3-3 が Regnase-1 と β TRCP の結合を阻害するメカニズム.....	32
4.3. 14-3-3 による Regnase-1 の機能抑制の生物学的意義は何か?.....	33
4.4. Regnase-1 の核-細胞質シャトリングと mRNA 認識の関係.....	33
4.5. Regnase-1 の制御と応用.....	34
引用文献.....	35
謝辞.....	41

要旨

RNA 分解酵素である Regnase-1 は、インターロイキン-6 (IL-6)などの炎症関連分子をコードする mRNA を分解することで、過剰な炎症が起きるのを防ぐ役割を持っている。しかしながら、インターロイキン-1 β (IL-1 β)や Lipopolysaccharide (LPS)などの刺激下において、Regnase-1 がどのような制御を受けるかについては不明な点が残されていた。本研究では Regnase-1 結合タンパク質の網羅的な解析を行うことで、新たに 14-3-3 タンパク質を IL-1 β 刺激依存的な Regnase-1 の結合パートナーとして同定した。14-3-3 はリン酸化タンパク質に結合することが知られており、Regnase-1 アミノ酸配列の 494 番目と 513 番目の 2 つのセリン残基(S494、S513)が IL-1 β 刺激によってリン酸化されることが、Regnase-1 と 14-3-3 の結合に必須であることが分かった。また、Regnase-1 と 14-3-3 の結合は IL-1 β だけでなく、LPS などの Toll-like receptor (TLR)リガンド刺激によっても誘導された。Regnase-1 と 14-3-3 の結合を誘導するこれらの刺激の細胞内シグナル伝達は、アダプタータンパク質 MyD88 に依存しており、その下流で活性化することが知られているキナーゼ IRAK1 の C-terminal structured domain (CSD)が Regnase-1 と 14-3-3 の複合体形成に必須であることが分かった。MyD88 依存性の刺激下においては、Regnase-1 が β -transducin repeat-containing protein (β TRCP)と結合し、ユビキチン化を介したタンパク質分解を受けることが知られているが、14-3-3 は β TRCP と Regnase-1 の結合を阻害し、Regnase-1 のタンパク質安定化に寄与している可能性が示唆された。実際に、Regnase-1 が 14-3-3 と結合できないような変異を持つノックインマウス *Regnase-1*^{S513A/S513A} を作成し、そのマウス由来の細胞を調べてみたところ、S513A の変異を持つ Regnase-1 は、MyD88 依存性の刺激下でタンパク質として不安定であることが分かった。その一方で、14-3-3 と結合しタンパク質として安定な Regnase-1 は、分解標的 mRNA と結合することができず、標的 mRNA を分解する Regnase-1 の機能が 14-3-3 との結合によって抑制されることが、RNA 免疫沈降などの解析により明らかとなった。さらに、14-3-3 と結合していない Regnase-1 が細胞内で核と細胞質をシャトルする性質を持つのに対し、14-3-3 と結合した Regnase-1 は核への移行ができなくなっていることも分かった。これらのことから、MyD88 依存性の刺激下では、14-3-3 が Regnase-1 を細胞質に止め、mRNA との結合を阻害することで Regnase-1 の機能を抑制し、炎症関連遺伝子が適切に発現するように調節していることが示唆された。

略語

3'UTR	3' untranslated region
ActD	Actinomycin D
CBP80	80 kDa nuclear cap-binding protein
CHX	Cycloheximide
CRM1	Chromosome region maintenance 1
Dox	Doxycycline
DSP	Dithiobis(succinimidyl propionate)
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
IKK	I-kappa-B kinase
IL-1R	Interleukin-1 receptor
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IRAK1/2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1/2
LMB	Leptomycin B
LPS	Lipopolysaccharide
MEF	Mouse embryonic fibroblast
NES	Nuclear export signal
PEC	Peritoneal exudate cell
Reg1	Regnase-1
SCF 複合体	SKP1-CUL1-F-box protein complex
TAK1	Transforming growth factor β -activated kinase 1
TLR	Toll-like receptor
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
λ PP	λ -protein phosphatase

第1章 序論

1.1. Regnase-1 による炎症制御メカニズム

脊椎動物において炎症反応は免疫細胞を活性化させ、体内に侵入してきた病原体を排除する重要な役割を担っている。その一方で、過剰な炎症反応は宿主自身の組織にも損傷を与える恐れがあるため、炎症を担う遺伝子の発現は適切に制御される必要がある。炎症関連遺伝子の発現は、病原体由来の病原体関連分子パターン(PAMPs)や、障害を受けた細胞から放出されるダメージ関連分子パターン(DAMPs)が TLR などのパターン認識受容体(PRR)によって認識されることを契機として誘導される(Fitzgerald & Kagan, 2020; Takeuchi & Akira, 2010) (図 1)。これに加えて、炎症関連遺伝子の発現は転写後調節によっても制御を受けることが知られており、これまで様々な RNA 結合タンパク質が炎症関連遺伝子の転写後調節に関わっているという報告がなされてきた(Anderson, 2010; Carpenter et al., 2014; Turner & Díaz-Muñoz, 2018)(図 1)。

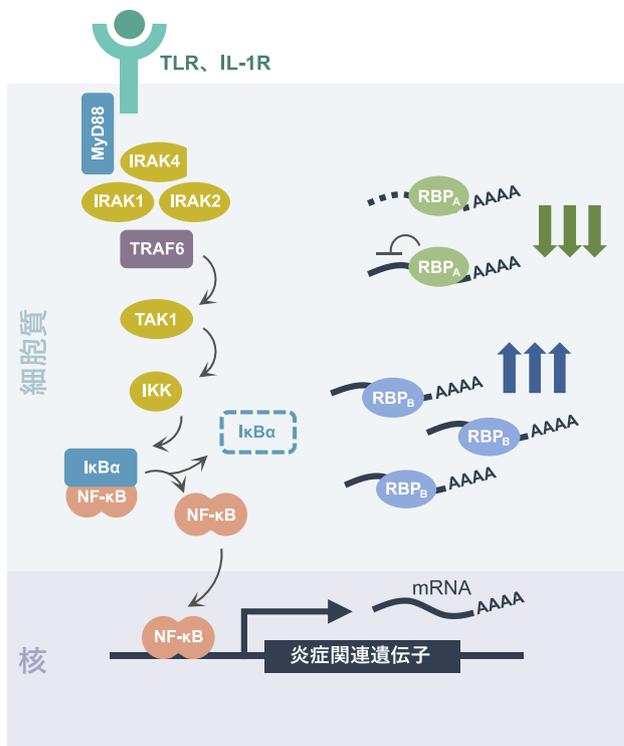


図 1 TLR 刺激下における転写活性化と転写後調節

TLR やインターロイキン-1 受容体(IL-1R)はアダプタータンパク質 MyD88 を介して IRAK4、IRAK1/2 を活性化させる。その下流では TRAF6、TAK1、IKK が活性化し、結果として IκBα の分解と NF-κB の核移行が誘導され、NF-κB によって炎症関連遺伝子の転写が誘導される。

転写産物である mRNA はその後、RNA 結合タンパク質(RBP)によって様々な制御を受ける。例えば mRNA の分解を誘導して不安定化させるようなもの(この図での RBP_A)もあれば、逆に mRNA を安定化させるものもある(図での RBP_B)。

なおこの図では、本研究に直接関わる分子以外のものはいくつか省略してある。

Regnase-1 (Mcp1p1 としても知られる)は遺伝子 *Zc3h12a* (以降マウスの場合は *Regnase-1*、ヒトの場合は *REGNASE-1* と表記する)にコードされる RNA 分解酵素であり、炎症関連遺伝子の転写後調節に関わる因子の 1 つである(Matsushita et al., 2009)。Regnase-1 は IL-6 や PTGS2 といった炎症関連分子をコードする mRNA の 3'非翻訳領域(3'UTR)に存在する独特のステムループ構造を認識し、結合した mRNA を分解することでその発現を抑え、過剰な炎症反応が起きるのを防ぐ役割を持っている(Mino et al., 2015)。Regnase-1 ノックアウトマウスが重篤な自己免疫疾患の表現型を呈することから、Regnase-1 は炎症制御において重要な役割を持っていることが分かる(Matsushita et al., 2009; Uehata et al., 2013) (図 2)。

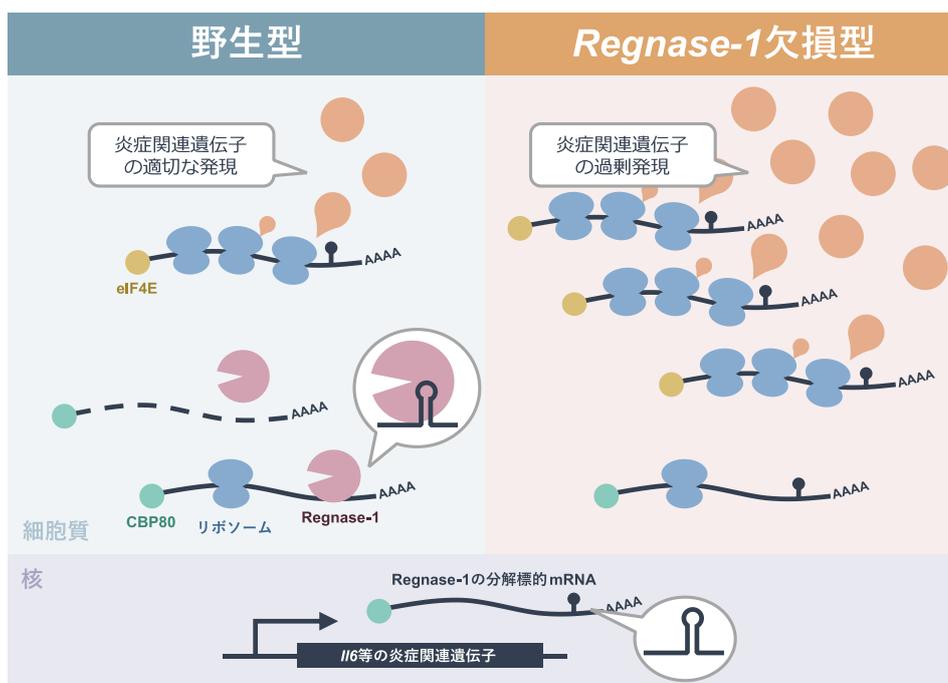


図2 Regnase-1による標的 mRNA の分解

炎症関連分子の発現量は Regnase-1 によって適切な量に調整される (左)。Regnase-1 を欠損した細胞では炎症関連分子が過剰に発現する(右)。

Regnase-1 は核キャップ結合蛋白質(CBP80)が結合した mRNA を認識し、分解することが報告されている(Mino et al., 2019)。CBP80 は核内で転写された mRNA の 5'キャップ構造に結合し、mRNA の核外輸送とそれに続くパイオニアラウンド翻訳の後、別のキャップ結合タンパク質 eIF4E と入れ替わる(Maquat et al., 2010; Müller-Menicoll & Neugebauer, 2013)。パイオニアラウンド翻訳は mRNA の品質管理が行われるステップでもあり、このステップをクリアした mRNA はより翻訳効率の高い定常状態翻訳(steady-state translation)へと移行する。Regnase-1 による mRNA の分解は、RNA ヘリケース UPF1 の助けを借りて、パイオニアラウンド翻訳のタイミングで行われることが報告されており(Mino et al., 2015, 2019)、高い効率の翻訳が行われる前に標的 mRNA を分解することで、効率よく標的遺伝子の発現を抑制していると考えられている(図 2)。

1.2. βTRCP を介した Regnase-1 の分解メカニズム

先に述べた通り、適切な炎症反応は病原体を排除するのに欠かすことはできない。以前の研究で、炎症のブレーキとして働く Regnase-1 について、炎症を引き起こすような刺激を細胞が受けた際、Regnase-1 はタンパク質レベルで分解されることが報告されている(Iwasaki et al., 2011; Tanaka et al., 2019)。インターロイキン-1 受容体(IL-1R)や TLR などの、アダプタータンパク質 MyD88 に依存してシグナルが伝達される刺激下では、Regnase-1 の 435 番目と 439 番目の 2 つのセリン残基(S435/S439)が IκB キナーゼ(IKK)によってリン酸化される。そうしてリン酸化された Regnase-1 は SKP1-CUL1-F-box (SCF)複合体の構成タンパク質である βTRCP に認識され、ユビキチン化を受け、最終的にプロテアソームを介して分解される(Iwasaki et al., 2011) (図 3)。このような Regnase-1 の量的制御によって、炎症反応が妨害されないように調節されていると考えられていた。

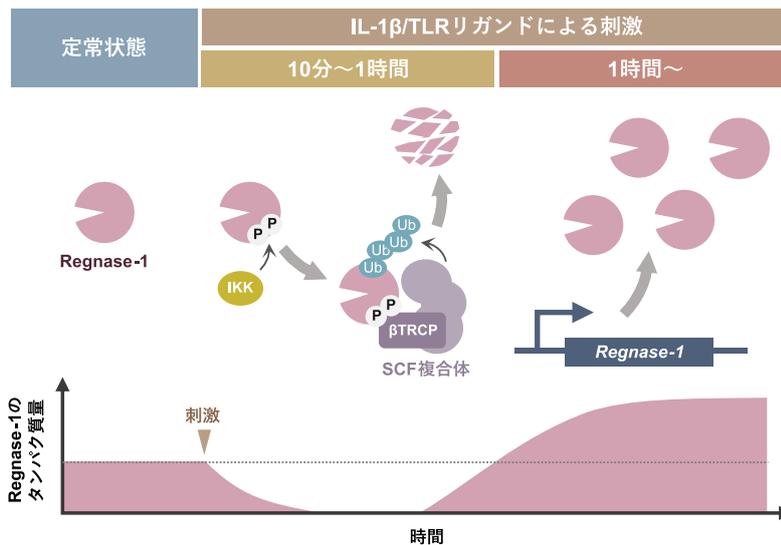


図 3 IL-1R、TLR 刺激下における Regnase-1 の量的変化

細胞が IL-1 β や LPS 等で刺激されると、活性化した IKK によって Regnase-1 は S435 と S439 のリン酸化を受ける。リン酸化した Regnase-1 は β TRCP を含む SCF 複合体に認識されユビキチン化を受け、その後プロテアソームによって分解される。刺激から約 1 時間経つと Regnase-1 の転写誘導が活発になり始め、Regnase-1 の発現量は増加していく。

1.3. 本研究の目的

1.2 では IL-1R や TLR の刺激下において Regnase-1 が量的な制御を受けることについて述べたが、Regnase-1 の制御メカニズムについては不明な点が残されていた。特に、IL-1 β や LPS といった MyD88 依存性の刺激は Regnase-1 のタンパク質分解と同時に Regnase-1 の転写も誘導することが知られており、刺激後に分解されて減少した Regnase-1 のタンパク質量は刺激後 2 時間程度で回復し、4 時間ほど経過すると未刺激状態よりも高いレベルの発現量を呈する (Iwasaki et al., 2011) (図 3)。本研究では、炎症刺激下、特に MyD88 依存性の刺激下において上記のような発現パターンを持つ Regnase-1 について、その働きがどのようにして制御されているかを明らかにすることを目的とした。特に、タンパク質-タンパク質相互作用の観点から、SCF 複合体以外にどのようなタンパク質が Regnase-1 に結合するかを網羅的に解析することとした。

第2章 実験材料と方法

マウス

Regnase-1 欠損マウスについては以前の論文の通りである (Matsushita et al., 2009)。 *Regnase-1*^{S513A/S513A} ノックインマウスは CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用い、以前の論文の手法に則って作成した (Fujihara & Ikawa, 2014)。 gRNA の発現プラスミドは、pX330 (Addgene plasmid # 42230) に 5'-CACCCGCGGCT CAGACCAGTA CTCTC-3' と 5'-AAACGAGAGT ACTGGTCTGA GCCGC-3' の 2 つのオリゴ DNA をアニーリングさせた後に挿入した (Cong et al., 2013)。 このプラスミドはシングルスランドオリゴ DNA (5'- GAAGGACAGG AGTGGGTGGG GGTAATGGGT ACGGCTCAGC CCAGTACTCT CTGGATGGGT AGGTGGGTGG CGGGGGCACA -3') とともに C57BL/6J マウスの受精卵にインジェクションした。 目的の配列がノックインできたかは直接 DNA シーケンシングによって調べた。

全てのマウスが Specific pathogen-free (SPF) 条件下で飼育され、すべての動物実験は京都大学動物実験委員会のガイドラインに則って行われた (承認番号: MedKyo21057)。

細胞

HeLa 細胞、HEK293T 細胞、RAW264.7 細胞、マウス胎児線維芽細胞 (MEF) は、10% Fetal bovine serum (FBS)、1% ペニシリン/ストレプトマイシン (nacalai tesque)、100 μ M 2-メルカプトエタノール (nacalai tesque) を含む DMEM (nacalai tesque) で培養した。

腹腔浸出細胞 (peritoneal exudate cells、PECs) は、マウスに 2 ml の 4% Brewer's チオグリコレート培地を腹腔注射し、3.5 日後に回収後、10% FBS、1% ペニシリン/ストレプトマイシン (nacalai tesque)、100 μ M 2-メルカプトエタノールを含む RPMI-1640 (nacalai tesque) で培養した。

実験試薬

本研究で使用した主な試薬は以下 (表 1) のとおりである。

表 1 使用した実験試薬

試薬名	製造	製品番号
anti-mouse-Regnase-1 抗体	MBL Life Science	受託作製
anti-human-Regnase-1 抗体	Atlas Antibodies	HPA032053
anti-14-3-3 (pan) 抗体	Santa Cruz Biotechnology	sc-1657
anti-I κ B- α 抗体	Santa Cruz Biotechnology	sc-371
anti-IRAK1 抗体	Santa Cruz Biotechnology	sc-5288
anti-FLAG mouse 抗体	Sigma	F3165
anti-FLAG rabbit 抗体	Sigma	F7425
anti-HA mouse 抗体	Sigma	H3663
anti-HA rabbit 抗体	Sigma	H6908
anti-Myc mouse 抗体	Sigma	M4439
anti-Myc rabbit 抗体	Sigma	C3956
anti- β -Actin-HRP	Santa Cruz Biotechnology	sc-47778-HRP

Anti-Mouse IgG-HRP F(ab') ₂	cytiva	NA9310-1ML
Anti-Rabbit IgG-HRP F(ab') ₂	cytiva	NA9340-1ML
F(ab') ₂ -anti-Mouse IgG (H+L)-AF488	Invitrogen	A11017
DSP	TCI	D2473
Pam3CSK4	InvivoGen	tlrl-pms
poly I:C	Cytiva	27473201
LPS	InvivoGen	tlrl-smlps
R848	InvivoGen	tlrl-r848-5
CpG DNA	InvivoGen	tlrl-1668-1
MG-132	Sigma	474790
Actinomycin D	Sigma	A9415
Leptomycin B	Sigma	L2913

プラスミド

FLAG タグ付きのタンパク質発現には pFLAG-CMV2 (Sigma)をバックボーンとして使用した。HA タグもしくは Myc タグが付いたタンパク質の発現には、pFLAG-CMV2 の FLAG の配列を HA や Myc の配列に置き換えて使用した。マウス由来の *Regnase-1* cDNA は以前の論文の通り挿入してある(Matsushita et al., 2009)。14-3-3 と β TRCP のコーディング配列(CDS)は HeLa 細胞の cDNA を鋳型として増幅し、In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio)によって挿入した。Myc タグ付きの IRAK1 の CDS は HA タグ付きの IRAK1 を発現するベクター(Iwasaki et al., 2011)に由来する。*Il6* 発現ベクターは pEGFP-C1 (Clontech)の EGFP 配列と *Il6* 遺伝子配列を置き換えることで作成した。*Regnase-1* の断片配列を融合させた EGFP の発現には pEGFP-C1 を使用し、EGFP の C 端側にそれぞれの *Regnase-1* 配列の断片を挿入した。

欠損変異体もしくは点変異体は In-Fusion HD Cloning Kit もしくは QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent)で作成した。

形質導入に用いるレンチウイルス用のベクターには FLAG-HA-*Regnase-1* の配列を pInducer20 (Addgene plasmid #44012)(Meerbrey et al., 2011)由来のベクターである pInducer20-puro に挿入した。

IRAK1、*IRAK2* のノックアウトのためのプラスミドには、pX459 (Addgene Plasmid #62988)に以下のオリゴ DNA をアニーリングして挿入した。

IRAK1

5'-CACCGGTCTGGTCGCGCACGATCA-3'

5'-AAACTGATCGTGCGCGACCAGACC-3'

IRAK2

5'-CACCGAAAACCGCAAAATCAGCCAG-3'

5'-AAACCTGGCTGATTTTGC GGTTTTC-3'

プラスミドトランスフェクション

各プラスミドのトランスフェクションでは、HeLa 細胞には Lipofectamine 2000 (Invitrogen)、

HEK293T 細胞には PEI max (Polysciences)を、それぞれの使用書に従って使用した。

FLAG-HA タグ付き Regnase-1 発現細胞の作製

Regnase-1 結合タンパク質の探索、また Regnase-1 リン酸化サイトの同定には FLAG と HA の 2 つのタグが付加された Regnase-1 をドキシサイクリン(Dox)依存的に発現する HeLa 細胞(Dox-FLAG-HA-Regnase-1-HeLa 細胞)を使用した。

Dox-FLAG-HA-Regnase-1-HeLa 細胞はレンチウイルスによる形質導入によって作成した。ウイルスの作製には、pInducer20-puro-FLAG-HA-Regnase-1 ベクターを第 3 世代パッケージングベクターと共に HEK293T 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから 6 時間後に培地を新しいものに交換し、その後 48 時間培養した。レンチウイルスを含む培地は 0.45 μ m フィルターで濾過し、HEK293T 細胞を取り除いた。ウイルスを含む培地を使って HeLa 細胞を 24 時間培養し、その後新しい培地で 48 時間培養を続けた。形質転換された細胞は 0.5 μ g/ml のピューロマイシン(InvivoGen)でセレクションした。

HeLa 細胞における IRAK1 および IRAK2 ノックアウト

IRAK1、IRAK2 をノックアウトするために、IRAK1 と IRAK2 を標的とする gRNA を含んだ pX459 プラスミドを HeLa 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションの 48 時間後、2 μ g/ml のピューロマイシンを含む培地でさらに 48 時間培養することで pX459 を発現する細胞だけをセレクションした。それぞれの遺伝子のノックアウト効率はウェスタンブロットによる確認を試みたが、IRAK2 を検出できる抗体が手に入らなかったため、ここでは IRAK1 の結果のみを載せた。

DSP (Dithiobis(succinimidyl propionate))によるタンパク質の架橋

DSP 架橋の前に FLAG-HA-タグが付いた Regnase-1 を発現させるため、Dox-FLAG-HA-Regnase-1-HeLa 細胞を 1 μ g/ml の Dox (Sigma)で 4 時間インキュベートした。また、ネガティブコントロールとして Dox を添加しない細胞も用意した。また、IL-1 β 刺激ありのサンプル用に、Dox を添加して 2 時間後に IL-1 β (10 ng/ml、R&D Systems)を添加し、DSP 架橋まで細胞を 2 時間刺激した。Dox を培地に加えて 4 時間後、37°Cに温めておいた PBS で細胞を 2 回洗浄し、0.1 mM DSP (TCI)を含む PBS を加え、37°Cで 30 分インキュベートした。その後、37°Cの PBS で 1 回洗浄し、STOP 溶液(1 M Tris-HCl pH 7.4 を含む PBS)を加えて常温で 15 分インキュベートし DSP 架橋を停止させた。その後 PBS で細胞を 2 回洗浄し、細胞溶解と免疫沈降を行った。

免疫沈降

免疫沈降にはあらかじめ洗浄した Dynabeads Protein G (Invitrogen)を FLAG 抗体、HA 抗体または Myc 抗体と混ぜ、回転させながら 4°Cで 1 時間インキュベートしたビーズを使用した。

DSP で架橋された細胞は、IP バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.4、150 mM NaCl、0.5% (vol/vol) NP-40)に cOmplete Mini EDTA-free (Sigma)、PhosSTOP (Sigma)、200 U/ml Benzamide (Millipore)を溶かしたバッファーで溶解し、氷上で 10 分インキュベートした。細胞溶解液は遠心(15,000 rpm、5 min、4°C)し、上清を FLAG 抗体が結合した Dynabeads と混ぜ、回転させながら 4°Cで 2 時間インキュベートした。その後、ビーズを IP バッファーで 3 回洗浄し、FLAG 溶出バッファー(100 μ g/ml FLAG ペプチド(Sigma)、50 mM Tris-HCl pH7.4、150 mM NaCl)で回転さ

せながら 4°Cで 10 分インキュベートすることで FLAG-HA-Regnase-1 を溶出した。この溶出ステップは合計で 2 回行った。溶出したタンパク質は HA 抗体が結合した Dynabeads と混ぜ、回転させながら 4°Cで 2 時間インキュベートし、2 度目の免疫沈降を行った。その後、IP バッファでビーズを 3 回洗浄し、溶出用尿素バッファ(8 M 尿素、50 mM Tris-HCl pH 8.0)でタンパク質を溶出した。溶出したタンパク質は質量分析まで-80°Cで保存した。

Regnase-1 のリン酸化サイトの同定には、結合タンパク質の同定にも使用した Dox-FLAG-HA-Regnase-1-HeLa 細胞を使用した。Dox-FLAG-HA-Regnase-1-HeLa 細胞は 1 µg/ml の Dox で 4 時間処理した。刺激ありのサンプルには Dox 添加と同じタイミングで最終濃度が 10 ng/ml になるように IL-1β を添加した。4 時間のインキュベーションの後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、cOmplete Mini EDTA-free と PhosSTOP を含む IP バッファで細胞を溶かした。FLAG-HA-Regnase-1 は FLAG 抗体で前述のように免疫沈降で精製し、SDS サンプルバッファ(50 mM Tris-HCl pH 6.8、2% (wt/vol) SDS、15% (vol/vol) 2-mercaptoethanol、10% (vol/vol) glycerol、bromophenol blue)でビーズから溶出し、95°Cで 5 分インキュベートした。溶出したタンパク質は SDS-PAGE によって分離した後、Regnase-1 を含むゲルを切り出し、質量分析まで 4°Cで保存した。

精製した Regnase-1 結合タンパク質の解析や Regnase-1 のリン酸化サイトの同定には、京都大学大学院薬学研究科製剤機能解析学分野の小形公亮先生と石濱泰先生に、サンプル処理から液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)による解析、そして生データ処理まで協力していただいた。詳細な方法等については以前の論文の通りである(Akaki et al., 2021)。

タンパク質-タンパク質結合の検出には、一過性にタグ付きのタンパク質を発現する HeLa 細胞を cOmplete Mini EDTA-free と PhosSTOP を含む IP バッファで溶かし、実験結果に記した通りの抗体で前述のように免疫沈降を行った。タンパク質の溶出には IP バッファと SDS サンプルバッファを 2 対 1 で混合したものを使用し、95°Cで 5 分インキュベートした。

Regnase-1 と RNA の結合には、FLAG-Regnase-1-D141N 等を一過性に発現する細胞を cOmplete Mini EDTA-free と RNaseOut (Invitrogen)を含む IP バッファで溶かし、FLAG 抗体を使って前述の様に免疫沈降を行った。免疫沈降した RNA を含むタンパク質の一部は IP バッファと SDS サンプルバッファを 2 対 1 で混合したもので溶出し、Regnase-1 の免疫沈降の確認に使用した。残りの免疫沈降物は TRIzol (Invitrogen)によって RNA を溶出した。

タンパク質結合ネットワークの解析

Regnase-1 の結合タンパク質として同定されたタンパク質同士の結合ネットワーク解析には、Regnase-1 なし(Dox なし)のサンプルと比べて検出量が 4 倍以上のタンパク質群を使用した。また、サンプル調製の際に入り込んだケラチンタンパク質は解析から除いた。ネットワーク解析には STRING データベースを使い(Szklarczyk et al., 2019)、Cytoscape で可視化した(Shannon et al., 2003)。

λ-プロテインフォスファターゼ(λPP)処理

HA-14-3-3ε を一過性に発現する HeLa 細胞を使って、IL-1β での刺激(10 ng/ml、4 時間)あり/なしの 2 種類のサンプルを用意した。細胞は cOmplete Mini EDTA-free を含む IP バッファで溶出し、一部は細胞溶解液(WCL)としてそのまま λPP 処理を行った。14-3-3 に結合したタンパク質は、前述のような方法で HA 抗体を使って免疫沈降し、タンパク質の溶出には 250 µg/ml の HA

ペプチドを用いて、前述の FLAG ペプチド溶出と同じ方法で溶出した。

細胞溶解液と HA-14-3-3ε の結合タンパク質は λPP (NEB) を使って使用書の通り処理した。λPP 未処理用のサンプルには λPP の代わりに同量の IP バッファーを加えた。処理後のサンプルは SDS サンプルバッファーと 2 対 1 で混ぜ、95°C で 5 分インキュベートした。

ウェスタンブロット

細胞は cOmplete Mini EDTA-free と PhosSTOP を含む IP バッファーもしくは RIPA バッファー (1% (vol/vol) NP-40、0.1% (wt/vol) SDS、1% (wt/vol) sodium deoxycholate、150 mM NaCl、20 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA) で溶かし、氷上で 5 分インキュベートしたのち、遠心 (15,000 rpm、5 min、4°C) した。遠心後、上清を SDS サンプルバッファーと 2 対 1 で混ぜ、95°C で 5 分インキュベートした。SDS-PAGE には e-PAGEL 7.5% (ATTO) もしくは 5~20% を使用し、その後 Immun-Blot PVDF メンブレン (0.2 μm、Bio-Rad) に転写した。ブロッキング剤には 5% スキムミルクを使用し、抗体反応には Signal Enhancer HIKARI (nacalai tesque) を使用した。使用した抗体については表 1 の通りである。2 次抗体にはホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (HRP) が付加されており、Immobilon Forte Western HRP 基質 (Millipore) と反応させ、Amersham Imager 600 (cytiva) で発光を検出した。得られたデータの解析には Fiji を使用した (Schindelin et al., 2012)。

RNA 抽出と RT-qPCR

細胞の RNA の回収には TRIzol を使用し、使用書に従って RNA を抽出した。また、Regnase-1 と結合した RNA の精製には RNA Clean and Concentrator-5 (Zymo Research) を使用書の通りに使用した。

RNA の逆転写には ReverTra Ace (TOYOBO) を使用書の通り使用し、cDNA は PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) と混和後、StepOnePlus™ リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いてその増幅を検出した。それぞれの RNA 量は 18S もしくは *Actb* との相対値を算出している。本研究の RT-qPCR で使用したプライマーは表 2 の通りである。

表 2 qPCR プライマー

Gene	Species	Forward/Reverse	Sequence (5' to 3')
<i>Il6</i>	mouse	Forward	GTAGCTATGGTACTCCAGAAGAC
<i>Il6</i>	mouse	Reverse	ACGATGATGCACTTGCAGAA
<i>Zc3h12a</i>	mouse	Forward	CGAGAGGCAGGAGTGGAAAC
<i>Zc3h12a</i>	mouse	Reverse	CTTACGAAGGAAGTTGTCCAGGCTAG
<i>Nfkbiz</i>	mouse	Forward	CTCCGACTCCTCCGATTTCTC
<i>Nfkbiz</i>	mouse	Reverse	GCTTGTGCTTCGGATGTGTAG
<i>Actb</i>	mouse	Forward	GGCTGTATCCCCTCCATCG
<i>Actb</i>	mouse	Reverse	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
<i>18S</i>	mouse/human	Forward	CGGACAGGATTGACAGATTG
<i>18S</i>	mouse/human	Reverse	CAAATCGCTCCACCAACTAA
<i>IL6</i>	human	Forward	CAGCCACTCACCTCTCAGAAC
<i>IL6</i>	human	Reverse	GCATCCATCTTTTTTCAGCCATCTTTGG
<i>PTGS2</i>	human	Forward	CATGTCAAACCGAGGTGTATG
<i>PTGS2</i>	human	Reverse	GAAGTGGGTAAGTATGTAGTGCAC
<i>NFKBIZ</i>	human	Forward	GAAAGGGCCCGATTTCGTTGTCTG
<i>NFKBIZ</i>	human	Reverse	GAAGCAGATCAGCACTGCTCTC
<i>ZC3H12A</i>	human	Forward	GAAGAGGAAAAGGAGGGCAG

<i>ZC3H12A</i>	human	Reverse	CTCCAGGATGGCACAAACAC
<i>CXCL1</i>	human	Forward	GAATTCACCCCAAGAACATC
<i>CXCL1</i>	human	Reverse	CTTCTGGTCAGTTGGATTTG
<i>CXCL2</i>	human	Forward	GAAGTGCCTGCCAGTGCTTG
<i>CXCL2</i>	human	Reverse	GATTTTCTTAACCATGGGCGATG
<i>CXCL3</i>	human	Forward	GTGGTCACTGAACTGCGCTG
<i>CXCL3</i>	human	Reverse	GATTTTCTGAACCATGGGGGATG
<i>MAFK</i>	human	Forward	CGACTAATCCCAAACCGAATAAGG
<i>MAFK</i>	human	Reverse	GTTCTTGAGTGTGCGCCGAC
<i>NFKBID</i>	human	Forward	CTCCTGACTTCTACCCACCCTC
<i>NFKBID</i>	human	Reverse	CCAAAGCCAGCATGTGAGCTC
<i>NFKBIA</i>	human	Forward	GAGGAGTACGAGCAGATGGTC
<i>NFKBIA</i>	human	Reverse	CAGGTTGTTCTGGAAGTTGAG
<i>ACTB</i>	human	Forward	CACCATTGGCAATGAGCGGTTCC
<i>ACTB</i>	human	Reverse	CTTCTGCATCCTGTGGCAATGC

RNA シーケンシング

野生型もしくは *Regnase-1*^{SS13A/SS13A} マウス由来の PEC を最終濃度が 100 ng/ml になるように LPS (InvivoGen) で 0、4 または 8 時間刺激し、前述の通り TRIzol を使って RNA を精製した。cDNA ライブラリは NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) を使って調製し、NextSeq 500 System (Illumina) で使用書に従ってシーケンス解析を行った。

得られたデータは Galaxy を使って解析した (Afgan et al., 2018)。HISAT2 (paired end, unstranded) (Galaxy Version 2.1.0) を使って得られたリードをマウスゲノムにマッピングした後、featureCounts (Galaxy Version 1.6.3) を使ってリードをカウントした。

Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)

培地中のサイトカイン濃度は IL-6 Mouse Uncoated ELISA Kit (Invitrogen) を使用書に従って使用した。発光は iMark Microplate Reader (Bio-Rad) で検出した。

ルシフェラーゼアッセイ

5xNF- κ B ホタルルシフェラーゼレポーターベクターと、インターナルコントロールであるウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクター、野生型もしくは変異体 IRAK1 の 3 種類のベクターを HeLa 細胞にトランスフェクションし、ピッカジーンデュアルシーバンジュー発光キット (東洋ビーネット) を用いて発光を検出することで IRAK1 による NF- κ B 活性化の評価を行った。NF- κ B 活性化の評価にはホタルルシフェラーゼによる発光強度をウミシイタケルシフェラーゼによる発光強度で割ることで算出した。

細胞免疫染色/蛍光観察

Regnase-1 の局在を観察するために、FLAG タグ付きの *Regnase-1* を一過性に発現する細胞をカバーガラスの上で培養し、4%-バラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (nacalai tesque) で細胞を固定化した後、PBS に 0.5% (vol/vol) の Triton X-100 (nacalai tesque) を含む溶液で透過処理を行った。その後、ブロッキング溶液 (2% (vol/vol) ヤギ血清 (FUJIFILM Wako Pure Chemical)、0.1% (wt/vol) ゼラチンを含む PBS) でブロッキングし、抗体反応へと進んだ。使用した抗体は表 1 の通りである。また、2次抗体反応の際にヘキスト 33342 (Invitrogen) を用いて DNA (核) の染色も行った。

EGFP の検出には前述の通りに透過処理まで行い、その後ヘキスト 33342 で DNA を染色した。
蛍光は TCS SPE (Leica) で検出し、得られた画像は Fiji で解析した(Schindelin et al., 2012)。

アミノ酸配列解析

それぞれのタンパク質のアミノ酸配列は NCBI のデータベースを参照した。集めたアミノ酸配列は T-coffee アライメントで配列保存性を解析し(Notredame et al., 2000)、Jalview によって可視化した(Waterhouse et al., 2009)。

二次構造予測には PSIPRED 4.0 を用いた(Buchan & Jones, 2019; Jones, 1999)。

核外輸送シグナル(NES)の探索には予測ツール LocNES を使用した(D. Xu et al., 2015)。

3.1. Regnase-1 と 14-3-3 の結合メカニズム

3.1.1. IL-1 β 刺激依存的に Regnase-1 と結合するタンパク質の同定

まず、IL-1 β 刺激で Regnase-1 との結合が変動するタンパク質を網羅的に調べた。FLAG-HA タグが付加された Regnase-1 を発現する HeLa 細胞を IL-1 β で刺激後、架橋剤である DSP でタンパク質同士を架橋して免疫沈降を行い、質量分析によって結合タンパク質を同定した(図 4A)。IL-1 β 刺激有り無しとの 2 つの条件下で Regnase-1 結合タンパク質の量的な変化を調べたところ、SCF (Skp、Cullin、F-box)複合体と 14-3-3 タンパク質ファミリーが IL-1 β 刺激下において Regnase-1 と強く結合することが示唆された(図 4B)。Regnase-1 は IL-1 β 刺激によって SCF 複合体によってユビキチン化されることが知られているため(Iwasaki et al., 2011)、IL-1 β 刺激依存的に Regnase-1 が SCF 複合体と結合することはこれまでの報告を裏付ける結果となった。一方で、14-3-3 タンパク質群については、Regnase-1 との関連がこれまで報告されていなかった。そこで本研究では Regnase-1 と 14-3-3 の結合が及ぼす影響について調べることにした。

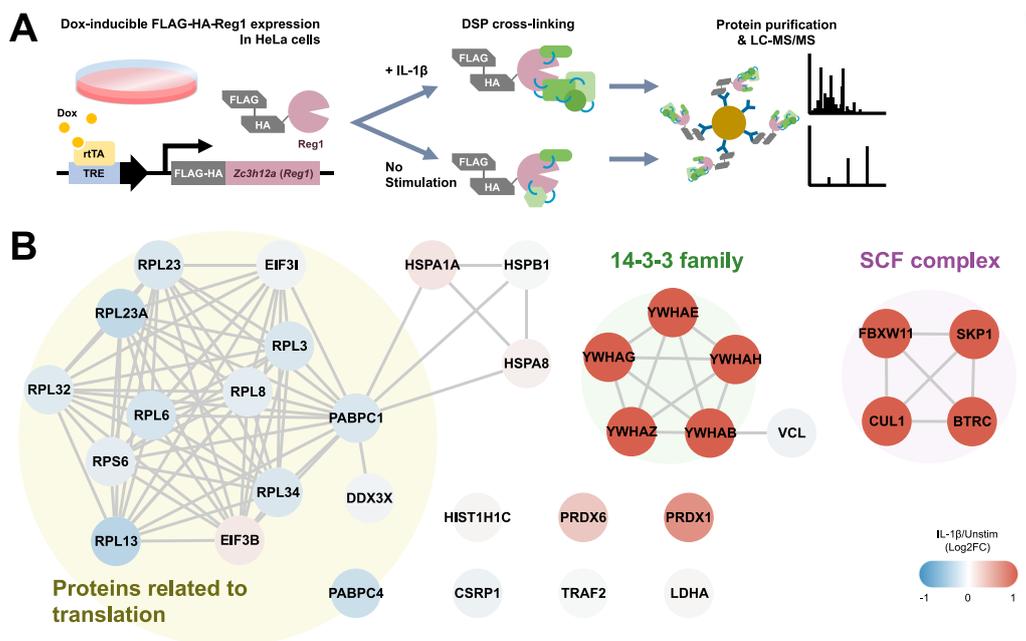


図 4 Regnase-1 結合タンパク質の結合ネットワーク

A) Regnase-1 結合タンパク質の網羅的解析の大まかな流れ。詳しくは実験材料と方法参照。
 B) それぞれのノードは Regnase-1 結合タンパク質と同定されたタンパク質を示す。IL-1 β 刺激で Regnase-1 との結合が弱まったものは青、強まったものは赤で表した。なお、質量分析は共同研究の結果である(実験材料と方法を参照)。YWHAB/E/G/H/Z: 14-3-3 β /ε/γ/η/ζ、BTRC: β TRCP1、FBXW11: β TRCP2、CUL1: Cullin-1。

14-3-3 ファミリーはヒトやマウスでは 14-3-3 β 、 γ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 θ 、 σ の 7 つのパラログから構成されており、ヘテロダイマーやホモダイマーを形成することが知られている(Aitken, 2006; Pennington et al., 2018)。14-3-3 にはリン酸化セリン/スレオニン残基に結合するポケットがあり、14-3-3 ダイマーは特有のモチーフを持つリン酸化サイトを 2 つ認識し結合する(Muslin et al., 1996; Yaffe et al., 1997)。また、SCF 複合体は結合タンパク質をユビキチン化する酵素活性を持

つが、14-3-3 自体には酵素活性は存在せず、結合タンパク質への影響は 14-3-3 が結合する部位によって多岐にわたることが知られている(Aitken, 2006; Pennington et al., 2018)。

まず、Regnase-1 と 14-3-3 もしくは Regnase-1 と β TRCP (SCF 複合体の構成要素であり、標的タンパク質に直接結合する)の結合が、架橋剤なしの条件下でも検出できるかを確認した。その結果、Regnase-1-14-3-3 と Regnase-1- β TRCP の両方の結合が IL-1 β 刺激に依存して起きることが、架橋剤なしの条件下でも検出できた(図 5A)。そのため、以降の実験では架橋剤を使用せずに免疫沈降を行った。

また、Regnase-1 と 14-3-3 の 7 つのパラログそれぞれとの結合を調べたところ、Regnase-1 は 14-3-3 σ 以外のすべての 14-3-3 パラログと結合できることが分かった(図 5B)。特に 14-3-3 β 、 γ 、 ε との結合は ζ や η 、 θ よりも強かったため、以降の実験では 14-3-3 ε を使って Regnase-1 と 14-3-3 の関係を調べた。

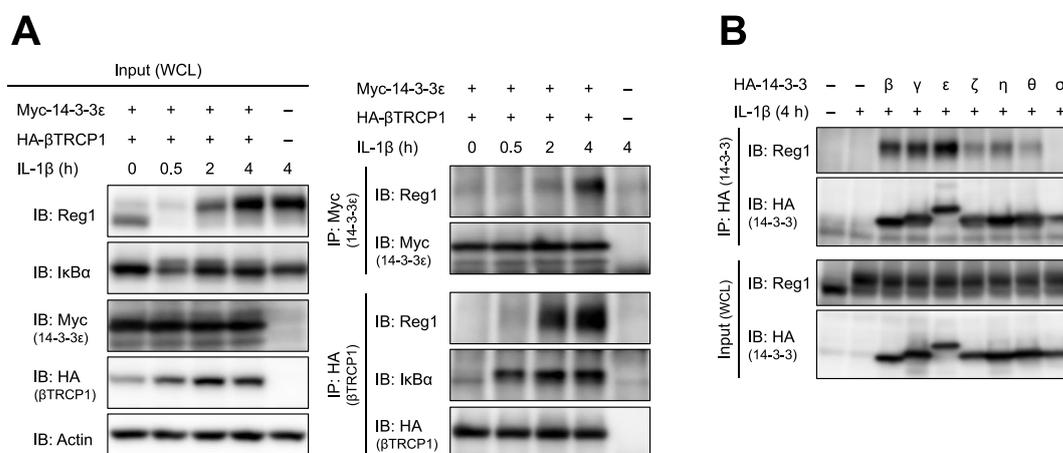


図 5 Regnase-1 は IL-1 β 刺激依存的に 14-3-3 ファミリータンパク質や SCF 複合体と結合する

A) IL-1 β 刺激下における 14-3-3 ε もしくは β TRCP と Regnase-1 の結合。HeLa 細胞に Myc-14-3-3 ε と HA- β TRCP1 を一過性に発現させ、IL-1 β (10 ng/ml) で刺激後、それぞれの結合を Myc 抗体もしくは HA 抗体による免疫沈降で調べた。

B) 14-3-3 パラログと Regnase-1 の結合。HeLa 細胞に HA タグ付きの 14-3-3 タンパク質を一過性に発現させ、IL-1 β (10 ng/ml) で 4 時間刺激後、HA-14-3-3 と Regnase-1 の結合を免疫沈降で調べた。

3.1.2. 14-3-3 は MyD88 依存型の刺激に依存して Regnase-1 と結合する

IL-1 β の刺激で活性化されるシグナル分子である MyD88 は、TLR リガンドによる刺激でも活性化される(Takeuchi & Akira, 2010)。そこで、TLR リガンド刺激でも Regnase-1 と 14-3-3 の結合が起きるかを調べたところ、Pam₃CSK₄ (TLR1/2 リガンド)、LPS (TLR4 リガンド)、R848 (TLR7/8 リガンド)、CpG (TLR9 リガンド)の刺激が Regnase-1 と 14-3-3 の結合を誘導し、poly I:C (TLR3 リガンド)による刺激は Regnase-1 と 14-3-3 の結合を誘導しなかった(図 6)。TLR3 のシグナルは TLR シグナルの中でも唯一、アダプタータンパク質 TRIF にのみ依存し、その他の TLR はアダプタータンパク質 MyD88 依存のシグナルを活性化することが知られている(Takeuchi & Akira, 2010)。これらの結果から、Regnase-1 と 14-3-3 の結合は、IL-1 β や LPS 等によって活性化される MyD88 を介したシグナルによって引き起こされることが示唆された。

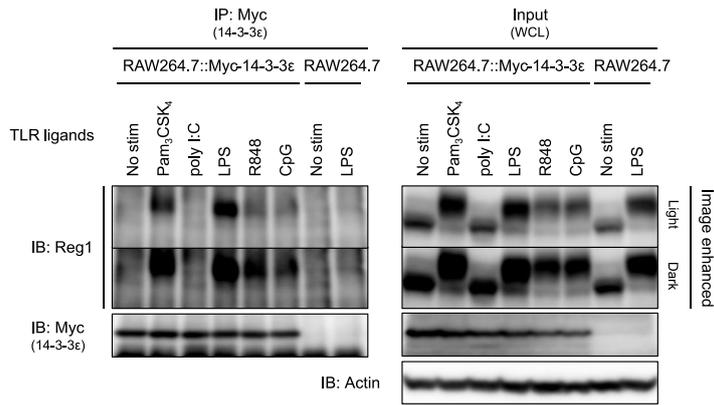


図 6 Regnase-1 と 14-3-3 の結合は MyD88 を活性化させる TLR 刺激でも誘導される

TLR 刺激下における Regnase-1 と 14-3-3 の結合。Myc-14-3-3ε を安定的に発現する RAW264.7 細胞を Pam₃CSK₄ (10 ng/ml)、poly I:C (100 μg/ml)、LPS (100 ng/ml)、R848 (100 nM)、CpG DNA (1 μM) で 4 時間刺激し、Regnase-1 と 14-3-3 の結合を免疫沈降で調べた。

3.1.3. Regnase-1 の S494 と S513 のリン酸化が Regnase-1 と 14-3-3 との結合に必須である

次に、14-3-3 と Regnase-1 の結合の分子メカニズムに注目した。まず、14-3-3 がリン酸化タンパク質に結合することから(Muslin et al., 1996; Yaffe et al., 1997)、14-3-3 と結合する Regnase-1 がリン酸化しているかを調べることにした。

図 5~図 6 に見られるように、ウェスタンブロットで Regnase-1 を検出した際、MyD88 依存性の刺激をした細胞では未刺激状態でのバンドよりも高い位置に 2 本目のバンドが検出される。未刺激状態よりも高い位置のバンドは Regnase-1 欠損細胞では検出されないことから(図 7A)、刺激によって Regnase-1 のバンドが上方にシフトしたものだと考えられた。このような Regnase-1 のバンドシフトは、細胞溶解液を脱リン酸化酵素である λ-フォスファターゼ(λPP)で処理すると未刺激状態の位置に下がることから(図 7B)、このバンドシフトは Regnase-1 のリン酸化の影響によるものと分かった。そこで次に Myc-14-3-3 の免疫沈降物についても同様に確認してみたところ、14-3-3 と結合している Regnase-1 は全てバンドシフトしており、このバンドシフトは λPP によって解消された(図 7B)。このことから、14-3-3 と結合した Regnase-1 はリン酸化されていることが分かった。

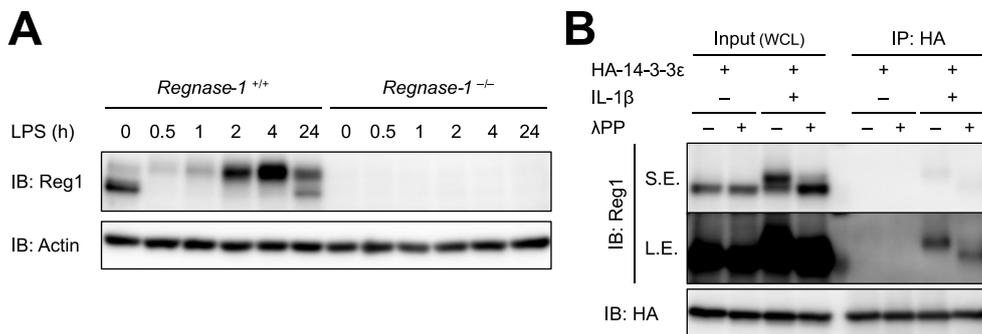


図 7 MyD88 依存性の刺激を受けると、Regnase-1 はリン酸化される

A 野生型(Regnase-1^{+/+})と Regnase-1 を欠損した腹腔浸出細胞(PEC) (Regnase-1^{-/-})を LPS(100 ng/ml)で刺激し、Regnase-1 をウェスタンブロットで検出した結果。

B HA-14-3-3ε を一過性に発現する細胞を IL-1β (10 ng/ml)で刺激し、細胞溶解液もしくは HA-14-3-3ε 結合タンパク質を λPP で処理後、ウェスタンブロットで Regnase-1 を検出した。S.E.: 短い露光時間での検出、L.E.: 長い露光時間での検出。

次に 14-3-3 との結合に必須な Regnase-1 のリン酸化部位を探索した。Regnase-1 と 14-3-3 との結合が刺激によって誘導されることから、IL-1 β で誘導される Regnase-1 のリン酸化部位を質量分析によって解析したところ、S21、S61、S62、S362、S439、S470、S494、そして S513 のリン酸化が IL-1 β で誘導されることが分かった(図 8A)。このうち、14-3-3 との結合に必須な部位を同定するため、それぞれのセリン(S)をアラニン(A)に置換した変異体を用いて 14-3-3 との結合を調べたところ、S494A と S513A の 2 つの変異体が 14-3-3 と結合できなくなることが分かった(図 8B)。この 2 つのリン酸化部位は Regnase-1 の Zinc Finger ドメインと C 末端側の CTD 構造領域の間にある Intrinsically disordered region (IDR) に位置し、S494 と S513 の周辺配列は種間の保存性が高いことが分かった(図 8C)。また、これらの配列は 14-3-3 との結合モチーフである Mode 2 (R-x-Y/F-x-pS-x-P) とも一部一致し(Yaffe et al., 1997)、これら 2 つのリン酸化サイトが 14-3-3 の結合サイトであると考えられる。

以上のことから、IL-1R や MyD88 依存の TLR 刺激が Regnase-1 の S494 と S513 のリン酸化を誘導することで、Regnase-1 が 14-3-3 と結合することが明らかとなった。

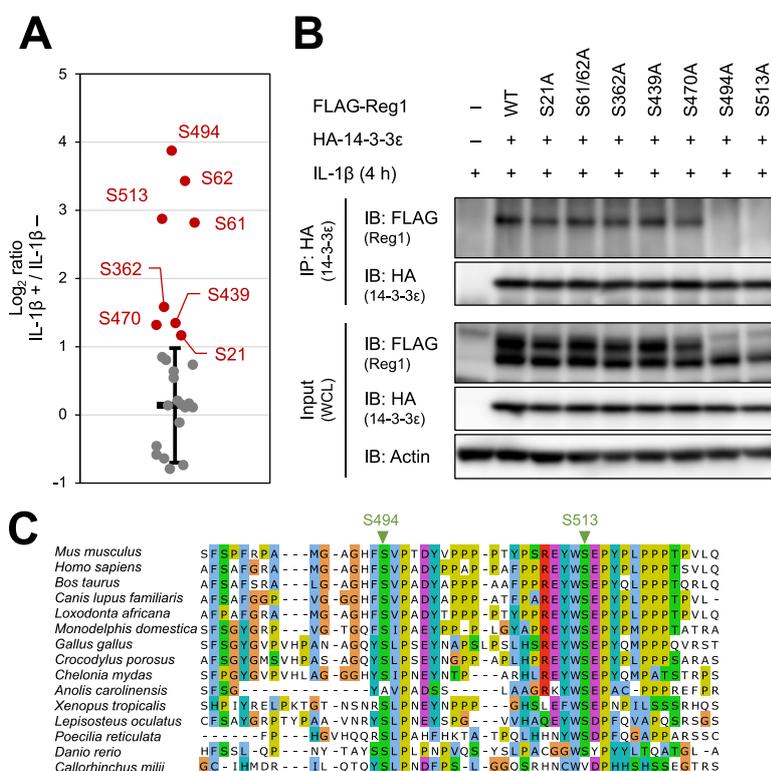


図 8 Regnase-1 の S494、S513 のリン酸化が 14-3-3 との結合に必須である

A) Regnase-1 のリン酸化サイトの定量化の結果。それぞれの点は未刺激状態と IL-1 β (10 ng/ml) 刺激状態とで比較した際のリン酸化サイトの量比であり、IL-1 β 刺激で 2 倍以上の増加がみられるリン酸化サイトは赤で印した。水平方向の黒い線は非リン酸化ペプチドの量比の平均値で、エラーバーは標準偏差値である。なお、質量分析は共同研究の結果である(実験材料と方法を参照)。

B) それぞれの Regnase-1-SA 変異体と 14-3-3 の結合。HA-14-3-3 ϵ と FLAG-Regnase-1-WT もしくは SA 変異体を HeLa 細胞に一過性に発現させ、IL-1 β (10 ng/ml) で 4 時間刺激後、HA 抗体で免疫沈降を行った。

C) Regnase-1 の S494/S513 の周辺アミノ酸配列の配列保存性。

3.1.4. IRAK1 の CSD は Regnase-1 と 14-3-3 の結合の誘導に必須である

図 5～図 6 で見た Regnase-1 のリン酸化によるバンドシフトは以前にも報告されており、MyD88 欠損細胞では TLR4 のリガンドである LPS 刺激下でも Regnase-1 のリン酸化によるバンドシフトは確認されていない(Iwasaki et al., 2011)。IL-1R や TLR の下流で活性化する MyD88 はアダプタータンパク質として働き、下流の IRAK4、IRAK1/2、そして TRAF6 を活性化させることが知られているが(Akira et al., 2006)、LPS 刺激による Regnase-1 のバンドシフトは *Irak1* と *Irak2* のダブルノックアウト細胞でも確認されていない(Iwasaki et al., 2011)。そこで、IRAK1/2 が Regnase-1 のバンドシフトだけでなく 14-3-3 との結合にも必須かどうかを CRISPR-Cas9 システムによる *IRAK1/2* のノックアウトによって調べた。その結果、*IRAK1* と *IRAK2* を標的とする gRNA、および Cas9 タンパク質を発現する細胞では Regnase-1 と 14-3-3 の結合が大きく損なわれていることが分かった(図 9A)。また、*IRAK1*、*IRAK2* を過剰発現させた細胞では、細胞を IL-1 β で刺激しなくても S494、S514 依存的な Regnase-1 と 14-3-3 の結合が確認できた(図 9B)。これらのことから *IRAK1/2* が Regnase-1 と 14-3-3 の結合において重要なシグナル分子であることが明らかとなった。

次に、*IRAK1* の様々な変異体を用いて、*IRAK1* が Regnase-1 と 14-3-3 の結合を誘導するメカニズムをより詳細に調べた。*IRAK1/2* は N 末端側にある Death ドメイン(DD)を用いて MyD88 と相互作用し、キナーゼとして活性化することが知られている(Gottipati et al., 2008; Wesche et al., 1997)。また、活性化した *IRAK* は TRAF6 と複合体を作り、TRAF6 を活性化させる(Ye et al., 2002) (図 1)。図 9C～D にある通り、DD が欠損した *IRAK1- Δ DD* (1-103)、キナーゼ活性を持たない *IRAK1-T209A* (Kollewe et al., 2004)、そして C 末端を欠損させた *IRAK1- Δ 619-710* は Regnase-1 と 14-3-3 の結合を誘導しなかった。*IRAK1* の C 末端には TRAF6 との結合領域があるため、TRAF6 と結合できない変異体、*IRAK1-E541/584/704A*(Ye et al., 2002)についても調べたところ、興味深いことにこの変異体は Regnase-1 と 14-3-3 の結合を誘導できることが分かった(図 9C)。図 9D～E に示す通り、*IRAK1* の C 末端には TRAF6 との結合モチーフのほかに構造を持つ領域(C-terminal structured domain、CSD)があることが予測された。そこで、この CSD を構成するアミノ酸配列の中で種間の保存性が極めて高い R663 と K665 をアラニンに置換したところ、この *IRAK1-R663/K665A* 変異体は Regnase-1 と 14-3-3 の結合を誘導できないことが分かった(図 9C)。

前述の通り、*IRAK1* は MyD88 依存の刺激下において NF- κ B を活性化させる重要な役割を持っている。興味深いことに、Regnase-1 と 14-3-3 の結合を誘導しない *IRAK1- Δ 619-710* と *IRAK1-R663/K665A* はいずれも NF- κ B の活性化には影響を及ぼさないことが分かった(図 9F)。TRAF6 と結合できない *IRAK1-E541/584/704A* は NF- κ B の活性化能を失っていることから、*IRAK1* による Regnase-1 と 14-3-3 の結合は NF- κ B の活性化メカニズムとは異なる経路で誘導されることが示唆された。

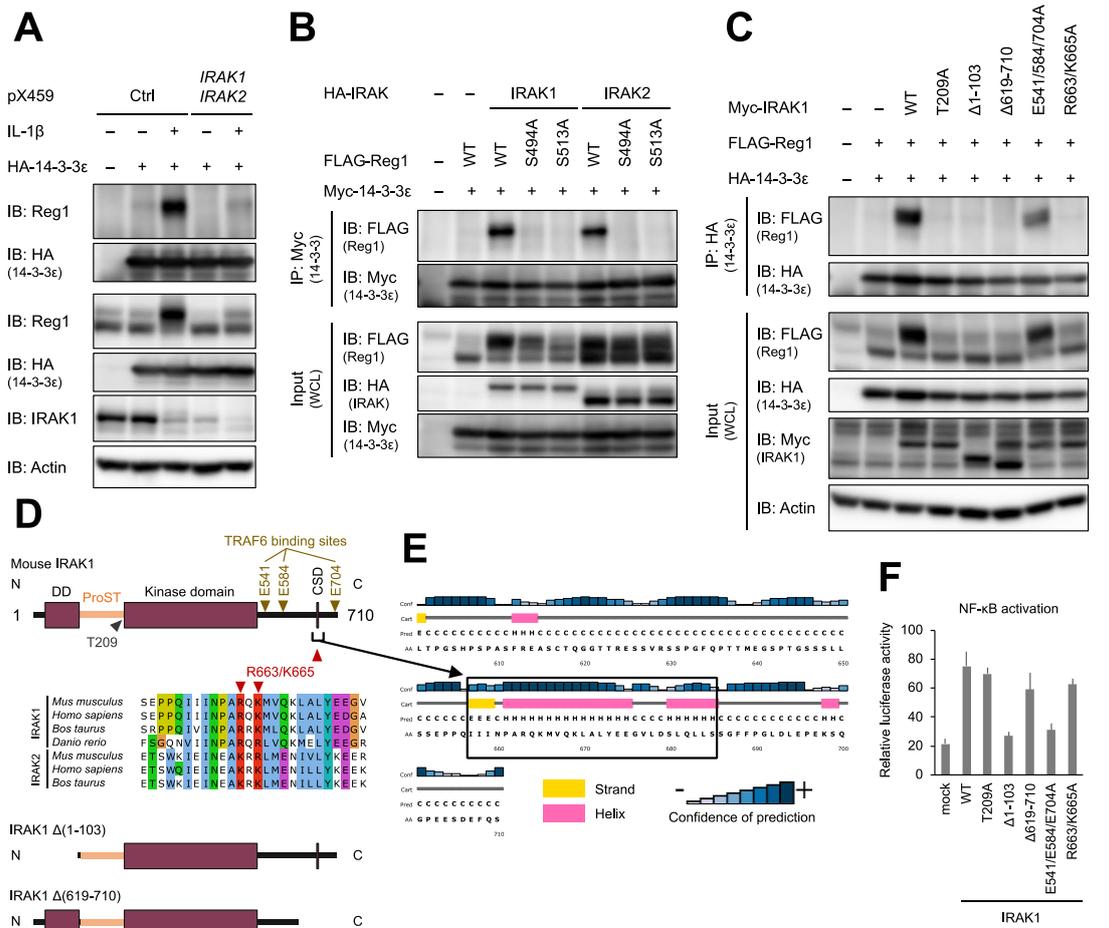


図 9 Regnase-1 と 14-3-3 の結合は IRAK1 に依存して誘導される

A) IRAK1/2 欠損 HeLa 細胞での Regnase-1 と 14-3-3 の結合。IRAK1 と IRAK2 を標的とする gRNA を発現する pX459 を一過性に発現させ、ピューロマイシンでセレクション後、HA-14-3-3ε と Regnase-1 との結合を免疫沈降で調べた。細胞は IL-1β (10 ng/ml) で 4 時間刺激した。

B) IRAK1/2 過剰発現下における Regnase-1 と 14-3-3 の結合。HeLa 細胞に HA-IRAK1 もしくは IRAK2 と FLAG-Regnase-1-WT もしくは SA 変異体を Myc-14-3-3ε と共に一過性に発現させ、Myc-14-3-3ε と FLAG-Regnase-1 の結合を免疫沈降で調べた。

C) 変異体 IRAK1 過剰発現下における Regnase-1 と 14-3-3 の結合。HeLa 細胞に Myc-IRAK1-WT もしくは変異体を FLAG-Regnase-1-WT と HA-14-3-3ε と共に一過性に発現させ、HA-14-3-3ε と FLAG-Regnase-1 の結合を免疫沈降で調べた。

D) マウス IRAK1 タンパク質の一次構造の図と CSD のアミノ酸配の一部。DD: Death ドメイン、CSD: C-terminal structured domain。

E) マウス IRAK1 の C 端側のアミノ酸配列の二次構造予測の結果。

F) IRAK1 変異体過剰発現による NF-κB の活性化。HeLa 細胞にそれぞれの IRAK1 変異体と NF-κB ルシフェラーゼレポーターを一過性に発現させ、ルシフェラーゼ活性を測定した。F)における棒グラフの値は biological replicates (n = 3)の平均値であり、エラーバーは標準偏差値である。

3.2. Regnase-1 と 14-3-3 および β TRCP の関係

3.2.1. Regnase-1 と 14-3-3、Regnase-1 と β TRCP の結合はそれぞれ独立して引き起こされる

図 10A に示す通り、14-3-3 との結合に必要な Regnase-1 のリン酸化サイト(S494、S513)は β TRCP との結合に必要なリン酸化サイト(S435、S439)の近傍に存在する。また、14-3-3 も β TRCP も MyD88 依存の刺激によって Regnase-1 に結合することから、Regnase-1-14-3-3 複合体形成と Regnase-1- β TRCP 複合体形成の関係について調べることにした。

まず、これら 2 種類の複合体形成が他方の複合体形成に必須かどうかを調べた。 β TRCP に結合できない変異体 Regnase-1-S435/439A が 14-3-3 に結合できること (図 10B)、14-3-3 に結合しない変異体 Regnase-1-S494A、-S513A が β TRCP に結合できることから (図 10C)、これら 2 種類の複合体形成は同じ Regnase-1 分子上で連続的に起きるものではないことが分かった。

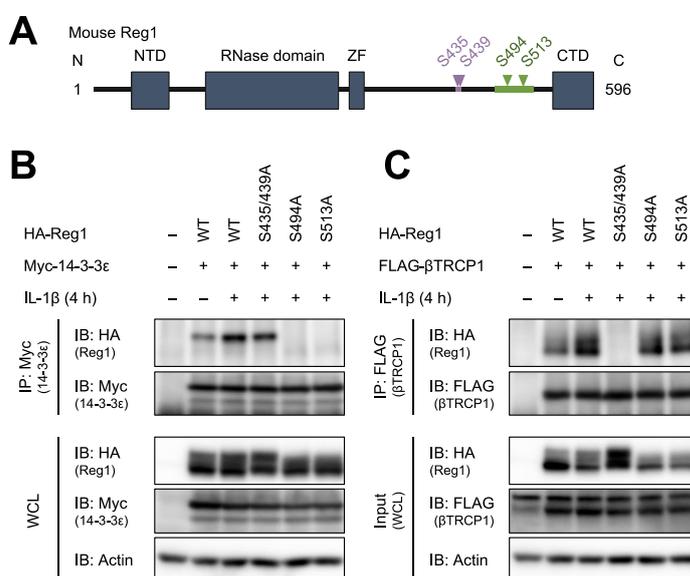


図 10 Regnase-1 と 14-3-3 の結合に β TRCP は必要なく、逆もまた同じである

A) マウス Regnase-1 タンパク質の一次構造の図。14-3-3 の結合サイトを緑、 β TRCP の結合サイトを紫で印した。NTD: N-terminal ドメイン、ZF: Zinc finger ドメイン、CTD: C-terminal ドメイン。

B) 各 Regnase-1-SA 変異体と 14-3-3 の結合。HeLa 細胞に HA-Regnase-1-WT もしくは SA 変異体と Myc-14-3-3 ϵ を一過性に発現させ、IL-1 β (10 ng/ml) で 4 時間刺激後、Myc 抗体で免疫沈降を行った。

C) 各 Regnase-1-SA 変異体と β TRCP の結合。HeLa 細胞に HA-Regnase-1-WT もしくは SA 変異体と FLAG- β TRCP を一過性に発現させ、IL-1 β (10 ng/ml) で 4 時間刺激後、FLAG 抗体で免疫沈降を行った。

次に、14-3-3、 β TRCP のそれぞれに結合する Regnase-1 のリン酸化状態をウェスタンブロットで確認してみたところ、それぞれに結合する Regnase-1 の泳動速度は異なることが分かった (図 11A~B)。14-3-3 と結合する Regnase-1 は高い位置にバンドシフトしているが、 β TRCP が結合する Regnase-1 は、これよりもより低い位置に検出された。この結果から、14-3-3 と結合するような Regnase-1 は β TRCP とは結合しないことが分かり、これはつまり、Regnase-1 に結合した 14-3-3 が Regnase-1- β TRCP の結合を阻害する可能性を示唆している。なお、14-3-3 がバン

ドシフトした Regnase-1 にしか結合しない(図 7)という性質上、この実験結果では β TRCP が Regnase-1 と 14-3-3 の結合を阻害しているかどうかは判定できない。しかしながら β TRCP と結合した Regnase-1 はユビキチン化に続くタンパク質分解を受けるため、間接的に Regnase-1 と 14-3-3 の結合を阻害しているといえる。

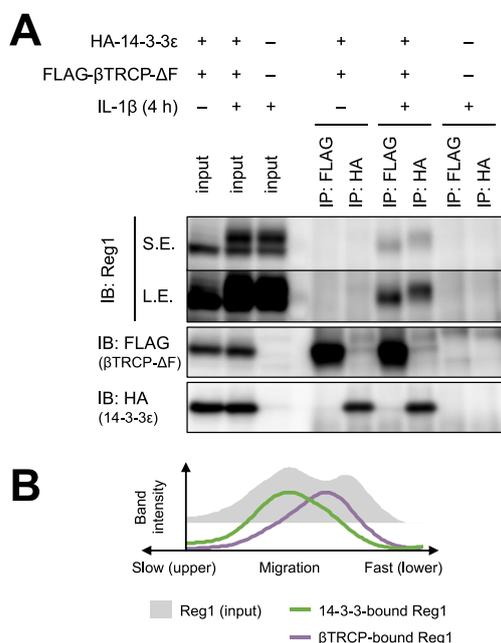


図 11 β TRCP は 14-3-3 が結合しない Regnase-1 に結合する

A) 14-3-3 に結合した Regnase-1 と β TRCP に結合した Regnase-1 のバンドの高さを比べた結果。HeLa 細胞に HA-14-3-3 ϵ を F-box ドメインを欠損した FLAG- β TRCP- Δ F と共に一過性に発現させ、IL-1 β (10 ng/ml) で 4 時間刺激した後に、FLAG、HA それぞれの抗体で免疫沈降を行った。なおこの実験では、ユビキチン化による Regnase-1 の泳動速度の変化(バンドシフト)を防ぐために、結合タンパク質をユビキチン化しない変異体である β TRCP- Δ F を使用している。S.E.: 短い露光時間での検出、L.E.: 長い露光時間での検出。

B) A)でのバンドの発光強度を定量化した結果。

3.2.2. Regnase-1 の S513A 変異体は MyD88 刺激下で不安定である

14-3-3 と結合した Regnase-1 が Regnase-1 の分解を誘導する β TRCP とは結合しない傾向にあることから、14-3-3 が Regnase-1 のタンパク質安定性に関与することが予想された。そこで、14-3-3 が Regnase-1 に与える影響についてより正確に調べるために、Regnase-1 に S513A の変異をもつ *Regnase-1*^{S513A/S513A} ノックインマウスを作成した。このマウスについて、生体レベルで大きな表現型は確認されず、脾臓中の T 細胞や B 細胞の数などについても野生型と大きな差は見られなかった。

次に *Regnase-1*^{S513A/S513A} マウス由来の MEF を用いて、IL-1 β 刺激後の Regnase-1 の状態をウェスタンブロットで調べた。野生型の MEF では、刺激後 30 分で Regnase-1 は分解され、刺激後 2~4 時間で再発現してきた。そして野生型の MEF において、この再発現した Regnase-1 のほとんどはバンドシフトした状態で検出された(図 12A)。一方で *Regnase-1*^{S513A/S513A} マウス由来の MEF では、刺激後 30 分で分解された後、Regnase-1 のタンパク質量が野生型のように増強されて発現することはなく、またバンドシフトも確認されなかった(図 12A)。IL-1 β 刺激後の Regnase-1 のタンパク質量に野生型と S513A で大きな差があることから、*Regnase-1* の mRNA 量を調べたところ、タンパク質量に見られたような大きな差は mRNA レベルでは確認されなかった(図 12B)。同様に、野生型もしくは *Regnase-1*^{S513A/S513A} のマウスから回収した腹腔浸出細胞(peritoneal exudate cell、PEC)を LPS で刺激した際にも、*Regnase-1* の mRNA 量には差はなく、Regnase-1-S513A のタンパク質量が大きく減少した(図 12C~D)。これらの結果から Regnase-1 の S513A 変異は MyD88 依存の刺激下において Regnase-1 タンパク質を不安定化している可能性が示唆された。

Regnase-1 が β TRCP を含む SCF 複合体にユビキチン化を受け、プロテアソームで分解される

ことから(Iwasaki et al., 2011)、プロテアソーム阻害剤である MG-132 で細胞を処理したところ、LPS で刺激した *Regnase-1*^{S513A/S513A} 由来の細胞においても *Regnase-1* のスミアなバンドが確認された(図 12C)。なお、バンドがスミアになる理由はおそらくユビキチン化による影響だと考えられる。また、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX)を用いて LPS 刺激下における *Regnase-1* タンパク質の分解速度を調べたところ、野生型ではバンドシフトした *Regnase-1* が比較的安定して存在するのに対し、S513A 変異体はすぐに分解されることが確認された(図 12E~F)。以上の結果から、14-3-3 に結合できない *Regnase-1*-S513A 変異体は MyD88 依存の刺激下において野生型よりもタンパク質として不安定であることが明らかとなった。

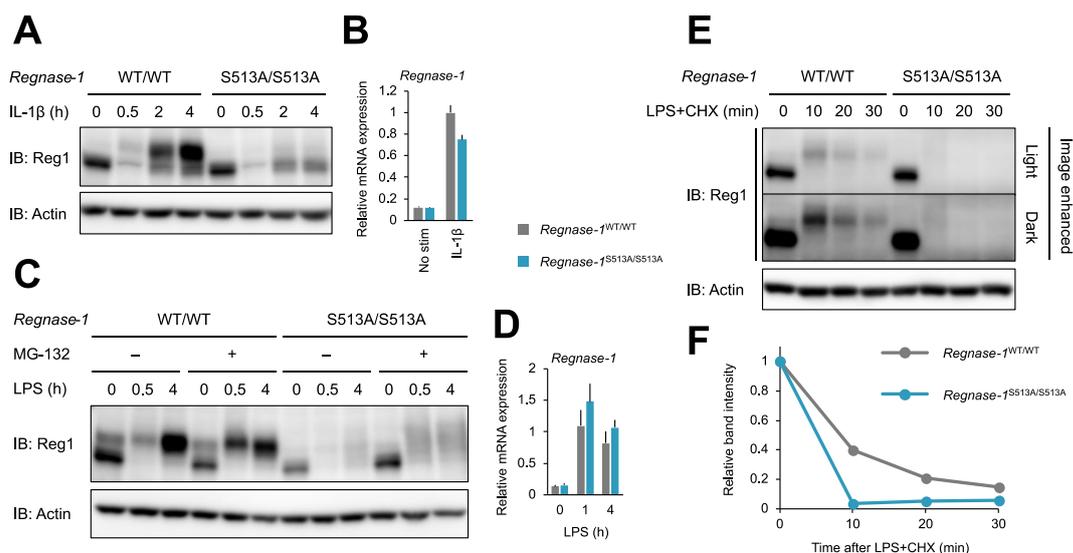


図 12 *Regnase-1* の S513A 変異は刺激後の *Regnase-1* タンパク質を不安定化させる

A-B) 野生型と S513A ノックインマウス由来の MEF を **A)** IL-1 β (10 ng/ml)で刺激し、ウェスタンブロットで *Regnase-1* を検出した。**B)** IL-1 β (10 ng/ml)で 4 時間刺激し、*Regnase-1* の mRNA 量を測定した。

C-D) 野生型と S513A ノックインマウス由来の PEC を LPS (100 ng/ml)で刺激し、**C)** ウェスタンブロットで *Regnase-1* を検出した。MG-132 (5 μ M)は刺激の 2 時間前に添加した。**D)** *Regnase-1* の mRNA 量を測定した。

E) 野生型と S513A ノックインマウス由来の PEC に LPS (100 ng/ml)とシクロヘキシミド (CHX、100 μ g/ml)を同時に添加し、ウェスタンブロットで *Regnase-1* の分解速度を調べた。

F) E)のバンドの発光強度から、*Regnase-1* タンパク質量の推移を定量化した。

B)と D)における棒グラフの値は biological replicates (n = 3)の平均値であり、エラーバーは標準偏差値である。

3.3. 14-3-3 は *Regnase-1* を機能的に抑制する

3.3.1. *Regnase-1* の S513A 変異は IL6 の産生量には影響しない

MyD88 依存の刺激下において *Regnase-1* の S513A の変異は *Regnase-1* のタンパク質量を著しく減少させた。そこで次に、*Regnase-1* の S513A の変異が *Regnase-1* の分解対象である *Il6* の mRNA 量に影響するかを調べた(図 13A~B)。興味深いことに、*Regnase-1* のタンパク質量の大きな差にも関わらず、*Il6* の mRNA 量は野生型と *Regnase-1*^{S513A/S513A} で同程度であった。また、それぞれの細胞から分泌された IL-6 の濃度を調べた際も同様に、野生型と *Regnase-1*^{S513A/S513A} において差は見られなかった(図 13C~D)。*Il6* 以外の遺伝子に S513A の変異の影響が出ている

可能性を考え、トランスクリプトームレベルでの解析も行ったが、*Ptgs2*や*Nfkbi2*などの既知の *Regnase-1* の標的を含め、S513A の変異が mRNA 量に影響するような遺伝子は見つからなかった(図 13E)。さらに、転写阻害剤である Actinomycin D (ActD)を添加することによって mRNA 分解速度を測定した際にも、野生型と *Regnase-1*^{S513A/S513A} で差は見られなかった(図 13F)。以上のことから、MyD88 依存の刺激下で *Regnase-1* タンパク質量が極めて少なくなる *Regnase-1*^{S513A/S513A} 細胞でも、*Regnase-1* による標的 mRNA の分解は野生型と同程度に行われていることが分かった。

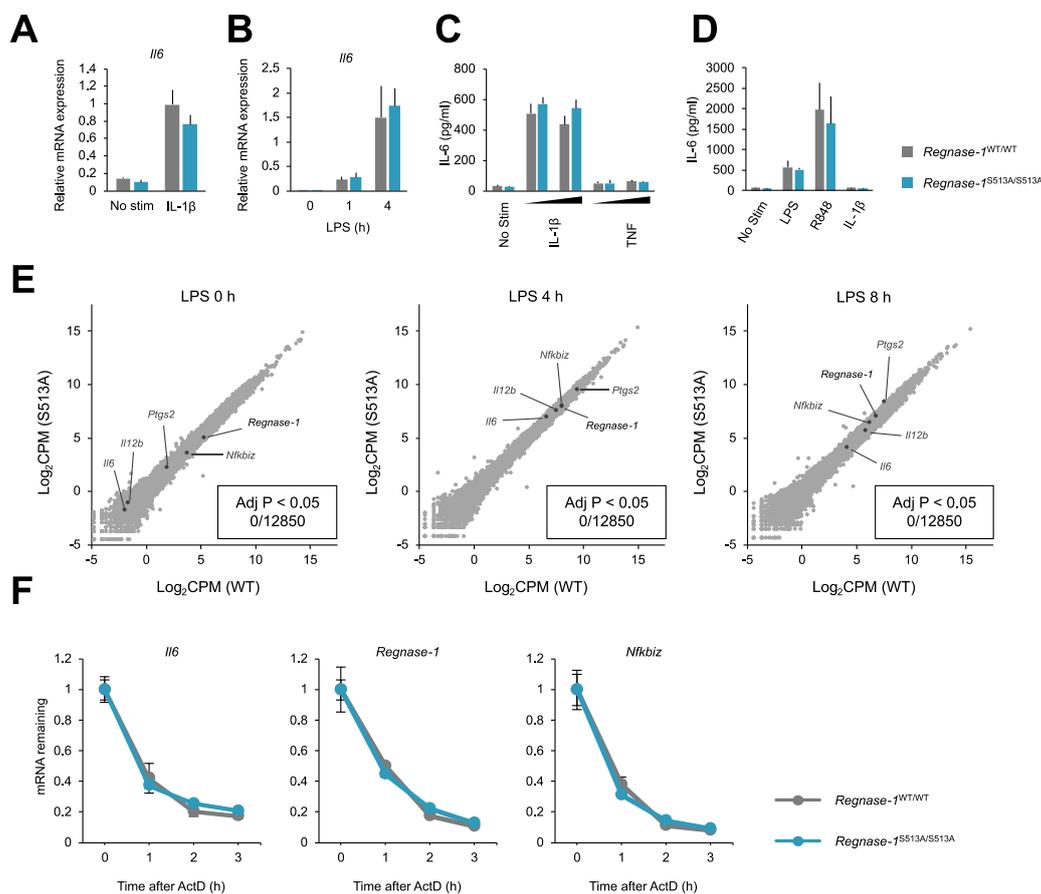


図 13 *Regnase-1* の S513A 変異は *Regnase-1* の分解標的 mRNA 量には影響しない

A) 野生型と S513A ノックインマウス由来の MEF を IL-1 β (10 ng/ml)で 4 時間刺激し、*I/6* の mRNA 量を測定した。

B) 野生型と S513A ノックインマウス由来の PEC を LPS (100 ng/ml)で刺激し、*I/6* の mRNA 量を測定した。

C) 野生型と S513A ノックインマウス由来の MEF を IL-1 β (10 ng/ml)、TNF (10 ng/ml)で 24 時間刺激し、培地中の IL-6 の濃度を測定した。

D) 野生型と S513A ノックインマウス由来の PEC を LPS (100 ng/ml)、R848 (100 nM)、IL-1 β (10 ng/ml)で 24 時間刺激し、培地中の IL-6 の濃度を測定した。

E) 野生型と S513A ノックインマウス由来の PEC を LPS (100 ng/ml)で刺激し、トランスクリプトーム解析を行った。Adj P: 調整済み P 値。

F) 野生型と S513A ノックインマウス由来の MEF を IL-1 β (10 ng/ml)で 4 時間刺激し、その後 Actinomycin D (ActD, 10 μ g/ml)を添加し、それぞれの mRNA の分解速度を測定した。

A)~D)、F)における棒グラフまたは折れ線グラフの値は biological replicates (n = 3)の平均値であり、エラーバーは標準偏差値である。

3.3.2. 14-3-3 とともに β TRCP とともに結合できない Regnase-1 変異体は野生型よりも強く *IL6* mRNA を抑える

図 12A、C にある Regnase-1 のバンドパターンを見てみると、野生型と S513A で大きな差があるのはリン酸化によって上にシフトした Regnase-1 の量であり、下のバンド(未刺激状態の Regnase-1 と同じ高さ)にある Regnase-1 の量には差がないことが分かる。このことと図 13 の結果を合わせると、刺激によってリン酸化されバンドシフトするような Regnase-1 は、*IL6* 等の標的 mRNA の分解には関与していない可能性が示唆された。そこで、タンパク質分解の影響がない状況下で Regnase-1 の機能を調べるために、バンドシフトしない変異体 Regnase-1-S513A に β TRCP を介した分解を受けなくなる S435/439A の変異を加えた変異体 Regnase-1-S435/439/513A を作成した。Regnase-1^{S513A/S513A} ノックイン細胞の結果と同様に、IL-1 β 刺激後の Regnase-1-S513A はタンパク質量が野生型に比べて少なく、顕著なバンドシフトは見られなかった(図 14A)。そして、S435/439A の変異をもつ Regnase-1 では刺激後でも濃いバンドがみられ、Regnase-1-S435/439A は主にバンドがシフトした状態であるのに対し、Regnase-1-S435/439/513A はほとんどバンドシフトしない状態で検出された(図 14A)。

次に、それぞれの Regnase-1-SA 変異体による mRNA の分解効果を評価した。その結果、Regnase-1-S435/439/513A が他の変異体(S513A や S435/439A)よりも強く、分解標的である *IL6* の mRNA 量を抑えることが分かった(図 14B)。このことから、14-3-3 の結合対象であるリン酸化されてバンドシフトするような Regnase-1 は、*IL6* の mRNA を分解する能力を失っていることが明らかとなった。

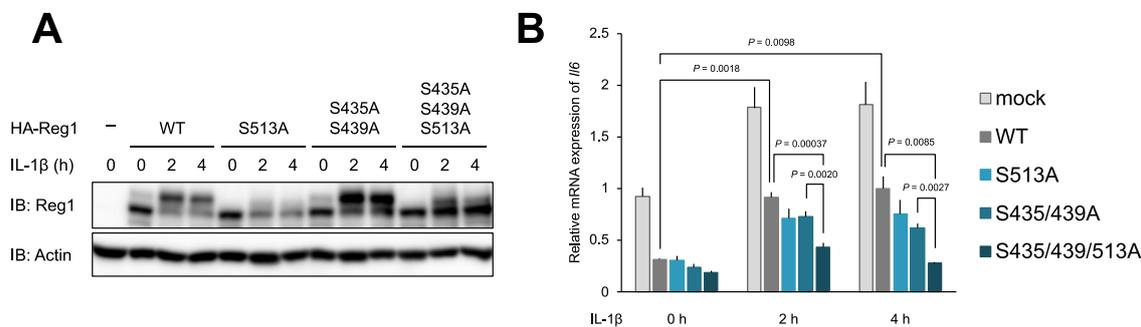


図 14 14-3-3 にも β TRCP にも結合しない Regnase-1 は *IL6* の発現を強く抑制する

A) IL-1 β 刺激下におけるそれぞれの Regnase-1-SA 変異体のタンパク質量とリン酸化パターン。REGNASE-1 欠損 HeLa 細胞に HA-Regnase-1-WT もしくは SA 変異体を一過性に発現させ、IL-1 β (10 ng/ml) で刺激後、ウェスタンブロットで Regnase-1 を検出した。なおこの実験では、発現させた Regnase-1 がリン酸化の影響を受けやすくするために Regnase-1 の発現をできるだけ抑えているので、HA 抗体ではなく力価の高い Regnase-1 抗体で Regnase-1 を検出した。

B) IL-1 β 刺激下におけるそれぞれの Regnase-1-SA 変異体による *IL6* mRNA の発現抑制。HeLa 細胞に HA-Regnase-1-WT もしくは SA 変異体を *IL6* と共に一過性に発現させ、IL-1 β (10 ng/ml) で刺激後、*IL6* の mRNA 量を測定した。

B)における棒グラフの値は biological replicates (n = 3)の平均値であり、エラーバーは標準偏差値である。P 値は t 検定(unpaired、両側検定)によって計算した。

3.3.3. 14-3-3 と結合した Regnase-1 は標的 mRNA と結合できず分解できない

ここでは 14-3-3 との結合が Regnase-1 に与える影響をより詳細に調べた結果を述べる。

IL-1 β 等の刺激は Regnase-1 以外の分子にも影響を与えることが予想されるので、未刺激状態と刺激下での Regnase-1 の機能を比べるのは困難であった。そこでまず、未刺激状態でもリン酸化状態を模したような変異体である Regnase-1-S494/513D 変異体を作成し 14-3-3 と結合するか調べたが、この変異体は 14-3-3 とは結合できないことが分かった(図 15A)。そこで次に、リン酸化非依存的に 14-3-3 と結合するタンパク質として知られる緑膿菌由来のタンパク質 Exoenzyme S (ExoS)の 14-3-3 との結合サイト(Fu et al., 1993; Karlberg et al., 2018; Masters et al., 1999)を、Regnase-1 の S494 と S513 の周辺に組み込んだ、変異体 Regnase-1-ExoSx2 を作成した(図 15B)。この変異体は野生型と比べて合計 22 アミノ酸も置換されているので、14-3-3 との結合以外の影響も考えられる。そこで、ExoS 由来の配列のうち 14-3-3 との結合に必須と考えられているアミノ酸(Ottmann et al., 2007; Yasmin et al., 2006)をアラニンに置換した Regnase-1-ExoSAAx2 もコントロールとして作成した(図 15B)。これらの変異体と 14-3-3 との結合を調べたところ、Regnase-1-ExoSx2 は MyD88 依存の刺激がなくても 14-3-3 と結合することが確認された(図 15A)。一方で、Regnase-1-ExoSAAx2 と 14-3-3 の結合は確認されなかった。

次に、上記の変異体を用いて Regnase-1 による *Il6* mRNA の分解能を調べた(図 15C)。14-3-3 に結合しない Regnase-1-S494/513D、-ExoSAAx2 は野生型と同じように *Il6* の mRNA 量を抑えたが、刺激なしでも 14-3-3 と結合する変異体 Regnase-1-ExoSx2 を発現する細胞では *Il6* の mRNA 量が野生型や他の変異体よりも高かった。また、それぞれの細胞から産生される IL-6 タンパク質の濃度もこれと同様の結果が得られた(図 15D)。これらの結果から、Regnase-1-ExoSx2 による *Il6* の発現抑制能力は野生型や他の変異体(Regnase-1-S494/513D、-ExoSAAx2)よりも低いことが分かった。

図 9B~C にあるように、IRAK1 の過剰発現でも Regnase-1 と 14-3-3 の結合が誘導されることが確認されていたため、IRAK1 の過剰発現でも Regnase-1 による *Il6* mRNA の発現抑制能力が弱まるかを調べた(図 15E)。野生型 IRAK1 と IRAK1-E541/584/704A (TRAF6 と結合しない変異体。Regnase-1 と 14-3-3 の結合は誘導できる(図 9C))では IRAK1 を過剰発現しない細胞に比べて *Il6* の mRNA 量が多く、Regnase-1 による *Il6* の発現抑制が弱まっていることが示唆された。一方で、Regnase-1 と 14-3-3 の結合を誘導しない変異体(IRAK1-T209A、- Δ 1-103、- Δ 619-710、-R663/K665A)はいずれも、Regnase-1 による *Il6* mRNA の発現抑制にほとんど影響しなかった。

以上の結果から、14-3-3 と結合した Regnase-1 は、標的である *Il6* mRNA を分解する能力が落ちていることが明らかとなった。

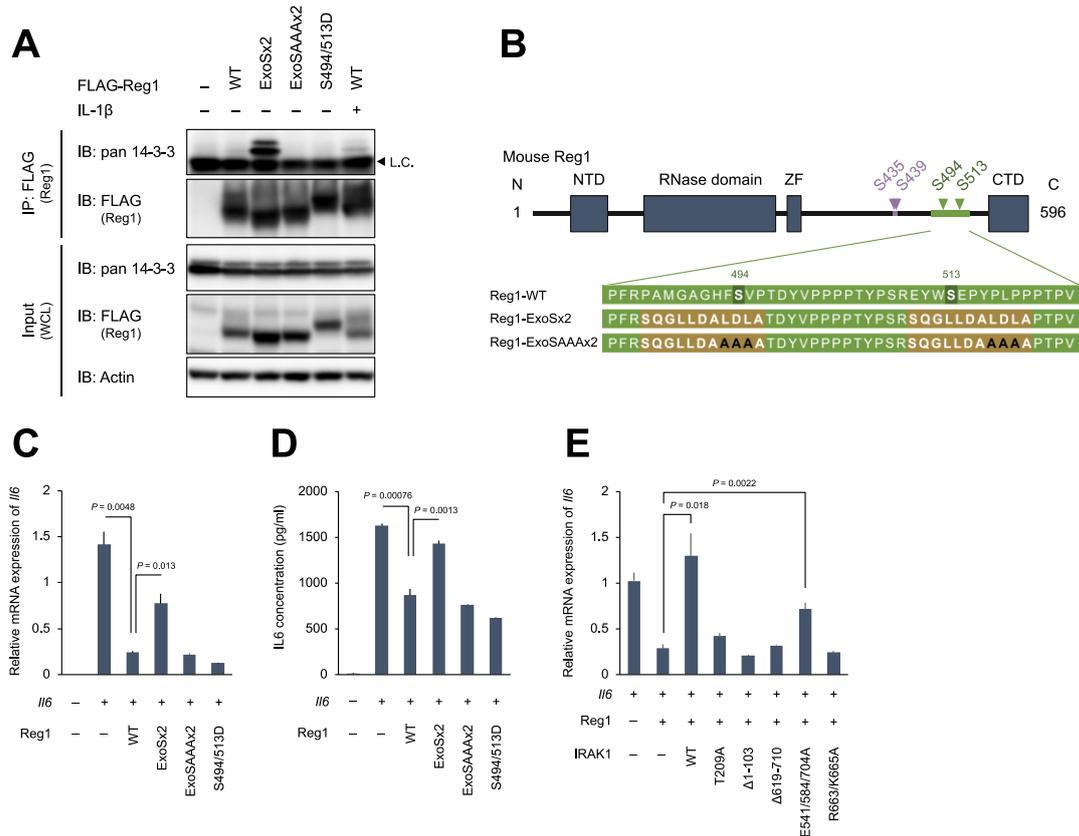


図 15 14-3-3 と結合する Regnase-1-ExoSx2 は *Il6* の発現を抑制する能力が低い

A) それぞれの Regnase-1 変異体と 14-3-3 の結合。HeLa 細胞に FLAG-Regnase-1-WT もしくは変異体を発現させ、FLAG 抗体で免疫沈降を行った。IL-1β 刺激ありのサンプルは IL-1β (10 ng/ml) で 4 時間刺激した。

B) マウス Regnase-1 タンパク質の一次構造の図と、Regnase-1-ExoSx2、-ExoSAAAx2 変異体で置換された部分のアミノ酸配列。14-3-3 の結合サイトを緑、βTRCP の結合サイトを紫で印した。NTD: N-terminal ドメイン、ZF: Zinc finger ドメイン、CTD: C-terminal ドメイン。

C) Regnase-1 変異体による *Il6* の発現抑制。HeLa 細胞に FLAG-Regnase-1-WT もしくは変異体を *Il6* と共に一過性に発現させ、*Il6* の mRNA 量を測定した。

D) C)での培地中の IL-6 の濃度を測定した。

E) IRAK1 の過剰発現下における Regnase-1 による *Il6* の発現抑制。HeLa 細胞に FLAG-Regnase-1-WT と Myc-IRAK1-WT もしくは変異体を *Il6* と共に一過性に発現させ、*Il6* の mRNA 量を測定した。

C)~E)における棒グラフの値は biological replicates (n = 3)の平均値であり、エラーバーは標準偏差値である。P 値は t 検定(unpaired、両側検定)によって計算した。

次に、14-3-3 による Regnase-1 の機能抑制のメカニズムを調べた。Regnase-1 は標的 mRNA に直接結合して分解するため(Mino et al., 2015; J. Xu et al., 2012; Yokogawa et al., 2016)、14-3-3 が Regnase-1 と標的 mRNA の結合に影響するかどうかという点に着目した。図 15 で使ったような Regnase-1-S494/513D、-ExoSx2、-ExoSAAAx2 変異体について、RNase 活性を失活させるような D141N の変異を加え(Matsushita et al., 2009; Yokogawa et al., 2016)、それぞれの Regnase-1 に結合する標的 mRNA 量を調べた(図 16)。その結果、S494/513D、ExoSAAAx2 の変異を持つ Regnase-1 では D141N の変異のみを持つ Regnase-1 と同程度の *IL6* mRNA が結合していたが、ExoSx2 の変異を持つ Regnase-1 からは *IL6* mRNA がほとんど検出されなかった。*IL6* 以外の標的 mRNA についても調べたところ、*PTGS2* や *NFKBIZ* を含め、調べたものではすべての mRNA で同様の

結果が得られた(図 16)。

これらの結果をまとめると、S494 と S513 でリン酸化されて 14-3-3 と結合した Regnase-1 は、標的 mRNA に結合できないために標的遺伝子の発現を抑制することができなくなっているということが明らかとなった。

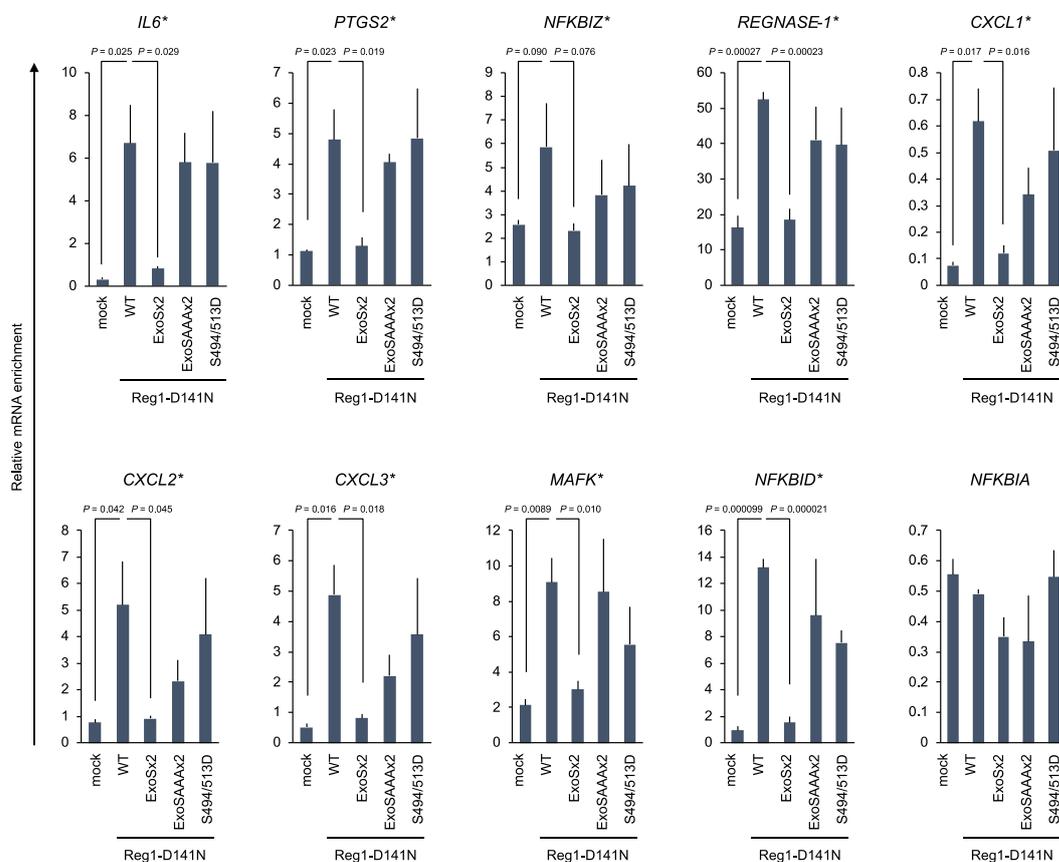


図 16 14-3-3 と結合する Regnase-1-ExoSx2 は Regnase-1 標的 mRNA に結合しない

Regnase-1 変異体と Regnase-1 の標的 mRNA の結合。HeLa 細胞に FLAG-Regnase-1 変異体 (いずれも D141N 変異を持つ)を一過性に発現させ、FLAG 抗体で免疫沈降を行い、Regnase-1 と結合した mRNA 量をそれぞれの遺伝子に対して測定した。* は Regnase-1 の結合標的 mRNA。

棒グラフの値は biological replicates (n = 3)の平均値であり、エラーバーは標準偏差値である。P 値は t 検定(unpaired、両側検定)によって計算した。

3.4. 14-3-3 は Regnase-1 の核-細胞質シャトリングを阻害する

3.4.1. Regnase-1 は核と細胞質をシャトルする

14-3-3 が Regnase-1 と mRNA の結合を阻害していることから、Regnase-1 による標的 mRNA の認識のメカニズムに 14-3-3 がどのように関わってくるのかを調べることにした。

Regnase-1 は CBP80 が結合した mRNA に結合することが以前報告されている(Mino et al., 2019)。CBP80 は核内での mRNA の転写から、細胞質に輸送されてすぐに起きるパイオニアラウンド翻訳の間まで mRNA と結合しており(Maquat et al., 2010; Müller-Mcnicoll & Neugebauer, 2013)、CBP80 結合型の mRNA を Regnase-1 が認識しているということは、Regnase-1 が核内もしくは mRNA の核外輸送のすぐあとに標的 mRNA に結合しているということを意味する。そこで、ここではまず、Regnase-1 の細胞内動態について調べた結果を述べる。

Regnase-1 は主に細胞質に局在することが知られているが(Mino et al., 2015)、まずは Regnase-1 が核内にも存在しうるかどうかを、タンパク質の核外輸送を担う CRM1 (Exportin-1 としても知られる)の阻害剤 Leptomycin B (LMB)で細胞を処理することで調べた。その結果、LMB 未処理状態では細胞質に局在する Regnase-1 が、LMB 処理によって核内に集積することが分かった(図 17)。この結果は Regnase-1 が LMB 未処理の状態では核と細胞質をシャトルしていることを意味しており、Regnase-1 の核内から細胞質への移動は細胞質から核内への移動のよりも高頻度で起きていると考えられる。

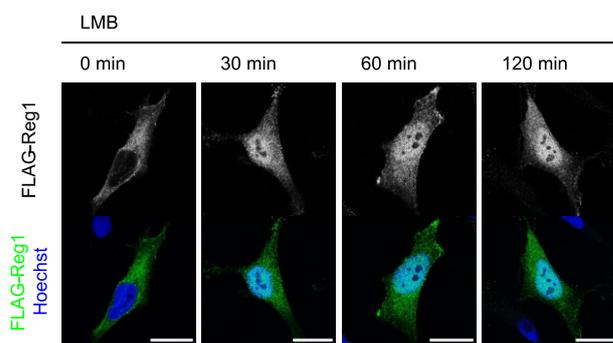


図 17 Regnase-1 は核と細胞質をシャトルする

Leptomycin B (LMB) で核に集積する Regnase-1。HeLa 細胞に FLAG-Regnase-1 を一過性に発現させ、LMB (10 ng/ml)で処理後、免疫染色を行った。白線の長さは 20 μ m 相当。

核外輸送を担う CRM1 は、輸送されるタンパク質が持つ核外輸送シグナル(Nuclear export signal、NES)を認識して核外へと輸送することが知られている(Hutten & Kehlenbach, 2007)。そこで次に、Regnase-1 が NES を持つかを調べた。NES は疎水性アミノ酸からなるモチーフを持っているため(la Cour et al., 2003)、NES の予測プログラム(D. Xu et al., 2015)を用いて NES として働きそうな配列を調べたところ、Regnase-1 の 433-447 が NES として働いている可能性が高いという結果が得られた(図 18A)。そこで、予想された NES を持たないような変異体、Regnase-1- Δ 422-451 の細胞内局在を調べたところ、この変異体は LMB 処理をしなくても核内に蓄積することが分かった(図 18B)。また、NES においては疎水性アミノ酸が重要であることから、Regnase-1 の 433-447 およびその周辺に含まれる疎水性アミノ酸をアラニンに置換してその局在を確認したところ、Regnase-1-L440A、M444A、L447A、W448A が LMB 処理なしでも核内に集積することが分かった(図 18B)。興味深いことにこれらの配列は β TRCP 結合サイトのすぐ隣に位置し、また種間での保存性が高いことも分かった(図 18C~D)。また、Regnase-1 の NES と同定された配列を蛍光タンパク質 EGFP に付加した EGFP-Reg1(400-458)が CRM1 依存的な細胞質局在を示す一方で、EGFP-Reg1(400-440)は積極的に核外輸送されていないことから、Regnase-1 の 400-458 の配列は単体で NES として機能することが分かった(図 18E)。

以上の結果から、Regnase-1 は核と細胞質をシャトルしており、その核外輸送は L440、M444、L447、W448 からなる NES によって CRM1 依存的に起きていることが明らかとなった。

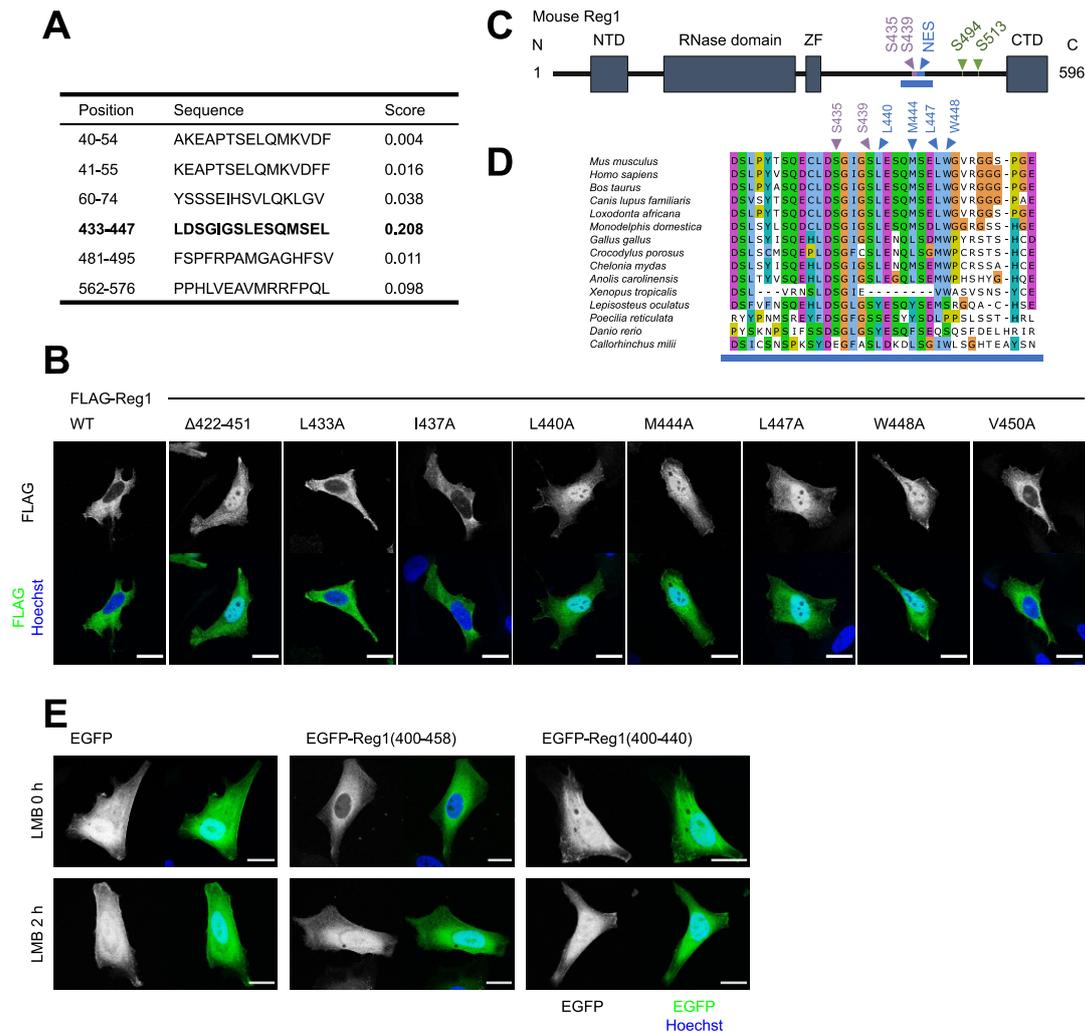


図 18 Regnase-1 の NES の同定

A) NES の予測ツールである LocNES の結果。スコアが高いほど NES である可能性が高い。

B) Regnase-1 変異体の局在。HeLa 細胞に FLAG-Regnase-1-WT もしくは変異体を一過性に発現させ、免疫染色を行った。

C) マウス Regnase-1 タンパク質の一次構造の図。14-3-3 の結合サイトを緑、βTRCP の結合サイトを紫、NES を青で印した。NTD: N-terminal ドメイン、ZF: Zinc finger ドメイン、CTD: C-terminal ドメイン。

D) Regnase-1 の NES 周辺のアミノ酸配列の配列保存性。

E) Regnase-1 の NES を融合した EGFP の局在。HeLa 細胞に Regnase-1 の断片を付加した EGFP を一過性に発現させその局在を観察した。

B)、E)における白線の長さは 20 μm 相当。

3.4.2. 14-3-3 は Regnase-1 の核-細胞質シャトリングを阻害する

次に、14-3-3 が Regnase-1 の細胞内動態に与える影響を、核-細胞質シャトリングの観点から調べた。リン酸化されなくても 14-3-3 と結合する Regnase-1-ExoSx2 と、そのコントロールである 14-3-3 とは結合しない Regnase-1-ExoSAAx2 について局在を確認したところ、LMB 処理をしていない細胞ではいずれの変異体も野生型 Regnase-1 と同様に細胞質局在を示したが、LMB 処理した細胞では、野生型と Regnase-1-ExoSAAx2 が核内集積を見せる一方で、Regnase-1-ExoSx2 は核内に集積しなかった(図 19)。このことは Regnase-1-ExoSx2 の細胞質から核内への輸送が起きていないことを意味しており、14-3-3 が結合した Regnase-1 は、14-3-3 が結合していな

い Regnase-1 と異なり、核内輸送が阻害された状態にあることを示唆している。

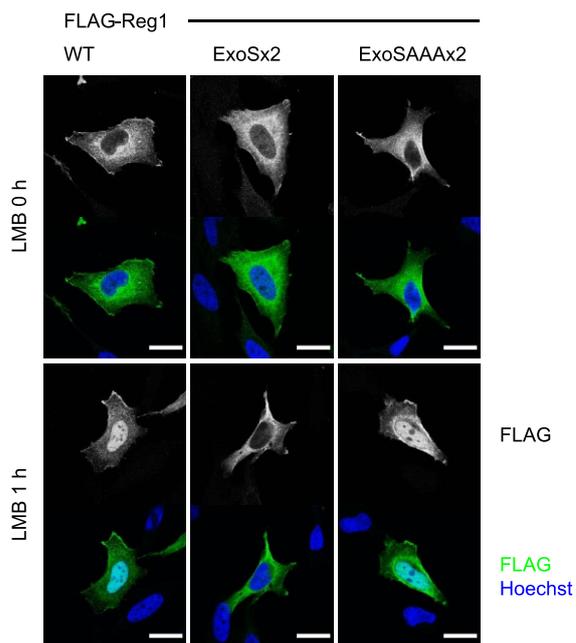


図 19 14-3-3 と結合する Regnase-1-ExoSx2 は核に移行しない

LMB 処理下での Regnase-1 変異体の局在。HeLa 細胞に FLAG-Regnase-1-WT もしくは変異体を一過性に発現させ、LMB (10 ng/ml)で処理後、免疫染色を行った。白線の長さは 20 μ m 相当。

第4章 考察

本研究では、炎症刺激下における Regnase-1 の活性の制御機構を、タンパク質-タンパク質結合の観点から研究を進めてきた。これまでの研究で、 β TRCP を含む SCF 複合体によるユビキチン化、およびこれに続くプロテアソームによる Regnase-1 のタンパク質分解というメカニズムは報告されていたが(Iwasaki et al., 2011)、本研究によって新たに、14-3-3 タンパク質が Regnase-1 と mRNA の結合を阻害するという、タンパク質分解とは異なるメカニズムで Regnase-1 の働きを抑えているということが明らかとなった(図 20)。さらに、14-3-3 と結合した Regnase-1 は細胞内での動態が変化し、核内へ移行できなくなっていることも分かった。本章では、今回明らかになった個々の点から新たに生まれた疑問点や今後のさらなる展望について考察していく。

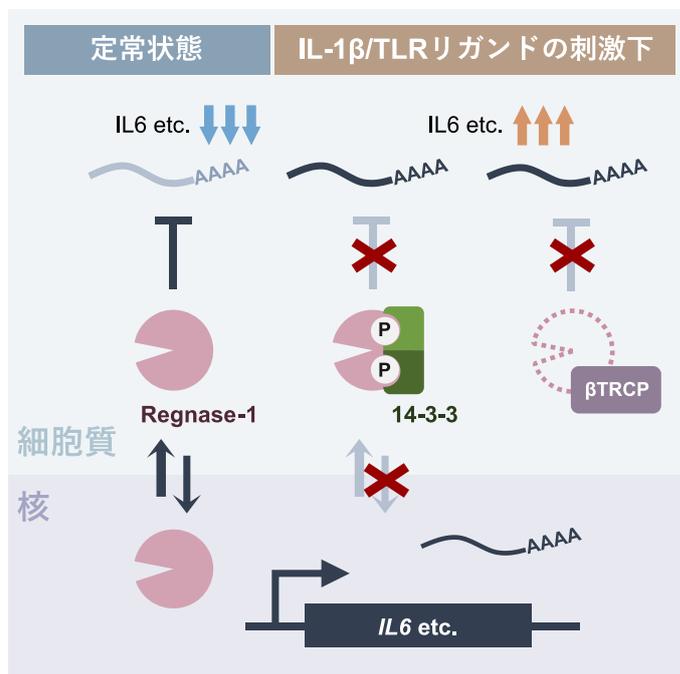


図 20 炎症刺激下における Regnase-1 の制御機構

細胞が未刺激の状態では Regnase-1 は核と細胞質をシャトルしながら、標的 mRNA を認識・分解し、その発現を抑制する。細胞が IL-1 β や LPS 等の MyD88 依存性の刺激を受けると、Regnase-1 は(1) β TRCP を介したタンパク質分解と(2) 14-3-3 を介した機能抑制を受ける。14-3-3 は Regnase-1 の核-細胞質シャトリングを阻害し、標的 mRNA との結合も阻害する。

4.1. Regnase-1-14-3-3 複合体形成のメカニズム

今回新たに Regnase-1 の結合タンパク質として同定された 14-3-3 は、Regnase-1 の S494 と S513 のリン酸化に依存して Regnase-1 と結合することが分かった(図 8)。また IL-1 β 刺激によって誘導されるこれらのリン酸化は、IRAK1 依存的に引き起こされることが明らかとなった(図 9)。そして興味深いことに、IRAK1 による Regnase-1 のリン酸化および 14-3-3 との結合は、IRAK1 の C 端側にある構造ドメイン、CSD に依存していた。これまでの報告では、IRAK1 の C 端領域は NF- κ B を活性化させるのに必要なシグナル分子である TRAF6 との結合に重要と考えられてきたが(Ye et al., 2002)、TRAF6 に結合しない IRAK1 変異体の実験結果から、IRAK1 と TRAF6 の結合は Regnase-1-14-3-3 複合体形成には必須ではないことが分かった(図 9C)。一方で、IRAK1 の CSD にある配列保存性が高いアミノ酸の変異体 IRAK1-R663/K665A は、NF- κ B を活性化する機能は持ちながらも、Regnase-1 と 14-3-3 の結合を誘導することはできなかった(図 9C、F)。これまでの研究でも、IRAK は NF- κ B 活性化だけでなく、炎症性サイトカインの mRNA の転写後調節にも関わっていると報告されており(Flannery et al., 2011; Hartupée et al., 2008; Wan et

al., 2009)、IRAK1 による mRNA の安定化には IRAK1 と TRAF6 の結合は必要ないという報告もある(Hartupee et al., 2008)。今回の結果から、IRAK1 による転写後調節の一つのメカニズムが CSD を介した Regnase-1 の制御によるものであることが明らかとなり、今後 IRAK を介した転写後調節を解明する上で1つの鍵となるだろう。

今回の研究で残る疑問の一つは、Regnase-1 の S494、S513 を直接リン酸化するキナーゼは何かという点である。IRAK1 が直接 S494、S513 をリン酸化する可能性も否定はできないが、IRAK1 の基質モチーフ解析の結果は pSxV もしくは KxxxpS となっており(Sugiyama et al., 2019)、S494 と S513 の周辺配列とは一致しない。IRAK1 の CSD を介して他のキナーゼが活性化し、そのキナーゼが Regnase-1 の S494 と S513 をリン酸化している可能性も十分考えられる。

また興味深いことに、Regnase-1 は7つの 14-3-3 パラログのうち 14-3-3 σ とは結合せず、その他のパラログの間でも Regnase-1 との結合の強さにはばらつきがあることが分かった(図 5B)。これに関連して、14-3-3 σ がホモダイマーしか形成しないのに対し、その他のパラログはヘテロダイマーを形成することが報告されている(Verdoodt et al., 2006)。Regnase-1 と 14-3-3 の結合パターンは、7つの 14-3-3 パラログそれぞれがもつ特異性を解き明かすためのヒントになるかもしれない。

4.2. 14-3-3 が Regnase-1 と β TRCP の結合を阻害するメカニズム

図 11 の実験から、Regnase-1 のユビキチン化と分解を誘導する β TRCP は、14-3-3 と結合した Regnase-1 を標的としないことが分かった。実際に 14-3-3 と結合できない変異体である Regnase-1-S513A は、IL-1 β や LPS の刺激後、タンパク質として非常に不安定であった(図 12、図 14)。このことから、14-3-3 と結合した Regnase-1 は比較的安定であることが分かるが、では 14-3-3 は Regnase-1 と結合することでどのようにして β TRCP との結合を阻害しているのだろうか。

図 10A にある通り、Regnase-1 の 14-3-3 との結合サイトは β TRCP との結合サイトと比較的近い位置(距離は約 50 アミノ酸)にあるため、これら2つのタンパク質が結合サイトを奪い合う形で競合的に Regnase-1 と結合している可能性が考えられる。しかしながら、本研究では Regnase-1 と 14-3-3、Regnase-1 と β TRCP の結合の様子を観察するには至っていない。今後、立体構造の予測ツール等を使えば、14-3-3 と β TRCP の競合モデルについて検証できるようになるかもしれない。

別の観点では、14-3-3 による Regnase-1 の細胞内動態の変化も Regnase-1 と β TRCP の結合に影響を与える可能性が考えられる。本研究によって、核と細胞質をシャトルする Regnase-1 は 14-3-3 と結合すると核移行できなくなることが明らかになったが(図 19)、 β TRCP も細胞質だけでなく核内にも局在することが知られている(Davis et al., 2002)。もし β TRCP との結合に Regnase-1 の核内輸送が必須の要素だとすると、14-3-3 による Regnase-1 と β TRCP の結合の阻害は、単純な競合によるものではなく、Regnase-1 の局在制御を介したものである可能性もある。興味深いことに、核外輸送を担う CRM1 が認識する Regnase-1 の NES (L440-W448)は、 β TRCP との結合サイト(D434-S439)のすぐ隣である(図 18D)。このため、 β TRCP が結合した Regnase-1 が CRM1 による核外輸送を受けられなくなる可能性は非常に高く、このことは Regnase-1 の核-細胞質シャトリングと β TRCP との結合の間に何らかの関連がある可能性を示唆している。

4.3. 14-3-3 による Regnase-1 の機能抑制の生物学的意義は何か？

本研究によって、14-3-3 は Regnase-1 をタンパク質として安定化させる一方で、機能的にはその働きを抑制することが分かった。しかしながら *Regnase-1*^{S513A/S513A} ノックインマウス由来の細胞は野生型と同じように Regnase-1 の標的遺伝子を発現し(図 13)、本研究では個体レベルでも野生型と比べて大きな表現型を見つけ出せていない。これは Regnase-1 の S513 のリン酸化とそれに続く 14-3-3 との結合が起きなくても、 β TRCP による Regnase-1 タンパク質の分解誘導という量的な制御によって Regnase-1 の働きを抑えているからだろう。実際に、 β TRCP に認識されず、14-3-3 と結合できない変異体 Regnase-1-S435/439/513A は、IL-1 β 刺激下でも強く *Il6* の発現を抑えた(図 14B)。このことから、Regnase-1 は MyD88 依存性の刺激下において、14-3-3 による機能抑制と β TRCP によるタンパク質分解という二重の制御を受けることが分かる。そして、図 14B の実験や *Regnase-1*^{S513A/S513A} 細胞の解析でも見られた通り、どちらか一つの制御機構が破綻した場合でも、もう一方のメカニズムによって Regnase-1 が働きすぎるのを防いでいるようだ。この二重の制御機構は、炎症刺激下に置いて Regnase-1 を制御することがいかに重要かを示しているとも考えられる。

以上のように考えると、14-3-3 による Regnase-1 の機能抑制は、 β TRCP による Regnase-1 の分解メカニズムが破綻した際のためにバックアップとして用意された、Regnase-1 の第二の抑止策として機能する可能性が考えられる。例えばウイルス由来のタンパク質や lncRNA 等によって β TRCP の働きが抑えられることが報告されている(Guo et al., 2020; Neidel et al., 2019; van Buuren et al., 2014; Yang et al., 2020)。このような状況下で細胞が炎症刺激を受けたとしても、Regnase-1 の分解は起きないと予想され、14-3-3 による Regnase-1 の制御はこのように際に重要になってくるのではないだろうか。

また、興味深いことに、IL-1 β や LPS といった刺激は *Regnase-1* 遺伝子の発現も誘導する(図 12B、D)。図 12A、C で見られる通り、刺激後の Regnase-1 のほとんどが分解か 14-3-3 との結合を誘導するリン酸化を受け、その働きは抑制されてしまうため、一見すると *Regnase-1* の転写を誘導してまで再発現させる意味はほとんどないように感じられる。しかしながら、*Regnase-1* 欠損マウス由来の PEC が、LPS 刺激下で野生型よりも過剰に *Il6* 等の Regnase-1 標的遺伝子を発現することから(Matsushita et al., 2009)、14-3-3 と β TRCP による 2 つの制御下においても、Regnase-1 による標的遺伝子の発現抑制は行われているようだ。転写による *Regnase-1* の発現誘導と 14-3-3/ β TRCP による翻訳後制御という対立する調節方法によって、Regnase-1 の働きは平衡的に制御されていると考えられる。

そうしたことを踏まえて注目すべきなのは、 β TRCP を介したタンパク質分解は不可逆的に行われるが、14-3-3 と Regnase-1 の結合は可逆反応である点だ。例えば Regnase-1 の S494/S513 の脱リン酸化などによって Regnase-1 が 14-3-3 と解離し、再び標的 mRNA を分解できるようになる可能性も十分に考えられる。IL-1 β 等の刺激によって新しく発現した Regnase-1 が、14-3-3 と結合し、タンパク質として安定的に細胞内に貯えられ、何らかの刺激やストレスなどによって再利用できるようなシステムを取っている可能性も考えられる。

4.4. Regnase-1 の核-細胞質シャトリングと mRNA 認識の関係

14-3-3 は Regnase-1 と標的 mRNA の結合を阻害することで Regnase-1 の機能を抑制することが

本研究で明らかとなったが、そのメカニズムについてはいくつか解明されるべき点が残されている。

14-3-3 による標的 mRNA 結合の阻害についてまず考えられる仮説として、Regnase-1 に結合した 14-3-3 が Regnase-1 の RNA 結合領域をマスクすることで標的 mRNA に結合できなくするというものも考えられるが、Regnase-1 の RNA 結合に関わる領域は RNase ドメインとその隣の Zinc Finger ドメインであることが知られており(J. Xu et al., 2012; Yokogawa et al., 2016)、14-3-3 の結合サイトとは離れた位置にある(図 10A)。そのため、14-3-3 が RNA と競合的に Regnase-1 と結合する可能性は極めて低いと考えられる。

そこで今回の研究では、Regnase-1 による mRNA 認識の場所もしくはタイミングが 14-3-3 との結合によって失われているのではないかと仮説を立てた。以前の報告で、Regnase-1 は CBP80 が結合した mRNA を標的とすることが明らかになっていたが(Mino et al., 2019)、この CBP80 結合型の mRNA は核内か核から細胞質に出てすぐの状態にあることが知られている(Maquat et al., 2010; Müller-Mcnicoll & Neugebauer, 2013)。このような mRNA を Regnase-1 が認識するには、Regnase-1 自身が核内に移動した方が効率が良いのではないかと考え、Regnase-1 の細胞内動態を調べたところ、Regnase-1 は核と細胞質をシャトルしていることが分かった(図 17)。そして興味深いことに、14-3-3 と結合する変異体 Regnase-1-ExoSx2 は核へ移行できないことから、14-3-3 は Regnase-1 の核移行を阻害していることが示唆された。残念ながら本研究では Regnase-1 の核移行が mRNA との結合に必須であるかまでは明らかにできなかったが、今回明らかになった核移行と mRNA 結合という相関関係から、Regnase-1 による標的 mRNA 認識のメカニズム解明へとつながる可能性もあると考えている。

なお、Regnase-1 の核内から細胞質への輸送メカニズムについては、Regnase-1 がもつ NES に依存していることが本研究で明らかとなった一方で(図 18)、Regnase-1 の核移行についての詳しいメカニズムについては明らかになっていない。Regnase-1 のアミノ酸配列内で典型的な核移行シグナル(nuclear localization signal、NLS)は見当たらず、14-3-3 による Regnase-1 の核移行阻害のメカニズムについてはさらなる調査が必要である。

4.5. Regnase-1 の制御と応用

本研究では Regnase-1 と 14-3-3 の結合に焦点を当てながら、Regnase-1 の制御メカニズムを解明してきた。最近の報告では Regnase-1 がヒトにおける疾患と直接かかわっていることが明らかになっているため(Kakiuchi et al., 2020; Nanki et al., 2020; Wei et al., 2019)、Regnase-1 の制御メカニズムを解明することは、将来的に Regnase-1 を治療の標的とする際に、大きな助けとなる可能性がある。例えば、Regnase-1 の S494 や S513 をリン酸化するキナーゼの阻害剤や活性化剤は、それぞれ Regnase-1 を介して細胞の炎症応答を抑えたり、高めたりする効果を持つ可能性がある。本章で挙げたようなことを含め、14-3-3 と Regnase-1 の関係についてさらなる研究が求められる。

引用文献

- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., Van Den Beek, M., Bouvier, D., Ech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltmann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A., & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W537–W544. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>
- Aitken, A. (2006). 14-3-3 proteins: A historic overview. *Seminars in Cancer Biology*, 16(3), 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.03.005>
- Akaki, K., Ogata, K., Yamauchi, Y., Iwai, N., Tse, K. M., Hia, F., Mochizuki, A., Ishihama, Y., Mino, T., & Takeuchi, O. (2021). Irak1-dependent regnase-1-14-3-3 complex formation controls regnase-1-mediated mrna decay. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.71966>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Anderson, P. (2010). Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 10(1), 24–35. <https://doi.org/10.1038/nri2685>
- Buchan, D. W. A., & Jones, D. T. (2019). The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W402–W407. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz297>
- Carpenter, S., Ricci, E. P., Mercier, B. C., Moore, M. J., & Fitzgerald, K. A. (2014). Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 361–376. <https://doi.org/10.1038/nri3682>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Davis, M., Hatzubai, A., Andersen, J. S., Ben-Shushan, E., Fisher, G. Z., Yaron, A., Bauskin, A., Mercurio, F., Mann, M., & Ben-Neriah, Y. (2002). Pseudosubstrate regulation of the SCF β -TrCP ubiquitin ligase by hnRNP-U. *Genes and Development*, 16(4), 439–451. <https://doi.org/10.1101/gad.218702>
- Fitzgerald, K. A., & Kagan, J. C. (2020). Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*, 180(6), 1044–1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>
- Flannery, S. M., Keating, S. E., Szymak, J., & Bowie, A. G. (2011). Human interleukin-1 receptor-associated kinase-2 is essential for toll-like receptor-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of tumor necrosis factor α . *Journal of Biological Chemistry*, 286(27), 23688–23697. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.248351>

- Fu, H., Coburn, J., & Collier, R. J. (1993). The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(6), 2320–2324.
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.6.2320>
- Fujihara, Y., & Ikawa, M. (2014). CRISPR/Cas9-based genome editing in mice by single plasmid injection. In *Methods in Enzymology* (Vol. 546, Issue C, pp. 319–336). Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00015-5>
- Gottipati, S., Rao, N. L., & Fung-Leung, W. P. (2008). IRAK1: A critical signaling mediator of innate immunity. *Cellular Signalling*, 20(2), 269–276.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.08.009>
- Guo, C. J., Ma, X. K., Xing, Y. H., Zheng, C. C., Xu, Y. F., Shan, L., Zhang, J., Wang, S., Wang, Y., Carmichael, G. G., Yang, L., & Chen, L. L. (2020). Distinct Processing of lncRNAs Contributes to Non-conserved Functions in Stem Cells. *Cell*, 181(3), 621–636.e22.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.006>
- Hartupée, J., Li, X., & Hamilton, T. (2008). Interleukin 1 α -induced NF κ B activation and chemokine mRNA stabilization diverge at IRAK. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15689–15693. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801346200>
- Hutten, S., & Kehlenbach, R. H. (2007). CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends in Cell Biology*, 17(4), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.02.003>
- Iwasaki, H., Takeuchi, O., Teraguchi, S., Matsushita, K., Uehata, T., Kuniyoshi, K., Satoh, T., Saitoh, T., Matsushita, M., Standley, D. M., & Akira, S. (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. *Nature Immunology*, 12(12), 1167–1175.
<https://doi.org/10.1038/ni.2137>
- Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology*, 292(2), 195–202.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3091>
- Kakiuchi, N., Yoshida, K., Uchino, M., Kihara, T., Akaki, K., Inoue, Y., Kawada, K., Nagayama, S., Yokoyama, A., Yamamoto, S., Matsuura, M., Horimatsu, T., Hirano, T., Goto, N., Takeuchi, Y., Ochi, Y., Shiozawa, Y., Kogure, Y., Watatani, Y., … Ogawa, S. (2020). Frequent mutations that converge on the NFKBIZ pathway in ulcerative colitis. *Nature*, 577(7789), 260–265. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1856-1>
- Karlberg, T., Hornyak, P., Pinto, A. F., Milanova, S., Ebrahimi, M., Lindberg, M., Püllen, N., Nordström, A., Löverli, E., Caraballo, R., Wong, E. V., Näreoja, K., Thorsell, A. G., Elofsson, M., De La Cruz, E. M., Björkegren, C., & Schüler, H. (2018). 14-3-3 proteins activate *Pseudomonas* exotoxins-S and -T by chaperoning a hydrophobic surface. *Nature Communications*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06194-1>

- Kollewe, C., Mackensen, A. C., Neumann, D., Knop, J., Cao, P., Li, S., Wesche, H., & Martin, M. U. (2004). Sequential Autophosphorylation Steps in the Interleukin-1 Receptor-associated Kinase-1 Regulate its Availability as an Adapter in Interleukin-1 Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5227–5236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309251200>
- la Cour, T., Gupta, R., Rapacki, K., Skriver, K., Poulsen, F. M., & Brunak, S. (2003). NESbase version 1.0: A database of nuclear export signals. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 393–396. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg101>
- Maquat, L. E., Tarn, W. Y., & Isken, O. (2010). The pioneer round of translation: Features and functions. *Cell*, 142(3), 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.022>
- Masters, S. C., Pederson, K. J., Zhang, L., Barbieri, J. T., & Fu, H. (1999). Interaction of 14-3-3 with a nonphosphorylated protein ligand, exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 38(16), 5216–5221. <https://doi.org/10.1021/bi982492m>
- Matsushita, K., Takeuchi, O., Standley, D. M., Kumagai, Y., Kawagoe, T., Miyake, T., Satoh, T., Kato, H., Tsujimura, T., Nakamura, H., & Akira, S. (2009). Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature*, 458(7242), 1185–1190. <https://doi.org/10.1038/nature07924>
- Meerbrey, K. L., Hu, G., Kessler, J. D., Roarty, K., Li, M. Z., Fang, J. E., Herschkowitz, J. I., Burrows, A. E., Ciccia, A., Sun, T., Schmitt, E. M., Bernardi, R. J., Fu, X., Bland, C. S., Cooper, T. A., Schiff, R., Rosen, J. M., Westbrook, T. F., & Elledge, S. J. (2011). The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(9), 3665–3670. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019736108>
- Mino, T., Iwai, N., Endo, M., Inoue, K., Akaki, K., Hia, F., Uehata, T., Emura, T., Hidaka, K., Suzuki, Y., Standley, D. M., Okada-Hatakeyama, M., Ohno, S., Sugiyama, H., Yamashita, A., & Takeuchi, O. (2019). Translation-dependent unwinding of stem-loops by UPF1 licenses Regnase-1 to degrade inflammatory mRNAs. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz628>
- Mino, T., Murakawa, Y., Fukao, A., Vandenbon, A., Wessels, H. H., Ori, D., Uehata, T., Tarte, S., Akira, S., Suzuki, Y., Vinuesa, C. G., Ohler, U., Standley, D. M., Landthaler, M., Fujiwara, T., & Takeuchi, O. (2015). Regnase-1 and roquin regulate a common element in inflammatory mRNAs by spatiotemporally distinct mechanisms. *Cell*, 161(5), 1058–1073. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.029>
- Müller-Mcnicoll, M., & Neugebauer, K. M. (2013). How cells get the message: Dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes. *Nature Reviews Genetics*, 14(4), 275–287. <https://doi.org/10.1038/nrg3434>
- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M., & Shaw, A. S. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, 84(6), 889–897. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81067-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81067-3)

- Nanki, K., Fujii, M., Shimokawa, M., Matano, M., Nishikori, S., Date, S., Takano, A., Toshimitsu, K., Ohta, Y., Takahashi, S., Sugimoto, S., Ishimaru, K., Kawasaki, K., Nagai, Y., Ishii, R., Yoshida, K., Sasaki, N., Hibi, T., Ishihara, S., ... Sato, T. (2020). Somatic inflammatory gene mutations in human ulcerative colitis epithelium. *Nature*, 577. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1844-5>
- Neidel, S., Ren, H., Torres, A. A., & Smith, G. L. (2019). NF- κ B activation is a turn on for vaccinia virus phosphoprotein A49 to turn off NF- κ B activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(12), 5699–5704. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813504116>
- Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302(1), 205–217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>
- Ottmann, C., Yasmin, L., Weyand, M., Veessenmeyer, J. L., Diaz, M. H., Palmer, R. H., Francis, M. S., Hauser, A. R., Wittinghofer, A., & Hallberg, B. (2007). Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 and exoenzyme S: From structure to pathogenesis. *EMBO Journal*, 26(3), 902–913. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601530>
- Pennington, K. L., Chan, T. Y., Torres, • Mp, & Andersen, • Jl. (2018). The dynamic and stress-adaptive signaling hub of 14-3-3: emerging mechanisms of regulation and context-dependent protein-protein interactions. *Oncogene*, 37, 5587–5604. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0348-3>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Sugiyama, N., Imamura, H., & Ishihama, Y. (2019). Large-scale Discovery of Substrates of the Human Kinome. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46385-4>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Von Mering, C. (2019). STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140(6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>

- Tanaka, H., Arima, Y., Kamimura, D., Tanaka, Y., Takahashi, N., Uehata, T., Maeda, K., Satoh, T., Murakami, M., & Akira, S. (2019). Phosphorylation-dependent Regnase-1 release from endoplasmic reticulum is critical in IL-17 response. *Journal of Experimental Medicine*, 216(6). <https://doi.org/10.1084/jem.20181078>
- Turner, M., & Díaz-Muñoz, M. D. (2018). RNA-binding proteins control gene expression and cell fate in the immune system review-article. In *Nature Immunology* (Vol. 19, Issue 2, pp. 120–129). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0028-4>
- Uehata, T., Iwasaki, H., Vandenbon, A., Matsushita, K., Hernandez-Cuellar, E., Kuniyoshi, K., Satoh, T., Mino, T., Suzuki, Y., Standley, D. M., Tsujimura, T., Rakugi, H., Isaka, Y., Takeuchi, O., & Akira, S. (2013). Malt1-induced cleavage of regnase-1 in CD4(+) helper T cells regulates immune activation. *Cell*, 153(5), 1036–1049. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.034>
- van Buuren, N., Burles, K., Schriewer, J., Mehta, N., Parker, S., Buller, R. M., & Barry, M. (2014). EVM005: An Ectromelia-Encoded Protein with Dual Roles in NF- κ B Inhibition and Virulence. *PLoS Pathogens*, 10(8), 1004326. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004326>
- Verdoodt, B., Benzinger, A., Popowicz, G. M., Holak, T. A., & Hermeking, H. (2006). Characterization of 14-3-3sigma dimerization determinants: Requirement of homodimerization for inhibition of cell proliferation. *Cell Cycle*, 5(24), 2920–2926. <https://doi.org/10.4161/cc.5.24.3571>
- Wan, Y., Xiao, H., Affolter, J., Kim, T. W., Bulek, K., Chaudhuri, S., Carlson, D., Hamilton, T., Mazumder, B., Stark, G. R., Thomas, J., & Li, X. (2009). Interleukin-1 receptor-associated kinase 2 is critical for lipopolysaccharide-mediated post-transcriptional control. *Journal of Biological Chemistry*, 284(16), 10367–10375. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807822200>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Wei, J., Long, L., Zheng, W., Dhungana, Y., Lim, S. A., Guy, C., Wang, Y., Wang, Y. D., Qian, C., Xu, B., Kc, A., Saravia, J., Huang, H., Yu, J., Doench, J. G., Geiger, T. L., & Chi, H. (2019). Targeting REGNASE-1 programs long-lived effector T cells for cancer therapy. *Nature*, 576(7787), 471–476. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1821-z>
- Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S., & Cao, Z. (1997). MyD88: An adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, 7(6), 837–847. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80402-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80402-1)
- Xu, D., Marquis, K., Pei, J., Fu, S. C., Cañatay, T., Grishin, N. V., & Chook, Y. M. (2015). LocNES: A computational tool for locating classical NESs in CRM1 cargo proteins. *Bioinformatics*, 31(9), 1357–1365. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu826>

- Xu, J., Peng, W., Sun, Y., Wang, X., Xu, Y., Li, X., Gao, G., & Rao, Z. (2012). Structural study of MCPIP1 N-terminal conserved domain reveals a PIN-like RNase. *Nucleic Acids Research*, 40(14), 6957–6965. <https://doi.org/10.1093/nar/gks359>
- Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J., & Cantley, L. C. (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*, 91(7), 961–971. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80487-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80487-0)
- Yang, Q., Li, K., Huang, X., Zhao, C., Mei, Y., Li, X., Jiao, L., & Yang, H. (2020). lncRNA SLC7A11-AS1 Promotes Chemoresistance by Blocking SCF β -TRCP-Mediated Degradation of NRF2 in Pancreatic Cancer. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 19, 974–985. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.11.035>
- Yasmin, L., Jansson, A. L., Panahandeh, T., Palmer, R. H., Francis, M. S., & Hallberg, B. (2006). Delineation of exoenzyme S residues that mediate the interaction with 14-3-3 and its biological activity. *FEBS Journal*, 273(3), 638–646. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05100.x>
- Ye, H., Arron, J. R., Lamothe, B., Cirilli, M., Kobayashi, T., Shevde, N. K., Segal, D., Dzivenu, O. K., Vologodskaya, M., Yim, M., Du, K., Singh, S., Pike, J. W., Darnay, B. G., Choi, Y., & Wu, H. (2002). Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature*, 418(6896), 443–447. <https://doi.org/10.1038/nature00888>
- Yokogawa, M., Tsushima, T., Noda, N. N., Kumeta, H., Enokizono, Y., Yamashita, K., Standley, D. M., Takeuchi, O., Akira, S., & Inagaki, F. (2016). Structural basis for the regulation of enzymatic activity of Regnase-1 by domain-domain interactions. *Scientific Reports*, 6, 22324. <https://doi.org/10.1038/srep22324>

謝辞

まず、本研究を進めるにあたり、数多くのご指導をいただいた京都大学大学院医学研究科分子生体統御学講座医化学分野の竹内理教授、三野亨史助教に深く感謝申し上げます。また、OB・OG 含め同研究室のメンバーには研究に関する様々なアドバイスをいただきました。加えて、奥本好美氏をはじめとする同研究室の秘書の方々にも感謝申し上げます。

本研究におけるタンパク質の質量分析では京都大学大学院薬学研究科製剤機能解析学分野の石濱泰教授と小形公亮助教に大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。また、取得していただいた実験結果の一部について本論文での使用を承諾いただいたことに関しても感謝申し上げます。

Regnase-1 の制御の意義について考える際、京都大学ウイルス・再生医科学研究所数理生物学分野の望月敦史教授、山内悠平博士には理論生物学的観点からご助言いただきました。心より感謝申し上げます。

京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学分野の小川誠司教授、垣内伸之助教には *REGNASE-1* 欠損 HeLa 細胞を譲っていただき、またトランスクリプトーム解析に関してもご協力いただきました。心より感謝申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Kotaro Akaki, Kosuke Ogata, Yuhei Yamauchi, Noriki Iwai, Ka Man Tse, Fabian Hia, Atsushi Mochizuki, Yasushi Ishihama, Takashi Mino, and Osamu Takeuchi

IRAK1-dependent Regnase-1-14-3-3 complex formation controls Regnase-1-mediated mRNA decay
eLife, 10, e71966, 2021