

博士論文

IRF 転写因子の活性化調節に関わる制御因子群の解析

松木 康祐

# 目次

要旨 .....	2
略語一覧 .....	3
序文 .....	6
結果 .....	13
第 1 章 細菌感染時における I 型 IFN の遺伝子の誘導制御 .....	13
細菌感染時の I 型 IFN 誘導における PRRs の役割 .....	13
TLR-MyD88 経路による I 型 IFN の抑制機構 .....	17
TLR-MyD88 経路による IRF3 の活性化の抑制 .....	18
TLR-MyD88 シグナルを介した強固な TBK1-IRF3 複合体の形成 .....	21
脱リン酸化酵素 MKP と IRF3-TBK1 との結合の解析 .....	23
MKPs による IRF3 の活性化制御についての解析 .....	26
TLR-MyD88 経路による I 型 IFN の遺伝子誘導の抑制機構の生理的意義 .....	28
第 2 章 I 型 IFN の遺伝子誘導における $\alpha$ -Cop の役割 .....	30
自然免疫受容体シグナル下流でリン酸化されるタンパクの網羅的解析 .....	30
$\alpha$ -COP の I 型 IFN の遺伝子誘導における解析 .....	30
$\alpha$ -COP の IRF3 活性化における役割の検討 .....	33
考察 .....	35
材料・方法 .....	71
謝辞 .....	93
参考文献 .....	94

## 要旨

I 型 IFN は抗ウイルス応答など生体防御に必須の役割を果たす一方、自己免疫疾患等の病態の増悪とも関連があり、その誘導は適切に制御される必要がある。I 型 IFN 誘導には IRF3 転写因子が重要な役割を果たすことが知られているが、その制御機構は不明な点が多い。本研究において、TLR-MyD88 経路のシグナルが MKPs と IRF3 の結合を促進し、I 型 IFN の誘導を抑制することを明らかにした。さらに、 $\alpha$ -COP が IRF3 と TBK1 の結合を促進し、I 型 IFN の誘導に関与することを見出した。本研究によって、IRF3 の活性化調節に関わる新たな制御因子が見出され、I 型 IFN 誘導の制御機構の一端が明らかとなった。

## 略語一覽

ASC	apoptosis associated speck-like protein
BFA	Brefeldin A
BMDCs	bone marrow-derived dendritic cells
c-di-GMP	cyclic-di-GMP
cGAS	cyclic GMP-AMP synthase
COPI	coatamer protein I
DAVID	The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DBD	DNA-binding domain
DDW	deionized distilled water
DUSP	dual-specificity phosphatase
HE	Hematoxylin-eosin
IFN	Interferon
IL	interleukin
IPS-1	IFN- $\beta$ promoter stimulator-1
IRF	IFN regulatory factor
ISG15	IFN stimulated gene 15
LPS	lipopolysaccharide
MBP	myelin basic protein
MEF	mouse embryonic fibroblast
MKP	mitogen-activated protein kinase phosphatase
moi	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
MX1	myxoma resistance protein 1

MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
NF- $\kappa$ B	nuclear factor- $\kappa$ B
NLRs	NOD-like receptors
ODN	oligodeoxynucleotides
OPTN	optineurin
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PECs	peritoneal macrophages
PGN	peptidglycan
PKR	protein kinase R
PLA	proximity ligation assay
PRRs	pattern recognition receptors
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RLRs	RIG-I-like receptors
RNAi	RNA interference
ROX	rhodamine
siRNA	small interfering RNA
SLE	systemic lupus erythematosus
SPF	specific pathogen free
STING	stimulator of IFN genes protein
TBK1	TANK-binding kinase 1
TLRs	Toll-like receptors
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
TRIF	Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$

$\alpha$ -COP      coatomer subunit  $\alpha$

ODN      oligodeoxynucleotides

## 序文

脊椎動物における免疫系は、大きく分けて自然免疫系と適応免疫系の二つの機構から構成され、外来病原体が侵入した際、それぞれが適切に協調し病原体の排除に寄与する。自然免疫系はいち早く病原体の侵入を察知し、I 型インターフェロン (Interferon: IFN- $\alpha/\beta$ ) や炎症性サイトカインの産生、樹状細胞の成熟化などを介し、T 細胞や B 細胞など適応免疫系を司る細胞群の活性化をも促進する。このような、自然および適応両免疫系が連携することによって効果的な生体防御系が構築され病原体を排除する<sup>1-4</sup>。一方で、免疫応答の過度な活性化は自己免疫疾患など種々の疾患とも深く関わりがあることが知られており<sup>5-7</sup>、適切な制御機構が作動することが重要である。

自然免疫系による病原体の認識はパターン認識受容体 (pattern recognition receptors: PRRs) と呼ばれる自然免疫受容体群によって担われている<sup>8-10</sup>。PRRs は細胞内における局在様式から、膜型受容体と細胞質内受容体の二つのグループに分類され、前者には Toll 様受容体 (Toll-like receptors: TLRs) などが知られており、後者としては RIG-I 様受容体 (RIG-I-like receptors: RLRs)、cGAS (cyclic GMP-AMP synthase)、NOD 様受容体 (NOD-like receptors: NLRs) などが知られている<sup>8-12</sup>。これらの受容体が、タンパク、核酸、脂質など、それぞれ対応する病原体特有の分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) (表 1) を認識すると、TLRs では MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) または TRIF (Toll-interleukin 1 receptor

domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$ ) を、RLRs では IPS-1 (IFN- $\beta$  promoter stimulator-1) を、cGAS では STING (stimulator of IFN genes protein) などのアダプター分子を介し、下流のシグナル経路が活性化され、最終的に転写因子である IRF (IFN regulatory factor) や NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) などが活性化されることで、I 型 IFN や TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ )、IL-6 (interleukin-6) などの炎症性サイトカインの遺伝子が誘導される<sup>13-15</sup> (序・図 1)。また NLRs は ASC (apoptosis associated speck-like protein) を介して下流のシグナルが活性化されることが知られている<sup>16-18</sup> (序・図 1)。

このようなシグナル伝達経路には、様々な分子が関与しており、その多くはリン酸化によって活性が制御されている<sup>19-21</sup>。リン酸化による制御機構については、さらに詳細について後述するが、一方で、このようなリン酸化による活性化機構が存在するが故に、それらを負に制御する脱リン酸化酵素の存在が報告されている<sup>20</sup>。中でも代表的な制御因子が MKP (mitogen-activated protein kinase phosphatase) であるが、これらは DUSP (dual-specificity phosphatase) に分類される脱リン酸化酵素であり、現在 10 種類が報告されている<sup>22,23</sup>。MKP の代表的な標的因子は MAPK (mitogen-activated protein kinase) であり、それらの activation loop 付近の T-X-Y モチーフを持つセリン/スレオニン残基を脱リン酸化することでこれらキナーゼの活性を負に制御している<sup>22,23</sup>。全ての MKP は N 末端側に kinase interaction domain (KIM) などの非触媒性のドメインと C 末端側にチロシンフォスファターゼ活性を持つ触媒性ドメインを有しているが、配列の相同性や、基質への特異性から三つのグループに分類される<sup>24</sup>。それぞれのグループは特徴的な局在を示し、MKP1(DUSP1)、



DUSP2、MKP2 (DUSP4)、DUSP5 は主に核<sup>24-26</sup>、MKP3 (DUSP6)、MKPX (DUSP7)、MKP4 (DUSP9) は主に細胞質、DUSP8、MKP5 (DUSP10)、MKP7 (DUSP16) は核と細胞質に局在することが報告されている。多くの MKP は増殖因子や様々なストレスによって活性化する MAPK によって活性化調節されていることが知られているが、DUSP2 が MKP1 の活性化調節に関与することが報告されていることや、欠損マウスが正常に発達することなどから MKP は単独ではなく協調的に MAPK の制御を行っていると考えられている<sup>24</sup>。これらの MKP の中でも、MKP1、MKP2、MKP5 については TLR4 シグナルの下流で機能することが分かっており、近年、MKP の PRR 応答における役割が注目されつつある<sup>22,24</sup>。

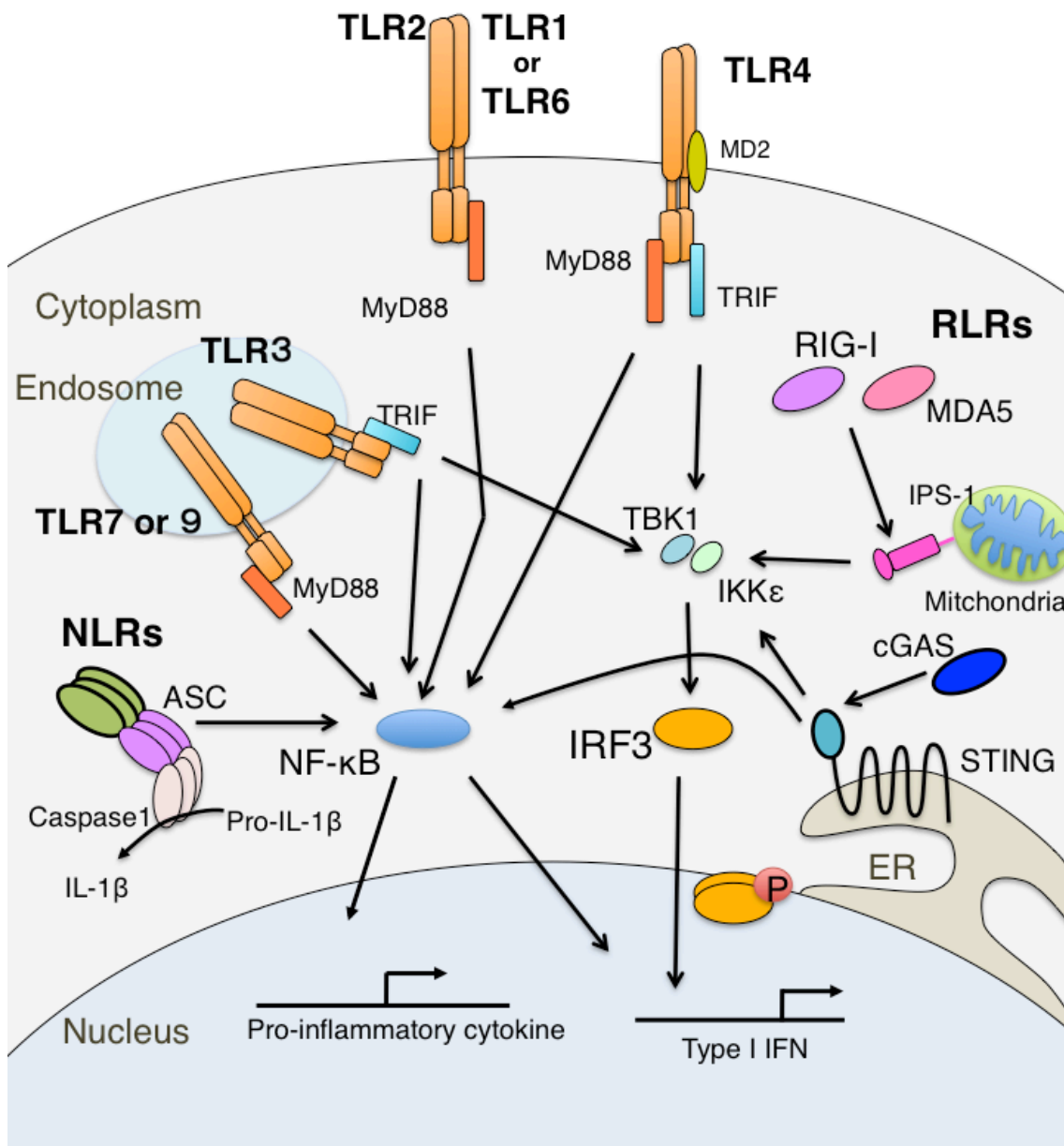
このように、PRRs は下流のシグナルは様々な因子によって厳密に制御されることで、各々に特異的な PAMPs に対して適切かつ迅速に様々な応答を惹起できると考えられる。そのような応答の中でも I 型 IFN 応答はウイルスの排除に必須であり、一方で、過剰な応答は自己免疫疾患などの病態を増悪させることが知られていることから、転写レベルで厳密な制御がなされている<sup>27-29</sup>。I 型 IFN 遺伝子の発現は IRF ファミリー転写因子によって担われており、これまでに 9 つの IRF 転写因子が報告されている<sup>30,31</sup>。IRF 転写因子は N 末端領域に DNA 結合ドメイン (DNA-binding domain: DBD) を有しており、この DNA 結合ドメインを介して標的遺伝子のプロモーター配列に結合することで、転写を活性化する<sup>29,31</sup>。IRF 転写因子の中でも IRF3 は、ほとんどの細胞種において恒常的な発現が認められ、定常状態においては細胞質に局在しているが、TLR 下流の TRIF 経路、または RLRs や cGAS など細胞質内核酸認識受容体経路の

活性化に伴い、セリンスレオニンキナーゼである TBK1 (TANK-binding kinase 1) によってリン酸化されることでホモ二量体を形成し<sup>32-34</sup>、核内に移行して I 型 IFN 遺伝子の誘導を活性化する<sup>29,31</sup> (序・図 1)。

誘導された I 型 IFN は、I 型 IFN 受容体を介して下流のシグナルを活性化し、PKR (protein kinase R)、MX1 (myxoma resistance protein 1) や ISG15 (IFN stimulated gene 15) などの抗ウイルス応答に関わる分子を誘導し<sup>35-37</sup>、ウイルス mRNA の転写抑制やウイルスタンパクの翻訳停止などにより、ウイルスの排除に寄与する<sup>35-37</sup>。このように抗ウイルス応答に I 型 IFN は重要であるが、一方で、種々の疾患やある種の細菌感染においては、I 型 IFN が病態や感染を増悪させてしまうことも知られている<sup>38,39</sup>。例えば、全身の炎症反応を特徴とする敗血症のマウス病態モデルである LPS (lipopolysaccharide) 誘導性のエンドトキシンショックでは *Ifnb* 遺伝子や *Irf3* 遺伝子欠損マウスにおいてその生存率が上昇することが報告されている<sup>40</sup>。また、I 型 IFN 受容体遺伝子欠損マウスでは全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosis: SLE) モデルにおいて病態が抑制されることが報告されており<sup>41</sup>、ヒトにおいても SLE 患者血中の I 型 IFN 量と病態ステージに相関があることが報告されている<sup>42,43</sup>。一方で、感染症において、細胞内寄生細菌の 1 種であるリステリア菌は、cGAS-STING を介して I 型 IFN を誘導することが知られているが、この誘導は生体に有害であり、細菌の排除に寄与するマクロファージの細胞死を誘導することで、抗細菌応答を阻害すると考えられている<sup>44-48</sup>。また、結核菌感染では強毒性株で I 型 IFN がより強く誘導され<sup>49</sup>、結核菌感染による生存率の低下につながっていることも報告されている<sup>49,50</sup>。

そのため、I 型 IFN の誘導は適切に制御される必要があり、中でも転写に必須の因子である IRF3 の機能制御は特に重要だと考えられる。しかしながら IRF3 の機能制御機構には未だ不明な点が多く残されており、例えば、細菌感染時に IRF3 を介して誘導される I 型 IFN 応答は、本来抑制されるべき有害な応答であるにも関わらず、適切に抑制するための回避機構の存在は明らかにされていなかった。そこで私は、本研究においてまず、IRF3 の活性化の制御機構を焦点に解析を行うことにした。その結果、細菌感染時の I 型 IFN 誘導の制御機構について、TLR-MyD88 経路によるシグナルが IRF3 の活性化を抑制する機構が存在することを明らかにし、その抑制機構に脱リン酸化酵素 MKP の関与が示唆された。

さらに、I 型 IFN 遺伝子の誘導を制御する新たな分子機構について探索を行ったところ、ゴルジ体から小胞体への輸送に働くことが知られている COPI (coatamer protein I) ファミリーのサブユニットである $\alpha$ -Cop が TBK1 キナーゼと IRF3 との結合を促進し、I 型 IFN の遺伝子誘導に関与することを見出した。これら一連の結果について、本論文では第一章を“細菌感染時における I 型 IFN 遺伝子の誘導制御”として、第二章を“I 型 IFN 誘導における $\alpha$ -Cop の役割についての解析”として、二章に分けて記述した。これらの知見は、感染症や自己免疫疾患などの治療薬開発において分子基盤を提供し、新規の治療標的分子の提示に繋がるものと期待される。



序・図1 PRRs 概略図

TLRs はアダプター分子である MyD88 (TLR3 は除く)、また TLR3、TLR4 は TRIF を介して、RIG-I 及び MDA5 などの RLRs は IPS-1 依存的に、cGAS は STING 依存的に下流の、NF-κB や IRF3 などの転写因子を活性化し、炎症性サイトカインや I 型 IFN を誘導する。NLRs は ASC 依存的に下流のシグナルを活性化し炎症性サイトカインを誘導する。

表 1 代表的な PRRs 及びそれらのリガンド

受容体	主なりガンド
膜型受容体	
TLR1	トリアシルリポタンパク質
TLR2	ペプチドグリカン (PGN)
TLR3	dsRNA
TLR4	リポ多糖 (LPS)
TLR5	フラジェリン (flagellin)
TLR6	ペプチドグリカン (PGN)
TLR7	ssRNA
TLR8	ssRNA
TLR9	非メチル化 DNA
細胞質内受容体	
RIG-I	dsRNA、5' 末端リン酸化 ssRNA
MDA5	dsRNA
cGAS	dsDNA
AIM2	dsDNA
NOD1	ペプチドグリカン (PGN)
NOD2	ペプチドグリカン (PGN)
NLRC4	フラジェリン (flagellin)

# 結果

## 第 1 章 細菌感染時における I 型 IFN の遺伝子の誘導制御

リステリア菌など、細胞内寄生細菌感染時においては、誘導された I 型 IFN が生体にとって不利益に作用することが知られており、実際、I 型 IFN 受容体遺伝子や *Irf3* 遺伝子の欠損マウスがリステリア菌の感染に対して耐性を示すことが示されている<sup>44,45</sup>。しかしながら、非常に興味深いことに、このような細菌による I 型 IFN の誘導レベルは、リステリア菌と同じ STING 経路を活性化する HSV-1 の場合と比較して非常に低い<sup>51</sup>。そのため、細菌の感染時には、生体に不利益な I 型 IFN の誘導を低いレベルに抑制する未知の機構の存在が考えられる。そこで、本章では細菌感染時の I 型 IFN の遺伝子誘導制御機構が存在するか否か、あるとすればどのような機構であるのか、解析を行うことにした。

### 細菌感染時の I 型 IFN 誘導における PRRs の役割

リステリア菌などの細菌感染時においては、TLRs をはじめ、cGAS や NLRs など、複数の PRRs のシグナル伝達経路が活性化されることが知られている<sup>52</sup>。そこで、細菌感染時の I 型 IFN 誘導における各 PRRs の役割についてまず検討を行った。野生型マウス、および各 PRRs 下流シグナルの活性化に必須のアダプター分子である、MyD88、STING、ASC を欠損したマウスから、そ

れぞれ腹腔マクロファージを調製し、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) を感染させ、6時間後に total RNA を回収し、*Ifnb1* 及び *Ifna4* のメッセンジャーRNA (messenger RNA: mRNA) 量について、逆転写酵素を用いた定量的 PCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: qRT-PCR) 法によって解析した。その結果、これまでの報告と一致して、リステリア菌感染時の I 型 IFN である *Ifnb1* 及び *Ifna4* の遺伝子誘導は、*Sting* 遺伝子欠損マクロファージにおいて顕著な減弱が認められた (図 1.1a)。一方で、非常に興味深いことに、*Myd88* 遺伝子欠損マクロファージにおいては、*Ifnb1* 及び *Ifna4* の遺伝子誘導がリステリア菌の感染によって非常に強く誘導されることが明らかとなった (図 1.1a)。また、*Asc* 遺伝子欠損マクロファージでは *Ifnb1* 及び *Ifna4* の遺伝子誘導は野生型と同等に誘導された (図 1.1a)。従って、リステリア菌感染時の I 型 IFN 誘導には STING が重要であり、NLRs-ASC の経路はほとんど関与しないことが判明するとともに、MyD88 を介したシグナルは、I 型 IFN 遺伝子の誘導を抑制することが判明した。

そこで、MyD88 を介した I 型 IFN 遺伝子誘導の抑制機構について解析を進めることとした。まず、時間経過での I 型 IFN の遺伝子誘導を検討した。*Myd88* 遺伝子欠損マクロファージにリステリア菌感染を行い、6、9時間後の *Ifnb1* の遺伝子誘導を qRT-PCR 法にて解析した。その結果、6、9時間どちらでも *Myd88* 遺伝子欠損マクロファージで *Ifnb1* の遺伝子誘導が顕著に誘導された (図 1.1b)。感染後9時間で *Ifnb1* の遺伝子誘導がより強く誘導されていたが、細胞死がより強く誘導されるため、より安定した解析が可能な6時間で解析を行った。次に、*Myd88* 遺伝子欠損マクロファージでのリステリア菌感染時の I

型 IFN の遺伝子誘導の増強が、リステリア菌に特有であるかどうか、細胞種に特異的な現象であるのか検証を行った。細胞内寄生細菌であるサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) を、野生型および *Myd88* 遺伝子欠損マウスの腹腔マクロファージに感染させ、6 時間後の *Ifnb1* の遺伝子誘導を qRT-PCR 法にて解析した。その結果、リステリア菌と同様に、サルモネラ菌を感染させた *Myd88* 遺伝子欠損細胞での *Ifnb1* の遺伝子誘導は、野生型と比較し、顕著に増強することを見出した (図 1.2)。従って、この *Ifnb1* の遺伝子誘導の亢進は、リステリア菌のみで見られる現象ではないことが明らかとなった。次に、細胞種特異性について検討を行った。野生型および *Myd88* 遺伝子欠損マウス由来の脾臓細胞、脾臓細胞由来 CD11b 陽性細胞、脾臓細胞由来 CD11c 陽性細胞を用いてリステリア菌感染を行い、6 時間後の *Ifnb1*、*Il12b* の遺伝子誘導を qRT-PCR 法にて検討した。その結果、腹腔マクロファージの時と同様、*Myd88* 遺伝子欠損マウス由来の細胞ではいずれも *Ifnb1* の遺伝子誘導が野生型と比較し、顕著に増強することが明らかとなった (図 1.3)。一方で、MyD88 の下流で誘導されることが知られている *Il12b* 遺伝子の誘導は、これまでの報告通り、*Myd88* 遺伝子欠損において顕著に減弱していた (図 1.3)。さらに、野生型および *Myd88* 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージにリステリア菌の感染を行い、6 時間後の遺伝子発現をマイクロアレイ法にて解析した結果、上記の結果と一致し *Myd88* 遺伝子欠損マクロファージでは I 型 IFN の遺伝子誘導が増強し、*Il12b* の誘導が減弱していた (図 1.4)。また、興味深いことに、I 型 IFN の誘導のみが MyD88 を介したシグナルで大きく抑制を受けることが判明した。以上の結果か



ら、MyD88 依存的な I 型 IFN の遺伝子誘導の抑制は、菌種、細胞種を問わずに認められる現象であることが明らかとなった。

MyD88 は主に TLR の下流で働くことが知られているアダプター分子であることから、I 型 IFN の遺伝子誘導の抑制はリステリア菌による TLR の刺激が関与することが予想された。そこで、リステリア菌由来分子を認識することが知られている TLR4 の遺伝子欠損細胞を用いて、リステリア菌感染時の I 型 IFN の遺伝子誘導への関与を検討した。野生型および *Tlr4* 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージにリステリア菌感染を行い、6 時間後の *Ifnb1* の遺伝子誘導を qRT-PCR 法で解析した。その結果、*Myd88* 遺伝子欠損マクロファージと同様、*Tlr4* 遺伝子欠損細胞では野生型と比較し、*Ifnb1* の遺伝子誘導が増強していた (図 1.5)。さらに、TLR4 の下流のシグナル伝達では、MyD88 だけではなく、TRIF もアダプター分子として機能することが知られている<sup>14,15</sup>。そこで、TRIF 経路による I 型 IFN の誘導抑制への関与についても検討した。野生型および *Trif* 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージにリステリア菌感染を行い、6 時間後の *Ifnb1* の遺伝子誘導を qRT-PCR 法で測定した。その結果、*Trif* 遺伝子欠損細胞では *Ifnb1* の遺伝子誘導は野生型のそれと同程度に誘導されていた (図 1.5)。従って、リステリア菌感染時の *Ifnb1* 遺伝子の抑制は、MyD88 シグナルに特異的であることが明らかとなった。以上の結果から、細菌感染時において、細菌による TLR4 の活性化と MyD88 を介したシグナルによって、STING を介した I 型 IFN の誘導を特異的に抑制する機構が存在すること

が明らかとなった。この機構が、I 型 IFN によるマクロファージのアポトーシス誘導を調節し、宿主に不利益な応答を抑制するものと考えられた。

### **TLR-MyD88 経路による I 型 IFN の抑制機構**

次に、この I 型 IFN の誘導抑制機構が TLR4 シグナルに特異的であるのかどうか、他の TLR においても見られる現象であるのか検討を進めた。リステリア菌の感染では、TLR4 に加えて TLR2 も活性化されるなど<sup>52</sup>、複数の TLR が活性化を受けてしまうため、特定の TLR のみを特異的に活性化するリガンドを用いて検討を進めることにした。野生型マウス由来の腹腔マクロファージに、二本鎖 DNA である poly(dA-dT) (B-DNA と呼ばれる：以下 B-DNA<sup>53</sup>) をリポフェクション法で細胞内に取り込ませた際には、細胞質内核酸認識受容体シグナル経路、特に STING に依存した経路が主に活性化され、I 型 IFN が誘導されることが知られている<sup>48,54</sup>。ここに、TLR4 のリガンドである LPS (lipopolysaccharide) または TLR2 のリガンドである PGN (peptidglycan) を単独又は同時に加えて刺激し、6 時間後の *Ifnb1*、*Ifna4*、及び *Il6* の遺伝子誘導を qRT-PCR 法で解析した。その結果、B-DNA 刺激による *Ifnb1* 及び *Ifna4* の誘導は、LPS または PGN で同時刺激した際に顕著に減弱するが、LPS または PGN 単独で刺激した場合よりは誘導されることがわかった (図 1.6)。一方で、*Il6* の遺伝子誘導は B-DNA を単独で刺激した群と比較し、減弱は認められず、むしろその誘導が増強していた (図 1.6)。従って、TLR4 のみでなく他の TLR によっても、STING を介した I 型 IFN 誘導は抑制されることが判明した。

次に、B-DNA 以外の細胞質内核酸認識受容体の活性化による I 型 IFN の遺伝子の誘導についても、TLR シグナルによる同様の抑制が見られるかどうか検討した。野生型マウスの腹腔マクロファージに、RLRs のリガンドである二本鎖 RNA の poly(I:C)、または cGAS のリガンドの c-di-GMP (cyclic-di-GMP) をリポフェクション法で細胞内に取り込ませ、ここに LPS または PGN をそれぞれ同時に加え、6 時間後の *Ifnb1*、*Ifna4*、及び *Il6* の遺伝子誘導を qRT-PCR 法で解析した。その結果、B-DNA 刺激の結果と同様に、poly(I:C)、または c-di-GMP 刺激によって誘導される *Ifnb1* 及び *Ifna4* の遺伝子誘導が、LPS または PGN の同時刺激によって減弱することが分かった (図 1.6)。またさらに、このようなリガンド刺激による I 型 IFN の抑制における MyD88 シグナルの関与について検討した。野生型マウスまたは *Myd88* 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージに、B-DNA をリポフェクション法で取り込ませ、この際 LPS と同時に刺激を行い、6 時間後の *Ifnb1* の遺伝子誘導を qRT-PCR 法で解析した。その結果、*Myd88* 遺伝子欠損細胞では B-DNA と LPS の同時刺激時の *Ifnb1* の遺伝子誘導抑制が顕著に減弱することが判明した (図 1.7)。以上の結果より、RLRs や cGAS など細胞質内核酸認識受容体の刺激によって誘導される I 型 IFN は、TLR-MyD88 経路によって特異的に抑制されていることが明らかとなった。

### **TLR-MyD88 経路による IRF3 の活性化の抑制**

TLR-MyD88 経路はどのようなメカニズムを介して I 型 IFN を特異的に抑制しているのだろうか。リステリア菌やサルモネラ菌の感染時、または細胞

質内核酸認識受容体の刺激時の I 型 IFN の遺伝子誘導には、転写因子である IRF3 が重要であることが知られており、IRF3 はセリン／スレオニンキナーゼである TBK1 によってリン酸化を受け、特に 396 番目のセリン残基がリン酸化されることで IRF3 のホモ二量体が形成され、核内移行することが知られている<sup>29,31</sup>。そこで、TLR-MyD88 経路の活性化が、細胞質内核酸認識受容体刺激による IRF3 の活性化を抑制するかどうか検討を行った。野生型マウスの腹腔マクロファージに B-DNA、または poly(I:C)をリポフェクション法で取り込ませ、単独または LPS を同時に加えて刺激を行い 0、1、2、4 時間後の IRF3 の Ser-396 のリン酸化を免疫ブロット法で解析した。その結果、B-DNA または poly(I:C)の刺激によって IRF3 の Ser-396 が強くリン酸化されるが、B-DNA、poly(I:C)ともに LPS を同時に刺激した際には、そのリン酸化が減弱することが判明した。従って、TLR4 シグナルの活性化により、IRF3 の活性化の指標の一つである Ser-396 のリン酸化が抑制されることが明らかとなった (図 1.8)。さらに、IRF3 の活性化の指標であるホモ二量体形成について、Native-PAGE 法で検討を行ったところ、poly(I:C)の単独刺激と比較し、LPS との同時刺激で IRF3 のホモ二量体の形成が減弱していた (図 1.9)。以上の結果から、TLR シグナルによって細胞質内核酸認識受容体刺激による IRF3 の活性化が抑制されることが示された。無刺激細胞と比較し、LPS 単独刺激で IRF3 のリン酸化が誘導されることが分かっている。しかしながら、そのレベルは poly(I:C)刺激による IRF3 のリン酸化と比較すると相対的には非常に低いレベルである(図 1.8)。すなわち、TLR 経路では IRF3 の活性化が起こるが、同時に TLR 下流で抑制機構も活性化されるため、IRF3 の活性レベルが低いと考えられる。この結果は過去

の報告と一致しており、IRF3 の活性化レベルと相関して、I 型 IFN 誘導のレベルも RLRs 経路に比べて、TLR4 経路では非常に低い<sup>51</sup>。

上述の結果から、TLR シグナルによって IRF3 のリン酸化が減弱することが明らかとなった。そこで次に、IRF3 の上流で、そのリン酸化を担う TBK1 キナーゼの活性化制御について検討した。TBK1 は上流のシグナルによって活性化を受けると自己リン酸化によりリン酸化されることが報告されている<sup>55</sup>。そこで、野生型マウスの腹腔マクロファージに B-DNA、または poly(I:C)をリポフェクション法で取り込ませ、単独または LPS と同時に刺激を行い、0、1、2、4 時間後に TBK1 のリン酸化について検討した。その結果、LPS 刺激は TBK1 の活性化の指標であるリン酸化には影響を与えないことが判明した (図 1.8)。さらに、B-DNA の単独刺激、または LPS や PGN と B-DNA との同時刺激の際における TBK1 の基質に対するリン酸化能について *in vitro* kinase assay 法を用いて解析した。野生型マウスの腹腔マクロファージに B-DNA をリポフェクション法で取り込ませ、単独または LPS、PGN と同時に刺激を行い、0、1、2 時間後にタンパクを回収し、抗 TBK1 抗体で免疫沈降を行い、ここに MBP (myelin basic protein) を基質として、<sup>32</sup>P で放射性標識された ATP をドナーとして混合し、反応させたのち、TBK1 による MBP のリン酸化について <sup>32</sup>P の活性を指標に検討した。その結果、TBK1 のキナーゼ活性化は B-DNA 単独と比較し、LPS や PGN との同時刺激によっても減弱せず、LPS との同時刺激時には亢進することが明らかとなった (図 1.10)。以上の結果から、TLR-MyD88 シグナルによって、細胞質内核酸認識受容体シグナルによる TBK1 の活性化は抑制されないことが明らかとなった。またさらに、細菌感染時の IRF3

と TBK1 の活性化における TLR-MyD88 シグナルの影響についても検討を行った。野生型および *Myd88* 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージにリステリア菌の感染を行い、0、2、4、6 時間後の IRF3 及び TBK1 の活性化を、リン酸化を指標に免疫ブロット法にて解析した。その結果、上記の結果と一致して、*Myd88* 遺伝子欠損細胞では野生型と比較し、IRF3 のリン酸化が亢進する一方、TBK1 のリン酸化にはそのような亢進は認められなかった (図 1.11)。

I 型 IFN の遺伝子誘導には IRF3 の他に IRF7 が関与していることが知られている。そこで、次に TLR 経路による IRF7 の活性化への影響を解析した。レトロウイルスを用いて FLAG-IRF7 を RAW264.7 細胞に発現させ、poly(I:C)をリポフェクション法で単独、または LPS と同時に刺激を行い 1、2、3、4、5 時間後の IRF7 の核移行を WB で解析した。その結果、IRF7 の核移行は LPS との同時刺激では減弱せず、3、4 時間では亢進していた (図 1.12)。以上の結果より、細菌感染時に活性化された TLR-MyD88 シグナルによって、STING 依存的な IRF3 の活性化が抑制され、I 型 IFN の遺伝子誘導が減弱することが明らかとなった。一方で、この時、TBK1 キナーゼの活性化には TLR-MyD88 シグナルは抑制しないことも明らかとなった。

### **TLR-MyD88 シグナルを介した強固な TBK1-IRF3 複合体の形成**

上記の解析から、TLR-MyD88 シグナルは、IRF3 をリン酸化し活性化を担う TBK1 キナーゼの活性を抑制しないことが明らかとなった。では、TLR-MyD88 経路はどのように IRF3 の活性化を特異的に抑制しているのだろうか。TBK1 と IRF3 は酵素-基質の関係にあるため、TLR-MyD88 シグナルは TBK1 と

IRF3 の結合に何らかの影響を与えているのではないかと考えた。そこで次に、TLR-MyD88 シグナルによる IRF3 と TBK1 の結合への影響について検討することにした。野生型マウスの腹腔マクロファージに B-DNA、または poly(I:C)をリポフェクション法で取り込ませ、単独または LPS と同時に刺激を行い、5 時間後において IRF3 と TBK1 の結合を *In situ* PLA (proximity ligation assay: 以下 PLA) にて解析を行った。PLA はタンパク質間の相互作用を検出する方法で、相互作用を検出したい二種類のタンパク質に、それぞれ一次抗体を作用させたのち (2つの一次抗体は異種動物由来の抗体になるよう組み合わせる)、後にポリメラーゼを用いて伸長反応できるように、PLA プローブと相補鎖になるように設計されたオリゴヌクレオチドを標識した二次抗体を作用させる。二種類のタンパク質が近接している場合、二次抗体に標識されたオリゴヌクレオチドが PLA プローブと相補鎖を形成することで環状構造となり、ここに DNA リガーゼを作用させることで閉環構造が形成される。この閉環 DNA を鋳型として伸長反応を行うことで繰り返し配列を有する一本鎖 DNA が合成され、この伸長された DNA 配列に特異的な蛍光プローブをハイブリダイズさせることで、蛍光スポット (PL(+))として検出される。これにより内在性タンパク質間の結合を、可視化・定量化することが可能となる。この手法を用いて TBK1 と IRF3 との結合を検討したところ、興味深いことに、B-DNA または、poly(I:C)刺激時の IRF3 と TBK1 との結合と比較し、B-DNA、poly(I:C)と LPS との同時刺激では PL(+))スポットの数が顕著に増加し、その結合が増強していることが判明した (図 1.13a.b)。一方で LPS 単独の刺激では IRF3 と TBK1 の結合は B-DNA 刺激のそれと比較して PL(+))スポットの数は明らかに低かった (図

1.13a)。このことは、本来であれば酵素-基質関係である TBK1 と IRF3 は、TBK1 が活性化され、それにより IRF3 がリン酸化を受けることで速やかに両者は解離するはずであるが、TLR-MyD88 シグナルの活性化によって、IRF3 と TBK1 の結合が解離しづらくなっており、結合状態のままのものが増加している可能性を示唆しているものと考えられる。そこでさらに、同様の検討を *Myd88* 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージで行ったところ、野生型細胞で観察された B-DNA と LPS との同時刺激による TBK1 と IRF3 の PL(+)スポットの増加が、*Myd88* 遺伝子欠損細胞では認められなかった (図 1.13a)。すなわち、TLR-MyD88 経路が IRF3-TBK1 の結合を増強させていることが明らかとなった。一連の結果から、TLR-MyD88 シグナルによって IRF3 と TBK1 の解離が抑制されてしまい、複合体形成状態で反応が停止することで、TBK1 による更なる IRF3 のリン酸化が阻害され、結果として I 型 IFN の誘導が抑制されるという可能性が考えられた。

### 脱リン酸化酵素 MKP と IRF3-TBK1 との結合の解析

これまでの解析から、TLR-MyD88 シグナルによって IRF3 と TBK1 の解離が阻害され、このことが I 型 IFN の抑制に関与していることが示唆された。では、どのようなメカニズムによってこの阻害がなされているのだろうか。酵素と基質の反応は“鍵と鍵穴”の関係であると考えられており、基質が酵素の活性中心に適合し、酵素反応によって基質の構造変化等によりアフィニティーが低下し、基質は酵素から解離すると考えられている。IRF3 の活性化には上述の Ser396 以外にも複数箇所のセリン残基がリン酸化を受けることが報告されてお



り<sup>56,57</sup>、これらがリン酸化されることによって IRF3 は、ホモ二量体を形成し核内移行する、“活性化型”へと立体構造が変化すると考えられている。私は、TLR-MyD88 シグナルによって、本来 TBK1 から解離すべき IRF3 が何らかの調節を受け、その結果 TBK1 から解離しづらくなっているのだらうと仮定した。IRF3 は複数の残基がリン酸化されることで活性化が調節されていることが報告されているため、私はリン酸化に着目し、特に、IRF3 と TBK1 のリン酸化反応の逆反応、すなわち脱リン酸化反応が促進されることによって IRF3 は TBK1 からの解離が抑制されるのではないだらうかという仮説を立てた。

そこでまず、TLR-MyD88 シグナルによる I 型 IFN の誘導の抑制に脱リン酸化酵素が関わっているか否かについて、脱リン酸化酵素の阻害剤であるフッ化ナトリウム (NaF) を用いて検討した。野生型マウス由来の腹腔マクロファージにフッ化ナトリウムを添加し、B-DNA をリポフェクション法で取り込ませ、単独または LPS と同時に刺激を行い、6 時間後の *Ifnb1* の遺伝子誘導を、qRT-PCR 法を用いて解析した。その結果、フッ化ナトリウム添加により、LPS と B-DNA の同時刺激による *Ifnb1* の遺伝子誘導抑制が認められなくなることが判明した (図 1.14)。すなわち、TLR-MyD88 シグナルによる I 型 IFN の抑制機構には脱リン酸化酵素が関与することが示唆された。TLR シグナルの下流では数多くの脱リン酸化酵素がその応答の調節に機能していることが知られている<sup>19,20</sup>。中でも MKP 脱リン酸化酵素ファミリー分子のうち、MKP1、MKP5 は TLR シグナルによって誘導、制御されることが報告されていることから<sup>58,59</sup>、私はこれら MKP について解析を進めることにした。

MKP1 及び MKP5 が IRF3 の活性化調節に関わっているかどうか検討するため、まず、これら MKPs と IRF3 との結合について、PLA を用いて解析した。野生型マウス由来の腹腔マクロファージに B-DNA をリポフェクション法で取り込ませ、単独または LPS と同時に刺激を行い、4 時間後の IRF3 と MKP1 または MKP5 との結合について検討した結果、IRF3 と TBK1 の結合と同様、B-DNA と LPS との同時刺激により、MKP1 または MKP5 と IRF3 との結合を示す PL(+)スポットが、B-DNA 刺激単独と比較し、顕著に増加することが判明した (図 1.15a)。すなわち、MKP1、MKP5 は B-DNA と LPS の同時刺激時において、IRF3 と複合体を形成していることが明らかとなった。さらに MKPs が TBK1 とも会合するかどうか、この会合に IRF3 が関与しているか否かについて解析を行った。野生型及び *Irf3* 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージを用い、B-DNA をリポフェクション法で取り込ませ、単独または LPS と同時に刺激を行い、MKPs と TBK1 の結合を PLA により検討した。その結果、B-DNA と LPS の同時刺激時において、B-DNA 単独刺激と比較し、MKP1 または MKP5 と TBK1 との結合を示す PL(+)スポットの増加が認められた (図 1.15b.c)。一方で、この PL(+)スポットの増加は *Irf3* 遺伝子欠損細胞においては認められなかった (図 1.15b.c)。すなわち、MKP1 または MKP5 と TBK1 との会合は IRF3 を介してなされていることが示唆され、MKPs と IRF3、さらに TBK1 との 3 者複合体が形成されているものと考えられた。

さらに、他の MKP ファミリー分子と IRF3 との結合についても解析した。MKP2、MKP3、MKP7 と IRF3 との結合について PLA を用いて解析したところ、B-DNA の単独刺激と比較し、B-DNA と LPS との同時刺激では MKP3 において

は PL(+)スポットの増加が認められたが、MKP2 及び MKP7 では PL(+)スポットの増強は認められなかった (図 1.16)。このことから、MKP3 も MKP1 や MKP5 と同様、IRF3-TBK1 と複合体を形成している可能性が考えられた。

以上の結果から MKP1、MKP3、MKP5 は TLR-MyD88 シグナル依存的に IRF3、さらには TBK1 とも会合し、この複合体が形成されることによって、I 型 IFN の誘導抑制がなされている可能性が考えられた。

### **MKPs による IRF3 の活性化制御についての解析**

MKPs と IRF3 とが会合することが判明したため、さらに MKPs による IRF3 の活性化調節について検討を進めることにした。まず HEK293T 細胞に FLAG タグを N 末端側に付加した IRF3、及び Myc タグを N 末端側に付加した MKP1、MKP3、または MKP5 を共発現させ、抗 Myc 抗体で免疫沈降を行い、IRF3 との会合について検証した。その結果、共発現系においても、抗 Myc 抗体の免疫沈降によって、3つのすべての MKP が IRF3 と会合することが分かった (図 1.17)。次に、TBK1 による IRF3 のリン酸化への MKPs の関与について検討した。これまでの報告から、TBK1 の過剰発現により IRF3 のリン酸化が誘導されることが報告されている<sup>60</sup>。そこで HEK293T 細胞に TBK1、IRF3 と MKP1 または MKP5 を共発現させ、TBK1 による IRF3 のリン酸化への MKPs の影響を解析した。その結果、MKP1 または MKP5 と共発現させることによって TBK1 による IRF3 のリン酸化が MKP1 の発現量依存的に減弱することが分かった (図 1.17)。さらに、この抑制に、MKP の脱リン酸化活性が必要かどうか検討を行った。MKP5 については脱リン酸化酵素活性に必要なアミノ酸残基

が報告されているため<sup>61</sup>、この MKP5 の変異体 (MKP5 CS) を用いて、HEK293T 細胞に TBK1、IRF3 と共発現させ、同様の検討を行った。その結果、野生型の MKP5 (MKP5 WT) と比較し、IRF3 のリン酸化レベルの減弱が変異体では少なくなることが分かった (図 1.17)。しかしながら、IRF3 のリン酸化の減弱レベルは小さくなるものの、未だリン酸化の減弱自体は MKP5 変異体を用いても見られたため、MKP5 による IRF3 リン酸化の抑制には脱リン酸化に依らない機構も存在することが示唆される。MKP2 や MKP3 においては、脱リン酸化活性非依存的に標的タンパクと結合し、その機能を抑制することが報告されているため<sup>62,63</sup>、MKP5 と IRF3 との結合自体が TBK1 による IRF3 のリン酸化の抑制に繋がっている可能性も考えられる。

さらに、MKP1、MKP5 による I 型 IFN 誘導抑制への関与について、*Mkp1*、または *Mkp5* 遺伝子欠損マウス由来のマクロファージを用いて解析を行った。野生型細胞及びこれらの遺伝子欠損細胞にリステリア菌を感染させ、*Ifnb1* の遺伝子誘導を qRT-PCR 法を用いて解析した。その結果、*Mkp1*、*Mkp5* 遺伝子欠損マウス由来のマクロファージにおいて、リステリア菌感染による *Ifnb1* の遺伝子誘導は野生型細胞と同程度であることが判明した (図 1.18)。上述の通り、IRF3 には MKP1、MKP5 に加えて MKP3 も結合するなど、複数の MKPs によって協調的に IRF3 のリン酸化が抑制される可能性があり、単独の MKP の発現を欠損させた場合においても、他の MKP が IRF3 のリン酸化の抑制を補完していると推察される。これら複数の MKPs の発現を同時に欠損させた細胞を用いるなど、その解析には工夫が必要であると考えられ、今後の興味ある課題である。

## TLR-MyD88 経路による I 型 IFN の遺伝子誘導の抑制機構の生理的意義

次に、今回見出された TLR-MyD88 経路による I 型 IFN の誘導抑制の生理的意義について解析した。リステリア菌感染時は TLR-MyD88 シグナルによって I 型 IFN が抑制されることによって、リステリア菌の効率的な排除に寄与していると予想される。そこで、まず、野生型マウスと *Myd88* 遺伝子欠損マウスにリステリア菌感染を行い、I 型 IFN の遺伝子誘導への MyD88 を介したシグナルが及ぼす影響を解析した。感染 2.5 日後において脾臓における *Ifnb1* の遺伝子誘導を qRT-PCR 法にて解析したところ、*Myd88* 遺伝子欠損マウスでは *Ifnb1* の遺伝子の誘導レベルが野生型マウスと比較し有意に上昇していた (図 1.19a)。また、この時見られた *Ifnb1* の遺伝子誘導の亢進が IRF3 に依存したものであるかどうか検討した。野生型マウス、*Myd88* 遺伝子欠損マウス、及び *Myd88* と *Irf3* の二重遺伝子欠損マウスにリステリア菌の感染を行い、脾臓における *Ifnb1* の遺伝子誘導を qRT-PCR 法で解析した。その結果、*Myd88* 遺伝子欠損マウスで亢進する *Ifnb1* の遺伝子誘導が、*Myd88* と *Irf3* の二重遺伝子欠損マウスでは有意に減弱することが判明した (図 1.19a)。さらに、本結果と一致して、それぞれのマウス由来の腹腔マクロファージにリステリア菌を感染させた系においても同様の結果が得られた (図 1.19b)。これらの結果から、リステリア感染時において TLR-MyD88 シグナルによって IRF3 の機能が抑制され、これが I 型 IFN の誘導抑制に繋がっていることが *in vivo* においても示された。最後に、この I 型 IFN 遺伝子の誘導抑制がリステリア菌の増殖、感染応答に及ぼす影響について検討した。野生型、*Myd88* 遺伝子欠損、及び *Myd88* と *Irf3* の二重遺伝子

欠損マウスにリステリア菌の感染を行い、脾臓におけるリステリア菌のタイターを測定した結果、I 型 IFN の遺伝子誘導の減少と相関して、*Myd88* と *Irf3* の二重遺伝子欠損マウスでは *Myd88* 遺伝子欠損マウスと比較して、リステリア菌の増殖が有意に減少することが示された (図 1.19a)。また、脾臓の HE 染色像から、リステリア菌の増殖抑制に伴って、組織破壊が軽減されていることも分かった (図 1.19a)。一方で、野生型のマウスと比較し *Myd88* と *Irf3* の二重遺伝子欠損マウスでは脾臓リステリア菌の増殖が増加していた (図 1.19a)。これまで、MyD88 を介したサイトカイン産生などがリステリア菌排除に重要な働きをしていることが知られていたが、さらに I 型 IFN を抑制することによってより効率的にリステリア菌排除に働いていることが示唆された。

以上の一連の結果から、リステリア菌の感染時、TLR-MyD88 経路により、MKPs 等を介して、STING 依存的な IRF3 による I 型 IFN の誘導が抑制されることが示された。

## 第2章 I型 IFN の遺伝子誘導における $\alpha$ -COP の役割

前章では細菌感染時における I 型 IFN の遺伝子誘導における IRF3 の新規制御機構が存在することを明らかとした。自然免疫受容体シグナルの下流では IRF3、MKPs を含め多くの分子がリン酸化、脱リン酸化によって制御されていることが知られている<sup>19-21</sup>。そこで、さらに I 型 IFN 遺伝子の発現制御に関わる分子機構を明らかにするため、定量的リン酸化プロテオーム解析を行い、自然免疫受容体シグナルの下流でリン酸化されるタンパクを網羅的に同定し、それらの I 型 IFN の遺伝子誘導における役割について解析した。

### 自然免疫受容体シグナル下流でリン酸化されるタンパクの網羅的解析

はじめに、自然免疫受容体シグナル下流でリン酸化されるタンパクを検出するために定量的リン酸化プロテオーム解析を行った。野生型マウスの腹腔マクロファージを用い、iTRAQ法によって自然免疫受容体シグナルでリン酸化されるタンパクを網羅的に同定し、Gene Ontology Enrichment解析を行ったところ、リン酸化の強度に相関して高くランクされるクラスターの存在が明らかとなり、その構成遺伝子としてCopa、Pom121、Tom1、Cog1を同定した (図2.1a.b) (九州大学 中山敬一博士との共同研究)。

### $\alpha$ -COP の I 型 IFN の遺伝子誘導における解析

次に、Gene Ontology Enrichment解析によって得られたタンパクが、実際にI型IFNの遺伝子誘導に関与するかを検討するために、マウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast: MEF) において、それぞれの分子に対してsiRNA

(small/short interfering RNA) 法を用いて遺伝子ノックダウンを行い、poly(I:C)をリポフェクション法により細胞内に取り込ませ、刺激後3時間での*Ifnb1*遺伝子誘導をqRT-PCR法にて解析した。その結果、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送を行うことが知られているコートタンパク質複合体 I (Coatamer protein I: COPI) の $\alpha$ サブユニット (coatamer subunit  $\alpha$  :  $\alpha$ -COP) の発現を減弱させた細胞において、*Ifnb1*の遺伝子誘導が顕著に減弱することが判明した (図2.2)。*Pom121*、*Tom1*の遺伝子ノックダウンした細胞においても有意に遺伝子誘導が減弱したが、*Copa*の遺伝子ノックダウンした細胞での減弱が最も顕著だったため、本研究では $\alpha$ -COPに注目しI型IFN誘導における役割について解析を行うことにした。

$\alpha$ -COPのI型IFN誘導における役割について更に解析を行うために、MEFにおいて*Copa*の遺伝子発現をsiRNAによりノックダウンし、poly(I:C)またはB-DNAをリポフェクション法により細胞内に取り込ませ、刺激後3時間での*Ifnb1*の遺伝子誘導をqRT-PCR法にて解析した。その結果、poly(I:C)と同様に、B-DNA刺激でも*Ifnb1*の遺伝子誘導が顕著に減弱していた (図2.3a)。同様の結果は、*Copa*に対する異なる標的配列のsiRNA (*Copa*#2、*Copa*#3) を用いて遺伝子ノックダウンした際も得られたため (図2.3a)、特に*Copa*の遺伝子発現が減弱していたsiRNA (*Copa*#1) を今後の解析に用いた。さらに、MEFにおいて*Copa*の遺伝子発現をsiRNAによりノックダウンし、poly(I:C)の濃度を変えて刺激し (3  $\mu$ g/mL、10  $\mu$ g/mL、30 $\mu$ g/mL)、2、4、6時間後のI型IFNの遺伝子誘導をqRT-PCR法にて解析した結果、*Copa*を遺伝子ノックダウンした細胞では、全ての時間経過において、また全ての濃度のpoly(I:C)刺激において、コントロール



siRNAを用いた細胞と比較し、I型IFNの遺伝子誘導の顕著な減弱が認められた (図2.3b.c)。

COPIがウイルス粒子のエンドサイトーシスに関与することや、*Copa*の遺伝子をノックダウンした細胞でインフルエンザウイルスなどのエントリーが抑制されることが報告されている<sup>64</sup>。そのため、*Copa*の遺伝子ノックダウン細胞では、リガンドである核酸の取り込み自体が阻害されてしまい、これがI型IFNの遺伝子誘導の減弱の原因になっている可能性が考えられる。そこで、*Copa*の遺伝子ノックダウン細胞における核酸の取り込みについて検討を行った。*Copa*の遺伝子をノックダウンしたMEFにローダミン (rhodamine: ROX) で標識したpoly(I:C) (ROX-poly(I:C)) をリポフェクション法により細胞に取り込ませて刺激を行い、4時間後において核酸の取り込みをフローサイトメトリー (flow cytometry) 法を用いて解析した。その結果、*Copa*遺伝子をノックダウンした細胞においても、コントロールの細胞と比較し、poly(I:C)の取り込み減弱は認められなかったことから、 $\alpha$ -COPは核酸の取り込み自体には関与していないことが示された (図2.4)。

以上の結果から、 $\alpha$ -COPはpoly(I:C)刺激時のI型IFNの遺伝子誘導に重要な働きをしている可能性が示唆された。そこで、さらに他の自然免疫受容体にそれぞれ特異的なリガンドを用いて、誘導されるI型IFNへの $\alpha$ -COPの関与について検討した。マクロファージのマウス細胞株であるRAW264.7細胞にsiRNAを用いて $\alpha$ -COP遺伝子の発現をノックダウンし、LPS (TLR4リガンド)、CpG-BODN (oligodeoxynucleotides : TLR9リガンド)、R837 (TLR7リガンド)、poly(I:C) (RLRsリガンド) またはB-DNA (cGAS、STINGのリガンド) で刺激

し、6時間後の遺伝子誘導をqRT-PCR法で解析した。その結果、LPS、poly(I:C)またはB-DNA刺激によるI型IFNの遺伝子誘導が、*Copa*遺伝子ノックダウン細胞において顕著に減弱した(図2.5)。一方で、CpG-B ODNとR837刺激によるI型IFN遺伝子の誘導は減弱しなかった(図2.5)。RLRsやcGASのシグナル下流、およびTLR4シグナル下流のI型IFN遺伝子誘導はIRF3を介して行われている一方、TLR9、TLR7の下流ではIRF3を介さず、IRF7やIRF1を介することが報告されている。従って、上記の結果から、 $\alpha$ -COPはIRF3を介したI型IFNの遺伝子誘導に特異的に関与している可能性が示唆された。

#### **$\alpha$ -COP の IRF3 活性化における役割の検討**

前項の結果から、 $\alpha$ -COPがIRF3を介したI型IFNの遺伝子誘導に関与することが示唆されたため、次に、IRF3活性化における $\alpha$ -COPの関与について検討した。RAW264.7細胞において、siRNA法を用いて*Copa*遺伝子をノックダウンし、poly(I:C)またはLPSによる刺激を行い、0、2、4時間後または、0、1、3時間後のIRF3、TBK1のリン酸化について免疫ブロット法にて解析した。検討の結果、*Copa*の遺伝子ノックダウンしたRAW264.7細胞では、IRF3のser396のリン酸化が減弱していたが、TBK1のリン酸化は亢進していた(図2.6)。前章において述べた通り、IRF3及びTBK1のリン酸化は活性化の指標として用いられている。従って、上述の結果から、 $\alpha$ -COPがIRF3のリン酸化を正に制御することが示唆された。

TBK1の活性化が減弱していないにもかかわらず、IRF3のリン酸化が減弱していたことから、IRF3とTBK1の結合阻害が起きている可能性が考えられ

た。そこで、*Copa*遺伝子をノックダウンしたMEFをpoly(I:C)で刺激し、4時間後のIRF3とTBK1との結合を、PLAを用いて解析した。RAW246.7細胞では細胞質領域が小さく免疫染色での解析が困難なため、MEFを用いて解析した。その結果、poly(I:C)刺激時において、*Copa*遺伝子ノックダウン細胞ではIRF3とTBK1の結合が減弱することが判明した（図2.7）。さらに、同様の条件で $\alpha$ -COPとIRF3、TBK1との結合についてPLAにて検討した結果、poly(I:C)刺激に応じて、 $\alpha$ -COPとIRF3、及び $\alpha$ -COPとTBK1のPL(+)スポットの数が増強され、 $\alpha$ -COPとIRF3、及び $\alpha$ -COPとTBK1が刺激依存的に結合することが判明した（図2.8）。これらの結果から $\alpha$ -COPはTBK1とIRF3との結合を介し、TBK1によるIRF3のリン酸化を正に制御していると考えられた。

以上の一連の検討によって、 $\alpha$ -COPをI型IFN遺伝子の発現誘導を正に制御する因子として新規に同定した。 $\alpha$ -COPは刺激依存的にIRF3、TBK1と結合し、IRF3とTBK1の結合を促進していることが示唆された（図2.9）。

補足：巻末に示す結果のうち図1.10の結果は根岸英雄特任助教（東京大学生産技術研究所炎症・免疫制御学社会連携研究部門）、図1.17の結果は博士課程の遠藤信康氏（同）の協力を得て行われたものである。

## 考察

本研究は、未だ完全には明らかにされていない自然免疫受容体シグナルによる I 型 IFN 遺伝子誘導の制御機構について解析を行った。マクロファージをはじめとする自然免疫担当細胞は、自然免疫受容体を複数発現させ、病原体が持つ分子のパターンを汎く認識することで種々の病原体感染に対応していると考えられている。この認識様式は、厳密な分子認識を基本とする適応免疫系のそれと比較すると、適応される範囲は広いものの、厳密性の低い認識様式であると考えられる。そのため、一つの病原体に対しても複数の受容体が同時に活性化され、中には細菌感染時に産生される I 型 IFN のように、生体にとって不利益な免疫応答を誘導してしまう危険性をも孕んでいる。本研究において見出した、TLR-MyD88 シグナルによる I 型 IFN 遺伝子誘導の抑制機構は、まさにそのような危険性を排除するための機構と考えられる。さらに、TLR-MyD88 経路による I 型 IFN 遺伝子誘導の抑制は、TBK1 の活性化には影響しない形で、IRF3 のリン酸化を特異的に抑制することによって達成されていた。何故 TLR-MyD88 を介したシグナルは、細胞質内核酸認識受容体シグナルによって活性化されるシグナル伝達経路の全てではなく、IRF3 のみを特異的に抑制するのだろうか。これは、I 型 IFN の誘導という不利益な応答のみを特異的に排除するための機構であることが考えられる。TLR シグナルと細胞質内核酸認識受容体シグナルを同時に活性化した場合、細菌の排除に寄与する炎症性サイトカインである *Il6* の遺伝子は、TLR の単独刺激と比較し、より強力に誘導され

ている。すなわち、複数の自然免疫受容体が同時に活性化されることで、強力な炎症性サイトカインの遺伝子誘導を可能にし、細菌感染という非常事態に最大限の能力で対応していると考えられる。このような炎症性サイトカインの遺伝子誘導には、転写因子である NF- $\kappa$ B の活性化が重要であることが知られているが、最近の報告から、細胞質内核酸認識受容体シグナルによって活性化された TBK1 が、NF- $\kappa$ B の活性化にも関与することが報告されている<sup>65</sup>。さらに、TBK1 は細菌感染時にオプチニューリン (optineurin : OPTN) や p62 などの分子のリン酸化を介し、オートファージを促進することで細菌排除に作用していることも報告されている<sup>66-68</sup>。従って、TLR-MyD88 シグナルが TBK1 を抑制すると、細菌感染に対して不利になる可能性があり、IRF3 の活性化のみを特異的に阻害する方が生体にとって都合が良いと考えられる。実際、*Irf3* 遺伝子欠損マウスや I 型 IFN 受容体遺伝子欠損マウスではリステリア菌の感染に対し、耐性を示すにも関わらず、*Sting* 遺伝子欠損マウスではリステリア菌の感染に対し耐性を示さないことが報告されていることも<sup>69</sup>、この仮説を支持するものだと考えられる。*Irf3* と *Sting* の二重遺伝子欠損マウスを作成し、リステリア菌の感染に対する耐性を調べることにより IRF3 を特異的に抑制する本機構の生理的意義がさらに明らかになる可能性が考えられる。また、これまでの当研究室における解析から、細胞質内核酸認識受容体シグナルによって活性化された IRF3 が TLR 刺激による *Il12b* の遺伝子誘導を抑制することで、Th1/Th17 応答を抑制することが見出されている<sup>51</sup>。Th1/Th17 応答は細菌の排除に重要であるため<sup>70-72</sup>、細菌感染時に IRF3 が活性化されてしまうことは、I 型 IFN の遺伝子誘導を活性化してしまうだけでなく、*Il12b* の遺伝子誘導をも抑制してしまう

という、生体にとって二重の意味で不利益があると考えられ、TLR 下流のシグナルにおいて IRF3 の機能を抑制することは、理に適った戦略であると考えられる。

本研究による解析から、このような I 型 IFN の遺伝子発現の抑制は、MKPs による IRF3 の活性化調節によってなされていることが示された。PLA を用いた解析からは、TLR 刺激依存的に MKP が誘導され、IRF3 と結合し、この IRF3 との結合を介して TBK1 とも複合体を形成することが示された。本研究の解析において見られたような、TBK1 の活性化を抑制せずに IRF3 の活性化のみを抑制する機構はこれまでに例がない。MKP1 及び MKP5 については TLR シグナルによってその発現が誘導されるため、IRF3 活性化の抑制は TLR-MyD88 シグナルに依存的であると考えられる。一方で、MKP3 については、そのような誘導は認められないため、MKP の活性化自体が TLR-MyD88 によって制御されている可能性が考えられる。MKPs がどのような活性化制御を受けるのか、その詳細の解明は今後の課題であると考えている。

PLA による解析から、MKPs による I 型 IFN 誘導の抑制は、IRF3 と TBK1 との結合が解離せず、長い時間維持されてしまい、IRF3 の活性化が減弱することによるものであると考えられた (図 1.13a.b)。脱リン酸化酵素活性を欠失させた MKP5 変異体を用いた解析から、MKPs による IRF3 の活性抑制には脱リン酸化が関与していることが示唆された (図 1.17)。自然免疫受容体下流のシグナルにおいて、IRF3 は複数のセリン/スレオニン残基がリン酸化を受けることが知られており、これらに対して MKPs による脱リン酸化がなされることで、IRF3 の立体構造が変化し、TBK1 と持続的に結合するのではないかと

考えられる。自然免疫受容体シグナルの活性化による IRF3 のリン酸化部位、さらには MKPs の標的リン酸化部位を明らかにすることで、今後、この機構の詳細を明らかにできるものと思われる。一方で、脱リン酸化酵素活性を欠失させた MKP5 変異体によっても、若干の IRF3 の活性化抑制が認められた。MKPs が IRF3 と結合することによって、TBK1 との解離を物理的に阻害している可能性も考えられる。MKPs、IRF3、TBK1、さらには他の分子が会合する可能性も含め、このような複合体の構成分子の同定と立体構造のシミュレーションを重ねていくことで MKPs による IRF3 の活性化抑制機構を明らかにできる可能性が考えられる。また、本研究での解析から、*Mkp1* 遺伝子欠損および *Mkp5* 遺伝子欠損細胞ではリステリア菌感染時の *Ifnb1* の遺伝子誘導に影響が認められなかった (図 1.18)。MKP1、3、5 の複数の MKPs がその抑制に関与しているため、一つの MKP を欠失させても、他の MKP が機能補完すると考えられるため、*Ifnb1* の遺伝子誘導に差が認められなかったものと考えられる。これら MKPs の発現を全て欠損させた条件下において検討する必要があるものと思われる。

本研究において、複数の自然免疫シグナル間の干渉による I 型 IFN 誘導の制御機構が存在することがはじめて明らかとなった。このような機構は、効率の良い感染防御に重要であるだけでなく、その異常制御によって自己免疫疾患の病態増悪にも関与してしまう可能性が考えられる。また、TLR を活性化するアジュバントを用いた場合、I 型 IFN の誘導が抑制されることが予想されるため、ウイルスの生ワクチンとアジュバントを併用した場合などは、I 型 IFN を介した抗ウイルス応答の低下によって、生ウイルスの増殖が増強される可能

性が危惧される。従って、本機構の詳細を解明することは、ワクチンやそれらの疾患の予防法原理の確立、病理の理解に役立つことが期待される。

IRF3をはじめ、自然免疫受容体シグナル下流でリン酸化による制御を受ける分子が多く知られている<sup>19-21</sup>。本研究におけるリン酸化プロテオームの網羅的解析から、 $\alpha$ -COP が IRF3 の活性化に関与する可能性が示唆された。実際、本研究の解析結果から $\alpha$ -COP は IRF3 と TBK1 に結合し、I 型 IFN の遺伝子誘導の活性化への関与を示す結果が得られた (図 2.4、図 2.8)。またこの時、TBK1 のリン酸化は抑制されず、むしろ亢進しており、一方で、IRF3 の活性化の指標である Ser396 のリン酸化に減弱が認められた (図 2.6)。細胞内輸送機構に関わる分子として知られている  $\alpha$ -COP が、どのように IRF3 の活性化の制御に関わっているのか、その機構の解明は興味深い課題である。 $\alpha$ -COP が細胞内のどのような場所で IRF3 や TBK1 と会合しているのか、その反応の場を明らかにすることは I 型 IFN 誘導に関連する複合体について情報を与えてくれることが期待される。

本研究から、 $\alpha$ -COP 遺伝子の発現をノックダウンした細胞では、コントロールの細胞と比較し、定常状態において TBK1 のリン酸化が亢進していることが分かった (図 2.6)。また、これらの細胞を刺激した際の TBK1 のリン酸化にも亢進が認められた (図 2.6)。 $\alpha$ -COP はゴルジ体から小胞体への逆行輸送に関与することが知られており、これまでの報告から、小胞輸送の阻害剤である BFA (Brefeldin A) を添加した際、小胞体ストレスが誘導され、STING を介して TBK1-IRF3 経路が活性化を受け、I 型 IFN が誘導されることが示されている



73。また、*Copa* の遺伝子ノックダウンした細胞において小胞体ストレスが生じることが報告されており<sup>74</sup>、さらに、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送に関わるタンパク群との結合ができない  $\alpha$ -COP の変異体が遺伝性自己免疫疾患の患者組織サンプルからの全エクソームシーケンスから見出されており、この変異体を発現させると逆行輸送が阻害され、小胞体ストレスが誘導されることも報告されている<sup>74</sup>。これらのことから、*Copa* の遺伝子ノックダウンさせた細胞においては小胞体ストレスが誘導されており、定常状態において TBK1 の活性化が亢進しているものと考えられる。一方で、このように定常状態での TBK1 の活性化の亢進が認められているにも関わらず、IRF3 の活性化、及び I 型 IFN の誘導は見られていない。このことは、 $\alpha$ -COP は IRF3 の活性化に重要であり、小胞体ストレスが起きている状態においても *Copa* の遺伝子発現が減弱している状況下においては、IRF3 の活性化がほとんど起きないため、結果として I 型 IFN の誘導が見られない、と解釈することができる。このように考えると、 $\alpha$ -COP は IRF3 の活性化に特異的に関与していることが強く示唆される。しかしながら、一方で小胞体ストレスは細胞死を誘導するなど、細胞の生命維持機構にも大きな影響を与えていることが知られており<sup>75-78</sup>、*Copa* の遺伝子ノックダウンにより小胞体ストレスが誘導され、細胞の基本的機能に支障をきたし、IRF3 の活性化及び I 型 IFN の遺伝子誘導にもその影響を及ぼしている可能性も否定はできていない。今後解析を進める際は、このような可能性も十分に加味し、結果の解釈を慎重に行い、解析する必要があると考えている。 $\alpha$ -COP が IRF3 の活性化にどのように場において、どのように関与しているのか、その機

構の詳細を明らかにすることは、自己免疫疾患の病理の理解にも繋がる可能性があると考えられるため、重要な課題であると考えている。

一方で、別の観点からは、 $\alpha$ -COP が IRF3 を活性化するメカニズムの詳細を解析していくことで、小胞輸送システムと免疫応答との連携など、細胞機能と免疫応答との間に新たな関連性が見出されることが期待される。また、 $\alpha$ -COP の例をきっかけとして、さらにリン酸化プロテオーム解析結果を生かしたスクリーニングを新たな視点で展開することで、自然免疫受容体シグナルによる I 型 IFN 誘導システムの包括的理解に繋がることを期待される。

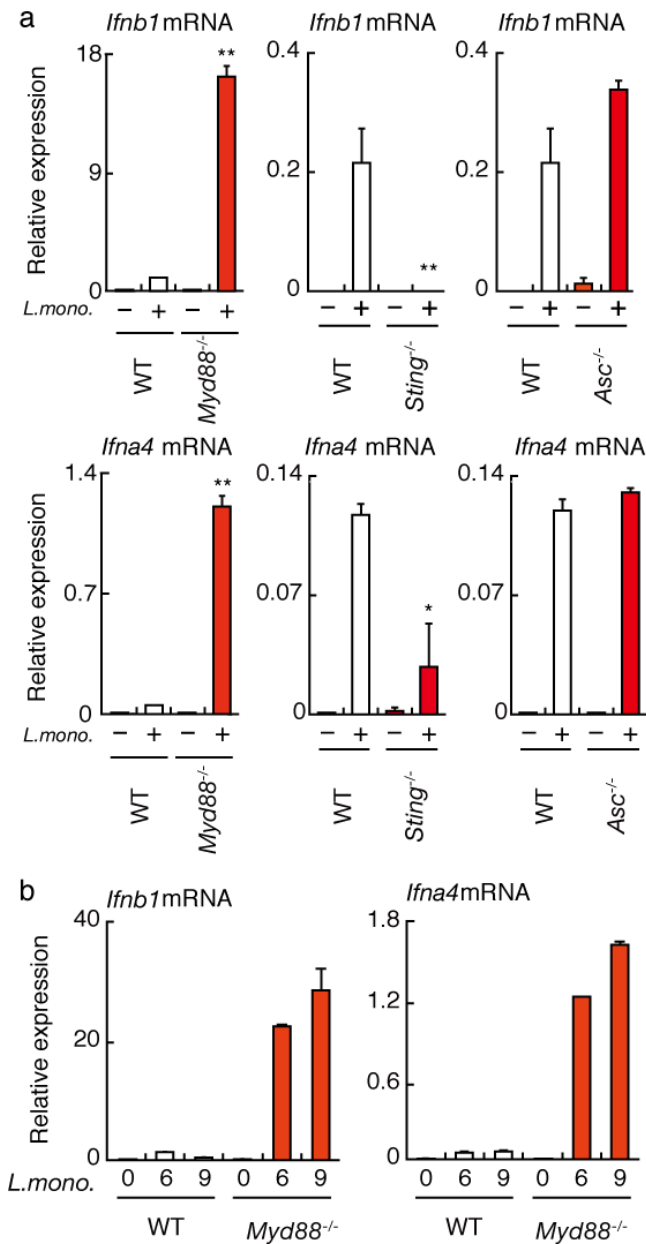


図 1.1 リステリア菌感染時の各種遺伝子欠損細胞での I 型 IFN 誘導

a. 野生型 (WT)、*Myd88* 遺伝子欠損 (*Myd88*<sup>-/-</sup>)、*Sting* 遺伝子欠損 (*Sting*<sup>-/-</sup>)、*Asc* 遺伝子欠損 (*Asc*<sup>-/-</sup>) マウス由来の腹腔マクロファージにリステリア菌を 1 moi (Multiplicity of Infection) で感染させ、6 時間後の I 型 IFN (*Ifnb1*、*Ifna4* 遺伝子) の mRNA の相対発現量 (Relative expression) を qRT-PCR で解析した。

b. 野生型 (WT)、*Myd88* 遺伝子欠損 (*Myd88*<sup>-/-</sup>) マウス由来の腹腔マクロファージにリステリア菌を 1 moi で感染させ、6、9 時間後の *Ifnb1*、*Ifna4* の mRNA を qRT-PCR で解析した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。  
\* : P<0.05、\*\* : P<0.01 で野生型細胞と比較して有意差があることを示す。

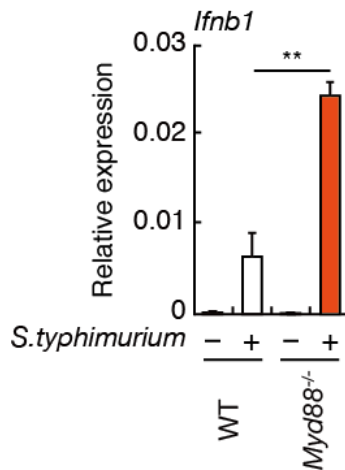


図 1.2 *Myd88* 遺伝子欠損マクロファージのサルモネラ感染時の I 型 IFN 誘導

野生型 (WT) もしくは *Myd88* 遺伝子欠損 (*Myd88*<sup>-/-</sup>) マウス由来の腹腔マクロファージにサルモネラ菌を 1 moi で感染させ、6 時間後の *Ifnb1* 遺伝子の mRNA の相対発現量を qRT-PCR で解析した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。\*\* :  $P < 0.01$  で野生型細胞と比較して有意差があることを示す。

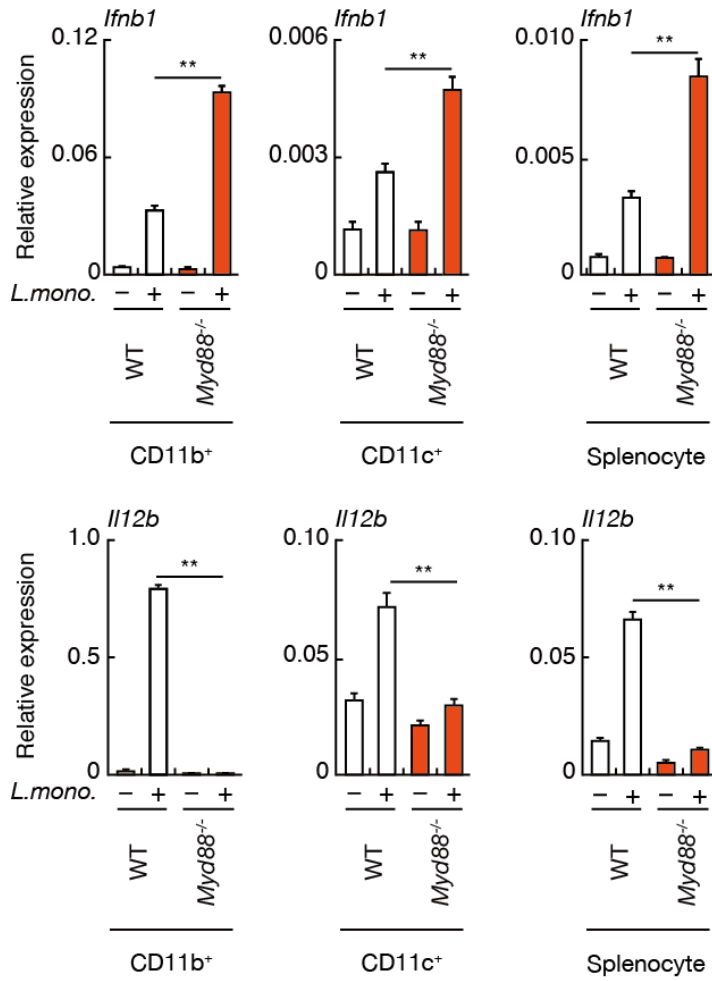


図 1.3 *Myd88* 遺伝子欠損細胞におけるリステリア感染時のサイトカイン誘導

野生型 (WT) もしくは *Myd88* 遺伝子欠損 (*Myd88*<sup>-/-</sup>) マウス由来の脾細胞から調製した CD11b 陽性細胞、CD11c 陽性細胞、および脾細胞にリステリア菌を 1 moi で感染させ、6 時間後の *Ifnb1*、*Il12b* 遺伝子の mRNA の相対発現量を qRT-PCR で解析した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$  で野生型細胞と比較して有意差があることを示す。

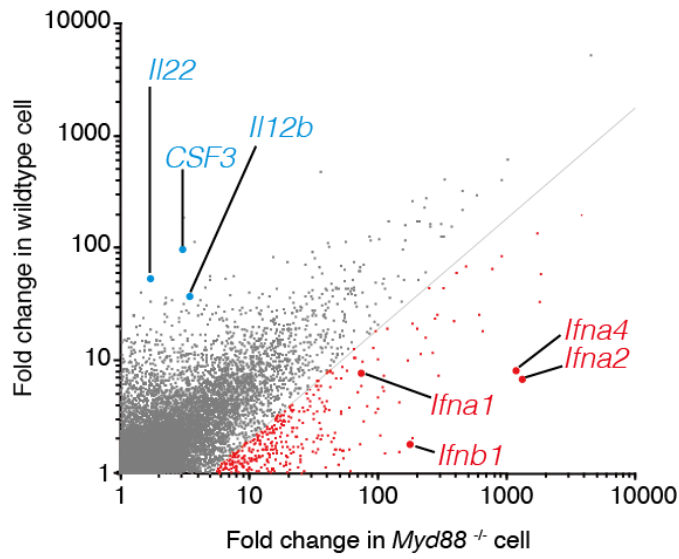


図 1.4 リステリア菌感染時のマイクロアレイによる mRNA の網羅的解析  
 野生型 (WT) もしくは *Myd88* 遺伝子欠損 (*Myd88*<sup>-/-</sup>) マウス由来の腹腔マクロファージにリステリア菌を 1 moi で感染させ、6 時間後の遺伝子発現パターンをマイクロアレイにて網羅的に解析した。図中の Fold change の値はそれぞれの無刺激時の発現レベルと比較したものである。

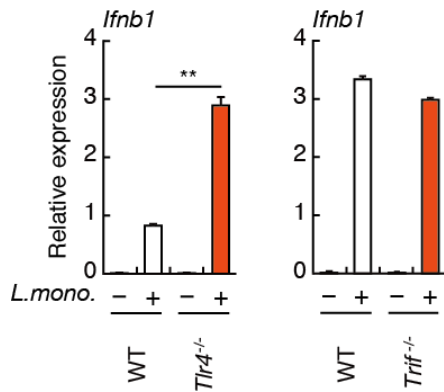


図 1.5 *Tlr4* 遺伝子欠損、*Trif* 遺伝子欠損マクロファージにおけるリステリア菌感染時の I 型 IFN 誘導

野生型 (WT)、*Tlr4* 遺伝子欠損 (*Tlr4*<sup>-/-</sup>) または *Trif* 遺伝子欠損 (*Trif*<sup>-/-</sup>) マウス由来の腹腔マクロファージにリステリア菌を 1 moi で感染させ、感染後 6 時間の *Ifnb1* 遺伝子の mRNA の相対発現量を qRT-PCR で解析した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。\*\* :  $P < 0.01$  で野生型細胞と比較して有意差があることを示す。

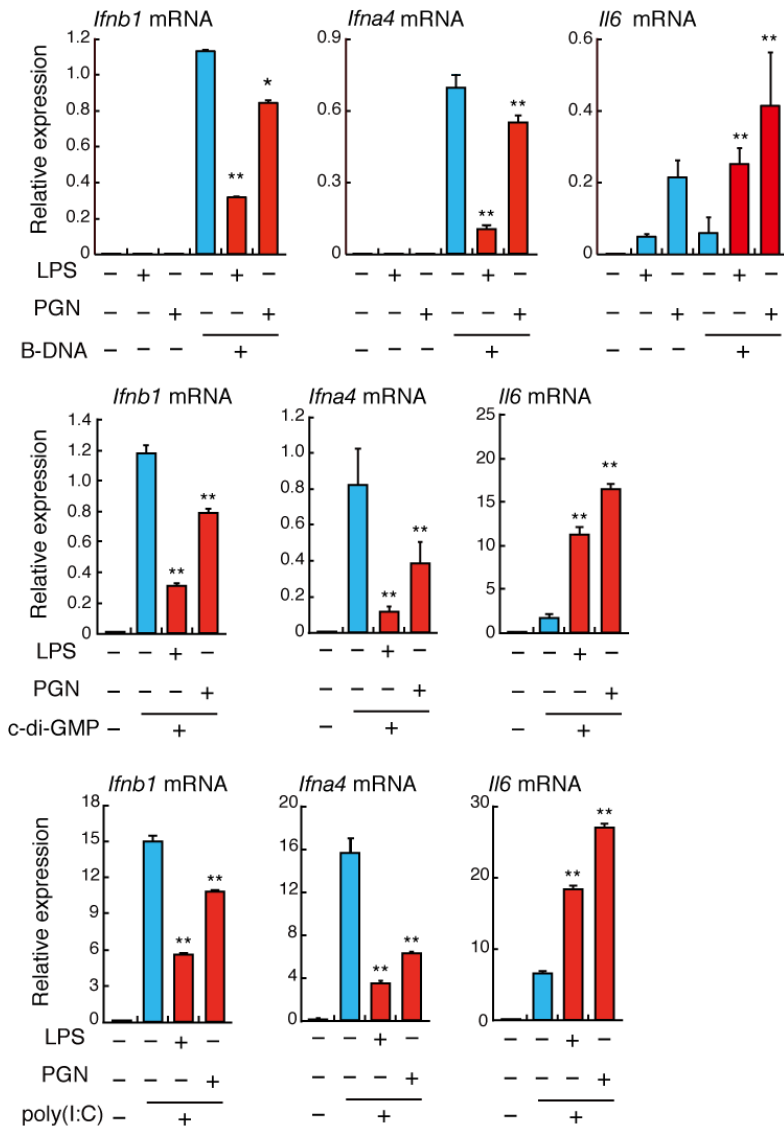


図 1.6 細胞質内核酸認識受容体刺激時の I 型 IFN 誘導における TLR シグナルの影響

野生型マウス由来の腹腔マクロファージを B-DNA (10 $\mu$ g/mL)、poly(I:C) (10 $\mu$ g/mL)、c-di-GMP (10 $\mu$ g/mL)、LPS (100ng/mL)、PGN (10 $\mu$ g/mL) で図中の通りに刺激を行い、6 時間後の *Ifnb1*、*Ifna4*、*Il6* 遺伝子の mRNA の相対発現量を qRT-PCR で解析した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。\*: $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$  で B-DNA、poly(I:C)、c-di-GMP 単独刺激と比較して有意差があることを示す。



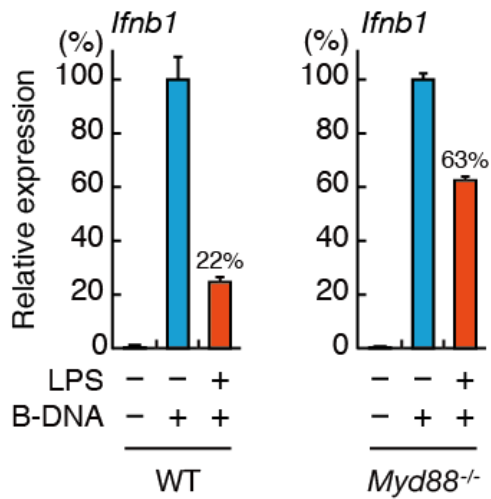
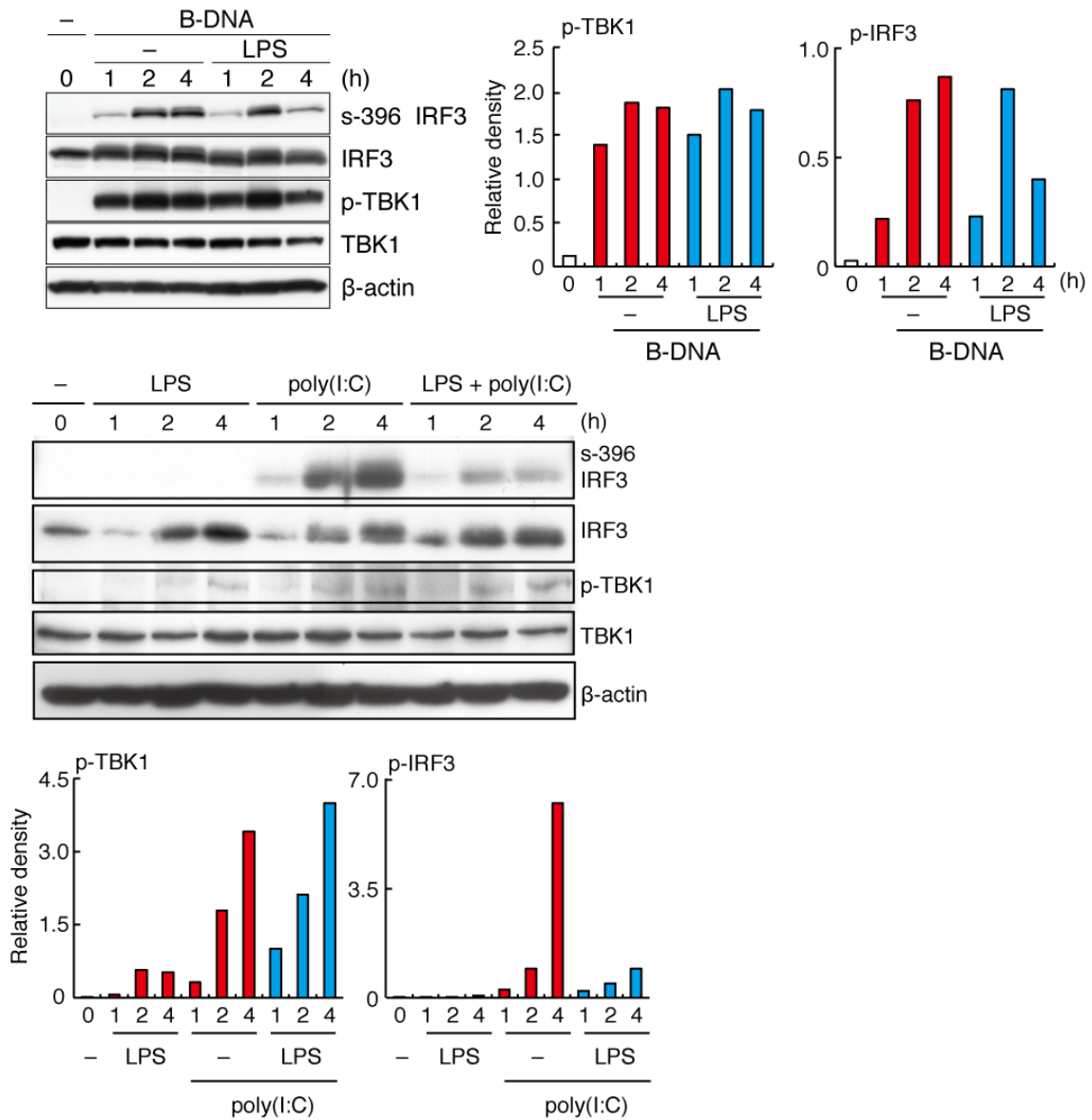


図 1.7 *Myd88* 遺伝子欠損マクロファージにおける TLR シグナルの I 型 IFN 誘導への関与

野生型 (WT) もしくは *Myd88* 遺伝子欠損 (*Myd88*<sup>-/-</sup>) マウス由来の腹腔マクロファージを B-DNA (10 $\mu$ g/mL) 単独または LPS (100ng/mL) と同時に刺激を行い、6 時間後の *Ifnb1* 遺伝子の mRNA の相対発現量を qRT-PCR で解析した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。



**図 1.8 TLR シグナルによる IRF3 及び TBK1 の活性化への影響**

野生型マウス由来の腹腔マクロファージに B-DNA (10 $\mu$ g/mL)、poly(I:C) (10 $\mu$ g/mL)、LPS (100ng/mL) を図中に示す通りに刺激を行った。刺激後 0、1、2、4 時間後のタンパクを回収し、免疫ブロッティングにより IRF3、TBK1 のリン酸化を検出した。グラフは p-IRF3、p-TBK1 の相対バンド強度を Image J により数値化したものを示す。

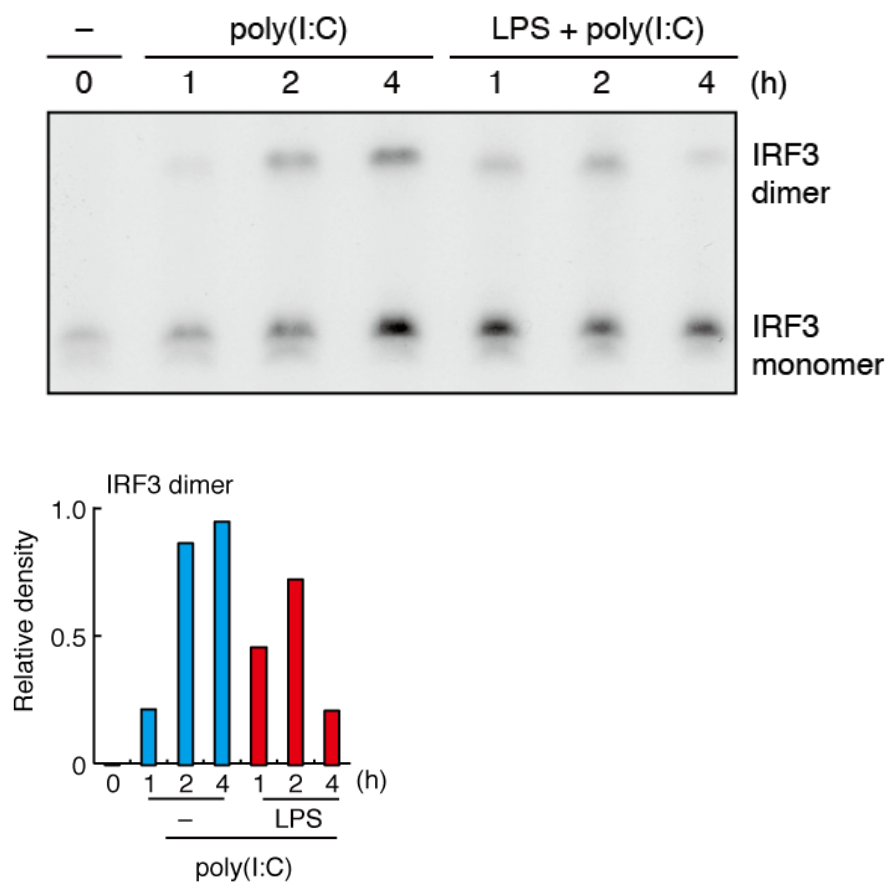
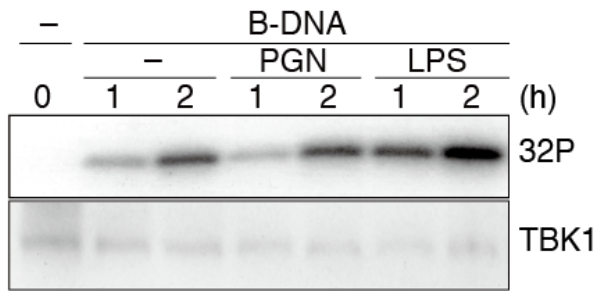


図 1.9 TLR シグナルによる IRF3 二量体形成の抑制

(上図) 野生型マウス由来の腹腔マクロファージに poly(I:C) (10 $\mu$ g/mL) 単独または LPS (100ng/mL) と同時に刺激を行い、刺激後 0、1、2、4 時間後のタンパクを回収し、native PAGE 法で IRF3 の二量体形成を検出した。(下図)IRF3 dimer の相対バンド強度を Image J により数値化したものを示す。



**図 1.10 TLR シグナルによる TBK1 活性化への影響**

野生型 マウス由来の腹腔マクロファージに B-DNA (10 $\mu$ g/mL) 単独または LPS (100ng/mL)、PGN (10 $\mu$ g/mL) と同時に刺激を行い、0、1、2 時間後のタンパクを回収した。その後、抗 TBK1 抗体で免疫沈降を行い、MBP (myelin basic protein) と  $^{32}$ P 標識 ATP を混合し *in vitro* kinase assay を行い、SDS-PAGE 法を行い MBP の  $^{32}$ P を検出した。

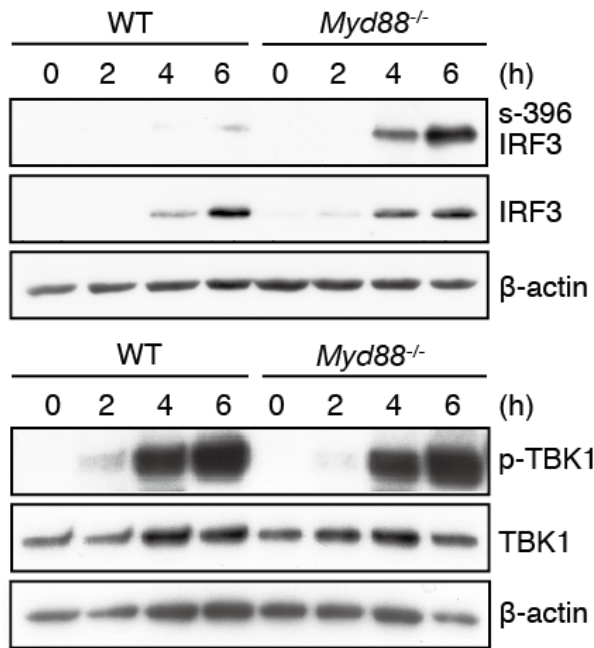


図 1.11 *Myd88* 遺伝子欠損マクロファージにおけるリステリア感染時の IRF3 の活性化

野生型 (WT) もしくは *Myd88* 遺伝子欠損 (*Myd88*<sup>-/-</sup>) マウス由来の腹腔マクロファージにリステリア菌を 1 moi で感染させ、0、2、4、6 時間後のタンパクを回収し、免疫ブロッティングにより IRF3、TBK1 のリン酸化を検出した。

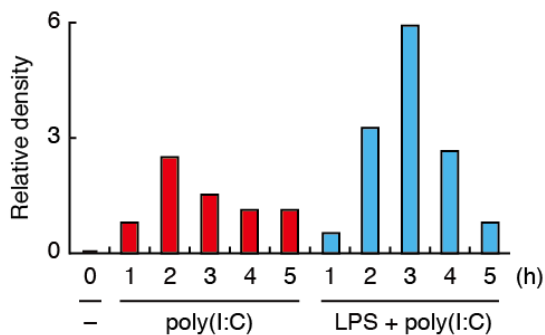
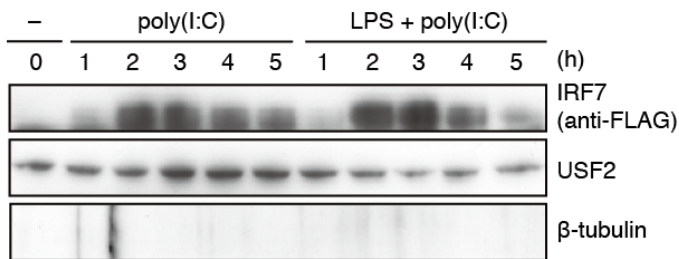


図 1.12 TLR シグナルによる IRF7 活性化への影響

(上図) FLAG-IRF7 をレトロウイルスで発現させた RAW264.7 細胞に poly(I:C) (10 $\mu$ g/mL) 単独または LPS (100ng/mL) と同時に刺激を行った。刺激後 0、1、2、3、4、5 時間後の核分画のタンパクを回収し、FLAG-IRF7 の核移行を免疫ブロッティングで検討した。(下図) 上図の IRF7 の相対バンド強度を Image J により数値化したものを示す。

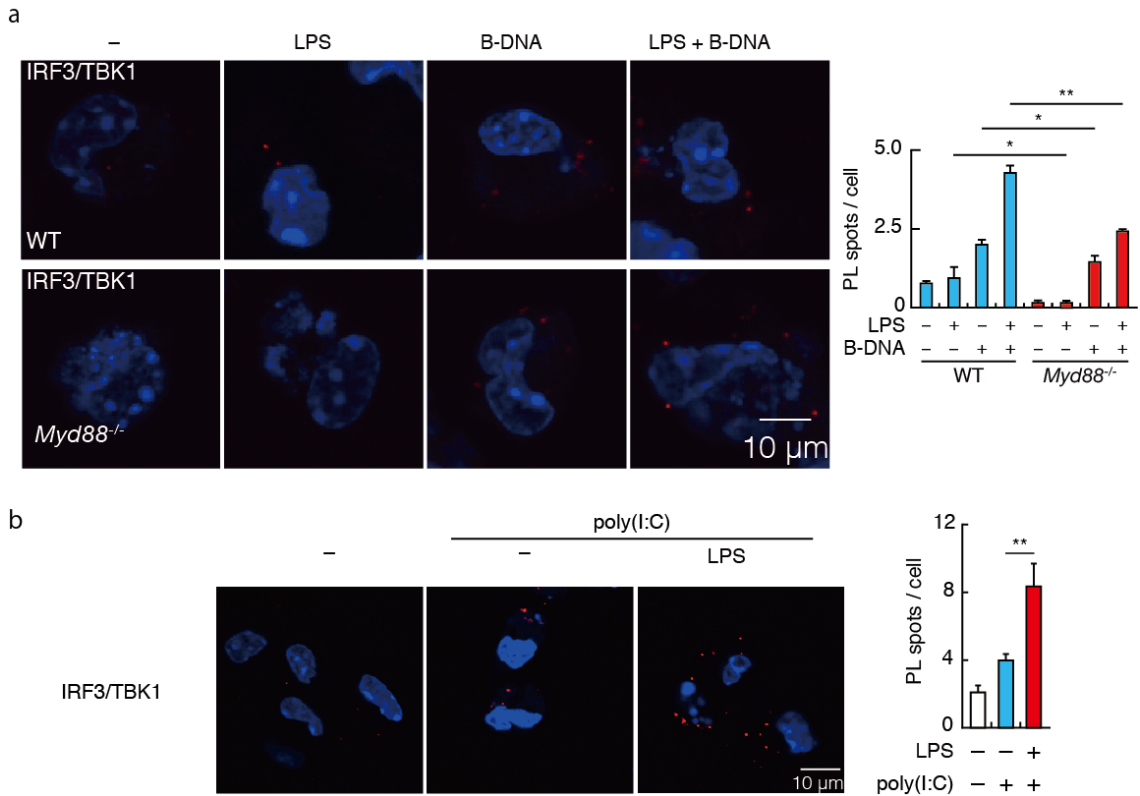


図 1.13 TLR シグナルによる IRF3 と TBK1 の結合への影響

a. (左図) 野生型 (WT) もしくは *Myd88* 遺伝子欠損 (*Myd88*<sup>-/-</sup>) マウス由来の腹腔マクロファージに B-DNA (10μg/mL) 単独または LPS (100ng/mL) と同時に刺激を行った。刺激 5 時間後の IRF3 と TBK1 の結合を PLA で検出した。赤色のスポット (PL(+)スポット) は IRF3 と TBK1 の複合体形成を示す。核 (青色) は DAPI で染色した。(右図) 細胞内の PL(+)スポット数を計測し定量した。b. (左図) 野生型マウス由来の腹腔マクロファージに poly(I:C) (10μg/mL) 単独または LPS (100ng/mL) と同時に刺激を行った。刺激 5 時間後の IRF3 と TBK1 の結合を PLA で検出した。赤色のスポット (PL(+)スポット) は IRF3 と TBK1 の複合体形成を示す。核 (青色) は DAPI で染色した。(右図) 細胞内の PL(+)スポット数を計測し定量した。データは平均値と標準偏差 (n = 6) を表す。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$  で有意差があることを示す。

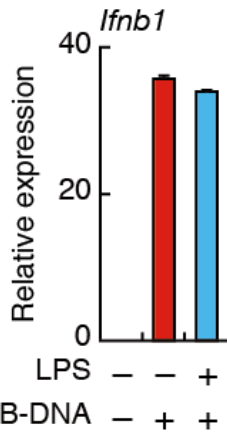
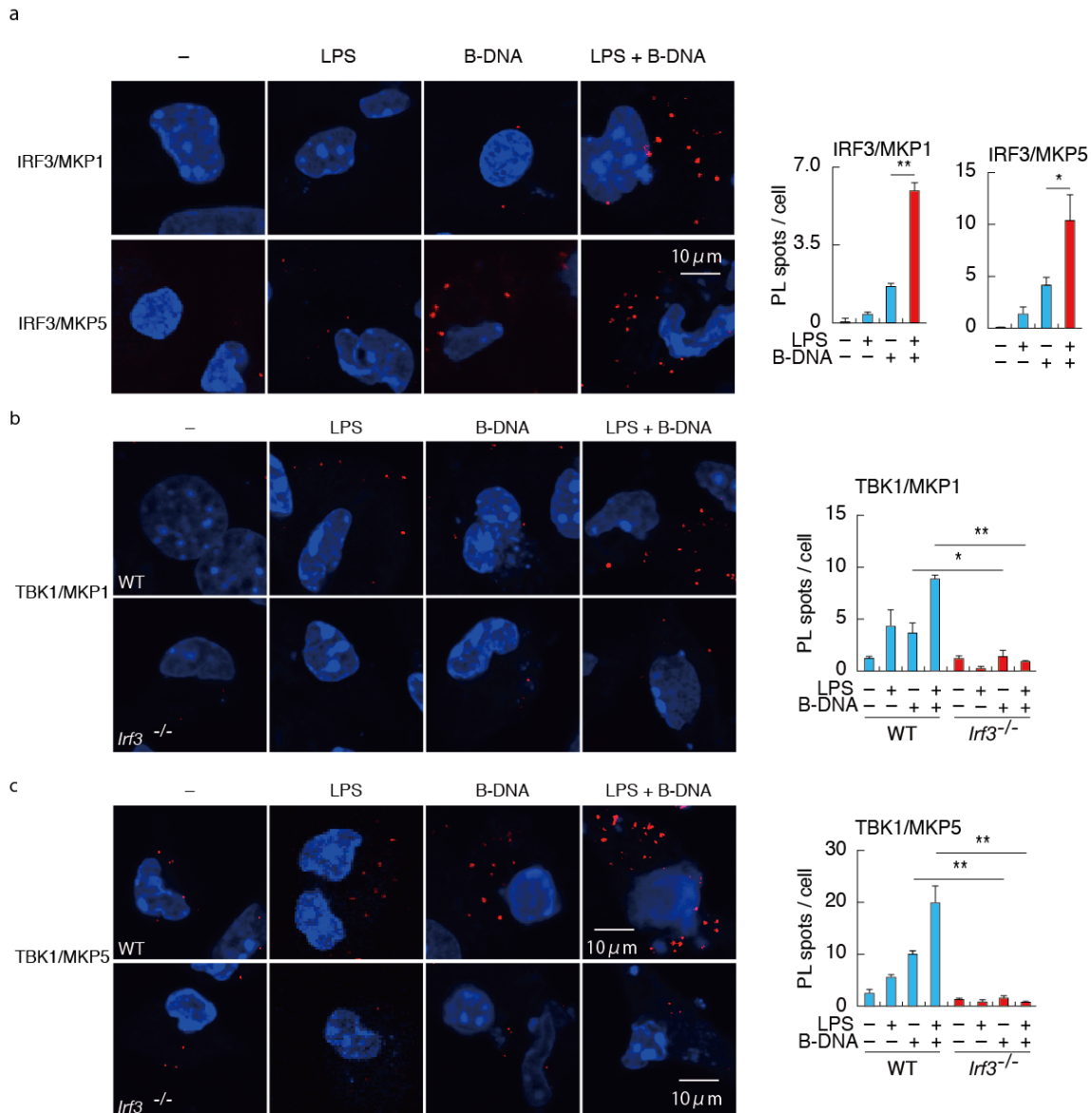


図 1.14 脱リン酸化酵素阻害剤の TLR シグナルによる I 型 IFN 誘導抑制への影響

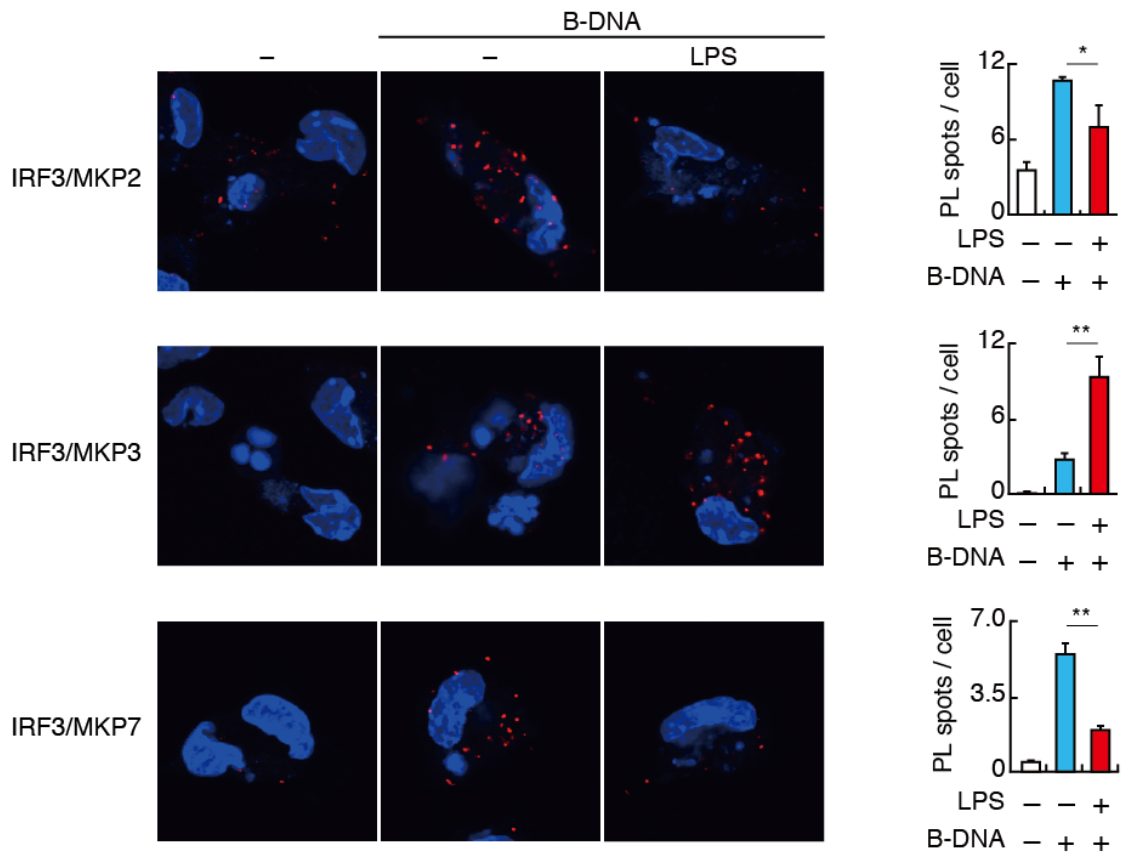
野生型マウス由来の腹腔マクロファージにフッ化ナトリウムを添加し、B-DNA (10 $\mu$ g/mL) 単独または LPS (100ng/mL) と同時に刺激を行い、6 時間後の *Ifnb1* 遺伝子の mRNA の相対発現量を qRT-PCR で解析した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。





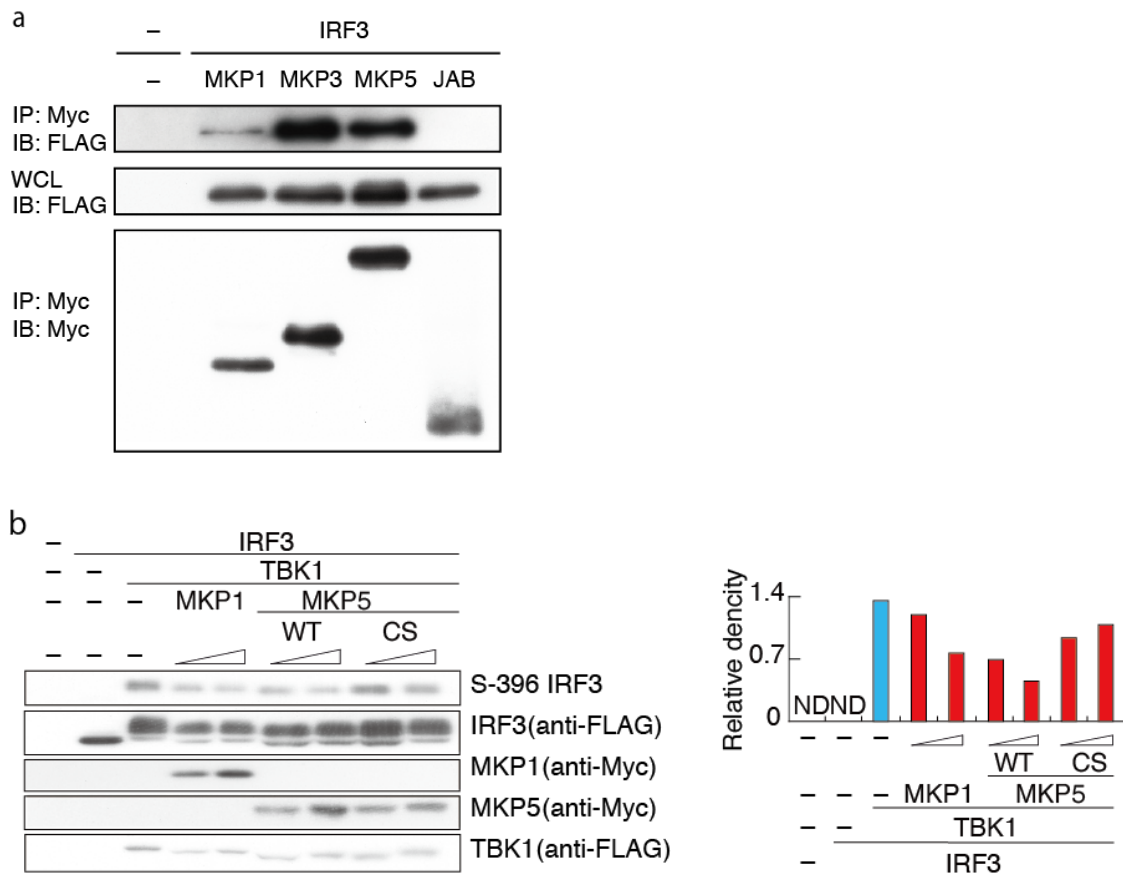
**図 1.15 LPS、B-DNA、または共刺激時の IRF3、TBK1 と MKPs との結合の解析**

a. (左図) 野生型マウス由来の腹腔マクロファージに B-DNA (10 $\mu$ g/mL)、LPS (100ng/mL) を単独、または同時に刺激を行った。刺激 5 時間後の IRF3 と MKP1、IRF3 と MKP5 の結合を PLA で検出した。赤色のスポット (PL(+)) は図中のタンパク同士の複合体形成を示す。核 (青色) は DAPI で染色した。(右図) 細胞内の PL(+)スポット数を計測し定量した。b c. (左図) 野生型マウス及び *Irf3* 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージに B-DNA (10 $\mu$ g/mL)、LPS (100ng/mL) を単独、または同時に刺激を行った。刺激 5 時間後の b.TBK1 と MKP1、c.TBK1 と MKP5 の結合を PLA で検出した。赤色のスポット (PL(+)) は図中のタンパク同士の複合体形成を示す。核 (青色) は DAPI で染色した。(右図) 細胞内の PL(+)スポット数を計測し定量した。データは平均値と標準偏差 (n = 6) を表す。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$  で有意差があることを示す。



**図 1.16 B-DNA、または LPS との同時刺激による IRF3 と MKPs の結合への影響**

(左図) 野生型マウス由来の腹腔マクロファージに B-DNA (10 $\mu$ g/mL)、LPS (100ng/mL) を単独、または同時に刺激を行った。刺激 5 時間後の IRF3 と MKP2、MKP3、MKP7 の結合を PLA で検出した。赤色のスポット (PL(+)) スポット) は図中のタンパク同士のコプレキス形成を示す。核 (青色) は DAPI で染色した。(右図) 細胞内の PL(+) スポット数を計測し定量した。データは平均値と標準偏差 (n = 6) を表す。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$  で有意差があることを示す。



**図 1.17 IRF3 の活性化に対する MKPs の影響**

a. HEK293T 細胞に FLAG-IRF3 と Myc-MKP1、Myc-MKP3、Myc-MKP5 を共発現させ、抗 Myc 抗体で免疫沈降を行い、免疫ブロッティングで IRF3 (FLAG) を検出した。b. (左図) HEK 293T 細胞に TBK1、IRF3 と MKP1、MKP5(WT)、MKP5(CS)の共発現を行い、IRF3 のリン酸化を免疫ブロッティングで検出した。(右図) IRF3 のリン酸化の相対バンド強度を Image J により数値化したものを示す。ND : not detected.

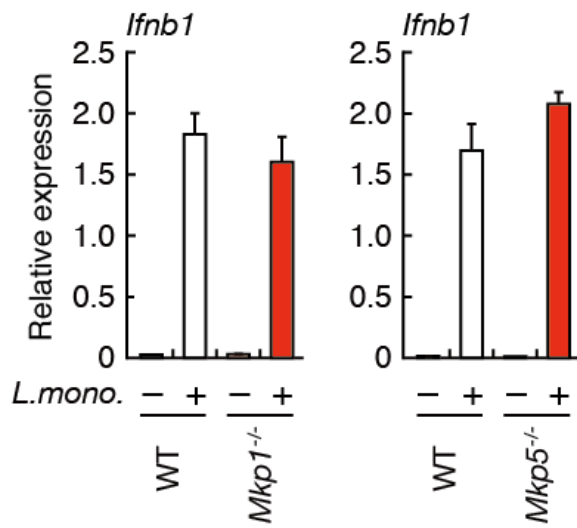


図 1.18 *Mkp1* 遺伝子欠損細胞、*Mkp5* 遺伝子欠損細胞のリステリア菌感染時の I 型 IFN 誘導

野生型 (WT) もしくは *Mkp1* 遺伝子欠損細胞 (*Mkp1*<sup>-/-</sup>)、*Mkp5* 遺伝子欠損細胞 (*Mkp5*<sup>-/-</sup>) マウス由来の腹腔マクロファージにリステリア菌を 1 moi で感染をさせ、6 時間の *Ifnb1* 遺伝子の mRNA の相対発現量を qRT-PCR で解析した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。

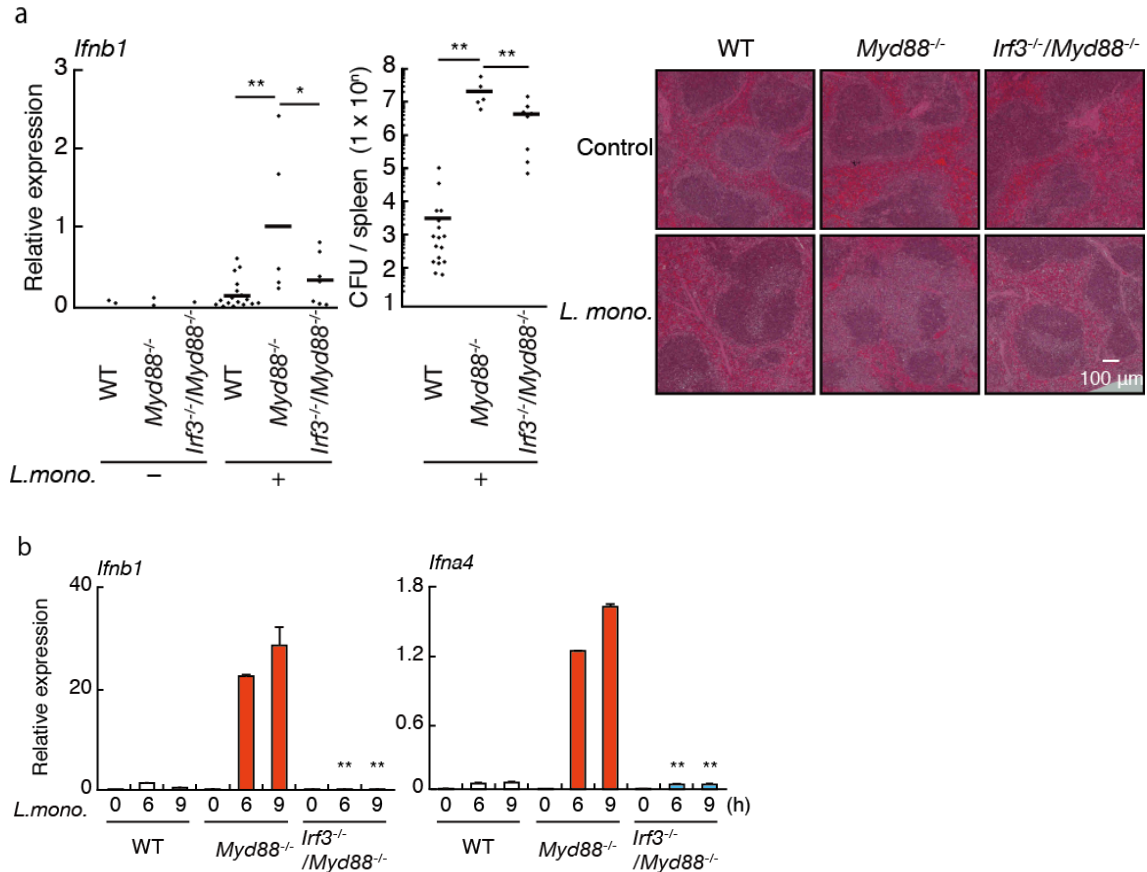


図 1. 19 *Myd88* 遺伝子欠損マウス、*Myd88/Irf3* 遺伝子欠損マウスにおけるリステリア菌感染の検討

a.野生型 (WT) マウス (無感染 : n=2、感染 : n=17) *Myd88* 遺伝子欠損 (*Myd88*<sup>-/-</sup>) マウス (無感染 : n=2、感染 : n=5)、もしくは *Irf3/Myd88* 遺伝子欠損 (*Irf3*<sup>-/-</sup>/*Myd88*<sup>-/-</sup>) マウス (無感染 : n=2、感染 : n=7) にリステリア菌を ( $10^5$  cfu) 感染させ、2.5 日後の脾臓の *Ifnb1* 遺伝子の mRNA の相対発現量を qRT-PCR で解析した (左図)。脾臓中のリステリア菌の力価を測定した (中図)。脾臓の組織切片を作成し、HE 染色を行った (右図)。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$  で有意差があることを示す。b.野生型マウス、*Myd88* 遺伝子欠損マウス、もしくは *Myd88/Irf3* 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージにリステリア菌を 1 MOI で感染を行い、感染後 6 時間の *Ifnb1* 遺伝子の mRNA の相対発現量を qRT-PCR で解析した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$  で *Myd88* 遺伝子欠損細胞と比較し有意差があることを示す。

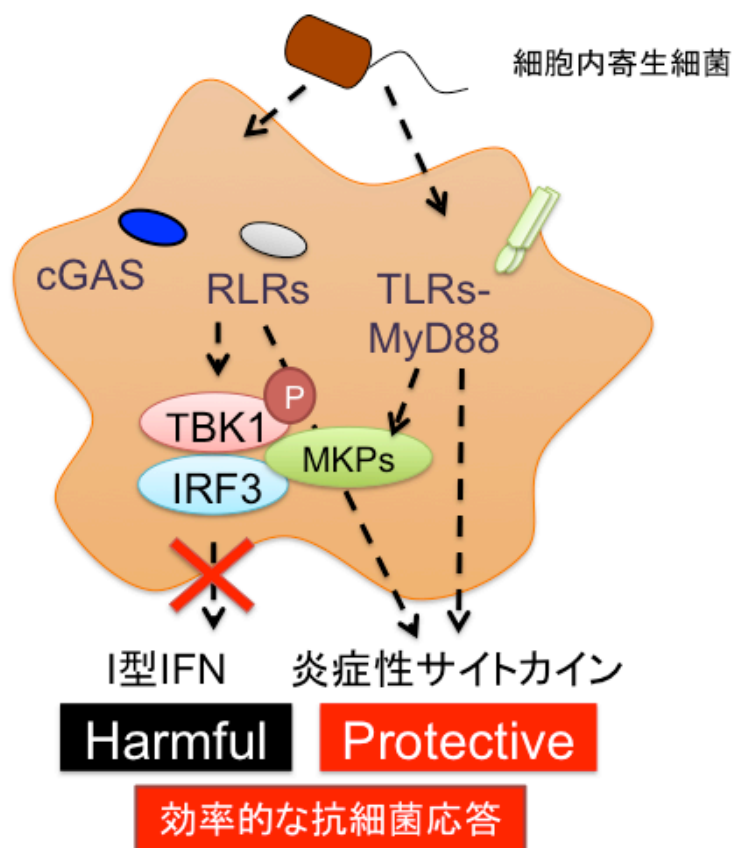
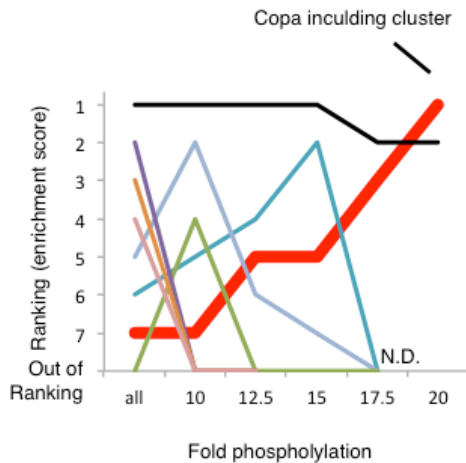


図 1.20 研究まとめ図

細菌感染時活性化した TLRs は cGAS、RLRs などの他のパターン認識受容体と協調して IL-6 を始めとする炎症性サイトカインの産生など生体に **Protective** に働くとともに、MyD88 を介して細胞質内核酸認識受容体による I 型 IFN の遺伝子誘導を TBK1-IRF3-MKPs の複合体形成を促進することで IRF3 のリン酸化を特異的に抑制している可能性が示唆された。誘導される免疫応答の生体に不利益に働く免疫応答を抑制することで、効率的に抗細菌応答を行っていると考えられる。

a



b

Gene Name	fold phosphorylation
coatomer protein complex subunit alpha (Copa)	20.43206
component of oligomeric golgi complex 1 (Cog1)	23.21726
nuclear pore membrane protein 121 (Pom121)	23.80301
predicted gene 5884 (Tom1)	39.84888

図 2.1 活性化マクロファージにおけるリン酸化タンパクの網羅的解析

a.野生型マウス由来の腹腔マクロファージを LPS(100ng/mL)で刺激を行い、15min 後のリン酸化タンパクを iron immobilized metal ion affinity chromatography (Fe-IMAC) カラムで回収し、iTRAQ 法をもちいて質量分析計でリン酸化タンパクの相対変化量を検出した。DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery : <https://david.ncifcrf.gov>) を用いて、Gene Ontology Enrichment 解析を行い、検出された全リン酸化タンパク、及び定常時と比較し、LPS 刺激でリン酸化強度が 10、12.5、15、17.5、20 倍以上をそれぞれ対象とし Gene Ontology Enrichment 解析を行い、形成されるクラスターの Enrichment Score の順位の推移を示した。N.D.はクラスター形成がされなかったことを示す。b.定常状態と比較し 20 倍以上のリン酸化強度を示すタンパクを Gene Ontology Enrichment 解析を行い、最上位のクラスターに含まれるタンパクとリン酸化強度を示す。

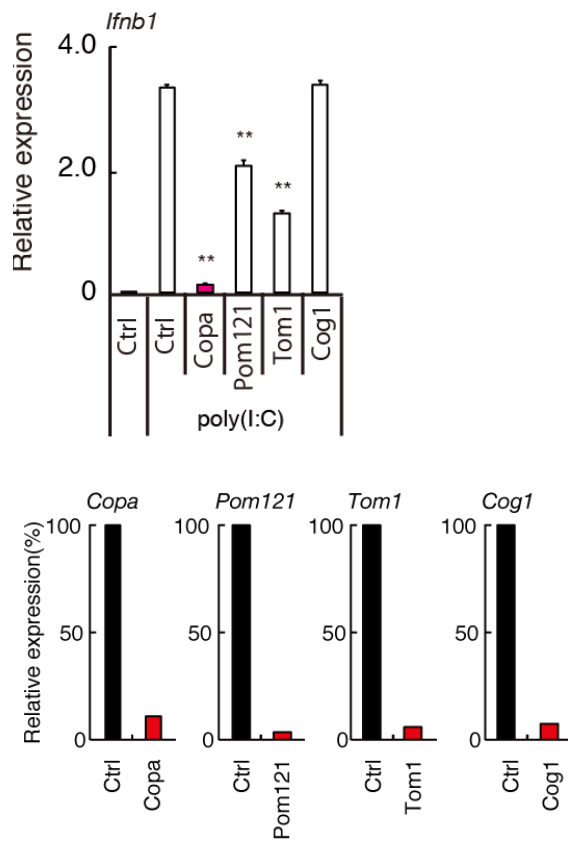


図 2.2 同定分子の遺伝子ノックダウン細胞における I 型 IFN 誘導への影響

(上図) 野生型 MEF にコントロール siRNA(Ctrl Si)または *Copa*、*Cog1*、*Pom121*、*Tom1* を標的とした siRNA を用いて遺伝子ノックダウンを行い、その後 poly(I:C) (10 $\mu$ g/mL) で刺激を行い、6 時間後の *Ifnb1* の遺伝子誘導を qRT-PCR で解析した。(下図) Ctrl siRNA を用いた細胞と比較した *Copa*、*Cog1*、*Pom121*、*Tom1* の遺伝子誘導を qRT-PCR で解析した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。\*\* :  $P < 0.01$  でコントロール細胞と比較し有意差があることを示す。



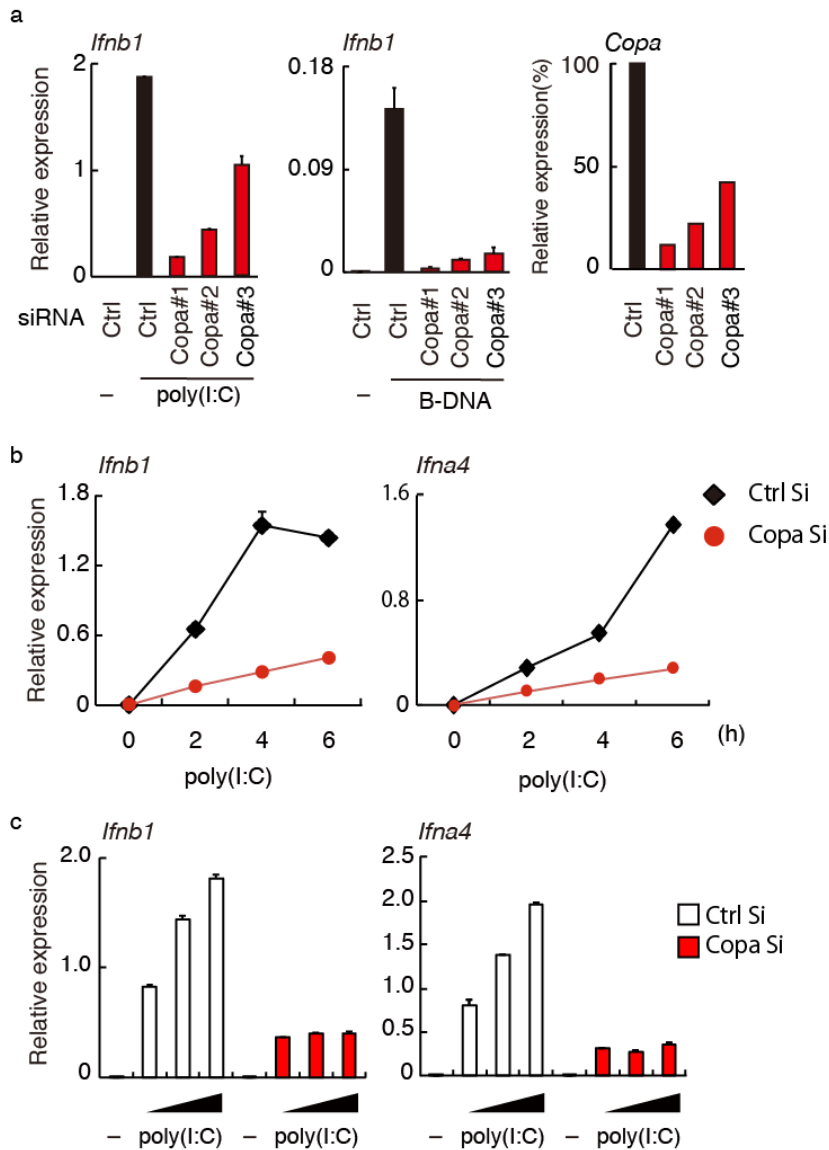


図 2.3 *Copa* 遺伝子ノックダウン細胞における I 型 IFN 誘導

a. 野生型 MEF にコントロール siRNA(Ctrl)または *Copa* を標的とした siRNA(Copa#1、Copa#2、Copa#3)を用いて遺伝子ノックダウンを行い、poly(I:C) (10 $\mu$ g/mL) または B-DNA (10 $\mu$ g/mL) で刺激を行い、3 時間後の *Ifnb1* の mRNA の相対発現量を qRT-PCR で解析した。b. 野生型 MEF にコントロール siRNA(Ctrl Si)または *Copa* を標的とした siRNA(Copa Si)を用いて遺伝子ノックダウンを行い、その後 poly(I:C) (10 $\mu$ g/mL) で刺激を行い 2、4、6 時間後の *Ifnb1*、*Ifna4* 遺伝子の mRNA の相対発現量を qRT-PCR で解析した。c. 野生型 MEF にコントロール siRNA(Ctrl Si)または *Copa* を標的とした siRNA(Copa Si)を用いて遺伝子ノックダウンを行い、その後 poly(I:C) (3、10、30 $\mu$ g/mL) で刺激を行い、6 時間後の mRNA の相対発現量を qRT-PCR で解析した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。

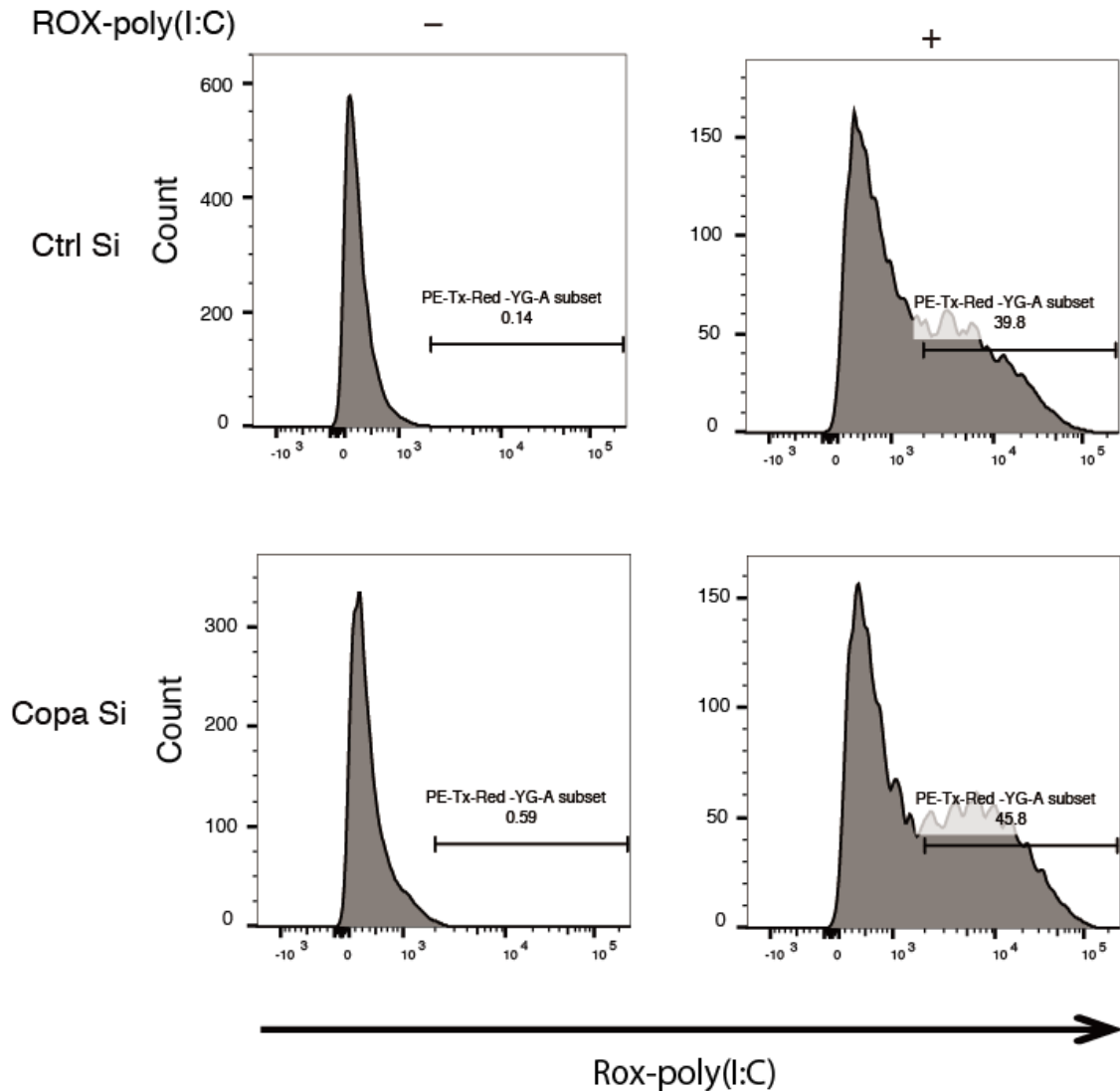


図 2.4 *Copa* 遺伝子ノックダウン細胞における核酸の取込み効率の解析  
 野生型 MEF にコントロール siRNA(Ctrl Si)または *Copa* を標的とした siRNA(Copa Si)を用いて遺伝子ノックダウンを行い、Rhodamine 標識 poly(I:C) (Rox-poly(I:C)) を  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  で刺激を行い、4 時間後の Rox-poly(I:C)由来の蛍光を、フローサイトメトリーにて検出した。Rox-poly(I:C)由来蛍光の蛍光強度を横軸とし、細胞数をヒストグラムで示した。各パネル中の数値は、Rox-poly(I:C)陽性細胞の全体に占める割合を示す。

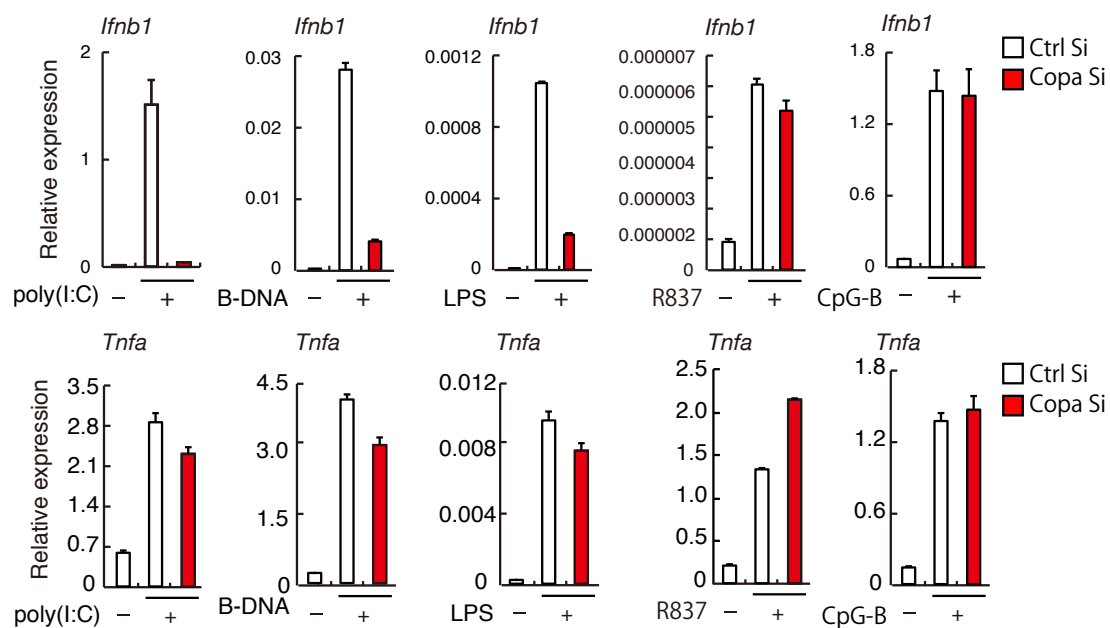
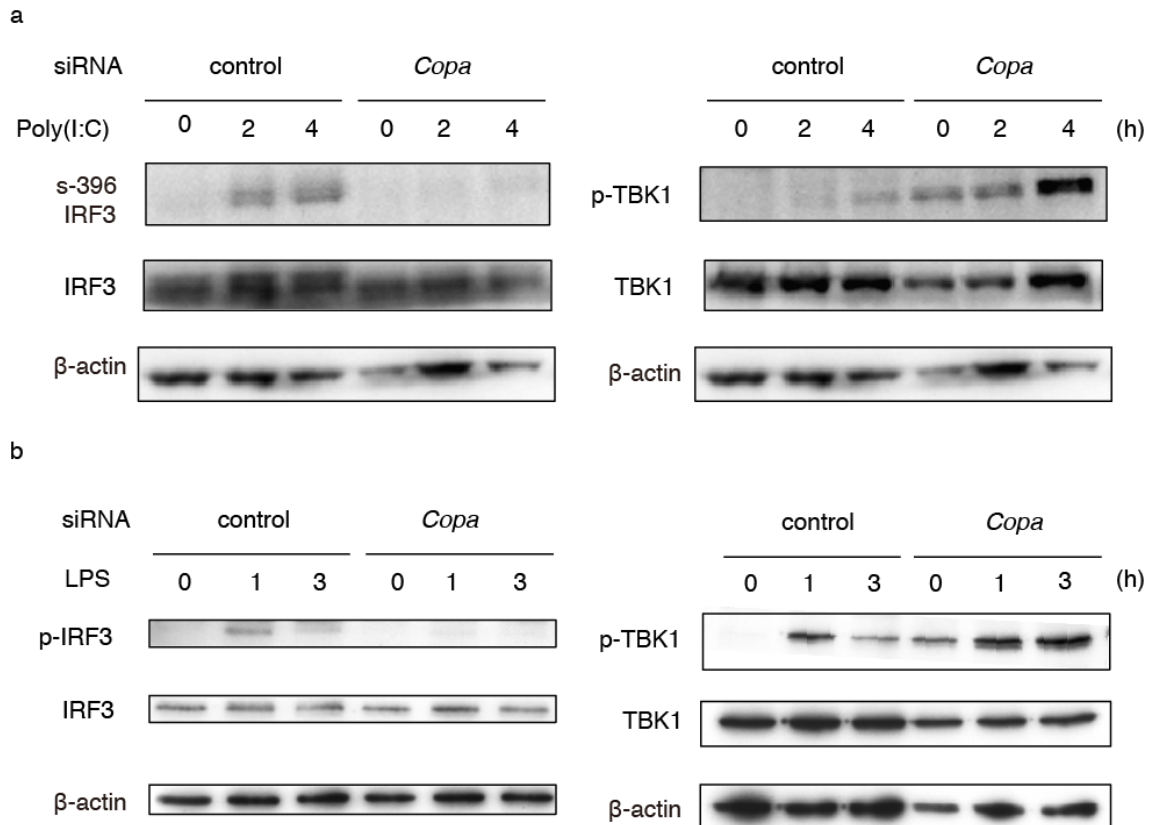


図 2.5 *Copa* 遺伝子ノックダウン細胞における poly(I:C)、B-DNA、LPS、R837、CpG-B ODN 刺激時の I 型 IFN 誘導への影響

RAW264.7 細胞にコントロール siRNA(Ctrl Si)または *Copa* を標的とした siRNA(Copa Si)を用いて遺伝子ノックダウンを行い、その後 B-DNA (10 $\mu$ g/mL)、poly(I:C) (10 $\mu$ g/mL)、LPS (100ng/mL)、R837 (10 $\mu$ g/mL)、CpG-B ODN (3 $\mu$ M) で刺激を行い 6 時間後の *Ifnb1*、*Tnfa* 遺伝子の mRNA の相対発現量を qRT-PCR で解析した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。



**図 2.6 *Copa* 遺伝子ノックダウン細胞における IRF3、TBK1 の活性化**

a. RAW264.7 細胞にコントロール siRNA (control) または *Copa* を標的とした siRNA (*Copa*) を用いて遺伝子ノックダウンを行い、その後 poly(I:C) (10 $\mu$ g/mL) で刺激を行い、0、2、4 時間後のタンパクを回収し、免疫ブロッティングにより IRF3、TBK1 のリン酸化を検出した。b. Raw246.7 細胞にコントロール siRNA (control) または *Copa* を標的とした siRNA (*Copa*) を用いて遺伝子ノックダウンを行い、その後 LPS (100ng/mL) で刺激を行い、0、1、3 時間後のタンパクを回収し、免疫ブロッティングにより IRF3、TBK1 のリン酸化を検出した。

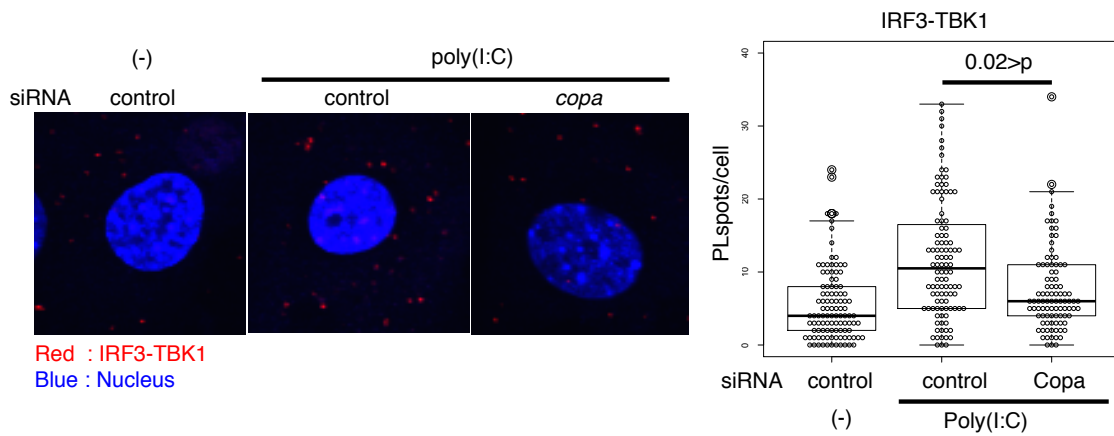


図 2.7 *Copa* 遺伝子ノックダウン細胞における IRF3 と TBK1 の結合

(左図) 野生型 MEF にコントロール siRNA (control) または *Copa* を標的とした siRNA (*Copa*) を用いて遺伝子ノックダウンを行い、その後 poly(I:C) (10 $\mu$ g/mL) で刺激を行い、4 時間後の IRF3 と TBK1 の結合を PLA で検出した。赤色のスポットは IRF3 と TBK1 の複合体形成を示す。核 (青色) は DAPI で染色した。(右図) 細胞内の PL(+)スポット数を計測し定量した。

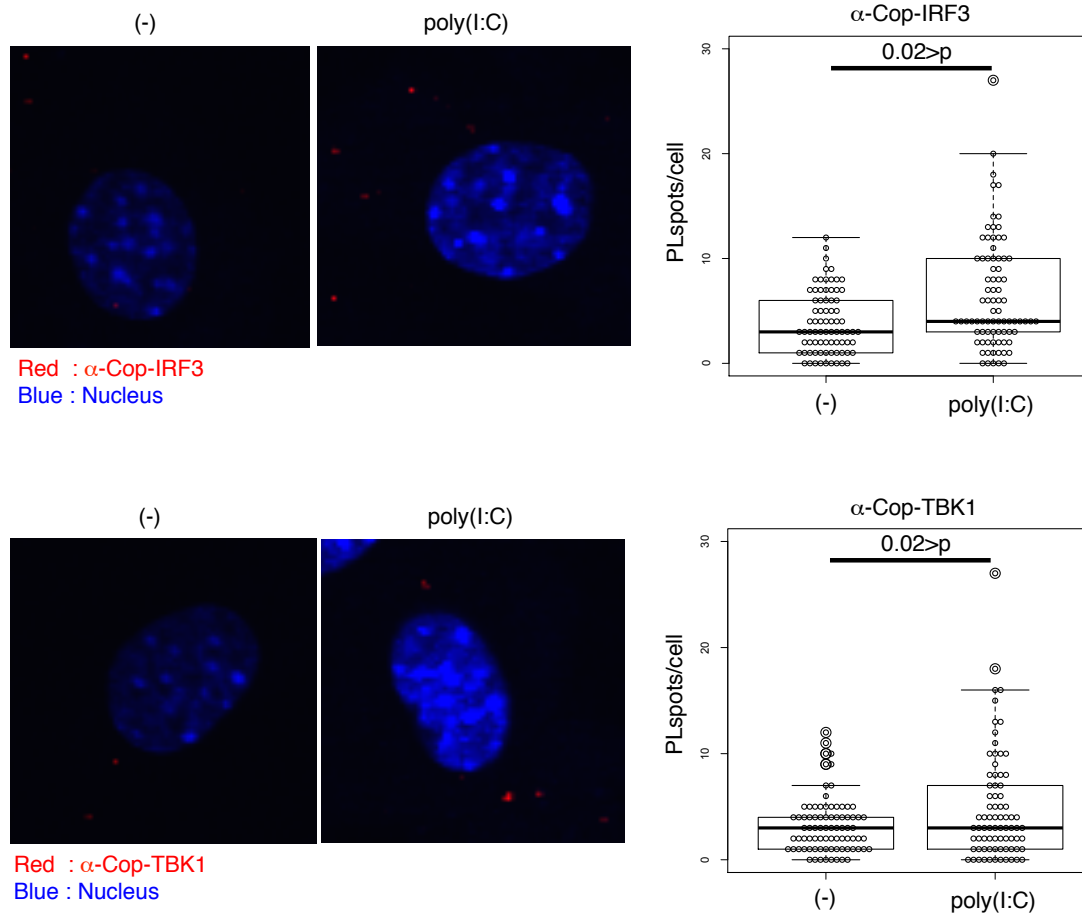


図 2.8 poly(I:C)刺激による  $\alpha$ -COP と IRF3、TBK1 の結合

(左図) 野生型 MEF に poly(I:C) (10 $\mu$ g/mL) で刺激を行い、4 時間後の  $\alpha$ -COP と IRF3、 $\alpha$ -COP と TBK1 の結合を PLA で検出した。赤色のスポットは図中のタンパク同士の複合体形成を示す。核 (青色) は DAPI で染色した。(右図) 細胞内の PL(+)スポット数を計測し定量した。

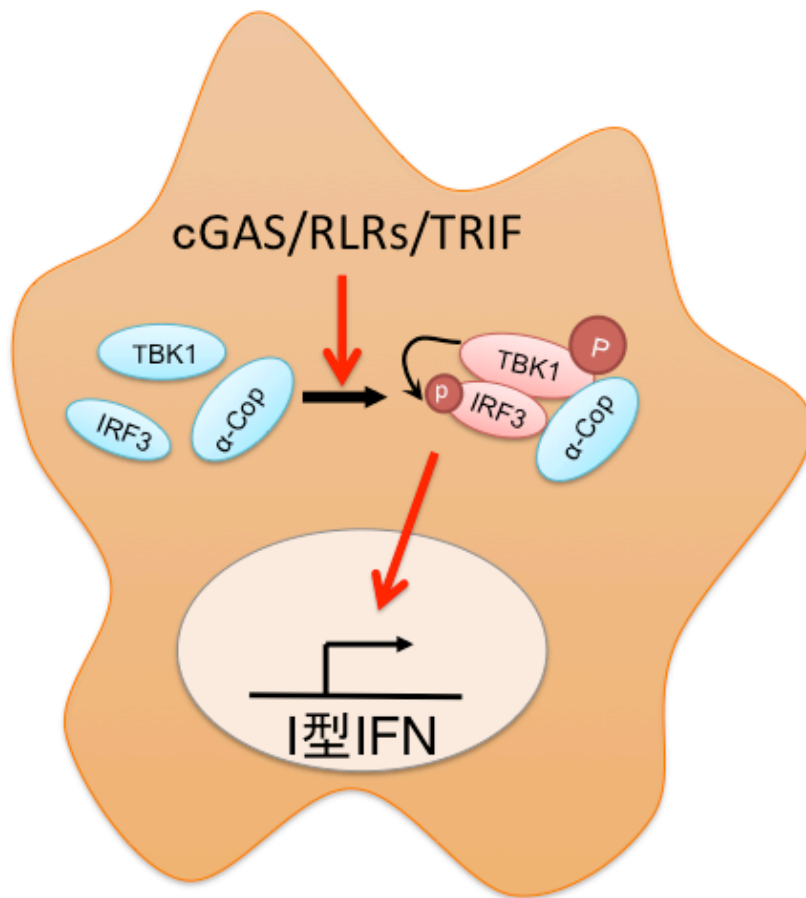


図 2.9 研究まとめ図

本研究によって I 型 IFN の誘導に関与する分子として  $\alpha$ -COP を同定した。 $\alpha$ -COP は刺激依存的に TBK1、IRF3 と結合し、TBK1、IRF3 の結合を促進させることで I 型 IFN の遺伝子誘導を正に制御している可能性が示唆された。

## 材料・方法

### 【培地】

#### ・ DMEM 培地

9.5g のダルベッコ変法イーグル培地を 1L の DDW (deionized distilled water) で溶解し、オートクレーブで 121°C、15min 滅菌処理を行い、最終濃度 0.12% 炭酸水素ナトリウム、4mM L-グルタミン (和光純薬)、非働化処理を行った 10% ウシ胎児血清 (fetal calf serum: FCS、HyClone) をシリンジフィルター (孔径 0.2  $\mu\text{m}$ , Corning) を通し加えた。

#### ・ RPMI 培地

RPMI medium 1640 (ナカライテスク) に終濃度 100 $\mu\text{M}$  非必須アミノ酸溶液 (ナカライテスク)、100 $\mu\text{M}$  ピルビン酸ナトリウム溶液 (ナカライテスク)、50 $\mu\text{M}$  2-メルカプトエタノール (ナカライテスク)、10% FCS をシリンジフィルター (孔径 0.2  $\mu\text{m}$ , Corning) を通した後に加えた。

#### ・ PFE

PBS pH 7.2 (ナカライテスク) に 1mM EDTA (GIBCO) 及び 2% FCS をシリンジフィルター (孔径 0.2  $\mu\text{m}$ , Corning) を通して加えた。

### 【マウス】



本研究で使用した野生型の C57BL/6J マウスは日本クレアより購入した。*Irf3* 遺伝子欠損マウスは本研究室において作製された<sup>79</sup>。*Trif* 遺伝子欠損マウス、及び *Myd88* 欠損マウスは大阪大学免疫学フロンティア研究センター自然免疫学研究室（審良静男博士）からご供与頂いた。*Sting* 欠損マウスは University of Miami School of Medicine, Department of Cell Biology (G. N. Berber 博士) からご供与頂いた。*Asc* 欠損マウスは信州大からご供与頂いた。*Mkp1* 欠損マウスは Department of Immunobiology, Yale University School of Medicine (Richard A. Flavell 博士) からご供与頂いた。*Mkp5* 欠損マウスは Department of Microbiology, National University of Singapore (Yongliang Zhang 博士) からご供与いただいた。*Irf3*<sup>-/-</sup>と *Myd88*<sup>-/-</sup> 遺伝子同時欠損マウスは *Irf3*<sup>-/-</sup> マウスと *Myd88*<sup>-/-</sup> マウスを掛け合わせ用いた。すべてのマウスは SPF (specific pathogen free) の環境で飼育し、マウスを用いた実験においては、東京大学医学系研究科動物実験委員会により実験の承認を頂いており (医—P10-122 及び医-P10-123)、「東京大学動物実験実施規則」並びに「東京大学動物実験実施マニュアル」を遵守しながら、動物愛護の観点に基づき遂行した。

## 【細胞】

### ・腹腔マクロファージの調製 (peritoneal macrophages: PECs)

マウス 腹腔内に 4 % チオグリコレート (日水製薬株式会社) 4 mL を投与し、72 時間後のマウス腹腔に PFE (1 x PBS、2% FCS、1mM EDTA) 6mL を 2 回注入し回収した。回収した細胞はセルストレイナー (40 $\mu$ m Corning) を通したの

ち、培養ディッシュ上にて RPMI 培地で培養し、3 時間後に PBS で洗浄を行い  
接着した細胞を PECs として用いた。

- ・ マウス骨髄由来樹状細胞 (**bone marrow-derived dendritic cells: BMDCs**)  
の調製

マウスの脛骨及び後肢の大腿骨を回収し、両端を解剖用ハサミで切断したのち  
PFE で内腔の骨髄を回収した。回収した骨髄細胞をセルストレイナー (40  $\mu$ m  
Corning) に通したのち、1×RBC (red blood cell) lysis buffer (eBioscience) に懸  
濁し、室温にて 1 分間静置し、赤血球を溶血処理し、終濃度 100ng/mL GM-CSF  
(Peprotech) を添加した RPMI 培地で 2 日に一回培地交換しながら 6 日間培養  
し、懸浮細胞を樹状細胞として用いた。

- ・ マウス脾臓由来 CD11b<sup>+</sup>、CD11c<sup>+</sup> 陽性細胞 (**CD11b<sup>+</sup>、CD11c<sup>+</sup> splenic cell**)  
の調製

マウスから脾臓を摘出し、1 mg/mL コラゲナーゼ D (Roche) と 0.2 mg/mL  
DNase I (Roche) を添加した PBS を注射器にて注入し回収し、さらにスライド  
ガラスにて破碎し回収し、溶液中で 10 分ごとに攪拌しつつ 37°C の湯浴で 30  
分間反応させた。さらに、1x RBC lysis buffer を加えて赤血球を溶血させた脾臓  
細胞の mix から CD11b MicroBeads (Miltenyi Biotec)、CD11c MicroBeads

(Miltenyi Biotec) を用いて CD11b 陽性細胞、CD11c 陽性細胞を分離し、これを脾臓由来 CD11b 陽性細胞、脾臓由来 CD11c 陽性細胞として実験に用いた。

- ・ **マウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast: MEF)**

日本クレアより購入した妊娠 14 日目の C57BL/6J マウスを用いた。マウス胎仔を子宮より取り出し、PBS 中で洗浄した。解剖用ハサミで胎盤を除き、メスを用いて細く切り刻んだ。これを 0.25%トリプシン (GIBCO) で 37°C、30 分間消化処理を行ったのち、DMEM 培地で培養した。実験に用いた細胞は、全て継代回数 5 回以内の細胞を用いた。

- ・ **胎仔肝細胞由来マクロファージ**

妊娠 14 日目のマウスより胎仔を取り出し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓をセルストレイナー上ですり潰し、通した細胞を 1×RBC lysis buffer に懸濁し、室温にて 1 分間静置し、赤血球を溶血処理した。その後、PFE で 2 回洗浄を行い、再度セルストレイナー (40 μm) を通し RPMI 培地で培養した。

## 【試薬】

- ・ **リガンド**

TLR4 のリガンドである LPS、TLR2 のリガンドであるペプチドグリカン、細胞質内の DNA 認識受容体のリガンドである poly (deoxyadenylic-deoxythymidylic) ・ poly (deoxythymidylic-deoxyadenylic) acid [poly (dA-dT) ・ poly (dT-dA)] は、細胞質内にて B 型コンフォメーションをとることから B-DNA と呼ばれている<sup>53</sup>。これらは Sigma より購入した。poly(I:C) (polyriboinosinic-polyribocytidylic acid) は GE Healthcare Bioscience より、TLR5 リガンド Flagellin は Enzo Life Sciences より、TLR7 リガンドの R837 は Invivogen より、TLR9 リガンドの CpG-B ODN は Fasmac より購入した。また、c-Gas のリガンドである cyclic di-GMP、ローダミン標識した poly(I:C)は Invivogene より購入した。

#### ・ トランスフェクション試薬

細胞質内核酸受容体への刺激には Lipopfectamine 2000 (Invitrogen) を使用した。プラスミド DNA をトランスフェクションするには X-tremeGENE9 DNA Transfection Reagent (Roche) を使用した。

#### ・ プラスミド DNA

pCL-ECO、VSV-G、PMDOGP は北海道大学の 大場雄介博士よりご供与頂いた。MKP1、MKP3、MKP5、MKP5(CS)ベクターは京都大学の 西田栄介博士よりご供与頂いた。

## 【核酸及び TLR リガンドによる細胞刺激】

### ・細胞質内核酸受容体への刺激

核酸 200 $\mu$ g/mL となるように低血清培地 Opti-MEM (GIBCO) で希釈し、Lipofectamine2000 (Invitrogen) を Opti-MEM 培地で 5 倍希釈 (核酸 1 $\mu$ g に対し Lipofectamine2000 を 1 $\mu$ L 使用する) し、室温 5 分間で静置した。その後、希釈したものを 1:1 で混合しさらに室温にて 15 分間静置した。核酸と Lipofectamine2000 の複合体が形成され、細胞培養液中に終濃度をそれぞれ別で示す濃度になるように細胞培養液に加えた。

## 【RNA 解析】

RNA の調製には RNAiso plus (TaKaRa) を用いてプロトコールに従い行った。細胞を 350 $\mu$ l の RNAiso plus で溶解し、70 $\mu$ l のクロロホルム溶液を加え混合し、8,000g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離し、上清を回収した。回収した上清に 300 $\mu$ l のイソプロパノールを加え混合し、室温で 10 分間静置した後、12,000g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離し、上清を除去した。その後、沈殿を 70%エタノールで洗浄し、8,000g、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心分離した後、上清を除去し沈殿を乾燥させ total RNA を得た。cDNA の調製には PrimeScript RT reagent with gDNA Eraser (TaKaRa) を用いてプロトコールに従い調製した。得られた total RNA 7 $\mu$ l(1 $\mu$ g 以下)に 5 $\times$ gDNA eraser buffer を 2 $\mu$ l、gDNA Eraser を 1 $\mu$ l 加え、室温で 5 分間静置した。その後、5 $\times$ PrimeScript Buffer2 を 4 $\mu$ l、PrimeScript Enzyme mix 1 を 1 $\mu$ l、RT Primer Mix を 1 $\mu$ l 加え、RNase Free 水で総量を 20 $\mu$ l にし、37 $^{\circ}$ C 15 分、85 $^{\circ}$ C 5 秒反応させ逆転写を行った。

qRT-PCR は SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いて Lightcycler480 (Roche Molecular Biochemicals) によって行った。SYBR Premix Ex Taq (2x) を 10 mL、プライマーは sense プライマー及び anti-sense プライマーを終濃度が共に 0.5 μM、蒸留滅菌水で 20 倍に希釈した cDNA 溶液 2μl を加え、蒸留滅菌水で全量を 20 μl とした溶液を用いて PCR 反応を行った。95°C 1 分保温の後、95 °C 10 秒、57 °C 5 秒、72 °C 10 秒のサイクル反応を用いた。各遺伝子の mRNA 発現量は、リアルタイム PCR によって解析した。段階希釈した検量線サンプルを用いてサイクル数 (Ct 値) より相対量を測定し、ハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: GAPDH) の遺伝子の mRNA 発現量によって標準化した。なお、検量線サンプルは実験ごとに異なるものを使用しているため、データとして示されている値は同じグラフ内でのみ比較可能な相対値である。qRT-PCR に用いたプライマーは過去の報告に従い下記の配列を用いた<sup>51</sup>。

遺伝子		配列
<i>Ifna4</i>	sense	5'- CAATGACCTCAAAGCCTGTGTG - 3'
	anti-sense	5'- CACAGTGATCCTGTGGAAGT - 3'
<i>Ifnb1</i>	sense	5'- ACGCCTGGATGGTGGTCCGA - 3'
	anti-sense	5'- TGCCTGCAACCACCACTCATTCT - 3'
<i>Il6</i>	sense	5'- ACGATGATGCACTTGCAGAA - 3'
	anti-sense	5'- GTAGCTATGGTACTCCAGAAGAC - 3'

<i>Tnfa</i>	sense	5'- TCATACCAGGAGAAAGTCAACCTC - 3'
	anti-sense	5'- GTATATGGGCTCATAACCAGGGTTT - 3'
<i>Gapdh</i>	sense	5'- CTCATGACCACAGTCCATGC - 3'
	anti-sense	5'- CACATTGGGGGTAGGAACAC - 3'
<i>Copa</i>	sense	5'- GCTCAAGAACTTCAAGACAGC - 3'
	anti-sense	5'- TAGATGGGCCGGTAAGATG-3'

#### 【細胞への遺伝子導入】

X-tremeGENE9 DNA Transfection Reagent (Roche) の添付のプロトコールに従って行った。細胞を 60%コンフルエンスで播種し 18 時間培養した。添付のプロトコールに従いプラスミド DNA と X-tremeGENE9 DNA Transfection Reagent を 1:3 の割合 (プラスミド DNA 1  $\mu$ g に対して X-tremeGENE9 DNA Transfection Reagent 3  $\mu$ l) で低血清培地 Opti-MEM (GIBCO) と混合し、室温にて 15 分間静置した後、培養液中に加えた。

#### 【レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入】

組み替えレトロウイルス作成に用いるパッケージング細胞には HEK293T を使用した。HEK293T 細胞を 10cm 細胞培養ディッシュに  $3 \times 10^6$  個、10mL に播種し 18 時間培養した。培養上清に VSV-G1 $\mu$ g、PMDOGP2 $\mu$ g、pBABE-puro-

FLAG-IRF7 2 $\mu$ g と X-tremeGENE9 DNA Transfection Reagent 15 $\mu$ l を低血清培地 Opti-MEM (GIBCO) 500 $\mu$ l で希釈し、室温にて 15 分間静置した後、培養液中に加えた。72 時間後の培養上清をシリンジフィルター (孔径 0.2  $\mu$ m) を通し、前日に播種した Raw246.7 細胞に加え 6 時間インキュベーションした。6 時間後にピューロマイシン終濃度 (4.5 $\mu$ g/mL: Sigma) を加えた培地に培養液を置換し、薬剤セレクションを行った。

### 【イミュノブロッティング】

#### ・一次抗体

ウサギ抗 IRF3 ポリクローナル抗体 (Bethyl Laboratories)

ウサギ抗 リン酸化 IRF3 (Ser396) (4D4G) 抗体 (Cell Signaling)

マウス抗 I $\kappa$ B $\alpha$  (L35A5) 抗体 (Cell Signaling)

ウサギ抗 リン酸化 I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser32) 抗体 (Cell Signaling)

ウサギ抗 JNK 抗体 (Cell Signaling)

ウサギ抗 リン酸化 JNK (Thr183/Tyr185) 抗体 (Cell Signaling)

ウサギ抗 p38 MAP Kinase 抗体 (Cell Signaling)

ウサギ抗 リン酸化 p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) 抗体 (Cell Signaling)

ウサギ抗 FLAG 抗体 (Sigma)

#### ・二次抗体

HRP 結合ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare)



HRP 結合マウス IgG 抗体 (GE Healthcare)

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

・細胞溶解液

50 mM Tris-HCl (pH 7.4) (ナカライテスク)

500mM NaCl (関東化学)

20mM  $\beta$ -グリセロリン酸ナトリウム n 水和物 (和光純薬)

2mM EDTA (同仁化学)

1.5% NP-40 (ナカライテスク)

1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (和光純薬)

200 $\mu$ M Dithiothreitol (DTT, 和光純薬)

10 $\mu$ g/mL Aprotinin (TaKaRa BIO)

10 $\mu$ g/mL Leupeptin (和光純薬)

1mM APMSF (和光純薬)

・ 6 $\times$ Loading Buffer

330mM Tris-HCl (pH 6.8) (ナカライテスク)

9.5% SDS

600mM DTT

0.12% BPB (和光純薬)

培養皿上の細胞を PBS で 2 回洗淨し、1mL の PBS を加えスクレーパーで回収した。4°C、1,300rpm、5 分間遠心分離を行い、その後上清を捨てた。細胞沈殿に細胞溶解液を加え懸濁した。5 分毎にタッピングを行い、30 分間氷上で静置し、13,000g、4°C、20 分間遠心分離を行い、上清を回収した。回収した上清を 6× Loading Buffer と混合し、98°C で 5 分間静置しタンパクを変性させ解析に使用した。

### 電気泳動

・泳動バッファー

25mM Tris-HCl (pH 8.0) (ナカライテスク)

192mM グリシン (和光純薬)

0.1% SDS (ナカライテスク)

8%アクリルアミドゲルで 30mA 定電流で電気泳動を行った。

### 転写

・転写バッファー

50mM Tris-HCl (pH 8.0)

80mM グリシン

0.04% SDS

20%メタノール (和光純薬)

ポリフッ化ビニリデン(PVDF) 膜(Millipore)をメタノールで1 分間浸し、その後転写バッファー中に泳動後のアクリルアミドゲルと共に室温で15 分間振盪させた。これらを、転写バッファーで浸した濾紙に挟み転写を行った。

### Native-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (native-PAGE)

#### タンパク調製

・細胞溶解液

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

150mM NaCl

1% NP40

100 $\mu$ g/mL leupeptin

1mM APMSF

5mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

・2×Loading Buffer

125nM Tris-HCl (pH6.8)

30% グリセロール

0.01% BPB

培養皿上の細胞を PBS で2 回洗浄し、1mL の PBS を加えスクレーパーで回収した。4°C、1,300rpm、5 分間遠心分離を行い、その後上清を捨て、細胞沈殿に細胞溶解液を加え懸濁した。30 分間氷上で静置し、13,000g、4°C、20 分間遠心

分離を行い、上清を回収した。回収した上清を 2× Loading Buffer と混合し解析に使用した。

#### 電気泳動

- upper chamber buffer

25 mM Tris-HCl (pH 8.4)

192mM グリシン

0.2% sodium deoxycholate (和光純薬)

- lower chamber buffer

25mM Tris-HCl (pH 8.4)

192mM グリシン

READY GELS J (4%/7.5%) (BIO-RAD)を泳動用バッファー中で 40mA、30 分間プレランした後、調製したサンプルを 25mA、50 分間電気泳動した。

#### 転写

- 転写バッファー

18.6 mM Tris-HCl

143mM グリシン

20% メタノール

ポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜(Millipore)をメタノールで1分間浸し、その後転写バッファー中に泳動後のゲルと共に室温で15分間振盪させた。これらを、転写バッファーで浸した濾紙に挟み転写を行った。

#### 抗体反応

##### ・TBST

200 mM Tris-HCl (pH 8.0)

150mM NaCl (関東化学)

0.1%Polyoxyethylene(20) sorbitan monolaurate (Tween20 : 和光純薬)

##### ・ブロッキング溶液

スキムミルク (Difco) を TBST で溶解させ、終濃度 5%に調製し使用した。

##### ・ECL 試薬

Western Lightning Plus-ECL(PerkinElmer)

転写後の PVDF 膜をブロッキング溶液中で、室温で1時間振盪させた後、一次抗体液中に4°Cで一晩、二次抗体液中に室温で1時間振盪させた(抗体反応終了後 TBST を用いて室温で5分間、3回洗浄)。ECL 試薬により発光を行い X線フィルム(富士フィルム)にて検出した。

### 【核内タンパク質の分画】

#### ・緩衝液 A

10mM HEPES-KOH(pH 7.5)(ナカライテスク)

10mM KCl (ナカライテスク),

1.5mM MgCl<sub>2</sub> (ナカライテスク),

0.5mM APMSF (和光純薬)

#### ・緩衝液 B

10mM HEPES-KOH (pH 7.5),

10mM KCl,

1.5mM MgCl<sub>2</sub>

0.5mM APMSF,

0.4% NP-40

#### ・緩衝液 C

20mM HEPES-KOH (pH 7.5)

600mM KCl

1.5mM MgCl<sub>2</sub>

25% グリセロール(和光純薬)

培養皿上の細胞を PBS で 2 回洗浄し、1mL の PBS を加えスクレーパーで回収した。4°C、1,300rpm、5 分間遠心分離を行い、その後上精を除いた。緩衝液 A に懸濁し、等量の緩衝液 B を加えて穏やかに混和し室温で 5 分間静置した。

これを 4°C、3,000rpm、5 分間遠心分離し、上精を除いた後に沈殿を緩衝液 A で洗浄、4°C、3,000rpm、5 分間遠心分離し上精を除き、緩衝液 C で懸濁し、10 分ごとにタッピングしながら氷上に 30 分静置した。その後、14,000 rpm、4°C、15 分間で遠心分離し、上清を核内画分として回収した。

### 【免疫沈降】

#### 抗体

ヤギ抗 IRF3 抗体 (sc-15991: Santa Cruz biotechnology)

ウサギ抗 FLAG 抗体 (Sigma)

ウエスタンブロッティングと同様にタンパク調製を行った。免疫沈降には immunoprecipitation Kit Dynabeads protein G (life technologies) を用いて、添付のプロトコール通りに行った。Dynabeads を分離用磁石を用いて分離し、PBS で希釈した抗体液で懸濁し、室温で 10 分間チューブローテターを用いて混和した。その後、分離用磁石を用いて分離し、付属の Ab Binding バッファーで 1 回洗浄した。その後、分離用磁石を用いて分離し調製したタンパク溶液と混合し、室温で 30 分間チューブローテターを用いて混和した。付属の Washing バッファーで 3 回洗浄し、1× Loading Buffer で懸濁し、98°C で 5 分間静置しタンパクを変性させ解析に使用した。

## 【Duolink *in situ* PLA (Proximity Ligation Assay)】

- ・ 一次抗体

ウサギ抗 MKP1 (DUSP1) 抗体 (sc-1102: Santa Cruz biotechnology)

ウサギ抗 MKP2 (DUSP4) 抗体 (ab72593: abcam)

ウサギ抗 MKP3 (DUSP6) 抗体 (ab76310: abcam)

ウサギ抗 MKP5 (DUSP19) 抗体 (sc-135201: Santa Cruz biotechnology)

ウサギ抗 MKP7 (DUSP16) 抗体 (PAB4146: abnova)

ヤギ抗 IRF3 抗体 (sc-15991: Santa Cruz biotechnology)

ウサギ抗 TBK1 抗体 (sc-9085: Santa Cruz biotechnology)

ヤギ抗 TBK1 抗体 (sc-9910: Santa Cruz biotechnology)

- ・ 二次抗体

Duolink In Situ PLA Probe Anti-Rabbit MINUS Affinity purified Donkey anti-Rabbit

IgG (H+L) (Sigma Aldrich)

Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Goat PLUS Affinity purified Donkey anti-Goat

IgG (H+L) (Sigma Aldrich)

- ・ 試薬

Duolink In Situ Detection Reagents Red (Sigma Aldrich)

- ・ 細胞調製



細胞は丸カバーガラス（12 丸 No.1: 松波硝子工業株式会社）上に播種した。培養細胞を PBS で 2 回洗浄した後に、4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液（和光純薬工業）を用いて室温で 15 分間静置し、細胞の固定を行った。その後、PBS で 2 回洗浄し、50 $\mu$ g/mL のジギトニン（和光純薬工業）-PBS を用いて室温で 15 分間静置し、細胞の透過処理を行った。その後、PBS で 2 回洗浄し付属の Blocking solution を用いて室温で 2 時間静置しブロッキングを行った。

- ・一次抗体反応

付属の Antibody Diluent（1x）で抗体を希釈し、パラフィルム上にカバーガラスを置き、40 $\mu$ l の抗体希釈液をカバーガラス上に滴下し、室温で 1 時間抗体反応を行った。その後、添付の洗浄バッファーA で 5 分間 3 回洗浄を行った。

- ・二次抗体反応

付属の Antibody Diluent（1x）で抗体を希釈し、パラフィルム上にカバーガラスを置き、40 $\mu$ l の抗体希釈液をカバーガラス上に滴下し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間抗体反応を行った。その後、添付の洗浄バッファーA で 5 分間 3 回洗浄を行った。

- ・ライゲーション反応

Ligation solution（5 $\times$ buffer と DNA リガーゼを混合）を 40 $\mu$ l カバーガラス上に滴下し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間ライゲーション反応を行った。その後、添付の洗浄バッファーA で 2 分間 2 回洗浄を行った。

- ・伸長反応と標識プローブのハイブリダイズ

Amplification solution (5×buffer とポリメラーゼを混合) を 40μl カバーガラス上に滴下し、37°C で 100 分間ライゲーション反応を行った。その後、添付の洗浄バッファーA で 10 分間 2 回、洗浄バッファーB で 1 分間 1 回洗浄を行った。

- ・包埋

付属の DAPI 含有のマウンテン剤 5μl を用いて包埋した。

観察は Fluoview FV1000 共焦点蛍光顕微鏡 (Olympus) にて行った。スポット数の計算は Duolink Image tool を用いて行った。

### 【リステリア感染】

マウスにリステリア菌 (笹川千尋 博士 (東京大学) より御供与頂いた) を PBS で  $10^5$ cfu/200μl に調製し、腹腔内投与で感染させた。

#### リステリア菌の力価測定

マウスの臓器をスライドガラスですり潰し、1 mL の PBS 中に懸濁の後、PBS で 100 倍から 100000 倍まで段階希釈した。これを 1.5% 寒天末 (ナカライテスク) と 3.7% Bacto™ Brain Heart Infusion (Becton Dickinson) を添加した無菌寒天培地に塗布して 37°C のインキュベーターで静置し、コロニー数を計測して臓器当たりの力価を算出した。

## ヘマトキシリン・エオジン (HE: Hematoxylin-eosin) 染色

マウスから摘出した臓器を 4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液で固定した。パラフィン包埋切片の作製と HE 染色は川崎臨床病理研究所にて行った。

### **【リン酸化プロテオーム解析】**

#### iTRAQ 法

細胞を Trizol (life technologies) で溶解し、クロロホルム溶液をくわえよく混合し、12,000g、4°C、15 分間遠心分離した。上相を除去しエタノールを加え、2,000g、4°C、5 分間遠心分離した。上清を回収し、イソプロパノールを加え混合し、12,000g、4°C、10 分間遠心分離した。沈殿を 0.3M グアニジン塩酸を溶かした 95%エタノールで3回洗浄した。得られた沈殿をトリプシンで消化し、リン酸化タンパクを iron immobilized metal ion affinity chromatography (Fe-IMAC) カラムで回収し、iTRAQ 法をもちいて質量分析計でリン酸化タンパクの相対変化量を検出した。質量分析は九州大学の中山敬一博士との共同研究によって行った。

#### Gene Ontology Enrichment 解析

DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery : <https://david.ncifcrf.gov>) を用いて、Gene Ontology Enrichment 解析を行った。

### 【RNA 干渉 (RNA interference: RNAi)】

RNAi によって遺伝子発現をノックダウンするために siRNA (small interfering RNA) を Lipofectamine RNAiMax を用いて細胞内に取り込ませた。使用した siRNA の配列は以下の通りである。

遺伝子		配列
<i>Copa#1</i>	sense	5'- GGACAUGAGUGGCCAUUAUdTdT - 3'
	anti-sense	5'- AUA AUGGCCACUCAUGUCCdTdT - 3'
<i>Copa#2</i>	sense	5'- UCAUGCCAUUGGAUACAAAdTdT - 3'
	anti-sense	5'- UUUGUAUCCAAUGGCAUGAdTdT - 3'
<i>Copa#3</i>	sense	5'- CAACCCCUUUGACAUUUGUdTdT - 3'
	anti-sense	5'- ACAA AUGUCA AAGGGGUUGdTdT - 3'
<i>Tom1</i>	sense	5'- GGACCAUCCUGCCGAAGAAAdTdT - 3'
	anti-sense	5'- UUCUUCGGCAGGAUGGUCCdTdT - 3'
<i>Pom121</i>	sense	5'- GCAGCUCCUUCGUUUUCCAdTdT - 3'
	anti-sense	5'- UGGAAAACGAAGGAGCUGCdTdT - 3'
<i>Cog1</i>	sense	5'- GUAGUGGCCUCUCCAUGAAAdTdT - 3'
	anti-sense	5'- UUCAUGGAGAGGCCACUACdTdT - 3'

### 【フローサイトメトリー解析】

各細胞を、培養上清を含めて回収した後、1,300 rpm、4°C で 5 分間遠心分離を行い、細胞を回収した。その後、PFE で 2 回 wash し 300  $\mu$ l に懸濁し、メッシュを通し解析した。フローサイトメトリー解析には LSRII Fortessa (BD Bioscience) を用いた。

### 【統計解析】

コントロール群とサンプル群の値に有意差があるか否かは、Student の  $t$  検定によって評価した。

## 謝辞

本研究を纏めるにあたりまして、大変ご多忙の中多大なご指導・ご鞭撻賜りました、東京大学生産技術研究所 炎症・免疫制御学社会連携研究部門 谷口維紹特任教授に謹んで御礼申し上げます。また、実験遂行から博士論文執筆にあたり、大変熱心にご指導下さいました特任准教授の柳井秀元先生、特任助教の根岸英雄先生、西尾純子先生に心より感謝申し上げます。博士課程4年の更級葉菜さんと、同3年の遠藤信康さん、深澤桂子さん（茨城県立中央病院）は、本研究をまとめるにあたり実験遂行、及び充実した議論など多大なご協力を頂きましたこと、心より感謝申し上げます。また、共同研究者である大場雄介教授、藤岡容一郎博士（北海道大学）、西田栄介教授（京都大学）、谷口俊一郎教授（信州大学）、野田哲生所長（がん研究所）、本田賢也教授（慶應大学）、Yongliang Zhang 博士（National University of Singapore）、Hongbo Chi 博士（St. Jude Children's Research Hospital）、Richard A. Flavell 教授（Yale University）、中山敬一博士（九州大学）に心より御礼申し上げます。最後に、本研究をまとめるに際し、多くのご助言、ご助力頂きました東京大学生産技術研究所炎症・免疫制御学社会連携研究部門の皆様にご感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1 Gordon, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* **111**, 927-930 (2002).
- 2 Janeway, C. A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **54 Pt 1**, 1-13 (1989).
- 3 Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**, 197-216, doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359 (2002).
- 4 Taylor, P. R. *et al.* Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* **23**, 901-944, doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816 (2005).
- 5 Abbas, A. K., Lohr, J. & Knoechel, B. Balancing autoaggressive and protective T cell responses. *Journal of Autoimmunity* **28**, 59-61, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2007.02.002> (2007).
- 6 Lang, K. S., Burow, A., Kurrer, M., Lang, P. A. & Recher, M. The role of the innate immune response in autoimmune disease. *Journal of Autoimmunity* **29**, 206-212, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2007.07.018> (2007).
- 7 Witebsky, E., Rose, N. R., Terplan, K., Paine, J. R. & Egan, R. W. CHronic thyroiditis and autoimmunization. *Journal of the American Medical Association* **164**, 1439-1447, doi:10.1001/jama.1957.02980130015004 (1957).
- 8 Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**, 675-680, doi:10.1038/90609 (2001).
- 9 Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801, doi:10.1016/j.cell.2006.02.015 (2006).
- 10 West, A. P., Koblansky, A. A. & Ghosh, S. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annual review of cell and developmental biology* **22**, 409-437, doi:10.1146/annurev.cellbio.21.122303.115827 (2006).
- 11 Sirard, J.-C., Vignat, C., Dessein, R. & Chamailard, M. Nod-Like Receptors: Cytosolic Watchdogs for Immunity against Pathogens. *PLoS Pathog* **3**, e152, doi:10.1371/journal.ppat.0030152 (2007).
- 12 Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. & Chen, Z. J. Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. *Science* **339**, 786-791, doi:10.1126/science.1232458 (2013).
- 13 Fitzgerald, K. A. *et al.* LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* **198**, 1043-1055, doi:10.1084/jem.20031023 (2003).

- 14 Yamamoto, M. *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640-643, doi:10.1126/science.1087262 (2003).
- 15 Yamamoto, M. *et al.* Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* **169**, 6668-6672 (2002).
- 16 Hasegawa, M. *et al.* ASC-mediated NF-kappaB activation leading to interleukin-8 production requires caspase-8 and is inhibited by CLARP. *The Journal of biological chemistry* **280**, 15122-15130, doi:10.1074/jbc.M412284200 (2005).
- 17 Sutterwala, F. S., Ogura, Y., Zamboni, D. S., Roy, C. R. & Flavell, R. A. NALP3: a key player in caspase-1 activation. *Journal of endotoxin research* **12**, 251-256, doi:10.1179/096805106x118771 (2006).
- 18 Sarkar, A. *et al.* ASC directs NF-kappaB activation by regulating receptor interacting protein-2 (RIP2) caspase-1 interactions. *J Immunol* **176**, 4979-4986 (2006).
- 19 Lang, R., Hammer, M. & Mages, J. DUSP meet immunology: dual specificity MAPK phosphatases in control of the inflammatory response. *J Immunol* **177**, 7497-7504 (2006).
- 20 Keyse, S. M. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Current Opinion in Cell Biology* **12**, 186-192, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)00075-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0955-0674(99)00075-7) (2000).
- 21 Arthur, J. S. & Ley, S. C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol* **13**, 679-692, doi:10.1038/nri3495 (2013).
- 22 Caunt, C. J. & Keyse, S. M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *The FEBS journal* **280**, 489-504, doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08716.x (2013).
- 23 Dickinson, R. J. & Keyse, S. M. Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *Journal of cell science* **119**, 4607-4615, doi:10.1242/jcs.03266 (2006).
- 24 Boutros, T., Chevet, E. & Metrakos, P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacological reviews* **60**, 261-310, doi:10.1124/pr.107.00106 (2008).
- 25 Slack, D. N., Seternes, O. M., Gabrielsen, M. & Keyse, S. M. Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *The Journal of biological chemistry* **276**, 16491-16500, doi:10.1074/jbc.M010966200 (2001).
- 26 Raingeaud, J. *et al.* Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *The Journal of biological chemistry* **270**, 7420-7426 (1995).
- 27 Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. & Tanaka, N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* **19**, 623-655, doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.623 (2001).



- 28 Taniguchi, T. & Takaoka, A. The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Current opinion in immunology* **14**, 111-116 (2002).
- 29 Honda, K. & Taniguchi, T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* **6**, 644-658, doi:10.1038/nri1900 (2006).
- 30 Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D. & Taniguchi, T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol* **26**, 535-584, doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090400 (2008).
- 31 Honda, K., Takaoka, A. & Taniguchi, T. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* **25**, 349-360, doi:10.1016/j.immuni.2006.08.009 (2006).
- 32 Ikushima, H., Negishi, H. & Taniguchi, T. The IRF family transcription factors at the interface of innate and adaptive immune responses. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **78**, 105-116, doi:10.1101/sqb.2013.78.020321 (2013).
- 33 Shu, C., Li, X. & Li, P. The mechanism of double-stranded DNA sensing through the cGAS-STING pathway. *Cytokine & growth factor reviews* **25**, 641-648, doi:10.1016/j.cytogfr.2014.06.006 (2014).
- 34 Takeda, K. & Akira, S. TLR signaling pathways. *Seminars in immunology* **16**, 3-9 (2004).
- 35 Ivashkiv, L. B. & Donlin, L. T. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* **14**, 36-49, doi:10.1038/nri3581 (2014).
- 36 Morales, D. J. & Lenschow, D. J. The antiviral activities of ISG15. *Journal of molecular biology* **425**, 4995-5008, doi:10.1016/j.jmb.2013.09.041 (2013).
- 37 Schneider, W. M., Chevillotte, M. D. & Rice, C. M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* **32**, 513-545, doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120231 (2014).
- 38 Lopez de Padilla, C. M. & Niewold, T. B. The type I interferons: Basic concepts and clinical relevance in immune-mediated inflammatory diseases. *Gene*, doi:10.1016/j.gene.2015.09.058 (2015).
- 39 Trinchieri, G. Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* **207**, 2053-2063, doi:10.1084/jem.20101664 (2010).
- 40 Karaghiosoff, M. *et al.* Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *Nat Immunol* **4**, 471-477, doi:10.1038/ni910 (2003).
- 41 Agrawal, H. *et al.* Deficiency of type I IFN receptor in lupus-prone New Zealand mixed 2328 mice decreases dendritic cell numbers and activation and protects from disease. *J Immunol* **183**, 6021-6029, doi:10.4049/jimmunol.0803872 (2009).
- 42 Hooks, J. J. *et al.* Immune Interferon in the Circulation of Patients with Autoimmune Disease. *New England Journal of Medicine* **301**, 5-8, doi:10.1056/NEJM197907053010102 (1979).
- 43 Ytterberg, S. & Schnitzer, T. Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **65**, 3011-3013, doi:10.1002/art.38169. (1982).

- 44 O'Connell, R. M. *et al.* Type I Interferon Production Enhances Susceptibility to *Listeria monocytogenes* Infection. *The Journal of Experimental Medicine* **200**, 437-445, doi:10.1084/jem.20040712 (2004).
- 45 Carrero, J. A., Calderon, B. & Unanue, E. R. Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to *Listeria* infection. *J Exp Med* **200**, 535-540, doi:10.1084/jem.20040769 (2004).
- 46 Auerbuch, V., Brockstedt, D. G., Meyer-Morse, N., O'Riordan, M. & Portnoy, D. A. Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* **200**, 527-533, doi:10.1084/jem.20040976 (2004).
- 47 Radoshevich, L. *et al.* ISG15 counteracts *Listeria monocytogenes* infection. *Elife* **4**, doi:10.7554/eLife.06848 (2015).
- 48 Ishikawa, H. & Barber, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674-678, doi:10.1038/nature07317 (2008).
- 49 Travar, M., Petkovic, M. & Verhaz, A. Type I, II, and III Interferons: Regulating Immunity to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, doi:10.1007/s00005-015-0365-7 (2015).
- 50 Antonelli, L. R. *et al.* Intranasal Poly-IC treatment exacerbates tuberculosis in mice through the pulmonary recruitment of a pathogen-permissive monocyte/macrophage population. *J Clin Invest* **120**, 1674-1682, doi:10.1172/JCI40817 (2010).
- 51 Negishi, H. *et al.* Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nat Immunol* **13**, 659-666, doi:10.1038/ni.2307 (2012).
- 52 Stavru, F., Archambaud, C. & Cossart, P. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. *Immunological reviews* **240**, 160-184, doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00993.x (2011).
- 53 Ishii, K. J. *et al.* A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* **7**, 40-48, doi:10.1038/ni1282 (2006).
- 54 Dempsey, A. & Bowie, A. G. Innate immune recognition of DNA: A recent history. *Virology* **479-480**, 146-152, doi:10.1016/j.virol.2015.03.013 (2015).
- 55 Clark, K., Plater, L., Peggie, M. & Cohen, P. Use of the pharmacological inhibitor BX795 to study the regulation and physiological roles of TBK1 and IkappaB kinase epsilon: a distinct upstream kinase mediates Ser-172 phosphorylation and activation. *The Journal of biological chemistry* **284**, 14136-14146, doi:10.1074/jbc.M109.000414 (2009).
- 56 Qin, B. Y. *et al.* Crystal structure of IRF-3 reveals mechanism of autoinhibition and virus-induced phosphoactivation. *Nature structural biology* **10**, 913-921, doi:10.1038/nsb1002 (2003).
- 57 Yoneyama, M. *et al.* Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *Embo j* **17**, 1087-1095, doi:10.1093/emboj/17.4.1087 (1998).

- 58 Chi, H. *et al.* Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2274-2279, doi:10.1073/pnas.0510965103 (2006).
- 59 Kondoh, K. & Nishida, E. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochimica et biophysica acta* **1773**, 1227-1237, doi:10.1016/j.bbamcr.2006.12.002 (2007).
- 60 Fitzgerald, K. A. *et al.* IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* **4**, 491-496, doi:10.1038/ni921 (2003).
- 61 Tanoue, T., Moriguchi, T. & Nishida, E. Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, MKP-5. *The Journal of biological chemistry* **274**, 19949-19956 (1999).
- 62 Jeong, M. W., Kang, T. H., Kim, W., Choi, Y. H. & Kim, K. T. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 regulates histone H3 phosphorylation via interaction with vaccinia-related kinase 1. *Mol Biol Cell* **24**, 373-384, doi:10.1091/mbc.E12-06-0456 (2013).
- 63 Brunet, A. *et al.* Nuclear translocation of p42/p44 mitogen - activated protein kinase is required for growth factor - induced gene expression and cell cycle entry. *The EMBO Journal* **18**, 664-674 (1999).
- 64 Thompson, J. A. & Brown, J. C. Role of Coatmer Protein I in Virus Replication. *Journal of virology & antiviral research* **1**, doi:10.4172/2324-8955.1000102 (2012).
- 65 Abe, T. & Barber, G. N. Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF-kappaB activation through TBK1. *Journal of virology* **88**, 5328-5341, doi:10.1128/jvi.00037-14 (2014).
- 66 Watson, R. O. *et al.* The Cytosolic Sensor cGAS Detects Mycobacterium tuberculosis DNA to Induce Type I Interferons and Activate Autophagy. *Cell Host Microbe* **17**, 811-819, doi:10.1016/j.chom.2015.05.004 (2015).
- 67 Pilli, M. *et al.* TBK-1 promotes autophagy-mediated antimicrobial defense by controlling autophagosome maturation. *Immunity* **37**, 223-234, doi:10.1016/j.immuni.2012.04.015 (2012).
- 68 Wild, P. *et al.* Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* **333**, 228-233, doi:10.1126/science.1205405 (2011).
- 69 Jin, L. *et al.* STING/MPYS mediates host defense against *Listeria monocytogenes* infection by regulating Ly6C(hi) monocyte migration. *J Immunol* **190**, 2835-2843, doi:10.4049/jimmunol.1201788 (2013).
- 70 Decken, K. *et al.* Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity* **66**, 4994-5000 (1998).
- 71 Hernandez, M. X. *et al.* Vaccine-induced protection against *Leishmania amazonensis* is obtained in the absence of IL-12/23p40. *Immunology letters* **105**, 38-47, doi:10.1016/j.imlet.2005.12.002 (2006).
- 72 Bedoya, S. K., Lam, B., Lau, K. & Larkin, J., 3rd. Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Clinical & developmental immunology* **2013**, 986789, doi:10.1155/2013/986789 (2013).

- 73 Liu, Y. P. *et al.* Endoplasmic reticulum stress regulates the innate immunity critical transcription factor IRF3. *J Immunol* **189**, 4630-4639, doi:10.4049/jimmunol.1102737 (2012).
- 74 Watkin, L. B. *et al.* COPA mutations impair ER-Golgi transport and cause hereditary autoimmune-mediated lung disease and arthritis. *Nature genetics* **47**, 654-660, doi:10.1038/ng.3279 (2015).
- 75 Oakes, S. A. & Papa, F. R. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annual review of pathology* **10**, 173-194, doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104649 (2015).
- 76 Shore, G. C., Papa, F. R. & Oakes, S. A. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Current Opinion in Cell Biology* **23**, 143-149, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2010.11.003> (2011).
- 77 Lerner, Alana G. *et al.* IRE1 $\alpha$  Induces Thioredoxin-Interacting Protein to Activate the NLRP3 Inflammasome and Promote Programmed Cell Death under Irremediable ER Stress. *Cell Metabolism* **16**, 250-264, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.007> (2012).
- 78 Huang, L., Xie, H. & Liu, H. Endoplasmic reticulum stress, diabetes mellitus, and tissue injury. *Current protein & peptide science* **15**, 812-818 (2014).
- 79 Sato, M. *et al.* Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* **13**, 539-548 (2000).