HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	核酸認識自然免疫レセプターToll-like receptor 3 により認識されるRNA構造の同定
Author(s)	立松, 恵
Description	配架番号：2060
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11067号
Issue Date	2013-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11067
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/54709
Type	doctoral thesis
File Information	Megumi_Tatematsu.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

核酸認識自然免疫レセプターToll-like receptor 3により認識されるRNA構造の同定

2013年9月

北海道大学

立松　恵

目次

発表論文目録および学会発表目録 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1

略語表 ・・3

序章 ・・5

材料と方法 ・・・10

第一章 ポリオウイルス感染細胞由来 RNA による TLR3 の活性化

緒言

結果 ・・21
1. 1 マウス脾臓由来樹状細胞のポリオウイルス感染細胞抽出 RNA に対する応答
1. 2 ポリオウイルス感染細胞抽出 RNA の検定
1. 3 ポリオウイルス感染細胞抽出 RNA の RNA 種の同定

考察 ・・26

第二章 ポリオウイルスゲノムを鋳型とした in vitro 転写 RNA による TLR3 の活性化

緒言

結果 ・・29
2. 1 ポリオウイルスゲノムを鋳型とした in vitro 転写 RNA (PV-RNA) による TLR3 の活性化
2. 2 PV-RNA の培養液中での安定性
2. 3 ヒト細胞株における PV-RNA による TLR3 応答の誘導
2. 4 PV-RNA と TLR3 の結合性
2. 5 TLR3 結合変異体を用いた PV5 による TLR3 活性化
2. 6 PV5 の細胞内取り込みに関わる分子
2. 7 PV5 の細胞内取り込みおよび TLR3 との共局在
2. 8 マウス免疫担当細胞における PV-RNA による IFN 産生
2. 9 マウス CD8 陽性樹状細胞における PV5 と TLR3 との共局在
2. 10 PV5 刺激における TLR3 依存的な応答への RNase 処理の影響

考察 ・・50

第三章 TLR3 を活性化する一本鎖 RNA の構造

緒言

結果 ・・・

発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文に発表した。

Megumi Tatematsu, Fumiko Nishikawa, Tsukasa Seya, Misako Matsumoto.
Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA.
Nature Communications, **4**:1833 (2013)

関連論文

1. Megumi Tatematsu, Akihiro Ishii, Hiroyuki Oshiumi, Masataka Horiuchi, Fuyuhiko Inagaki, Tsukasa Seya, Misako Matsumoto.
A molecular mechanism for Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation.
The Journal of Biological Chemistry, **285**(26):20128-36 (2010)

2. Miwa Sasai, Megumi Tatematsu, Hiroyuki Oshiumi, Kenji Funami, Misako Matsumoto, Shigetsugu Hatakeyama, Tsukasa Seya.
Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway.
Molecular Immunology, **47**(6):1283-91 (2010)

3. Ayako Watanabe, Megumi Tatematsu, Kazuko Saeki, Sachiko Shibata, Hiroaki Shime, Akihiko Yoshimura, Chikashi Obuse, Tsukasa Seya, Misako Matsumoto.
Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation.
The Journal of Biological Chemistry, **286**(12):10702-11 (2011)

4. Hiroki Itoh, Megumi Tatematsu, Ayako Watanabe, Katsunori Iwano, Kenji Funami, Tsukasa Seya, Misako Matsumoto.
UNC93B1 Physically Associates with Human TLR8 and Regulates TLR8-Mediated Signaling
PLoS One, **6**(12):e28500 (2011)

5. Vanessa Sancho-Shimizu, Rebeca Pérez de Diego, Lazaro Lorenzo, Rabih Halwani, Abdullah Alangari, Elisabeth Israelsson, Sylvie Fabrega, Annabelle Cardon, Jerome Maluenda, Megumi Tatematsu, Farhad Mahvelati, Melina Herman, Michael Ciancanelli, Yiqi Guo, Zobaida AlSum, Nouf Alkhamis, Abdulkarim S. Al-Makadma, Ata Ghadiri, Soraya Boucherit, Sabine Plancoulaine, Capucine Picard, Flore Rozenberg, Marc Tardieu, Pierre Lebon, Emmanuelle Jouanguy, Nima Rezaei, Tsukasa Seya, Misako Matsumoto, Damien Chaussabel, Anne Puel,

Shen-Ying Zhang, Laurent Abel, Saleh Al-Muhsen, Jean-Laurent Casanova.
Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency.
The Journal of Clinical Investigation, **121**(12):4889–4902 (2011)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Megumi Tatematsu , Tsukasa Seya, and Misako Matsumoto
Virus-derived single-stranded RNA with stable secondary structure extracellularly activates Toll-like receptor 3
IUMS 2011, 2011 年 9 月 13 日, 札幌

2. Megumi Tatematsu, Tsukasa Seya, and Misako Matsumoto
Virus-derived single-stranded RNA with stable secondary structure extracellularly activates Toll-like receptor 3
第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011 年 11 月 27, 千葉

3. 立松　恵、瀬谷　司、松本　美佐子
Toll-like receptor 3 を活性化する RNA の同定
第 49 回日本生化学会北海道支部例会, 2012 年 7 月 20 日, 札幌

4. 立松　恵、瀬谷　司、松本　美佐子
ウイルスゲノム由来の一本鎖 RNA による Toll-like receptor 3 活性化の解析
第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月 14 日, 大阪

5. Megumi Tatematsu, Tsukasa Seya, and Misako Matsumoto
Properties of viral single-stranded RNAs that harbor ability for endosomal TLR3 targeting
第 41 回日本免疫学会学術集会, 20112 年 12 月 6, 神戸

略語表

AP-1	activator protein 1
BPB	bromphenol blue
CARD	Caspase recruitment domain
Cardif	CARD adaptor inducing IFN-β
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dsRNA	double-stranded ribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FADD	Fas-associated death domain
FBS	fetal bovine serum
HA	Hemagglutinin
HEK	human embryonic kidney
HRP	horseradish peroxydase
IFN	Interferon
IKK	IκB kinase
IPS-1	Interferon-β promoter stimulator-1
IRAK	Interleukin-1 receptor associated kinase
IRF	interferon-regulatory factor
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	leucine-rich repeat
MAP	Mitogen-associated protein
MAVS	Mitochondrial antiviral signaling protein
MDA5	Melanoma differentiation associated gene 5
2-ME	2-mercaptoethanol
MEM	minimal essential medium
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NAK	NF-κB-activating kinase
NAP1	NAK-associated protein 1
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NLR	NOD-like receptor
NP-40	Nonidet P-40
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PRR	pattern-recognition receptor
PVDF	polyvinylidene fluoride

RIG-I	Retinoic acid-inducible gene 1
RIP	Receptor interacting protein
RLR	RIG-I-like receptor
rpm	revolutions per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
ssRNA	single-stranded ribonucleic acid
TANK	TRAF family member-associated NF-κB activator
TBK1	TANK-binding kinase-1
TICAM	TIR-containing adapter molecule
TIR	Toll-IL-1 receptor homology
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRIF	TIR domain containing adapter inducing IFN-β
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
VISA	Virus-induced signaling adaptor
v/v	volume per volume
WT	Wild type

序章

病原微生物などの異物に対抗する生体防御機構である免疫系は、獲得免疫と自然免疫に大別される。抗原抗体反応を利用する獲得免疫は、遺伝子の再構成を伴う特異性の高い応答であり、個体レベルでは免疫記憶により同種の抗原による再感作に対して極めて有効に機能する。一方、自然免疫においては、微生物に特有の分子パターン（PAMPs）を Toll-like receptor（TLR）や NOD-like receptor（NLR）、RIG-I-like receptor（RLR）などのパターン認識受容体（PRR）により認識し、比較的早い段階での防御反応を担う。また、魚類以上の高等生物のみが有する獲得免疫に対し、自然免疫は植物、昆虫からヒトに至るまで多細胞生物に広く存在し、無脊椎動物では免疫系の中心として機能する。

PRR として初めに発見された TLR は、ショウジョウバエにおける抗真菌応答に必須の受容体として発見された Toll の哺乳類ホモログとして単離された(1, 2)。

Ⅰ型膜タンパク質である TLR ファミリー分子は、ヒトでは 10 種類が知られており（3, 4)、細胞外の leucine-rich repeat（LRR）領域でそれぞれのリガンドを認識し、細胞内の Toll-IL-1 receptor homology（TIR）ドメインを介してシグナルを伝達する（5)。ウイルス認識に関与する TLR は 5 種類で、TLR3 は二本鎖 RNA（dsRNA）(6, 7)、TLR4 はウイルスの融合タンパクや封入体タンパクまたは細菌のリポ多糖（LPS）(8, 9)、TLR7、8 はイミダゾキノリン誘導体と一本鎖 RNA（ssRNA）(10-12）、TLR9 はウイルスおよび細菌由来の CpG DNA を認識する（13, 14)。これらの TLR は、リガンド認識により、炎症性サイトカインに加え、Ⅰ型インターフェロン（IFN）も誘導する（10, 13, 15）。

TLR ファミリーによるシグナル伝達においては、TIR ドメインを有するアダプター分子を介して細胞内シグナル伝達系が活性化され、サイトカイン産生が誘導される。TLR3 を除く TLR ファミリー分子はアダプター分子として Myeloid differentiation factor 88（MyD88）を介したシグナル伝達を行う。MyD88 は、Interleukin-1 receptor associated kinase（IRAK)-1、IRAK-4 を介して TNF receptor-associated factor（TRAF）6 を活性化し、Nuclear factor-kappa B（NF-κB）や Mitogen-associated protein（MAP）キナーゼの活性化を引き起こす（16)。TLR3 によるシグナル伝達では、TIR-containing adapter molecule-1（TICAM-1）（別名 TIR domain containing adapter inducing IFN-β（TRIF））がアダプター機能を担う（17, 18)。TLR4 下流でも TICAM-1 をアダプター分子として利用する経路があり、TLR4 は TICAM-1 とは直接結合せず、TIR-containing adapter molecule-2（TICAM-2)（別名 TRIF-related adapter molecule（TRAM））を介して TICAM-1 を活性化する（19, 20)。TLR4 を介した IFN-β産生は MyD88 非依存的であり、TICAM-1 は主にⅠ型 IFN 産生を誘導するアダプター分子と考えられている（21, 22）（図 1）。

TICAM-1 は、全長 712 アミノ酸の分子であり、TIR ドメインはほぼ中央に位置する。TIR ドメインは TLR3 および TICAM-2 と結合し、さらに TICAM-1 の TIR ドメイン同士で結合して多量体を形成することで活性化する。TICAM-1 の下流には NF-κB、Activator protein 1（AP-1)、Interferon-regulatory factor（IRF）-3 の 3 つの転写因子があり（23)、NF-κB、AP-1 は TRAF6 や Receptor interacting protein（RIP）-1 を介して活性化して炎症性サイトカインの産生、MAP キナーゼの活性化を引き起こす。IRF3 活性化経路では NAK-associated protein 1（NAP1)、TANK-binding kinase-1（TBK1)、IκB kinase（IKK）ε が三者複合体を形成して TICAM-1 からシグナルを受け取り、TBK1 および IKKεは、IRF3 を直接リン酸化する(24-26)。IRF3 の活性化経路では TRAF3 が必須であることもわかっているが、TICAM-1 と

TRAF3 は直接結合せず、TICAM-1 に結合する TRAF2 や TRAF6 を介して相互作用すると考えられているが、詳細はよくわかっていない (27, 28)。TICAM-1 の N 末端ドメイン (NTD) は、定常状態では TIR ドメインと分子内で相互作用することで TBK1 との結合領域を覆って不活性化状態を保っている。TIR ドメイン同士が結合して TICAM-1 が活性化すると、構造変化により NTD と TIR の相互作用ができなくなることで TBK1 の結合領域が露出し、NAP1、TBK1、IKKεの三者複合体が形成されて IRF3 が活性化するという制御機構が考えられている (図 2) (29)。

TLR のうち、唯一 TICAM-1 依存的なシグナル伝達経路のみを有する TLR3 は、エンドソームに局在し、細胞外からエンドサイトーシスによって取り込まれた dsRNA を認識する。TLR3 は、骨髄系の細胞のみでなく、線維芽細胞や上皮細胞にも発現しており(30)、これらの細胞ではエンドソームのみでなく、細胞表面にも局在がみられる(31)。TLR3 によるシグナル伝達はいずれもエンドソームで起こるが、細胞表面上の TLR3 もリガンド認識には関わっており、ウイルス感染が起こる気道や胃腸上皮細胞では細胞外のリガンドの素早い検出に寄与することが考えられる。さらに、TLR3 は中枢神経系の神経細胞、グリア細胞にも発現しており(32-36)、神経へ指向性を有するウイルスへの応答においても注目されている。

また、TLR 非依存的な IFN-β産生経路として、細胞質において RNA ヘリケースである Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I) および Melanoma Differentiation-Associated protein 5 (MDA5) がウイルス由来の dsRNA を認識する経路が知られており(37-39)、この経路ではアダプター分子として、ミトコンドリア外膜に局在する Interferon-β promoter stimulator-1 (IPS-1)（別名 Mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS), Virus-induced signaling adaptor (VISA), CARD adaptor inducing IFN-β (Cardif)）がシグナル伝達を担う (40-43) (図 3)。RIG-I は base-paired 5'-triphosphated RNA を、MDA5 は long dsRNA を認識することでウイルス感染に対して防御応答を引き起こす。dsRNA は、DNA ウイルスや (+) 鎖 RNA ウイルス感染時に、ウイルス複製中間体として生成される。感染細胞の細胞質内においては RLR が dsRNA を認識して防御応答が誘導される一方で、樹状細胞やマクロファージといった免疫担当細胞に強く発現している TLR3 は、ウイルス感染細胞の死などに伴い細胞外へ出た dsRNA が取り込まれた場合にエンドソームで認識するものと考えられている。

ウイルス感染に対する TLR3 の役割に関して、TLR3 KO マウスを用いた研究により、さまざまな報告があり、主にピコルナウイルスの認識に関与していると考えられる (44-47)。また、インフルエンザウイルスやフレボウイルス感染においては病態の悪化に関わるとされ (48, 49)、ウエストナイルウイルス感染においては感染防御および増悪のそれぞれに関与するという対立する報告があり (50, 51)、実際の TLR3 の機能については不明な点が多く残されている (表 1) 。

ヒト TLR3 におけるウイルス認識については報告が少ないが、小児の単純ヘルペスウイルス 1 型脳炎に対する防御応答において TLR3-TICAM-1 経路が重要であることがわかっている。ウイルス脳炎患者において UNC-93B1、TLR3、TICAM-1、TRAF3 の変異アレルが発見された(52-55)。ER タンパク質である UNC93B1 は、TLR3 が ER から出て細胞内で局在化するのに必須の分子である(56)。これらの分子の変異は、中枢神経系における HSV-1 感染に対する正常な TLR3 依存的な IFN 応答を妨げることで脳炎発症に関わっている。

このように、TLR3 は、マウスにおいてもヒトにおいてもウイルス感染に対する自然免疫応答を担っており、TLR3 によるウイルス RNA 認識は生体にとって重要な防御機構である。

TLR3 は、ウイルスの複製中間体として生じる dsRNA を認識すると考えられている。しかし、TLR3 がその感染病態に関与するとされるウイルスの中には、複製過程で dsRNA を作らない (-) 鎖 RNA ウイルスもあり（表 1）、ウイルス感染時に TLR3 がどのような RNA により活性化するかは不明である。また、TLR3 が mRNA やネクローシス細胞により活性化するという報告もあり（57, 58）、炎症時に自己由来の RNA を認識することも考えられ、TLR3 リガンドとなりうる RNA の構造的特徴は未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、ポリオウイルスを例として、ウイルス感染時に TLR3 が認識する RNA の構造について解析した。第一章では、ポリオウイルス感染細胞由来の RNA による TLR3 の活性化について、第二章では、in vitro 転写により作製したポリオウイルスゲノム配列をもつ RNA を用いた解析について記述する。さらに、第三章では、TLR3 が認識する RNA 構造の詳細について RNA 二次構造に基づいて検討した。

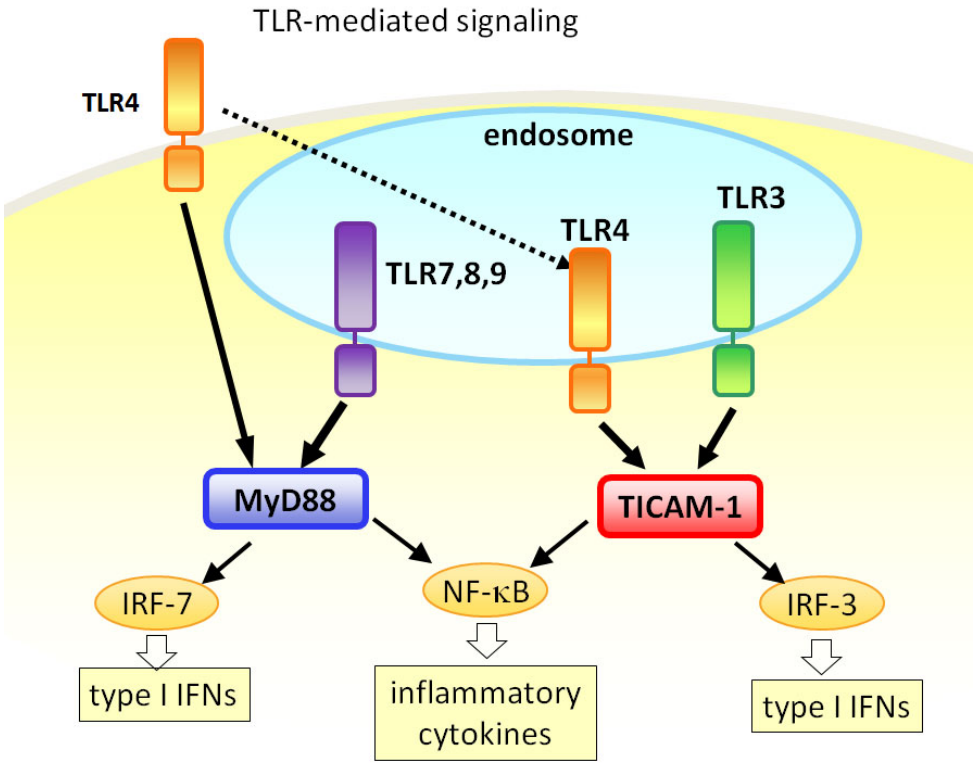


図 1　TLR を介したシグナル伝達経路

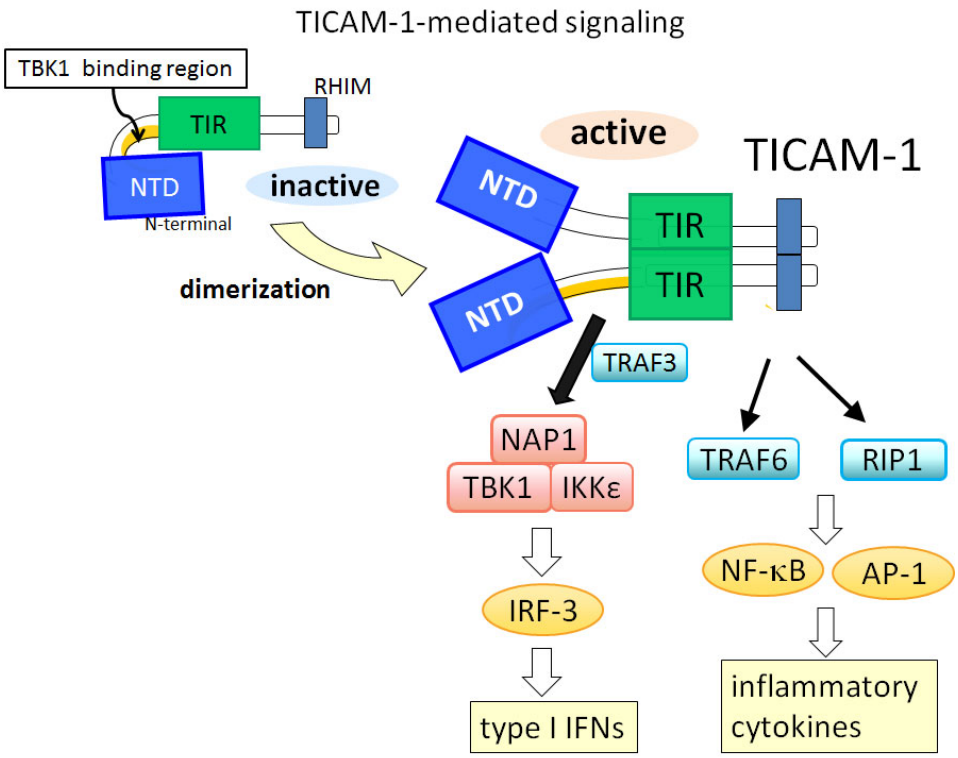


図 2　TICAM-1 を介したシグナル伝達経路

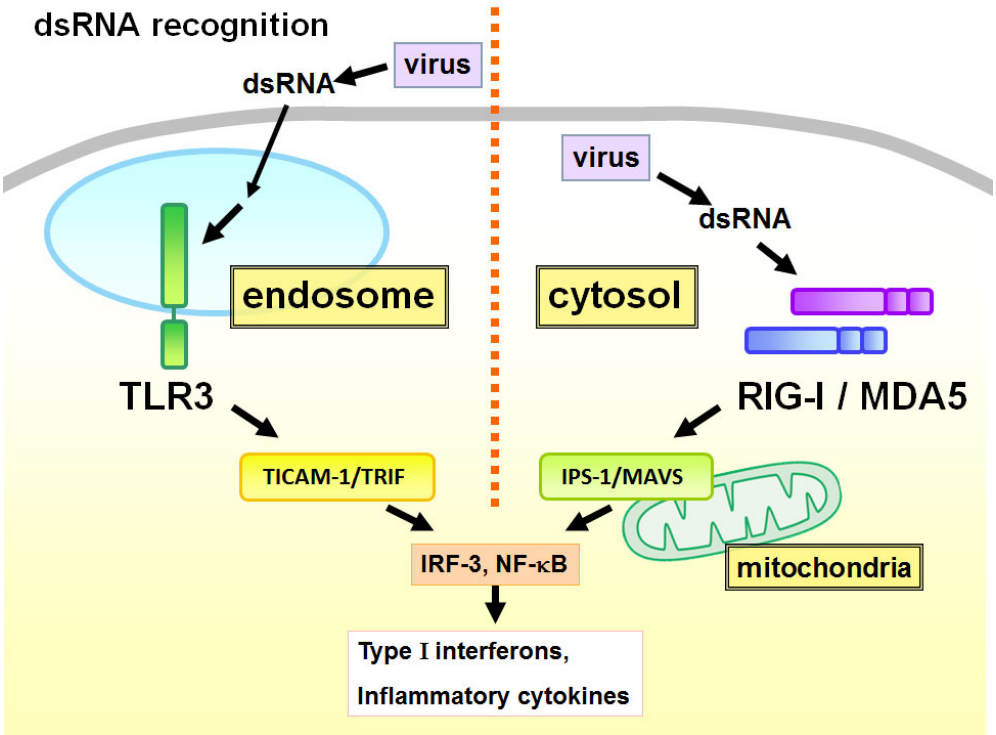


図 3　二本鎖 RNA による IFN 産生経路

genome	dsRNA generation	Elimination	Exacerbation
(+) ssRNA	＋	Poliovirus(46, 47)	West Nile virus(51)
		West Nile virus(50)	
		Encephalomycarditis virus(44)	
		Coxsackievirus group B serotype 3(45)	
dsDNA	＋	Murine cytomegarovirus(59)	
		Herpes simplex virus 1(60)	
(-) ssRNA	-		Influenza A virus(48)
			Phlebovirus(49)

表 1　ウイルス感染における TLR3 の役割

材料と方法

1.実験材料

1-1　細胞

溶液および緩衝液の組成

PBS(-)	137 mM NaCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, 2.68 mM KCl, 1.49 mM KH_2PO_4
$NaHCO_3$ 水溶液	10% $NaHCO_3$
トリプシン液	0.25% Trypsin-0.02% EDTA-PBS(-)

以下の試薬を各メーカーより購入した。

Eagle's MEM "Nissui"①	Nissui, Japan
L-Glutamine	GIBCO-Invitrogen
FBS	BioSource Intl., Inc.
DMEM (1.0 g/l Low Glucose)	GIBCO-Invitrogen
Opti-MEM	Invitrogen
100 mU/ml PenicillinG, 100 μg/ml Streptomycin	GIBCO-Invitrogen
MEM-α	GIBCO-Invitrogen
AIM	GIBCO-Invitrogen

Vero 細胞

サル腎由来細胞株 Vero 細胞は RIKEN BRC Cell Bank より購入した。予め 56℃で 30 分間加熱し非働化した 10% (v/v)ウシ胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 μg/ml Streptomycin を添加した DMEM (1.0 g/l Low Glucose)を用いて 37℃、5% CO_2 の条件下で培養した。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

HEK293 細胞

ヒト胎児腎細胞株 HEK293 細胞は住友製薬より供与された。予め 56℃で 30 分間加熱し非働化した 10% (v/v)ウシ胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 μg/ml Streptomycin を添加した DMEM (1.0 g/l Low Glucose)を用いて 37℃、5% CO_2 の条件下で培養した。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

HeLa 細胞

ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞は京都大学ウイルス研究所の藤田尚志教授より供与された。56℃、30 分間の非働化済みの 5% (v/v)ウシ胎児血清 FBS、1% (v/v) L-Glutamine、$NaHCO_3$ 水溶液を適量添加し

た Eagle's MEM 培地を用いて、37℃、5% CO2 の条件下で培養した。細胞は PBS で洗浄した後トリプシン液を用いて回収し、100% confluent になり次第継代を行った。

MRC-5 細胞

正常二倍体線維芽細胞 MRC-5 細胞は、予め 56℃で 30 分間加熱し非働化した 10% (v/v)ウシ胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 μg/ml Streptomycin を添加した MEM-αを用いて 37℃、5% CO_2 の条件下で培養した。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

1-2. プラスミド

pEF-BOS/TLR3 発現プラスミドは、当研究室で作製した (7)。pEF-BOS は、京都大学　長田重一教授より供与された (61)。Poliovirus (Mahoney strain) cDNA は、東京都臨床医学総合研究所 小池智教授より供与された。TLR3 結合変異体は山形大学 福田宏太郎博士より供与された (62)。

2. 方法

2-1　マウスからの細胞の分取および誘導

溶液および緩衝液の組成

ACK lysis buffer	150 mM NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$, 0.1 mM Na_2EDTA
MACS buffer	0.5% BSA, 2mM EDTA –PBS
Blotting buffer	48 mM Tris, 39 mM Glycine, 20% methanol (pH 9.4)
Washing buffer	0.1% (v/v) Tween20- TBS(-)
Blocking buffer	5% skim milk-Washing buffer
1 次、2 次抗体希釈液	5% skim milk-TBS(-)
TBS(-)	137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 25 mM Tris

以下の試薬を各メーカーより購入した。

collagenase D	Roche
RPMI1640	GIBCO-Invitrogen
HEPES	GIBCO-Invitrogen
Mercaptoethanol	GIBCO-Invitrogen

7週から10週齢のC57B/6雌マウスより取り出した脾臓をcollagenase D (400 Mandle unit/mL) にて37℃, 25分間処理し、EDTAを用いて反応を止めたのち、800 g, 10分間遠心した。ACK lysis buffer処理により溶血させて赤血球を取り除き、MACS bufferにて洗浄した。CD11c Micro Beads (Miltenyi Biotec Inc) を用いたMACSによりCD11c+細胞を分取し、splenic DCとした。また、CD8α+ DCについては、CD8α+ DC positive selection kit (Miltenyi Biotec Inc) を用いて添付文書に従って調製した。樹状細胞は、10%FCS, penicillin-streptomycin, 10mM HEPES, 55mM Mercaptoethanolを含むRPMI1640にて培養した。

7 週から 10 週齢のマウスより大腿骨を取り出し、70% Ethanol に 2 分間浸したのち、PBS(-)で 2 回洗浄した。培養液中で 26G 針を用いて骨髄細胞を押し出し、金属メッシュを通過させて骨片を取り除いた。ACK lysis buffer による溶血処理の後、L929 細胞の上清を 30%含む RPMI 1640 培地中で培養し、2 日後および 4 日後に培地交換を行ってマクロファージを誘導し、6 日目の細胞を BM-Mf として実験に用いた。

マウス細胞に対して刺激を加える場合、無血清培地である AIM 培地を使用し、血清を含まない条件で実験を行った。

マウスを利用した実験は、北海道大学動物実験に関する規程に従って行った。(実験計画番号 08-0243)

2-2　ウイルス感染細胞からの RNA 抽出

Vero 細胞にポリオウイルスを感染させ、48 時間後にメディウムごと細胞を回収し、2,000 rpm,10 分間の遠心により、培養上清を除いた。回収した細胞を TRIZOL (invivogen) にて溶解し、12,000 rpm, 10 分間遠心後の上清を 5 分間室温で静置した。ここに TRIZOL の 1/5 量のクロロホルムを加えて良く浸透し、室温で 2 分間静置したのち、11,400 rpm, 15 分間遠心して水層とクロロホルム層を分離した。水層のみ分取し、等量のイソプロパノールを加えてボルテックスにかけた。室温 10 分間の静置の後に 11,400 rpm　, 10 分間遠心して上清を捨て、沈殿を 80%エタノールで洗った。十分に風乾させて水に溶かし、抽出 RNA サンプルとした。

ポリオウイルスを用いた実験は、北海道大学病原体等安全管理規定に従って行った。

2-3　ルシフェラーゼレポータージーンアッセイ

HEK293 細胞を、96well plate に播種し、翌日、Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen Life Technology)を用いてトランスフェクションを行った。発現プラスミド量は各実験条件に従い、総量は 0.1 μg となる様に empty/ pEF-BOS を加えた。レポータージーンとして、IFN-βプロモータの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ p125-luc (東京大学 谷口維紹教授より供与)(63) を使用した。また、内部コントロールとして、Rennila luciferase (promega)を用いた。

トランスフェクション 24 時間後にリガンドを含む培地と交換することで刺激を加え、6 時間後に Passive Lysis Buffer (promega)を用いて細胞を可溶化した。

解析は、Dual-Luciferase reporter gene assay system のプロトコールに従った。各実験は少なくとも 3 回以上行い、代表例を示した。

2-4　in vitro 転写 RNA の作製

ポリオウイルスマホニー株の cDNA より、T7 promoter 配列を付加して PCR により任意の領域を PCR 反応で増幅した。このときに使用したプライマー配列を（表 2）に示す。PCR 反応後、DNA をエタノール沈殿により精製し、AmpliScribe T7 transcription kit (Epicentre Tschnologies) を用いて T7 promoter から 37℃で一晩転写反応を行った。DNase I で 37℃、15 分反応させて DNA を除去し、1%アガロースゲルにて電気泳動を行って RNA のバンドを RECOCHIP (Takara) により回収した。さらに RECOCHIP より溶出した RNA をエタノール沈殿により精製した。

二本鎖 RNA の作製のため、センス鎖とアンチセンス鎖の相補的な ssRNA を等量混合し、95℃においたのち徐々に室温まで温度をさげてアニーリングを行った。

PV5 の蛍光標識には 5' EndTag Nucleic Acid Lageling System (Vector Laboratories) を用い、cy3 標識 PV5 を作製した。

in vitro 転写 RNA により刺激を行う際は、polymyxin B (Sigma) を 5 μg/ml で 1 時間反応させ、LPS を除去した後に使用した。

表 2

Construct		Sequence (5'→3')
PV1	f	TGTAATACGACTCACTATAGGTTAAAACAGCTCTGGGGTT
	r	GGAACCACCATACGCTCTA
PV2	f	TGTAATACGACTCACTATAGGATGGTGGTTCTACCATTAAT
	r	GGGCCAATGGTAATATTGCAA
PV3	f	TGTAATACGACTCACTATAGGCCCCATTAAATTTTGCTA
	r	GGGAGAGCGTCTCTAGATGT
PV4	f	TGTAATACGACTCACTATAGGGCGGCAACATCTAGAGAC
	r	GGTGTCCGAATCCATATGTGGTCAG
PV5	f	TGTAATACGACTCACTATAGGATTCGGACACCAAAACAA
	r	GGTGTCTTCATAGTTCCTAG
PV6	f	TGTAATACGACTCACTATAGGAACTATGAAGACACCAC
	r	GGTTGCTACAGATTTACCTG
PV7	f	TGTAATACGACTCACTATAGGTAAATCTGTAGCAACCAA
	r	GGTCCTTGAAACAAAGCCTC
PV8	f	TGTAATACGACTCACTATAGGACCACTCCAGTATAAAG

	r	GTGTGCCCAAACGTCGCCGG
PV9	f	TGTAATACGACTCACTATAGGCCCTGAAGCGATCATACT
	r	GGCTGAGAGATGCATCATAC
PV10	f	TGTAATACGACTCACTATAGGAGTGATAACAGGTTCAGCAG
	r	GGTTTTTTTTTTTTTTTTCTCC
cPV1	f	TGTAATACGACTCACTATAGGACGCTCTATTTGAGTTTTC
	r	GGTTAAAACAGCTCTGGGGTT
cPV2	f	TGTAATACGACTCACTATAGGCCAATGGTAATATTGCAA
	r	GGATGGTGGTTCTACCATTAAT
cPV3	f	TGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGTCTCTAGATGT
	r	GGCCCCATTAAATTTTGCTA
cPV4	f	TGTAATACGACTCACTATAGGTGTCCGAATCCATATGTG
	r	GGCGGCAACATCTAGAGAC
cPV5	f	TGTAATACGACTCACTATAGGTGTCTTCATAGTTCCTAG
	r	GGATTCGGACACCAAAACAA
cPV6	f	TGTAATACGACTCACTATAGGTTGCTACAGATTTACCTG
	r	GGAACTATGAAGACAC
cPV7	f	TGTAATACGACTCACTATAGGTCCTTGAAACAAAGCCTC
	r	GGTAAATCTGTAGCAACCAA
cPV8	f	TGTAATACGACTCACTATAGGCCGCTGCAAACCCGTGTG
	r	GGACCACTCCAGTATAAAGA
cPV9	f	TGTAATACGACTCACTATAGGCTGAGAGATGCATCATAC
	r	GGCCCTGAAGCGATCATACT
cPV10	f	TGTAATACGACTCACTATAGGTTTTTTTTTTTTTTTCTCC
	r	GGTATGATGCATCTCTCAG
PV5a	f	TGTAATACGACTCACTATAGGATTCGGACACCAAAACAA
	r	GGTAGTATTTCCTTCTAGAC
PV5b	f	TGTAATACGACTCACTATAGGAAATACTACCCAGTATCC
	r	GGTGATGCCTTGTTCCATGG
PV5c	f	TGTAATACGACTCACTATAGGCATCACCAATTACATAGA
	r	GGTGTCTTCATAGTTCCTAG
PV5-D1	f	TGTAATACGACTCACTATAGGATTCGGACACCAAAACAA
	r	GGTAGTATTTCCTTCTAGAC
PV5-D2	f	TGTAATACGACTCACTATAGGAAATTTGCAACTACCACTTG
	r	AAATCCACTCCAAATGC
PV5-D3	f	TGTAATACGACTCACTATAGGATTCGGACACCAAAACAA
	r	GGTAGTATTTCCTTCTAGAC

PV5-D4	f	TGTAATACGACTCACTATAGGAAATTTGCAACTACCACTTG
	r	AAATCCACTCCAAATGC
PV5-D5	f	TGTAATACGACTCACTATAGGATTCGGACACCAAAACAA
	r	GGTAGTATTTCCTTCTAGAC
PV5(123)	f	TGTAATACGACTCACTATAGGATTCGGACACCAAAACAA
	r	GACTAAGAGGTCTCTACTCC
PV5(204)(41-244)	f	TGTAATACGACTCACTATA**GGG**AAATTTGCAACTACCACTT
	r	ACTGGAACGTTGGGCCAAC
PV5(216)(29-244)	f	TGTAATACGACTCACTATA**GGG**CTGCAGGTTACAAAATTTG
	r	ACTGGAACGTTGGGCCAAC
PV5(300)	f	TGTAATACGACTCACTATAGGATTCGGACACCAAAACAA
	r	GCCAATGAGCATATGGGACT
PV5(416)(41-456)	f	TGTAATACGACTCACTATA**GGG**AAATTTGCAACTACCACTT
	r	GGTGATGCCTTGTTCCATGG
PV5(456)	f	TGTAATACGACTCACTATAGGATTCGGACACCAAAACAA
	r	GGTGATGCCTTGTTCCATGG

アンダーラインは T7 promoter 配列を示す。

GGG は、transcription 反応効率の増強のため、ACA から変異させた配列を示す。

2-5　RNase 処理

以下の試薬を各メーカーより購入した。

Poly(I:C)	Amersham
RNase III	Ambion
RNase A	Ambion

Poly(I:C)および抽出 RNA、in vitro 転写合成 RNA (0.2 μg) に対し、付属の 10x バッファー (0.5 μl)、RNaseIII (9.7 unit) と RNase-free water を加えて総量 5.0 μl の系で 37℃において 30 分間反応させた。

RNase A 処理では、RNase-free water を用いて調整した 0.0 M または 0.3 M NaCl, 50 mM Tris (pH 7.5)の緩衝液中で行った。0.2 μg の RNA に対し、RNase A (20 pg)を加えて緩衝液で総量 5 μg として、37℃において 20 分間反応させた。

反応終了後、RNA は氷上において 6x loading dye を 1μl 加えてアガロースゲル電気泳動により分離した。

2-6　SDS-PAGE—Western blot

溶液および緩衝液の組成

Running buffer	25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS
Lysis buffer	50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% NP-40, 100 μg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 5 mM Na_3VO_4
Sample buffer (5×)	312.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 50% glycerol, 10% SDS, 0.025% BPB, 20% 2-ME
Blotting buffer	48 mM Tris, 39 mM Glycine, 20% methanol (pH 9.4)
Washing buffer	0.1% (v/v) Tween20- TBS(-)
Blocking buffer	5% skim milk-Washing buffer
1 次、2 次抗体懸濁液	5% skim milk-TBS(-)
TBS(-)	137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 25 mM Tris

抗体

		希釈倍率
Anti-raftlin pAb	九州大学 佐伯和子助教より供与	1/1,000
Anti-(β-actin) mAb	Sigma	1/1,000
Anti-TICAM-1 pAb	Cell signaling	1/500
HRP-conjucated secondary antibodies	Biosource	1/20,000

10%アクリルアミドゲル泳動によりサンプルを分離し、メタノールにより親水処理後 Blotting buffer で平衡化した PVDF 膜 (MILLIPORE) へ転写した。転写は、Blotting buffer を浸したろ紙各 3 枚で膜およびゲルをはさみ、15 V, 60 分間の通電により行った。

転写後、PVDF 膜を Blocking buffer 中で 30 分振盪し、任意の一次抗体と 4℃で一晩反応させた。洗浄バッファーで洗浄し、HRP 標識二次抗体と室温で 45 分間反応させ、ECL 試薬(MILLIPORE)により検出した。

2-7　フィルターバインディングアッセイ

反応液の組成

100 mM NaCl, 20 mM AcONa (pH 5.0-6.0) or 20 mM Tris-HCl (pH 6.5-7.0)

α-^{32}P 標識 ATP を加えて in vitro 転写を行い、放射性同位体標識 PV-RNA を作製した。標識した RNA (2 nM) とリコンビナント TLR3 (aa27-711, R&D systems) (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, または 200 nM)

を pH6.0 から pH7.0 の反応液中で混合した。30 分後、ニトロセルロースフィルタに通し、500 μl の反応液で二度洗浄し、結合した RNA 量を BAS 2500 (Fuji Film) を用いて測定した。結合活性は、使用した RNA の総量に対する TLR3 と結合してフィルタ上に残った RNA 量の割合により計算した。

2-8　定量 PCR

細胞を 24 well plate に播種し、各実験に応じて刺激を加えた後、RNeasy kit (Qiagen) により RNA を精製した。エタノール沈殿後の RNA をもとに、High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) を用いて random primer により逆転写して cDNA を合成した。cDNA より各実験に応じて Step One Real-time PCR system を用いて Ct 値を測定し、mRNA 量をΔΔCt 法により算出した。内部標準として GAPDH を使用した。

使用した primer の配列を（表 3 ）に示す。

表 3

Gene		Sequence (5'→3')
GAPDH	f	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
	r	TTGATTTTGGAGGGATCTCG
IFN-β	f	CAACTTGCTTGGATTCCTACAAAG
	r	TATTCAAGCCTCCCATTCAATTG
IL-6	f	CTCCAGGAGCCCAGCTATGA
	r	CCCAGGGAGAAGGCAACTG
TNF-α	f	TCTTCTCGAACCCCGAGTGA
	r	AGCTGCCCCTCAGCTTGA
Raftlin	f	CTGGATGGACCGGAGAGCAAC
	r	GTATTGCCGGCACTTCTGATGGC

2-9　RNA 干渉

細胞を 24 well plate に播種し、siRNA (20 pmol) を、必要に応じて他の発現ベクターとともに、Lipofect Amine 2000 を用いてトランスフェクションした。48 時間後にメディウムを交換して刺激を加え、細胞を回収した。回収した細胞は、それぞれの実験に合わせて Passive Lysis buffer、Lysis buffer、または TRIZOL により処理し、それぞれルシフェラーゼアッセイ、ウエスタンブロッティング、定量 PCR を行った。

siRNA negative control (AM4635) および si Raftlin (s23219) は、ambion-Applied Biosystems より、si TICAM-1 は Xeragon Inc.より購入した。

2-10　顕微鏡観察

溶液および緩衝液の組成

細胞固定液	4% パラホルムアルデヒド-PBS
細胞透過処理液	0.2% Triton X100, 1% BSA-PBS
抗体希釈液	1% BSA-PBS

抗体

		希釈倍率
Anti-EEA1 mAb	Affinity Bioreagents	1/200
Anti-LAMP1 pAb	Biolegend	1/200
Anti-huTLR3 mAb	当研究室にて作製	1/50
Anti-muTLR3 mAb	Dr. David M. Segal (National Institutes of Health) より供与	1/200
Alexa Fluor -conjucated secondary antibodies	Invitrogen	1/400

カバーガラスを敷いた 12 well plate に HeLa 細胞を播種し、24 時間後に PBS にて洗浄し、カバーガラスを取り出した。4℃において、カバーガラス上で cy3 標識 RNA (15 μg/ml)を 30 分間反応させて、細胞表面へ付着させた。12 well plate にカバーガラスを戻し、PBS で洗浄後メディウムを加えて 37℃に置き、タイムコースに応じて細胞固定液で 15 分間置いた。さらに細胞透過処理液と交換して 15 分置き、PBS で洗った後、カバーガラスを取り出し、一次抗体液を乗せて 4℃で一晩反応させた。PBS で 5 分間の振盪を 2 回行って洗浄し、蛍光標識二次抗体液で 30 分間反応させた。PBS で 5 分間の振盪を 2 回行い、さらに水により洗浄した後、カバーガラスを取り出して風乾させた。乾いたカバーガラスは、Prolong Gold (Invitrogen) によりスライドガラスにマウントし、マニキュアで固定した。各サンプルは、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss) にて 63 倍対物レンズを用いて観察した。

2-11　ELISA および CBA

24 well plate に播種した細胞 (1x 10^6 cells/ml) に刺激を加え、24 時間後に細胞上清を回収した。IFN-αおよび IFN-β については、抗体コート済みの ELISA kit (PBL Biomedical Laboratories) を用いて測定した。また、IL-6 および TNF については、CBA flex set (BD Bioscience) を用い、Facs Aria により測定、解析を行った。

2-12　RNA 二次構造予測

RNA 二次構造予測モデルは、以下の公開されたソフトウエアを用いた解析により得た。

mfold (http://mfold.rna.albany.edu/?q.mfold)、

RNAfold (http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi)、

centroidfold (http://www.ncrna.org/software/centroidfold/)

2-13　統計処理

有意差検定には、t-検定を行って p 値を求めた。(*p<0.05、**p<0.01)

第一章　ポリオウイルス感染細胞由来 RNA による TLR3 の活性化

ポリオウイルスはピコルナウイルス科エンテロウイルス属に属する急性灰白髄炎の原因ウイルスである。経口感染したポリオウイルスは、粘膜上皮細胞より生体内へと侵入して局所リンパ節で増殖し、中枢神経へと至る。宿主はヒトに限定されるため、マウスモデルにおいてはヒトポリオウイルスレセプタートランスジェニック（PVR-tg）マウスが利用されており、マウスのポリオウイルス感受性は I 型インターフェロン受容体ノックアウトにおいて著しく上昇することから、自然免疫系による IFN 産生の誘導がポリオウイルス感染制御に重要であることが知られている(64)。

近年、ポリオウイルスレセプター（PVR）Tg マウスを用いた研究により、ポリオウイルス感染防御における TLR3-TICAM-1 経路の役割の重要性が報告された(46, 47)。PVR T g /TICAM-1 KO マウスは、PVR Tg マウスに比べ、ポリオウイルス感染時の生存率が著しく低下する一方、PVR Tg / IPS-1 KO マウスにおいては著しい低下が見られなかった。また、PVR-Tg / TICAM-1 KO マウスから抽出した樹状細胞およびマクロファージにおいて、ポリオウイルス感染における IFN 産生が減弱した。これらのことから、TLR3-TICAM-1 経路依存的な IFN 産生がポリオウイルス感染防御に大きく寄与することが示された。

TLR3 は、ウイルスの複製中間体である dsRNA を認識すると考えられているが、ウイルス由来の RNA がどのような構造をとっている場合に TLR3 を活性化するのかについて詳細はわかっていない。そこで本章では、ポリオウイルス感染細胞から RNA を抽出し、その RNA が TLR3 を活性化することができるか、また、RNA の分子種や安定性、完全な二本鎖の形成の有無などについて検討した。

結果

1. 1　マウス脾臓由来樹状細胞のポリオウイルス感染細胞抽出 RNA に対する応答

ポリオウイルス RNA が、細胞外からの刺激において、樹状細胞のエンドソームに発現する TLR3 を活性化することができるかどうかについて検討した。無血清培地である AIM 培地に懸濁して播種したマウス脾臓細胞由来の樹状細胞に対し、ポリオウイルスを感染させた Vero 細胞から抽出した RNA により細胞外から刺激し、培養上清中に観測される IFN および炎症性サイトカインの量をそれぞれ ELISA および CBA により測定した。抽出した RNA には、宿主である Vero 細胞の RNA も含まれるため、コントロールとして非感染 Vero 細胞より同様に抽出した RNA を用いた。

IFN-β、IFN-α、TNF-αおよび IL-6 のすべてにおいて非感染細胞由来の RNA による産生は見られなかったが、ポリオウイルス感染細胞由来の RNA により容量依存的な誘導が見られた。(Fig.1.1) さらに、TLR3 KO マウスより調製した樹状細胞においては、産生量が著しく減弱した。また、TLR3 リガンドとしては二本鎖 RNA 合成アナログである poly(I:C)を用いたところ、poly(I:C)刺激による IFN 産生は TLR3 への依存性は低かった。これはマウスの樹状細胞における poly(I:C)応答は TLR3 のみでなく細胞質に存在する MDA5 によっても引き起こされるというこれまでの報告に合致している (65)。

1. 2　ポリオウイルス感染細胞抽出 RNA の検定

非感染 Vero 細胞およびポリオウイルス感染 Vero 細胞より抽出した RNA を、細胞刺激時と同様の無血清培地中で 30 分間 37℃においてインキュベートした。アガロースゲル泳動でそれぞれインキュベート前の RNA とインキュベート後の RNA を分離したところ、インキュベート前の感染細胞由来の RNA は、主に 8,000 塩基長程度の一本のバンドと 2,000 塩基長以下のスメアとして観察された。インキュベート後の RNA は、1,000 から 2,000 塩基長程度に分解されたスメアとして観察された。

非感染細胞由来の RNA については、インキュベート前はリボソーマル RNA の二本のバンドが観察され、インキュベート後には分解され、バンドが消失した。

1. 3. ポリオウイルス感染細胞抽出 RNA の RNA 種の同定

ポリオウイルス感染細胞由来の RNA が完全な二本鎖だけで構成されるかどうかについて、血清および RNase による分解性により評価した。二本鎖 RNA を特異的切断する RNase III による処理や血清を含む培地中でのインキュベートにより、感染細胞由来 RNA は 200 塩基長程度まで分解され、アガロースゲル電気泳動においてスメア状に観察された。さらに、反応溶液中の塩濃度によって切断する RNA 種が変化する RNase A を用いて同様の実験を行った。RNase A は、0 から 100 mM の低塩濃度においては一本鎖 RNA も二本鎖 RNA も切断し、300 mM 以上の高塩濃度条件下では ssRNA を特異的に分解する。ポリオウイルス感染細胞由来の RNA を 0 mM および 300 mM NaCl を含む緩衝液中で RNase A と反応

させたところ、塩を含まない場合は RNA が検出できなくなったのに対し、高塩濃度条件では 1,000 塩基長程度にスメア状の RNA が観察された。

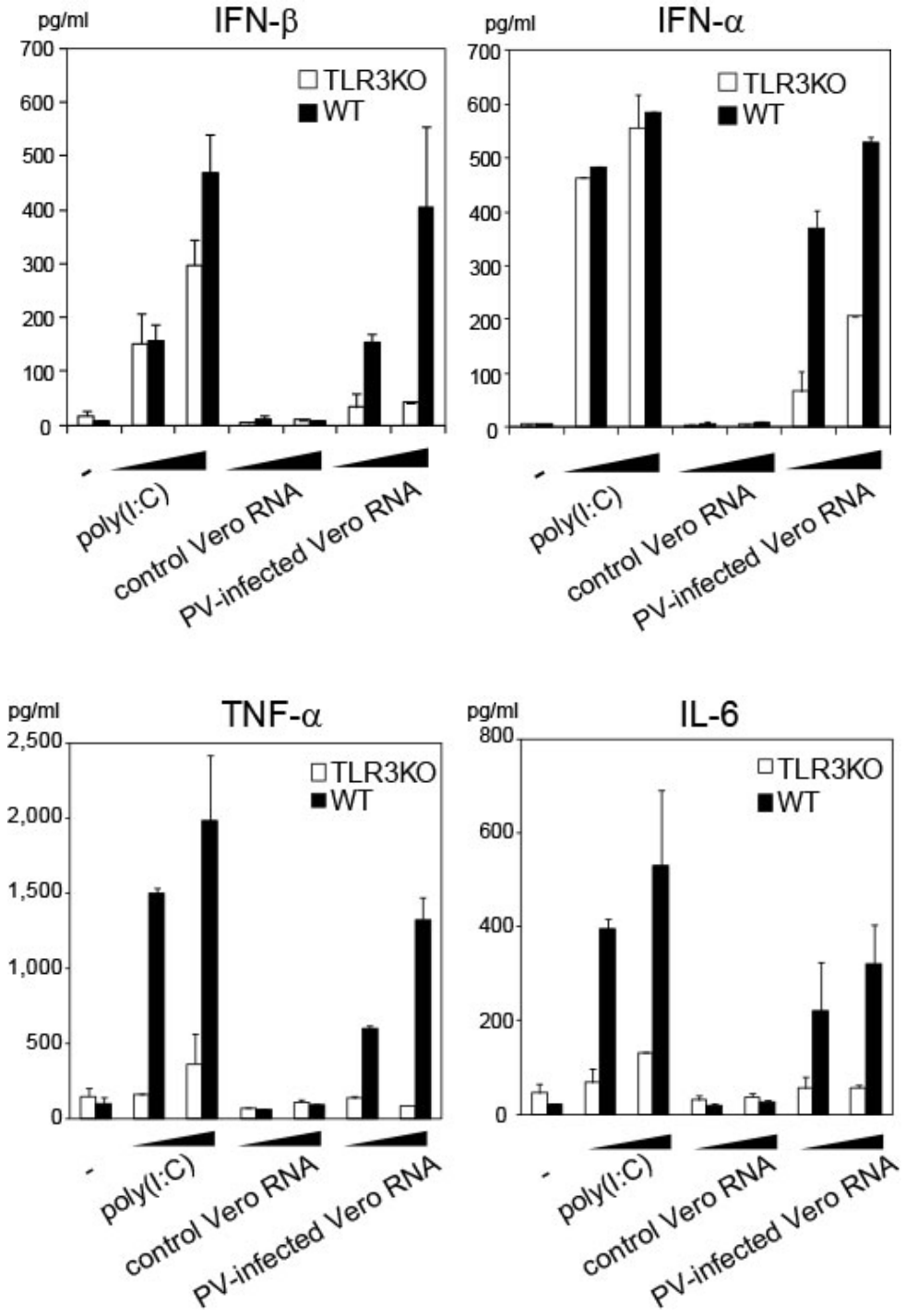


Fig.1.1　ポリオウイルス感染細胞由来の RNA による TLR3 依存的なサイトカイン産生

野生型（■）および TLR3 KO（□）マウスの脾臓より CD11c+樹状細胞を分取し、poly(I:C)、非感染 Vero 細胞由来の RNA（control Vero RNA）、およびポリオウイルス感染 Vero 細胞由来の RNA (PV-infected Vero RNA) それぞれ 25、100 μg/ml で刺激し、24 時間後の培養上清を回収した。上清に含まれる IFN-β、IFN-α、TNF-αおよび IL-6 の量を IFN については ELISA、炎症性サイトカインについては CBA により測定した。

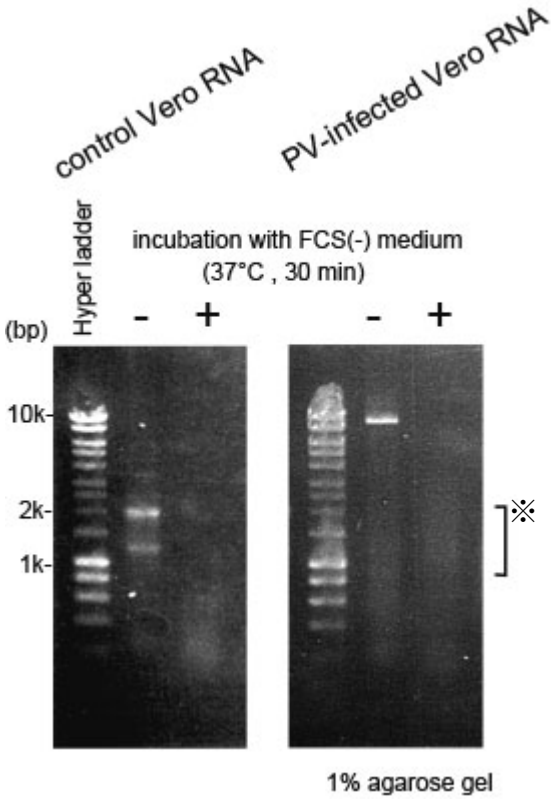


Fig.1.2　ポリオウイルス感染細胞由来の RNA のサイズ分布

非感染 Vero 細胞由来の RNA（control Vero RNA）およびポリオウイルス感染 Vero 細胞由来の RNA (PV-infected Vero RNA）を、それぞれ 0.2 μg ずつ血清を含まない培地中で 30 分間 37℃においてインキュベートした。インキュベーションなしの RNA とともに、1%アガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色して、UV 照射により観察した。※は、インキュベート後に生じた RNA を示す。

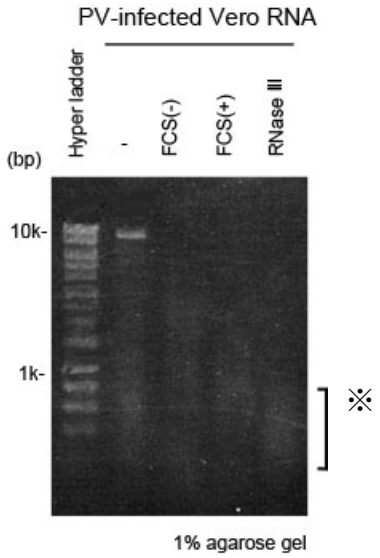


Fig.1.3.1　ポリオウイルス感染細胞由来の RNA の血清中での安定性

ポリオウイルス感染 Vero 細胞由来の RNA (PV-infected Vero RNA) (0.2 μg) を、血清を含まない培地中、血清を含む培地中、および RNase III を含む緩衝液中で 30 分間 37℃においた。インキュベーションなしの RNA とともに、1%アガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色して、UV 照射により観察した。※は、RNase III 処理により生じた RNA を示す。

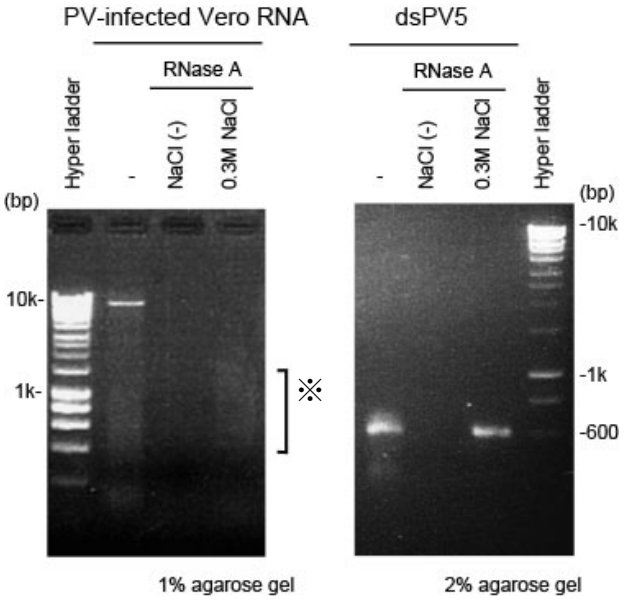


Fig.1.3.2　ポリオウイルス感細胞由来の RNA に含まれる ssRNA

ポリオウイルス感染 Vero 細胞由来の RNA (PV-infected Vero RNA) および 630 塩基対の dsRNA である dsPV5 (0.2 μg) を、0 M または 0.3 M NaCl の条件で RNase A を含む緩衝液中で 20 分間 37℃においた。インキュベーションなしの RNA とともに、1%または 2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色して、UV 照射により観察した。※は、高塩濃度条件での RNase A 処理により生じた RNA を示す。

考察

ポリオウイルス感染細胞より抽出したRNAにより、マウス脾臓細胞由来樹状細胞におけるTLR3依存的なI型IFNおよび炎症性サイトカイン産生が引き起こされることが判明した。用いたRNAは、感染細胞から全てのRNAを抽出したものであり、宿主であるVero細胞由来のRNAとポリオウイルス由来のRNAが含まれと考えられるが、ポリオウイルス感染細胞では宿主のmRNAからのタンパク合成が阻害されるシャットオフ状態になり、ウイルスのRNAが多量に産生されている。感染細胞由来のRNAではウイルス由来のRNAが大部分となり、非感染細胞由来のRNAで見られたバンドは検出されなかった。宿主由来のRNAも少量含まれている可能性があるが、非感染Vero細胞由来のRNAによるサイトカイン誘導がみられなかったことから、ポリオウイルス由来のRNAが樹状細胞に取り込まれてTLR3を活性化したと考えられる。

ポリオウイルス由来のRNAについては、(+) 鎖一本鎖RNAであるゲノムRNAだけでなく、複製により生じる 二本鎖RNAが含まれるが (66, 67)、抽出したRNAにおいて複製中間体がどの程度含まれるかは不明である。アガロースゲル電気泳動の結果、ゲノムRNAに相当する一本のバンドと広い範囲に及ぶスメアがみられ、これらのRNAは血清を含まない培地中でも分解を受けてバンドが短くなった。完全な二本鎖RNAはある程度分解耐性をもつことから、主体は二本鎖RNAではない可能性が示唆された。そこで、RNaseを用いて詳細に分解性を調べたところ、二本鎖RNAのみを切断するRNase IIIにより200塩基長程度まで分解され、検出された長いRNAのほとんどは二本鎖であることが考えられた。しかしながら、一本鎖RNAにおいても、一部相補鎖がアニーリングしていたり、部分構造を形成することで二本鎖領域を持つ場合はRNase III感受性となる場合がある。そこで、高塩濃度下では一本鎖RNAを特異的に切断するRNase Aと反応させたところ、8,000塩基長のバンドは検出できなくなり、400から1,500塩基長のスメアとなって観察された。また、RNase処理前のスメアとは中心となるサイズがずれており、8,000塩基長のバンドのみが消失したのではなく、未処理のRNAの多くは長さが変化したと考えられる。

これらのことから、ポリオウイルス感染細胞より抽出したRNAは、一本鎖RNAと二本鎖RNAの両方を含んでおり、複製中間体の二本鎖RNAは主要な構成成分とはいえず、むしろ、一本鎖RNAが非常に豊富であることがわかった。よって、樹状細胞においてTLR3依存的な応答を引き起こしたポリオウイルス由来のRNAが二本鎖RNAのみであるかは明確ではない。さらに、RNaseIIIへの感受性から、一本鎖RNAも二次構造により部分的な二本鎖構造を有する可能性が高く、TLR3が高次構造をとるRNAにより活性化されるかどうかが課題となった。そこで、次章では一本鎖RNAと二本鎖RNAに対するTLR3の応答性について検討する。

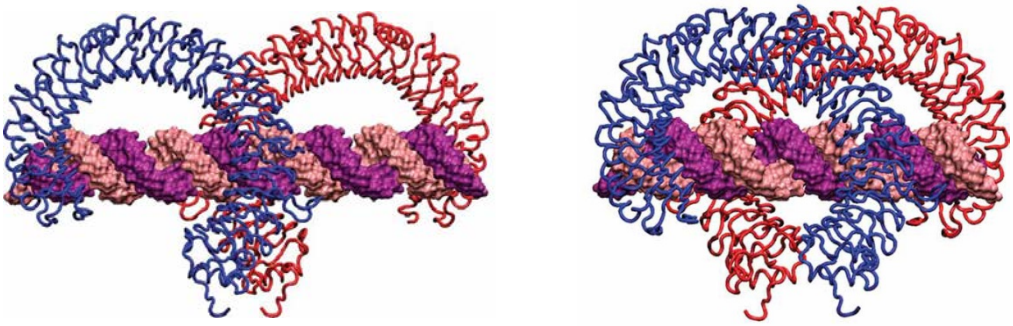
第二章　ポリオウイルスゲノムを鋳型とした in vitro 転写 RNA による TLR3 の活性化

第一章においてポリオウイルス感染細胞より抽出したRNAによってTLR3が活性化することがわかったが、一本鎖 RNA と二本鎖 RNA に分けて評価することはできないため、本章では、in vitro 転写により作製した RNA を用いて TLR3 依存的な応答について検討する。

エンドソームに局在する TLR3 のリガンドは、クラスリン依存的なエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれて TLR3 を活性化する（68)。TLR3 リガンドの細胞内への取り込みには Raftlin が必須の分子として関与することが分かっており、Raftlin はリガンド刺激により細胞質から細胞膜へ移動し、クラスリンと相互作用する。Raftlin 依存的に取り込まれたリガンドは、エンドソーム内の酸性環境で TLR3 と結合し、下流シグナル伝達を惹起する（69)。

これまで、40 から 50 塩基対以上の dsRNA が TLR3 と安定に結合し、90 塩基対以上の二本鎖 RNA が TLR3 依存的な IFN 産生誘導を行う事が報告されている（70, 71)。また、配列非依存的に 21 塩基対以上の siRNA が TLR3 依存的な細胞応答を引き起こすという報告があり（72)、21 から 30 塩基対の短い二本鎖 RNA においては、長鎖の場合と比較して TLR3 との結合の安定性は若干弱いものの、二分子の TLR3 と結合を形成することができることも知られている（73)。これらの報告は in vitro 転写反応により作製した二本鎖 RNA によるものであり、一定の長さ以上の二本鎖 RNA 構造をもつことで TLR3 を活性化することができると考えられる。

TLR3 は I 型膜貫通タンパク質であり、リガンド認識に関わる細胞外ドメインは 23 のロイシンリッチリピート（LRR）からなる。結晶構造解析により細胞外ドメインは馬蹄型をしており、正電荷を持つ残基の多い外側表面（convex surface）と、負電荷を帯び、糖鎖付加を受けたアスパラギン残基が位置する内側表面（concave surface）を持つことが分かった（74, 75)。TLR3 のリガンド結合領域は、細胞外ドメインの N 末端側と C 末端側にあり、N 末端側領域では、39 番目、60 番目のヒスチジン、C 末端側領域では 539 番目のヒスチジン、541 番目のアスパラギンがリガンドとの結合に必須のアミノ酸として同定されている（62)。実際、これらのアミノ酸の変異体では、poly(I:C)刺激による TLR3 の活性化はみられなくなることから、N 末端側、C 末端側の両方のリガンド結合領域へ二本鎖 RNA が結合すると TLR3 が活性化することがわかっている。膜上でリガンドと結合することで TLR3 が二量体として安定化され、下流へとシグナル伝達が可能となるモデルにより、RNA の長さによる TLR3 の活性化能の違いは TLR3 の多量体形成を促す効率に起因することが考えられる。(図 4)



40~50b bp　　21~30bp

図 4　TLR3 と dsRNA との結合様式
Pirher N et al. (2008) *Nat Struct Mol Biol* 15: 761-763 (73) より抜粋

ポリオウイルス感染細胞由来の RNA は、培養液中では 1,000 塩基長程度の長さが主体であったことから、刺激時に培養液に加えられた RNA は、すぐにある程度の分解を受けてから細胞内に取り込まれるものと考えられる。つまり、培養液中で安定に存在してエンドサイトーシスされることも TLR3 を活性化する条件のひとつと言える。TLR3 のリガンド結合領域に結合して TLR3 の二量体を安定化することと細胞内へエンドサイトーシスされることを TLR3 のリガンドとしての条件と考え、in vitro 転写 RNA については、その長さと培養液中での安定性に着目する。

結果

2.1　ポリオウイルスゲノムを鋳型とした in vitro 転写 RNA による TLR3 の活性化

ポリオウイルスマホニー株のゲノム全長 7441 塩基を 10 個の領域に分け、それぞれ 500 から 1,000 塩基長程度の RNA を in vitro 転写により作製し、さらに相補的な配列も作製し、アニーリングさせて二本鎖 RNA も作製した(Fig2.1.1a)。センス鎖を PV1 から PV10 とし、アンチセンス鎖を cPV1 から cPV10 とし、二本鎖 RNA を dsPV1 から dsPV10 とした。これらの RNA を以降、PV-RNA と表記する。

HEK293 細胞におけるルシフェラーゼアッセイにおいて、PV-RNA による刺激によって TLR3 依存的な IFN-βプロモータの活性化を測定したところ、二本鎖 RNA では dsPV1 から dsPV10 のすべてにおいて活性化が見られた。一方、ほとんどの一本鎖 RNA は活性がなかったが、一部の一本鎖 RNA ではプロモータ活性が上昇した(Fig.2.1.1b)。

センス鎖 RNA、アンチセンス鎖 RNA および二本鎖 RNA のうち、センス鎖から 5 つ、アンチセンス鎖、二本鎖から 3 つずつ選び、Lipofectamine 2000 を用いて細胞質内へ導入し、細胞内センサーによる IFN-βプロモータの活性化を調べた。その結果、すべての RNA によりプロモータが活性化し、細胞外からの刺激における TLR3 依存的なプロモータの活性化とは相関が見られなかった。(Fig.2.1.1c) in vitro 転写 RNA は、5'末端がリン酸されていることから、細胞内に直接導入した場合には RIG-I によって認識されると考えられた。

in vitro 転写一本鎖 RNA においても TLR3 を活性化する RNA がいくつかあったことから、一本鎖 RNA の長さによる TLR3 活性化能の違いを検討した。ポリオウイルスゲノム配列のうち、PV1 と PV2 を合わせた領域のものを PV *l*1 とし、順に PV9 と PV10 を合わせた領域の PV *l*9 までの 9 種類の一本鎖 RNA を作製した。同様にアンチセンス鎖についても cPV *l*1 から cPV *l*9 までを作製した(Fig.2.1.2a)。

長鎖 PV-RNA (PV *l*1 から PV *l*9 および cPV *l*1 から cPV *l*9) による TLR3 依存的な IFN-βプロモータの活性化を調べたところ、PV *l*4、PV *l*5、PV *l*6、cPV *l*4、cPV *l*5、cPV *l*6 において弱い活性がみられた(Fig.2.1.2b)。

さらに、PV-RNA のうち最も TLR3 活性化能の高い PV5 を 3 つの領域に分け、PV5a、PV5b および PV5c を作製した(Fig.2.1.3a)。これらの約 200 塩基長の短鎖 PV-RNA による TLR3 依存的な IFN-βプロモータの活性化を調べたところ、いずれも活性は見られなかった(Fig.2.1.3b)。

実験に使用した PV-RNA の長さおよび塩基組成を(表 4) にまとめる。

表 4

Construct	Region of the PV genome	Length (nts)	A	G	C	U
PV1	1-800	804	193	199	202	210
PV2	801-1655	855	236	210	221	190
PV3	1651-2562	912	253	209	234	216
PV4	2535-3398	864	244	188	228	203
PV5	3386-4015	630	194	150	139	147
PV6	3999-4540	542	186	115	115	126
PV7	4523-5115	593	187	133	131	142
PV8	5111-5956	846	267	204	189	186
PV9	5953-6713	761	243	186	153	179
PV10	6693-7456	766	246	152	164	204
PV/1	1-1655	1657	429	407	421	400
PV/2	801-2562	1767	489	419	455	406
PV/3	1651-3398	1748	491	390	452	415
PV/4	2535-4015	2006	435	334	363	348
PV/5	3386-4550	1155	373	261	250	271
PV/6	3999-5115	1117	367	244	242	264
PV/7	4523-5956	1434	453	335	318	328
PV/8	5111-6713	1603	510	388	340	365
PV/9	5953-7456	1506	485	333	311	377
PV5a	3386-3599	214	69	53	50	42
PV5b	3588-3841	254	67	66	58	63
PV5c	3833-4015	183	65	35	38	45

2.2　PV-RNA の培養液中での安定性

ポリオウイルスゲノムを鋳型とした in vitro 転写一本鎖 RNA の中には、TLR3 活性化能があるものとないものがあった。そこで、活性のない PV1、3、4 および cPV1 と、活性のある PV5、6 および cPV5 について、培地中での分解性を確認した。血清を含まない培地または血清を含む培地中で 30 分間 37℃においてインキュベートした後、インキュベートしないものと合わせてアガロースゲル電気泳動を行い、RNA サイズの変化を観察したところ、PV5、PV6 および cPV5 のみが血清を含む培地中でもインキュベート前のサイズを保ったバンドが検出された(Fig.2.2a)。また、PV5b の安定性についても同様に観察を行った(Fig.2.2b)。

2.3　ヒト細胞株における PV-RNA による TLR3 応答の誘導

cPV1 を TLR3 活性化能のないもの、PV5 および PV6 を活性化能のあるものとして、さらに詳細に PV-RNA による TLR3 の活性化について検討することとした。

HEK293 細胞では TLR3 を強制発現させたプロモーターアッセイにより PV-RNA による TLR3 の活性化を評価したが、内在性の TLR3 を活性化することを確認するため、TLR3 を発現している線維芽細胞および上皮細胞の細胞株を用いた。

ヒト胎児肺線維芽細胞 MRC5 細胞において、cPV1、PV5、PV6 および dsPV5 による刺激を行い、3 時間後の IFN-β、IL-6、TNF-αの mRNA 誘導を定量 PCR により測定した。その結果、HEK293 細胞と同様に、cPV1 では誘導が見られなかったのに対し、PV5、PV6 によって IFN-β、IL-6、TNF-αの mRNA 誘導が見られた。PV6 の活性はやや弱いものの、二本鎖 RNA である dsPV5 とほぼ同等の応答が確認された(Fig.2.3.1)。

ヒト子宮頸部癌細胞 HeLa 細胞において、MRC5 細胞と同様に cPV1、PV5、PV6 および dsPV5 による IFN-βの mRNA 発現誘導を定量 PCR によって測定したところ、cPV1 では誘導が見られず、PV5 および PV6 によって発現誘導が確認された(Fig.2.3.2)。

2.4　PV-RNA と TLR3 の結合性

cPV1、PV5 および PV6 で TLR3 の活性化能に違いがあったことから、活性のない cPV1 と活性のある PV5 について、TLR3 との結合活性を調べた。pH5.0 から pH7.0 の範囲でフィルターバインディングアッセイによりリコンビナントの TLR3 細胞外ドメインと結合する RNA を観測したところ、酸性条件下において、cPV1 に比べて PV5 の TLR3 に対する結合活性が強かった。また、中性条件では、どちらの RNA もほとんど結合活性を示さなかった(Fig.2.4)。

2.5　TLR3 結合変異体を用いた PV5 による TLR3 活性化

TLR3 の二本鎖 RNA 結合領域はすでに決定されており N 末端側、39、60 番目、C 末端側 539 番目のヒスチジンを変異させると、poly(I:C)による活性化は起こらない。PV5 と TLR3 の結合も同じリガンド結合領域を介しているかどうかを調べるため、HEK293 細胞に、WT TLR3 または結合変異体である H39A、H39E、H60A、H60E および H539A を発現させ、PV5 により刺激して 6 時間後の IFN-βプロモータの活性化をルシフェラーゼアッセイにより測定した。poly(I:C)と同様に、PV5 による刺激においてもすべての TLR3 結合変異体の強制発現では活性化がみられなかった(Fig.2.5)。 PV5 も二本鎖 RNA と同様に N 末端側と C 末端側の二か所の結合部位を介して TLR3 に結合すると考えられた。

2.6　PV5 の細胞内取り込みに関わる分子

Poly(I:C)刺激による TLR3 の活性化に必須の分子として Raftlin が知られている(69)。そこで、一本鎖 RNA である PV5 が poly(I:C)と同様の取り込み機構を利用するかについて検討するため、PV5 による TLR3 の活性化の場合も Raftlin が必須であるかどうかを調べた。

HEK293 細胞において、siRNA を用いて Raftlin をノックダウンし、PV5、PV6、dsPV5 による TLR3 依存的な IFN-βプロモータの活性化を測定した。Poly(I:C)と同様に、in vitro 転写一本鎖 RNA および二本鎖 RNA のすべてにおいて、Raftlin のノックダウンによりプロモータ活性が抑制された。(Fig.2.6.1a) また、コントロールとして TICAM-1 のノックダウンも行い、すべての RNA による刺激が TICAM-1 依存的であることも確認した。また、Raftlin および TICAM-1 のノックダウンは、ウエスタンブロットにより確認した(Fig.2.6.1b)。

内在性 TLR3 の活性化において Raftlin 依存的な取り込みが必要であることを確認するため、HeLa 細胞を用いた。HeLa 細胞において、HEK293 細胞と同様に siRNA により Raftlin をノックダウンし、PV5 によって刺激を加えたところ、3 時間後の IFN-β mRNA 発現誘導は、Raftlin のノックダウンにより減弱した(Fig.2.6.2a)。このときの Raftlin のノックダウンは、定量 PCR により確認した(Fig.2.6.2b)。

Poly(I:C)の取り込みは ODN により競合阻害されることから、poly(I:C)と ODN は共通の未同定の取り込みレセプターを介して起こると考えられている(68, 76, 77)。PV5 も同じレセプターによって細胞内へ入るかどうかを調べるため、PV5 による TLR3 活性化における ODN による阻害を検討した。HEK293 細胞において、PV5 刺激による IFN-βプロモータの活性化は、ODN2006 の容量依存的に抑制されたことから、PV も poly(I:C)/ODN の取り込みレセプターを介して細胞内へと取り込まれると考えられる (Fig.2.6.3)。

2.7　PV5 の細胞内取り込みおよび TLR3 との共局在

Poly(I:C)は、細胞外から刺激すると、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、エンドソーム内で TLR3 と相互作用する。PV5 も poly(I:C)と同様に Raftlin 依存的に応答を引き起こすことから、取り込みも同様の機構で起こることが想定される。そこで、PV5 が細胞内に取り込まれてエンドソーム内に入る様子を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

HeLa 細胞において、Cy3 で標識した PV5 を細胞外から加えて 4℃で 30 分間反応させて細胞膜へ付着させ、非特異的な結合を避けるために細胞表面をよく洗浄した後、37℃へ移して 0、5、15、30、60 分後の細胞を観察した。0 分では細胞表面に PV5 が結合している様子が観察され、5 分後ではエンドソームマーカである EEA1 と共局在した。その後 15 分後では EEA1 と TLR3 と三者で共局在しており、30 分、60 分後には一部 TLR3 と共局在していた。また、ライソソームマーカである LAMP1 との共局在は 15 分後まではほとんどみられず、30 分後以降ではよく共局在した(Fig.2.7.1a)。また、EEA1、TLR3、

LAMP1 と共局在する PV5 の割合をそれぞれの時間ごとに計測し、グラフに表した(Fig.2.7.1b)。

2.8　マウス免疫担当細胞における PV-RNA による IFN 産生

免疫系の細胞における PV-RNA による TLR3 の活性化について調べるため、マウス細胞より調製したマクロファージおよび樹状細胞を用いて IFN や炎症性サイトカインの産生誘導について検討した。また、TLR3 KO マウスを利用することで TLR3 依存性についても確かめた。

マウスの骨髄よりマクロファージを誘導し、cPV1、PV5、PV6 および dsPV5 により細胞外から刺激し、24 時間後の培養上清を回収した。培養上清中の IFN-βを ELISA により測定したところ、cPV1 に比べ、PV5、PV6、dsPV5 刺激により IFN-β産生が多く、ヒト細胞における応答と同様の結果が得られた(Fig.2.8.1)。

野生型および TLR3 KO マウスの脾臓から CD11c 陽性樹状細胞を分取し、cPV1、PV5、PV6 および dsPV5 により細胞外から刺激し、24 時間後の培養上清中の IFN および炎症性サイトカインの産生量をそれぞれ ELISA および CBA により測定した。野生型マウス由来の樹状細胞における IFN-β、IFN-α、TNF-αおよび IL-6 の産生は、cPV1 と比較して PV5、PV6、dsPV5 による刺激時に大きく誘導された。さらに、TLR3 KO マウス由来の樹状細胞では、PV-RNA による IFN およびサイトカインの産生は見られなかった(Fig.2.8.2)。

マウス樹状細胞のサブセットの中で、CD8 陽性樹状細胞は特に TLR3 を強く発現している(78)。野生型および TLR3 KO マウスの脾臓より CD11c 陽性 CD8 陽性樹状細胞を分取し、cPV1、PV5、PV6 および dsPV5 により細胞外から刺激し、24 時間後の培養上清中の TNF-αおよび IL-6 の産生量を CBA により測定した。cPV1 によるサイトカイン産生はやや少ないながらもすべての PV-RNA 刺激により TNF-α、IL-6 が TLR3 依存的に産生された(Fig.2.8.3a)。この時使用した CD11c 陽性 CD8 陽性樹状細胞について、精製度を Facs により確認したところ、90%以上であった。また、TLR3 抗体を用いて細胞内染色し、TLR3 の発現を確認した（Fig.2.8.3b)。

2.9　CD8 陽性樹状細胞における PV5 と TLR3 との共局在

TLR3 を強く発現する、マウス CD8 陽性樹状細胞において、PV5 が細胞内へ取り込まれる様子を顕微鏡観察した。

野生型マウス脾臓より分取した CD11c 陽性 CD8 陽性樹状細胞を抗 TLR3 抗体で染色し、cy3 標識した PV5 を用いて刺激して共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。Cy3 標識 PV5 による刺激後 15 分、30 分において、PV5 は細胞内に取り込まれて TLR3 と共局在した(Fig.2.9)。

2.10　PV5 刺激における TLR3 依存的な応答への RNase 処理の影響

PV5 による TLR3 活性化が RNA 構造に由来することを示すため、二本鎖 RNA を切断する RNase III により poly(I:C)および PV5 を消化した後、マウスの脾臓由来樹状細胞を刺激し、24 時間後の培養上清中のサイトカイン産生を調べた。Poly(I:C)および PV5 による TNF-α、IL-6 の産生誘導は、RNase III 処理により減弱した(Fig.2.10.1a)。RNase III 処理による RNA の分解はアガロースゲル電気泳動で確認した（Fig.2.10.1b)。

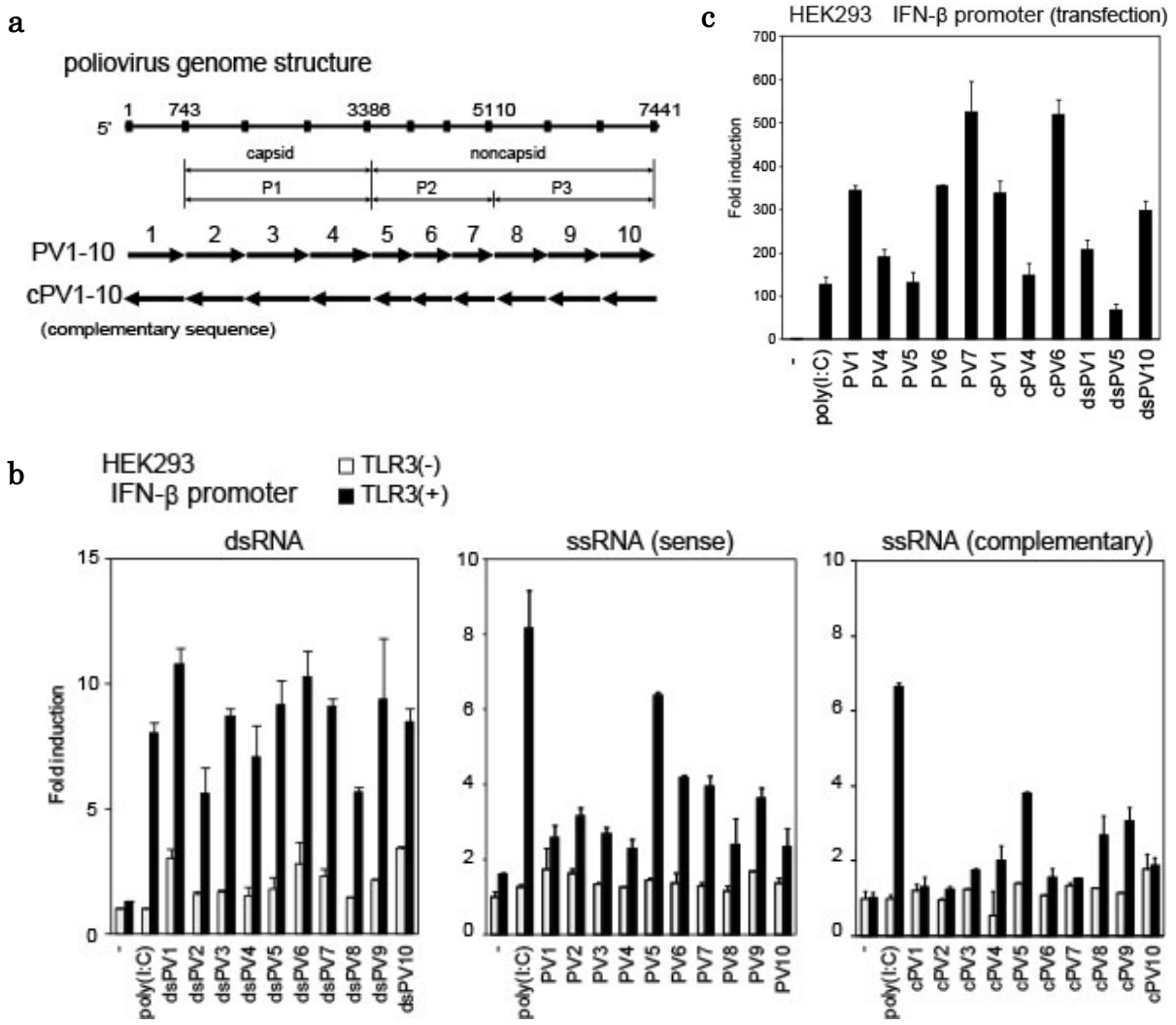


Fig.2.1.1　PV-RNA による IFN-βプロモータの活性化

a)　作製した PV-RNA のポリオウイルスゲノム配列における位置

b)　PV-RNA による TLR3 依存的 IFN-βプロモータの活性化

HEK293 細胞において、p125 レポーター、内部標準ウミシイタケルシフェラーゼ プラスミドと共に、空ベクター（□）または TLR3 発現ベクター（■）を導入した。24 時間後に poly(I:C)または PV-RNA（10 μg/ml）を細胞外に加え、刺激 6 時間後に細胞を回収し、可溶化した。ルミノメーターを用いて、細胞可溶化液のルシフェラーゼ活性を測定し、内部標準で補正した後、TLR3 非発現における無刺激状態を基準として、プロモータ活性の相対値をグラフ化した。

c)　PV-RNA による RLR 依存的 IFN-βプロモータの活性化

HEK293 細胞において、p125 レポーター、内部標準ウミシイタケルシフェラーゼ プラスミドを導入した。24 時間後に Lipofectamine2000 を用いて poly(I:C)または PV-RNA（1.0 μg/well）を細胞質内へ送り、刺激 24 時間後に細胞を回収し、可溶化した。ルミノメーターを用いて、細胞可溶化液のルシフェラーゼ活性を測定し、内部標準で補正した後、無刺激状態を基準として、プロモータ活性の相対値をグラフ化した。

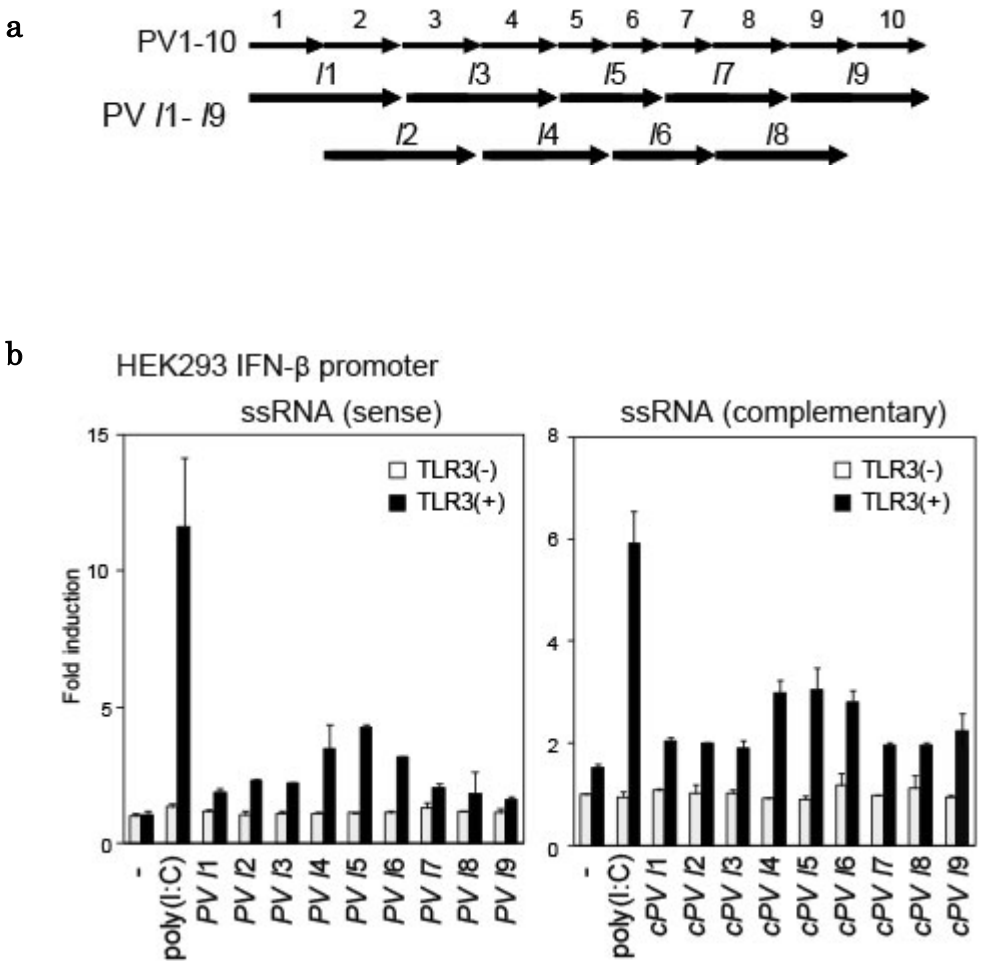


Fig.2.1.2　長鎖 PV-RNA による TLR3 依存的 IFN-βプロモータの活性化

a)　作製した長鎖 PV-RNA の、ポリオウイルスゲノム配列における位置

b)　長鎖 PV-RNA による TLR3 依存的 IFN-βプロモータの活性化

HEK293 細胞において、p125 レポーター、内部標準ウミシイタケルシフェラーゼ プラスミドと共に、空ベクター(□) または TLR3 発現ベクター (■)を導入した。24 時間後に poly(I:C)または長鎖 PV-RNA (10 μg/ml) を細胞外に加え、刺激 6 時間後に細胞を回収し、可溶化した。ルミノメーターを用いて、細胞可溶化液のルシフェラーゼ活性を測定し、内部標準で補正した後、TLR3 非発現における無刺激状態を基準として、プロモータ活性の相対値をグラフ化した。

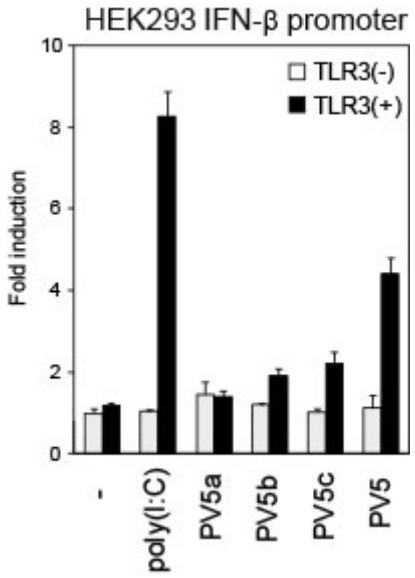


Fig.2.1.3　短鎖 PV-RNA による TLR3 依存的 IFN-βプロモータの活性化

HEK293 細胞において、p125 レポーター、内部標準ウミシイタケルシフェラーゼ プラスミドと共に、空ベクター(□) または TLR3 発現ベクター (■)を導入した。24 時間後に poly(I:C)または短鎖 PV-RNA (PV5a, PV5b, PV5c) (10 μg/ml) を細胞外に加え、刺激 6 時間後に細胞を回収し、可溶化した。ルミノメーターを用いて、細胞可溶化液のルシフェラーゼ活性を測定し、内部標準で補正した後、TLR3 非発現における無刺激状態を基準として、プロモータ活性の相対値をグラフ化した。

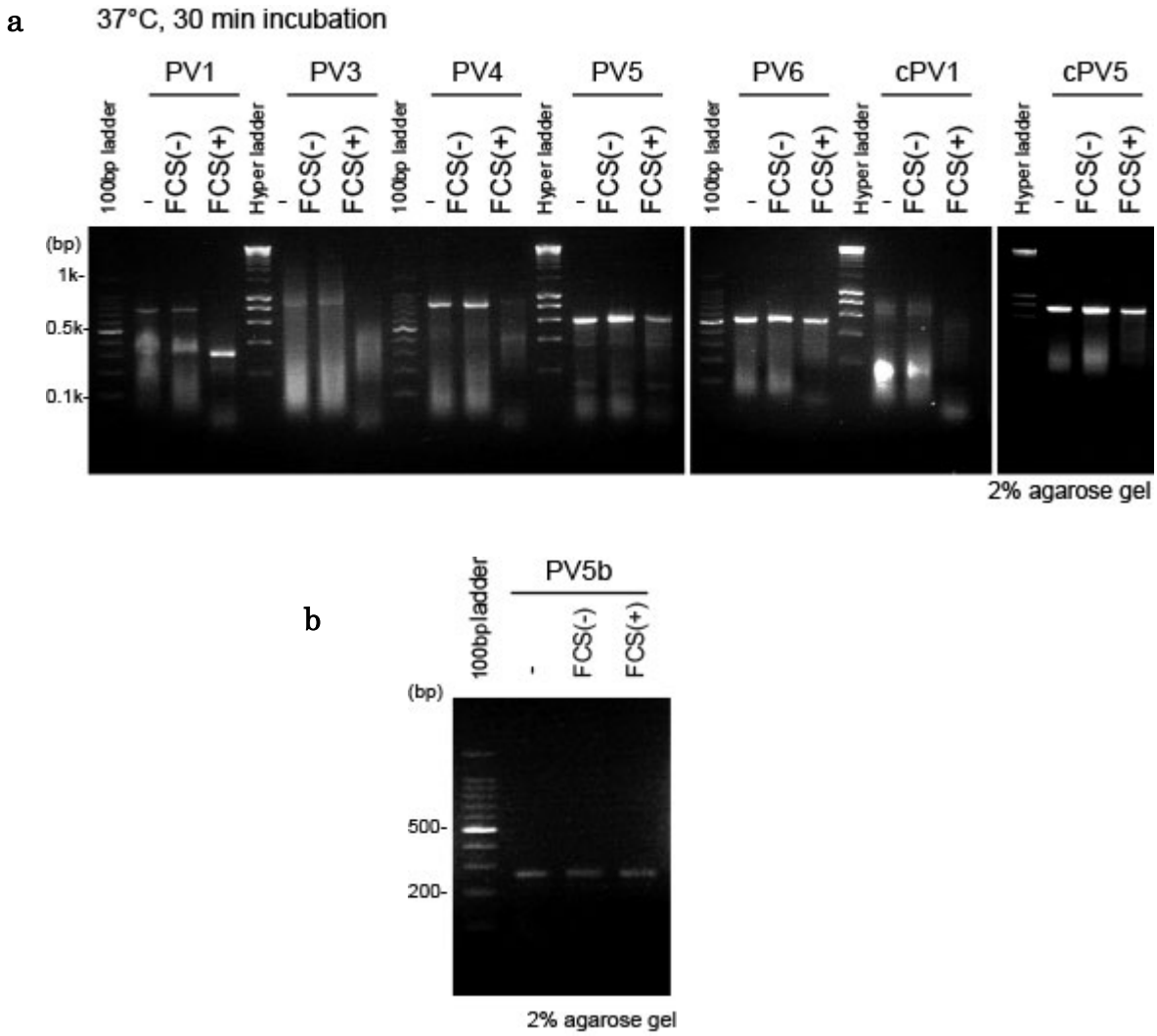


Fig.2.2　PV-RNA の培地中での分解

PV-RNA　(0.2 μg) **(a)** および短鎖 PV-RNA である PV5b (0.2 μg) **(b)** を、血清を含まない培地または含む培地中で 30 分間 37℃においてインキュベートした。インキュベーションなしの RNA とともに、2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色して、UV 照射により観察した。

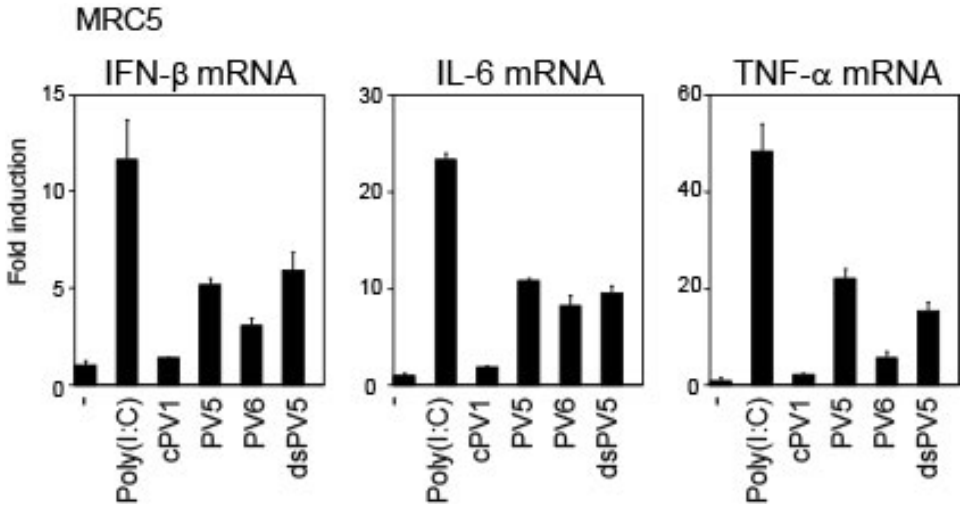


Fig.2.3.1　PV-RNA による TLR3 依存的サイトカイン産生

MRC-5 細胞において、poly(I:C)または PV-RNA (10 μg/ml) を細胞外に加え、刺激 3 時間後に細胞から RNA を抽出し、ランダムプライマーにより逆転写を行って cDNA を得た。cDNA から定量 PCR により GAPDH、IFN-β、IL-6、および TNF-αの mRNA 量を測定し、GAPDH を内部標準として無刺激状態を基準とした発現量の値をグラフに表す。

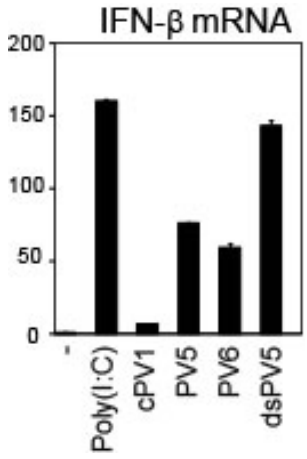


Fig.2.3.2　PV-RNA による IFN –β mRNA 誘導

HeLa 細胞において、poly(I:C)または PV-RNA (10 μg/ml)を細胞外に加え、刺激 3 時間後に細胞から RNA を抽出し、ランダムプライマーにより逆転写を行って cDNA を得た。cDNA から定量 PCR により GAPDH、IFN-βの mRNA 量を測定し、GAPDH を内部標準として無刺激状態を基準とした発現量の値をグラフに表す。

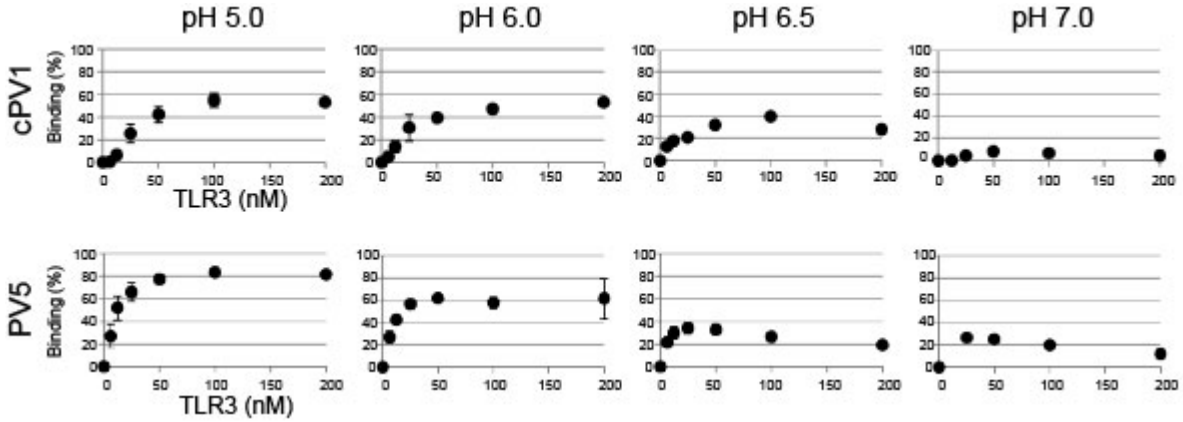


Fig.2.4　PV-RNA と TLR3 の結合性

^{32}P により放射性同位体ラベルした cPV1 と PV5 を、リコンビナント TLR3 タンパク質と各 pH の緩衝液中で反応させた。反応液についてニトロセルロースフィルタを通過させ、タンパク質と核酸の結合によりフィルタ上に残った RNA の量を放射性エネルギーセンサーを用いて測定した。横軸に反応に使用した TLR3 タンパク質の量を、縦軸に使用した RNA の総量における、フィルタ上に残存した RNA、つまり TLR3 と結合した RNA 量の割合を表す。

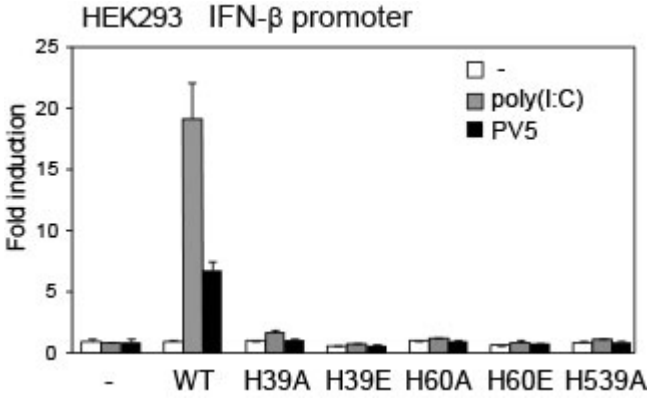


Fig.2.5　PV5 刺激における TLR3 のリガンド結合変異体発現の影響

HEK293 細胞において、p125 レポーター、内部標準ウミシイタケルシフェラーゼ プラスミドと共に、空ベクターまたは TLR3 WT、および 5 種類の TLR3 リガンド結合領域変異体の発現ベクターを導入した。24 時間後に培地（□）、poly(I:C) (10 μg/ml)(▩)、または PV5 (10 μg/ml) (■) を細胞外に加え、刺激 6 時間後に細胞を回収し、可溶化した。ルミノメーターを用いて、細胞可溶化液のルシフェラーゼ活性を測定し、内部標準で補正した後、TLR3 非発現における無刺激状態を基準として、プロモータ活性の相対値をグラフ化した。

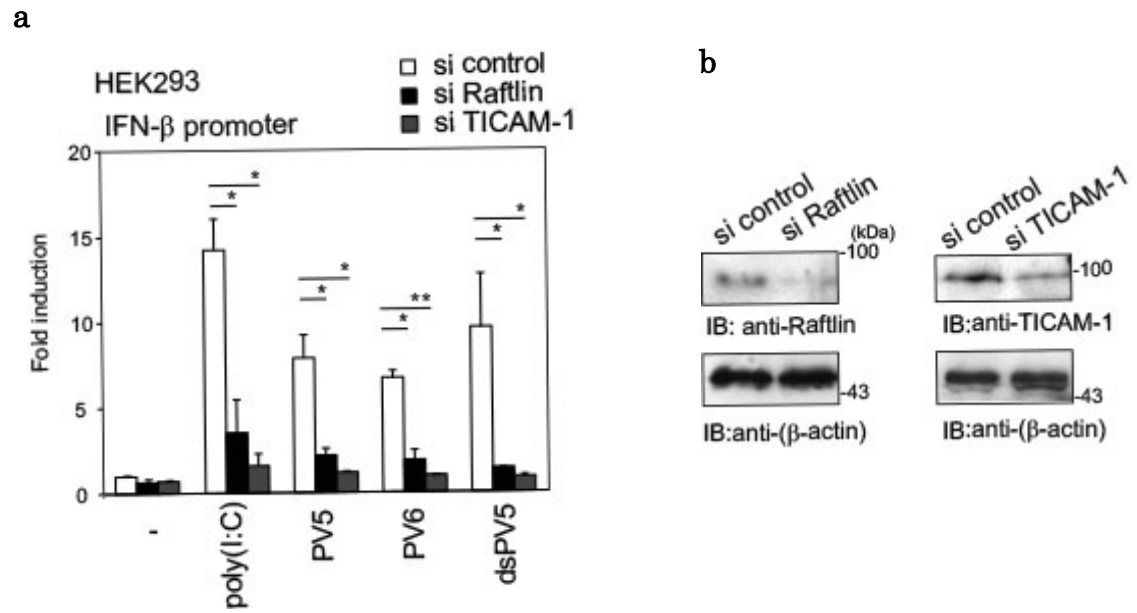


Fig.2.6.1　PV-RNA による TLR3 依存的 IFN-βプロモータの活性化における Raftlin の関与

HEK293 細胞において、p125 レポーター、内部標準ウミシイタケルシフェラーゼ プラスミドと共に TLR3 発現ベクターを導入した。同時に control si RNA (□)、Raftlin siRNA (■) および TICAM-1 siRNA (■)を導入してノックダウンを行った。48 時間後に poly(I:C)または PV-RNA を細胞外に加え、刺激 6 時間後に細胞を回収し、可溶化した。ルミノメーターを用いて、細胞可溶化液のルシフェラーゼ活性を測定し、内部標準で補正した後、control　siRNA 導入における無刺激状態を基準として、プロモータ活性の相対値をグラフ化した **(a)**。(*p<0.05、**p<0.01)

control siRNA の導入細胞および Rafltlin、TICAM-1 のノックダウン細胞の細胞可溶化液に SDS サンプルバッファーを加えボイルし、10% アクリルアミドゲルにより分離した。Raftlin のノックダウンは抗 Raftlin 抗体、TICAM-1 のノックダウンは抗 TICAM-1 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。コントロールとして、それぞれ抗β-actin 抗体によるブロットを行った **(b)** 。

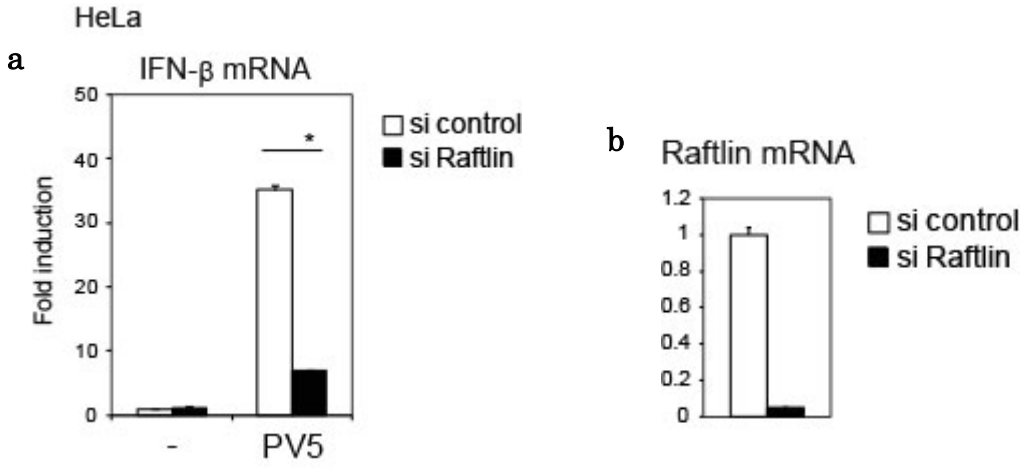


Fig.2.6.2　PV-RNA による TLR3 依存的 IFN-βプロモータの活性化における Raftlin の関与

HeLa 細胞において、control siRNA (□) および Raftlin siRNA を（■）導入してノックダウンを行い、48 時間後に PV5 (10 μg/ml) を細胞外に加えた。刺激 3 時間後に細胞から RNA を抽出しランダムプライマーにより逆転写を行って cDNA を得た。cDNA から定量 PCR により GAPDH および IFN-βの mRNA 量を測定し、GAPDH を内部標準として control siRNA 導入細胞における無刺激状態を基準とした発現量の値をグラフに表す **(a)**。(*$p<0.05$)

定量 PCR により同様に Raftlin の mRNA 量を測定し、GAPDH を内部標準として control siRNA 導入細胞を基準とした発現量の値をグラフに表す **(b)** 。

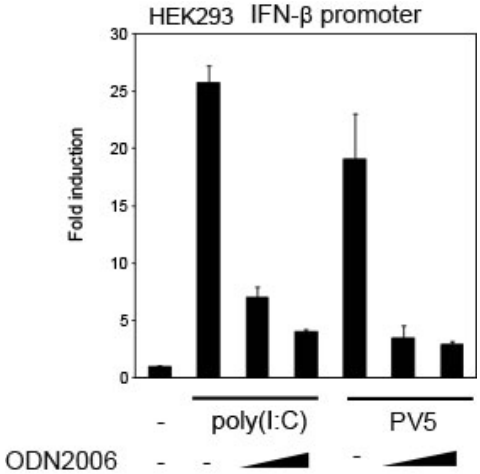


Fig.2.6.3　ODN2006 前処理による PV5 依存的 IFN-βプロモータの活性化への影響

HEK293 細胞において、p125 レポーター、内部標準ウミシイタケルシフェラーゼ プラスミドと共に TLR3 発現ベクターを導入した。24 時間後に ODN2006 (invivogen) を 0, 5, 20 μg/ml の濃度で培地に加え、1 時間後に poly(I:C)または PV5 による刺激（10 μg/ml）を加えた。刺激 6 時間後に細胞を回収し、可溶化した。ルミノメーターを用いて、細胞可溶化液のルシフェラーゼ活性を測定し、内部標準で補正した後、無刺激状態を基準として、プロモータ活性の相対値をグラフ化した。

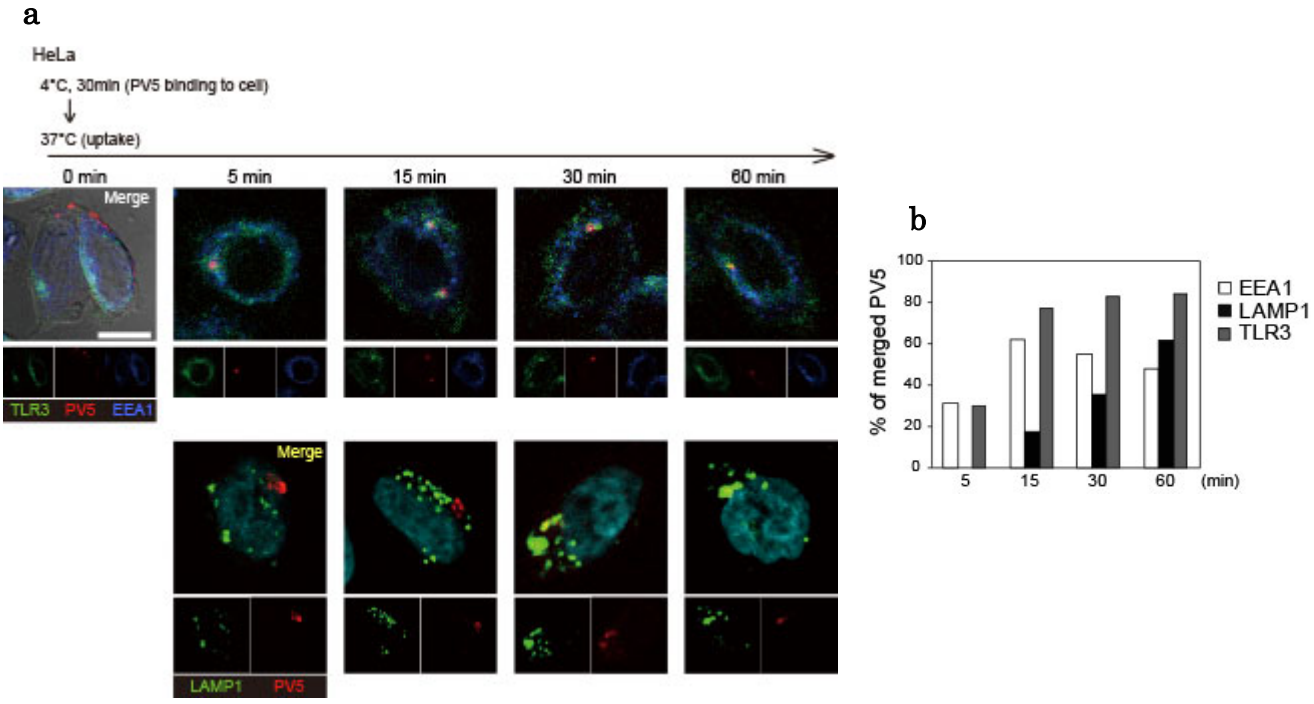


Fig.2.7.1　PV5 の細胞内への取り込みおよび TLR3、エンドソームマーカとの共局在

カバーガラスに播種した HeLa 細胞において、cy3 標識した PV5 (15 μg/ml) を 30 分間、4℃でインキュベートして細胞表面へ結合させ、洗浄後、37℃でインキュベートし、0、5、15、30、60 分後に細胞を固定し、膜の透過処理をおこなった。抗 EEA1 抗体と抗 TLR3 抗体、または抗 LAMP1 抗体単独で抗体反応を行い、Alexa 結合二次抗体により染色した後、洗浄、風乾させて、ProLong Gold を用いて封入した。共焦点レーザー顕微鏡により観察し、それぞれの刺激時間での代表的な写真を示す **(a)**。

上段では TLR3 を緑、PV5 を赤、エンドソームマーカである EEA1 を青色で表示する。このとき、三者のマージは白色で示される。下段ではライソソームマーカである LAMP1 を緑、PV5 を赤、核を水色で表示する。このとき、LAMP1 と PV5 のマージは黄色で示さる。37℃での反応時間が 0 分のものに限り、透過光での画像とマージさせた写真である。(スケール ;10 μm)

各インキュベート時間ごとに、エンドソーム、ライソソームマーカおよび TLR3 と共局在する割合をグラフで示す **(b)**。　少なくとも 70 個の PV5 シグナルをを観察して計数した。

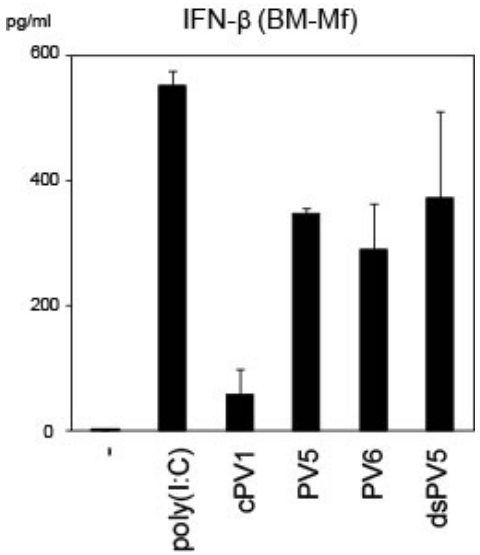


Fig.2.8.1　マウス骨髄由来マクロファージにおける PV-RNA による応答

マウスの骨髄細胞よりマクロファージを誘導し、poly(I:C)および PV-RNA (20 μg/ml) により細胞外から刺激した。24 時間後の培養上清を回収し、上清に含まれる IFN-βの量を ELISA により測定した。

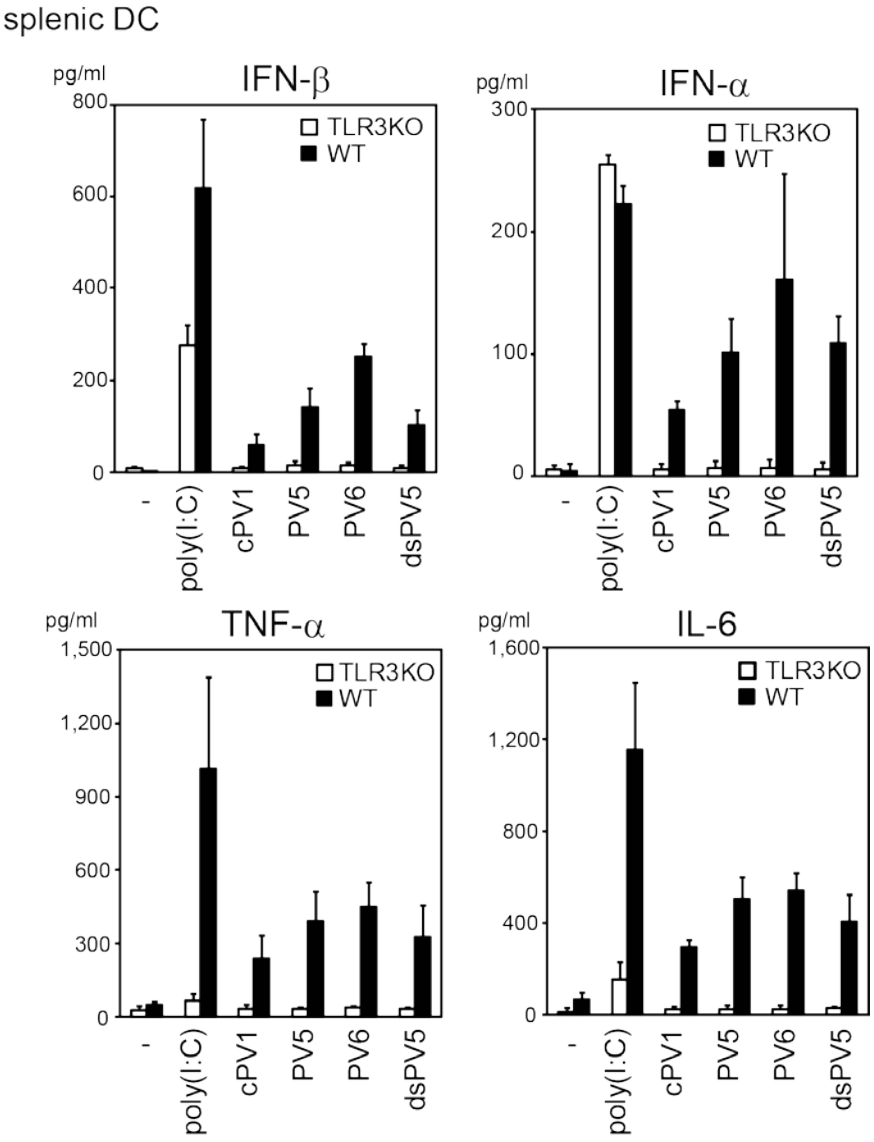


Fig.2.8.2　マウス樹状細胞における PV-RNA によるサイトカイン産生

野生型(■)および TLR3 KO（□）マウスの脾臓より CD11 c +樹状細胞を分取し、poly(I:C)および PV-RNA (20μg/ml) で刺激し、24 時間後の培養上清を回収した。上清に含まれる IFN-β、IFN-α、TNF-α および IL-6 の量を、IFN については ELISA、炎症性サイトカインについては CBA により測定した。

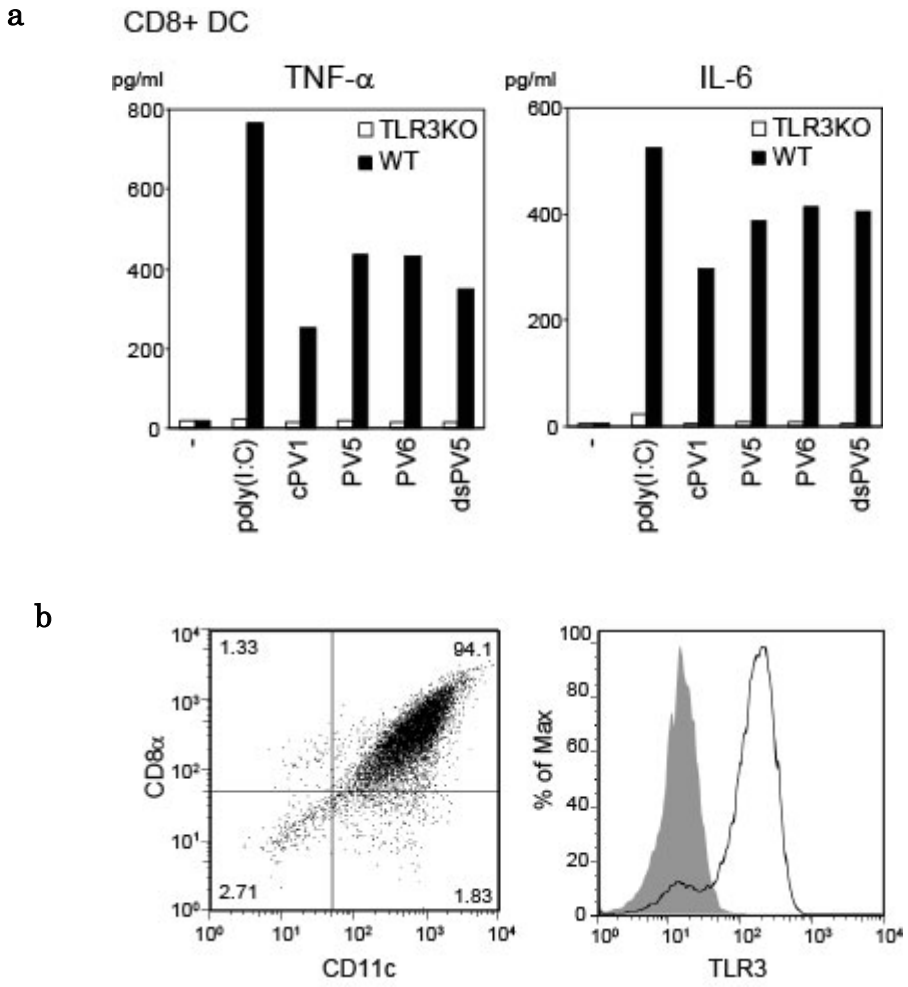


Fig.2.8.3　マウス CD8 陽性樹状細胞における、PV-RNA によるサイトカイン産生

a)　CD8 陽性樹状細胞における PV-RNA による TLR3 依存的応答

野生型（■）および TLR3 KO（□）マウスの脾臓より CD11 c +/CD8α+樹状細胞を分取し、poly(I:C)および PV-RNA（20μg/ml）で刺激し、24 時間後の培養上清を回収した。上清に含まれる TNF-αおよび IL-6 の量を CBA により測定した。

b)　CD8 陽性樹状細胞の精製度と TLR3 発現

マウス脾臓より分取した CD11 c +/CD8α+樹状細胞を、蛍光標識抗 CD11c 抗体および抗 CD8α抗体により染色し、Facs clibur により解析した。

野生型および TLR3 KO マウスの脾臓より分取した CD11c+/CD8α+樹状細胞を、cytofix/cytoperm kit (BD Biosciencce）により固定、透過処理し、蛍光標識抗 muTLR3 抗体により染色した後、Facs calibur により解析した。

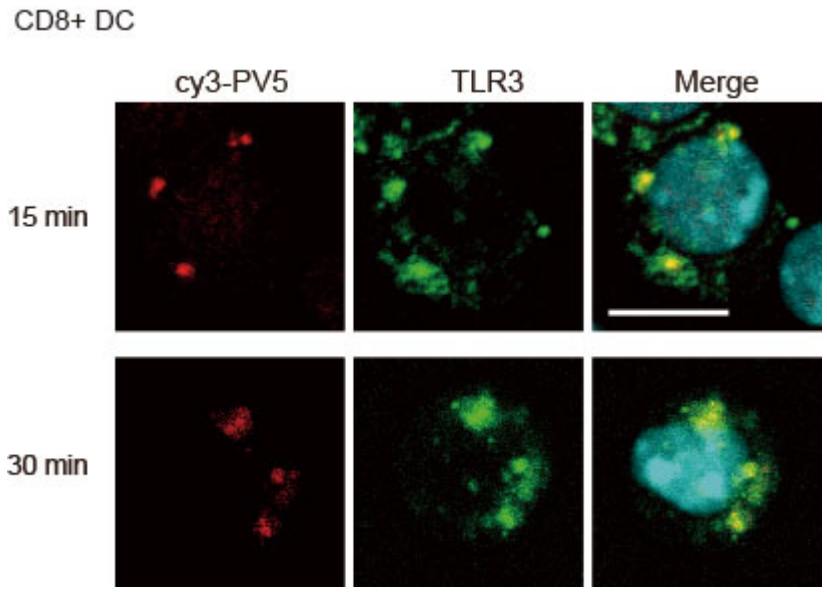


Fig.2.9　CD8α陽性樹状細胞における PV5 と TLR3 の共局在

マウス脾臓より分取した CD11c+/CD8α+樹状細胞を HeLa 細胞において、cy3 標識した PV5 により刺激した。37℃でインキュベートして 15 分、30 分後に、cytofix/cytoperm を用いて細胞の固定および膜の透過処理を行った。蛍光標識抗 muTLR3 抗体により染色を行い、cytospin によりスライドガラスへ付着させた。ProLong Gold を用いて封入した後、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。それぞれの刺激時間での代表的な写真を示す。

TLR3 を緑、PV5 を赤、核を水色で表示する。TLR3 と PV5 の共局在は黄色で示される。

(スケール ；10 μm)

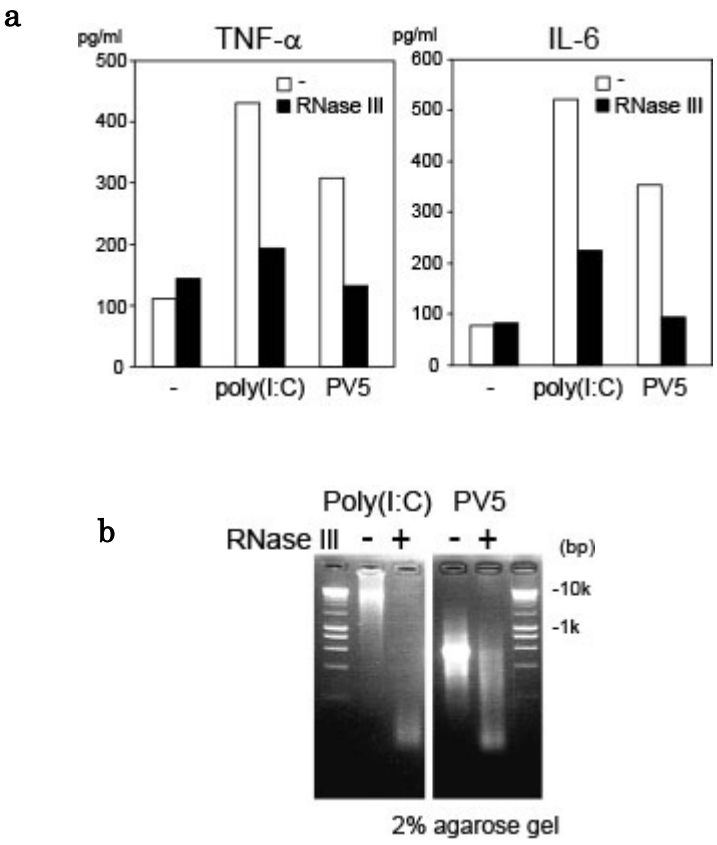


Fig.2.10.1　PV5 の RNA 構造による TLR3 の活性化

RNase III により 30 分間、37℃で処理した poly(I:C)および PV-RNA (20 μg/ml) (■) または未処理の poly(I:C)および PV-RNA (20 μg/ml) (□) により、野生型マウスの脾臓より分取した CD11c+樹状細胞に対して細胞外から刺激した。24 時間後の培養上清を回収し、上清に含まれる TNF-αおよび IL-6 の量を CBA により測定した。未処理のコントロールでは、RNase を含まない緩衝液中で 30 分間 37℃インキュベートした poly(I:C)および PV-RNA を用いた **(a)**。

また、RNase III 処理または未処理の poly(I:C)および PV5 を、2%アガロースゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイドにより染色して、紫外線を照射して可視化した **(b)**。

考察

ポリオウイルスのゲノムを鋳型として in vitro 転写にて作製した RNA (PV-RNA) について、TLR3 を活性化する能力を調べた。センス鎖とアンチセンス鎖をアニーリングさせた二本鎖 RNA である dsPV1 から dsPV10 ではすべて TLR3 依存的に IFN-βプロモータを活性化した。一本鎖 RNA である PV1 から PV10、cPV1 から cPV1 では、活性化が見られるものと見られないものがあり、平均して 3 倍以上のプロモータ活性の増強が見られるものは、PV5、PV6、PV9、cPV5 および cPV9 の 5 種類であった。活性があるものとないものを選んで培養液中での安定性を観察したところ、TLR3 を活性化した RNA はすべて血清を含む培地中でも構造を保っていることがわかった (Fig.2.1、Fig.2.2)。

一本鎖 RNA は、部分的に二本鎖構造を作り、ステムやループ、バルジといった内部の二次構造を形成することが知られている。一本鎖 RNA の安定性はこの二次構造によって決定すると考えられ、部分的二本鎖が占める割合が大きいほど安定であることが予想される。つまり安定な構造である程二本鎖部分が多く、TLR3 に認識されるのも同様に二本鎖部分であることが、一本鎖 RNA における安定性と TLR3 の活性化能の相関の要因であると考えることができる。また、RNA が TLR3 に認識されるためには、細胞外から細胞内に取り込まれる必要があることから、実験的には培地中で、生体内では細胞外の環境において分解されずに取り込みレセプターによって認識されることが、TLR3 のリガンドとなる RNA のひとつの条件となることも考えられる。

また、長さの異なる PV-RNA による TLR3 の活性化を同様のプロモーターアッセイで評価すると、およそ 2 倍の塩基長の RNA である PV *l*1 から PV l9、cPV *l*1 から cPV *l*9 では強い活性のあるものがなく、1/3 程度の塩基長の RNA では全く活性がみられなかった。さらに、活性のなかった PV5b は、血清を含む培地中でも安定であった。したがって、一本鎖 RNA による TLR3 の活性化においては、比較的安定な構造を維持できることと、適切な長さを有することが必要であると考えられる。

これまで、TLR3 を活性化するのは二本鎖 RNA であると考えられてきたが、本研究では、一本鎖 RNA においても TLR3 活性化能を有する可能性が示唆された。そこで、一本鎖 RNA による TLR3 の活性化も二本鎖 RNA による場合と同様の分子機構によって起こるかどうかについて、細胞外からエンドソームへの取り込み機構および TLR3 細胞外ドメインのリガンド結合領域の共通性の点から検討した。

Poly(I:C)はクラスリン依存的なエンドサイトーシスによって取り込まれ (68)、これは Raftlin 依存的に起こる (69)。Raftlin のノックダウンにより PV5 刺激による TLR3 応答が減弱したことから、PV5 も Rafltlin 依存的に細胞内へ取り込まれることがわかった。また、poly(I:C)と同様に PV5 による TLR3 の活性化も TLR3 のリガンド結合領域のアミノ酸変異体を用いた場合にはみられなくなったことから、PV5 と TLR3 の結合も 2 箇所の二本鎖 RNA 結合領域を介していることが明らかとなった。

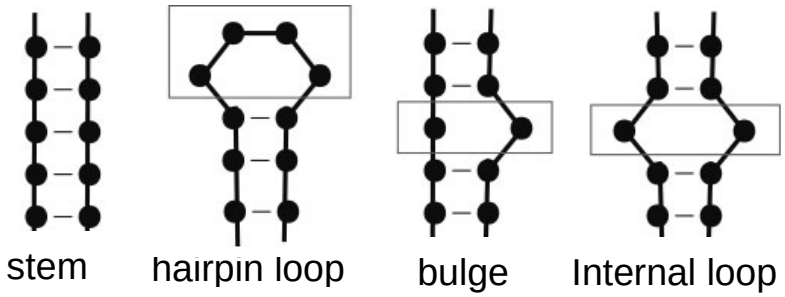
MRC5 細胞や HeLa 細胞において、PV5、PV6 刺激により IFN-β mRNA 発現誘導がみられたが、cPV1 による刺激ではみられなかった。一方、マウス脾臓由来樹状細胞では、PV5、PV6 により TLR3 依存的な IFN 産生がみられ、cPV1 によっても若干弱いながら IFN の産生誘導が観察された。このことは、一本鎖 RNA の取り込みまたは TLR3 による一本鎖 RNA の認識の範囲が、ヒトとマウスの間、あるいは細

胞の種類によって異なる可能性を示唆している。マウスおよびヒト TLR3 を活性化することのできる一本鎖 RNA の構造について、二次構造に着目して次章で検討する。

第三章　TLR3 を活性化する一本鎖 RNA の構造

一本鎖 RNA は、配列によって部分的に A-U、C-G、また場合によっては G-U の塩基対を形成することで二次構造をとることが知られている (79-81)。二本鎖部分をステム構造、ステムをつなぐ一本鎖部分をループ構造といい、ループ構造はさらに、ヘアピンループ、バルジ、インターナルループと呼ばれる構造に分けられる。(図 5） 一本鎖 RNA の二次構造については、いくつかの解析ソフトが公開されており、それぞれのアルゴリズムにより計算を行って最もエネルギー的に安定な二次構造を予測することができる。

（図 5）



第二章で、in vitro 転写により作製した一本鎖 RNA は、TLR3 を活性化するものとしないものに分けられた。TLR3 のリガンドは、基本的には二本鎖 RNA と考えられており、一本鎖 RNA の部分的な二本鎖構造が TLR3 に結合することで活性化する可能性がある。500 から 1,000 塩基長程度の PV-RNA では TLR3 を活性化するものがあったのに対して、1,500 から 2,000 塩基長程度の PV-RNA ではほとんど活性化がみられなかったことから、一本鎖 RNA が TLR3 に認識されるには、適切な長さがあると考えられる。

これまでに、二本鎖 RNA と TLR3 の結合について、40 から 50 塩基対が TLR3 の二量体化を起こす最小単位で、90 塩基対以上で TLR3 を多量体化させることでシグナル伝達を効率的に活性化することが報告されている (71)。さらに、21 から 30 塩基対の二本鎖 RNA でも、安定性は劣るものの二分子の TLR3 と結合を形成できることが明らかとなっている (73)。これらの報告から一本鎖 RNA の部分的な二本鎖構造が TLR3 に認識されるためには、ステム構造の長さが重要であると考えられる。さらに、二本鎖 RNA の場合と異なり、一本鎖 RNA が複雑な高次構造をとりすぎる場合には TLR3 に認識される際に立体的な障害となる部分が生じることでリガンドとして機能せず、このことが一本鎖 RNA よる TLR3 の活性化能の理解を複雑にしている可能性がある。

本章では、PV-RNA の二次構造、特に最も強い TLR3 活性化能を有する PV5 の二次構造について解析を行う。さらに二次構造を踏まえた活性化領域の検討により、一本鎖 RNA の構造依存的な TLR3 の活性化について探る。

結果

3.1　PV-RNA の二次構造予測

PV-RNA のうち、TLR3 を活性化しない cPV1、活性化する PV5 および PV6 について二次構造の予測を行った。予測ソフトとして mfold を使い、最も安定と考えられる構造を予測し、ステム部分（いずれも 10 塩基対以下）を黒塗りで示した（Fig. 3.1)。 それぞれステム部分として予測された塩基数の全塩基数に占める割合を百分率で表したところ、それぞれの PV-RNA において差は認められなかった。

3.2　PV5 の二次構造予測における複数の予測ソフトの比較検討

PV-RNA のうち最もよく TLR3 依存的な応答を引き起こす PV5 について、複数のソフトを用いて二次構造予測を行った。Centroidfold、mfold および RNAfold を利用したところ、それぞれ異なるモデルが予測された(Fig.3.2.1）。

これらの二次構造のうち、もっとも妥当なものを判断するため、MazF を用いて実際に RNA マッピングを行った。MazF は ACA 配列特異的なエンドリボヌクレアーゼであり、一本鎖で存在する ACA 配列のみを 5'側で切断する。PV5 を MazF により処理し、切断により生じた断片のサイズにより PV5 の中の ACA 配列が塩基対を形成しているかどうかを判断した。PV5 には 12 か所の ACA 配列があるが、Centroidfold、mfold、RNAfold で予測された二次構造は、4 番目と 5 番目の ACA 配列の塩基対形成のパターンが異なっており、centroidfold では 4 番目、5 番目とも一本鎖、mfold では 4 番目は一本鎖で 5 番目は二本鎖、RNAfold では 4 番目、5 番目とも二本鎖である（Fig. 3.2.2)。

PV5 を MazF で処理し､5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により切断断片のサイズを調べたところ、4 番目の ACA 切断で生じる 40mer の断片は確認され､5 番目の ACA 切断で生じる 83mer の断片は検出されなかった(Fig.3.2.3)。したがって、4 番目の ACA 配列は一本鎖、5 番目の ACA 配列は二本鎖であることが分かった。これは、mfold によるモデルと一致する。

3.3　PV5 欠損体の作製

PV5 による TLR3 の活性化において、どの部分の RNA 構造が重要であるかについて検討するため、mfold による二次構造予測を基にして、PV5 の部分欠損体 PV5-D1 から PV5-D5 を設計し in vitro 転写により作製した(Fig.3.3.1b)。　PV5 二次構造モデルにおいて、中心のステムが連続する部分を領域 A とし、それ以外の分枝を B から D 領域とし、すべての欠損体で A 領域を保持するように設計した。PV5-D1 は B 領域欠損、PV5-D2 は B,C 領域欠損、PV5-D3 は D 領域欠損、PV5-D4 は C,D 領域欠損、PV5-D5 は D,E 領域欠損とした（Fig.3.3.1a)。

また、作製した PV5 欠損体の安定性について、血清を含まない培地および血清を含む培地中でインキ

ュベートした後にアガロースゲル電気泳動により確認した。PV5-D1、D3、D5 では、血清を含む培地中でも元のサイズを保ったバンドが検出されたが、PV5-D2 および D4 では、分解されたスメアのみが検出された（Fig.3.3.2)。

作製した PV5 欠損体の塩基長および塩基組成を（表 5）に示す。

表 5

Construct	Region of the PV genome	Length (nts)	A	G	C	U
PV5-D1	3386-3763, 3841-4015	553	169	128	126	130
PV5-D2	3429-3763, 3841-3883	380	102	98	88	92
PV5-D3	3386-3484, 3646-4015	469	146	109	101	113
PV5-D4	3429-3484, 3646-3883	296	79	79	63	75
PV5-D5	3386-3484, 3748-4015	371	125	82	76	88

3.4　HEK293 細胞における PV5 欠損体による IFN-βプロモータの活性化

HEK293 細胞において、PV5-D1 から D5 により刺激し、TLR3 依存的な IFN-βプロモータの活性化を調べたところ、PV5-D1、D3、D5 刺激では PV5 と同等の活性がみられたのに対し、PV5-D2、D4 刺激では活性はみられなかった(Fig.3.4.1)。

PV5-D2 および D4 は血清を含む培地中では構造を保てないことから、DOTAP により直接エンドソームに導入することで分解を受けずに TLR3 まで送達された場合の IFN-βプロモータ活性化を調べた。その結果、細胞外から刺激した場合と同様に PV5-D1、D3、D5 刺激では PV5 と同等の活性がみられたのに対し、PV5-D2、D4 刺激では活性はみられなかった(Fig.3.4.2)。

3.5　マウス細胞における PV5 欠損体による TLR3 依存的サイトカイン産生

TLR3 KO マウスを用いて、PV5 欠損体刺激によるマウス樹状細胞およびマクロファージでの TLR3 依存的な応答について検討した。

野生型および TLR3 KO マウスの脾臓より CD11c 陽性樹状細胞を分取し、PV5-D1 から D5 により刺激して 24 時間後の培養上清を回収した。培養上清中の IFN-βを ELISA により、TNF-αおよび IL-6 を CBA により測定したところ、PV5-D2、PV5-D4 ではやや産生量が少ないものの、すべての PV5 欠損体によって TLR3 依存的に IFN、炎症性サイトカインの産生が誘導された（Fig.3.5.1)。

野生型および TLR3 KO マウスの骨髄よりマクロファージ細胞を誘導し、PV5-D1 から D5 により刺激

して 24 時間後の培養上清を回収した。培養上清中の IFN-βを ELISA により、TNF-αおよび IL-6 を CBA により測定したところ、樹状細胞と同様に PV5-D2、PV5-D4 ではやや産生量が少ないものの、すべての PV5 欠損体によって TLR3 依存的に IFN、炎症性サイトカインの産生が誘導された(Fig.3.5.2)。

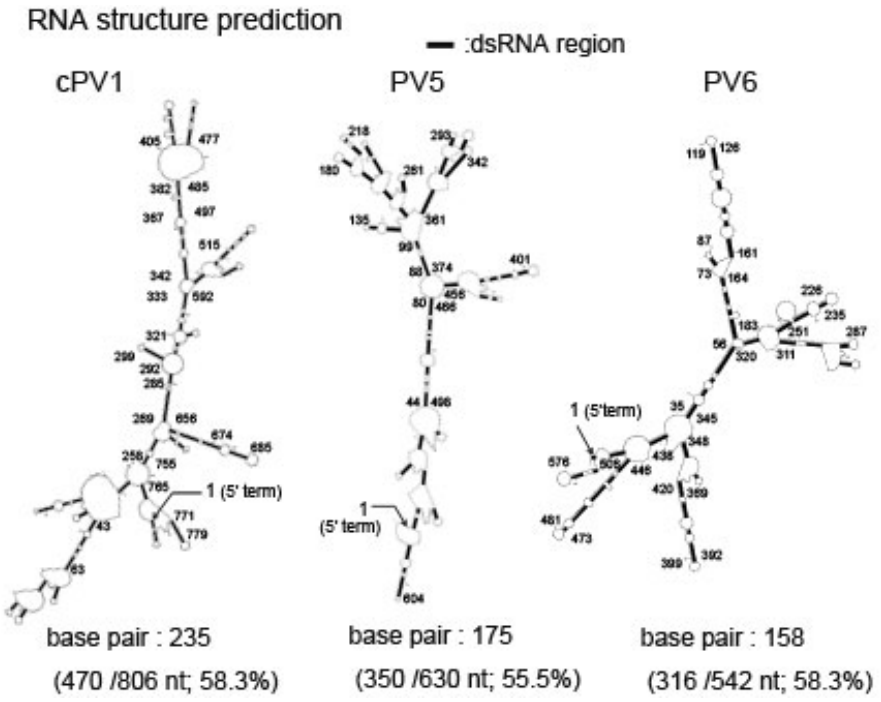


Fig.3.1　cPV1、PV5、PV6 の二次構造予測

PV-RNA の二次構造を、mfold を用いて解析した。塩基対を形成しているステム構造部分（いずれも 10 塩基対以下）を黒く塗り、全塩基対の数を示した。また、塩基対を形成する塩基数を全塩基数で除し、塩基対形成に関わる塩基の割合を百分率で表した。

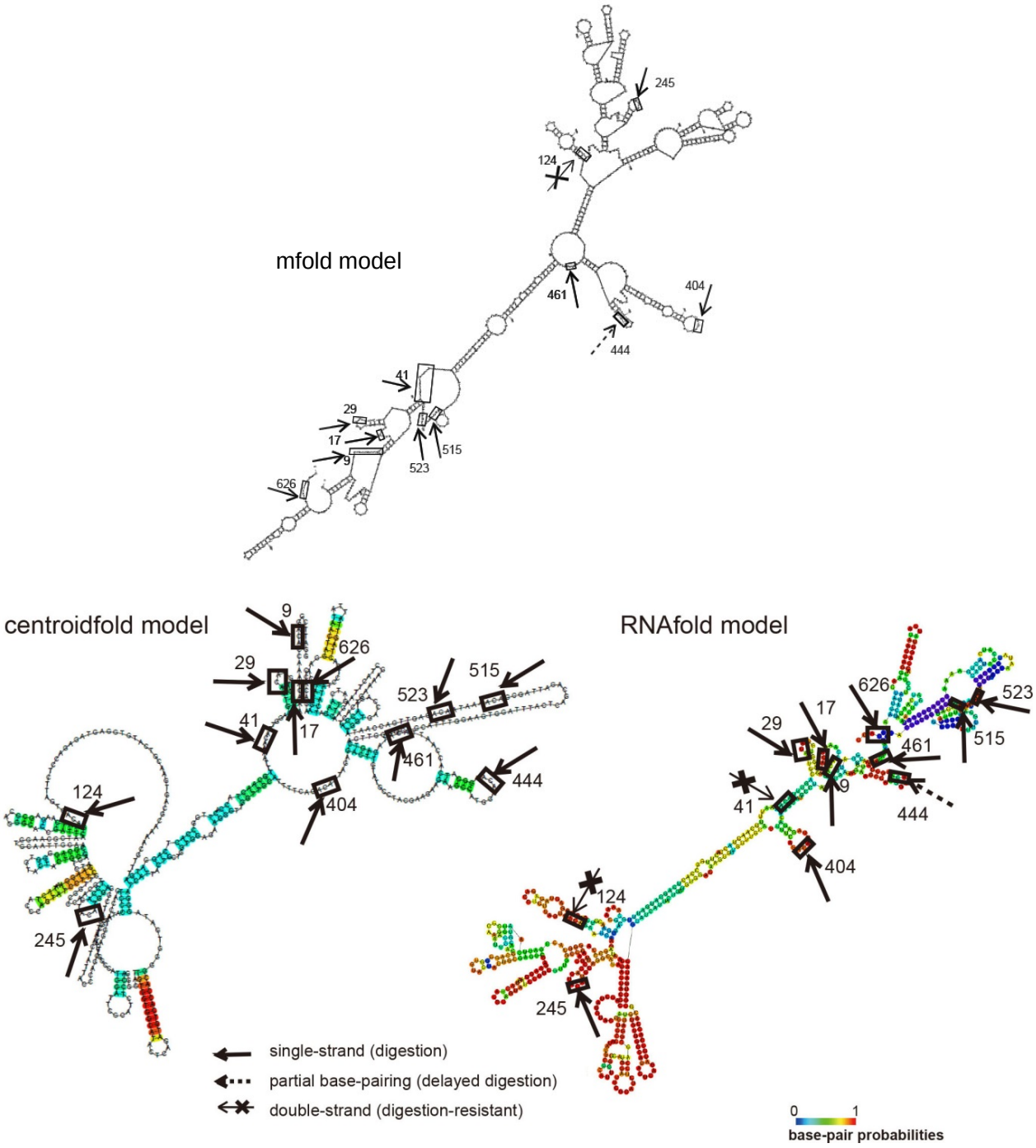


Fig.3.2.1　PV5 の二次構造予測と MazF 切断サイト

PV5 の二次構造を、mfold、RNAfold、centroidfold を用いて解析した。さらに、MazF で認識される ACA 配列 12 箇所をそれぞれ四角形で囲み、その 3 塩基が塩基対を形成しているかについて、矢印で示した。実線矢印は塩基対形成がなく MazF 感受性であること、点線矢印は一部分塩基対を形成しており MazF により長時間かけて切断されること、さらに×印がついた矢印は塩基対を形成しているため MazF 耐性であることを示す。

Fig.3.2.2　PV5 の二次構造モデルによる MazF 切断サイトの感受性の比較

mfold、RNAfold、centroidfold を用いて予測した PV5 二次構造モデルにおいて、MazF で認識される ACA 配列 12 箇所について、それぞれのモデルにおいて MazF により切断されるかどうかを示す。○印は塩基対形成がなく MazF 感受性であること、?印は一部分塩基対を形成しており MazF により長時間かけて切断されること、さらに×印は塩基対を形成しているため MazF 耐性であることを示す。

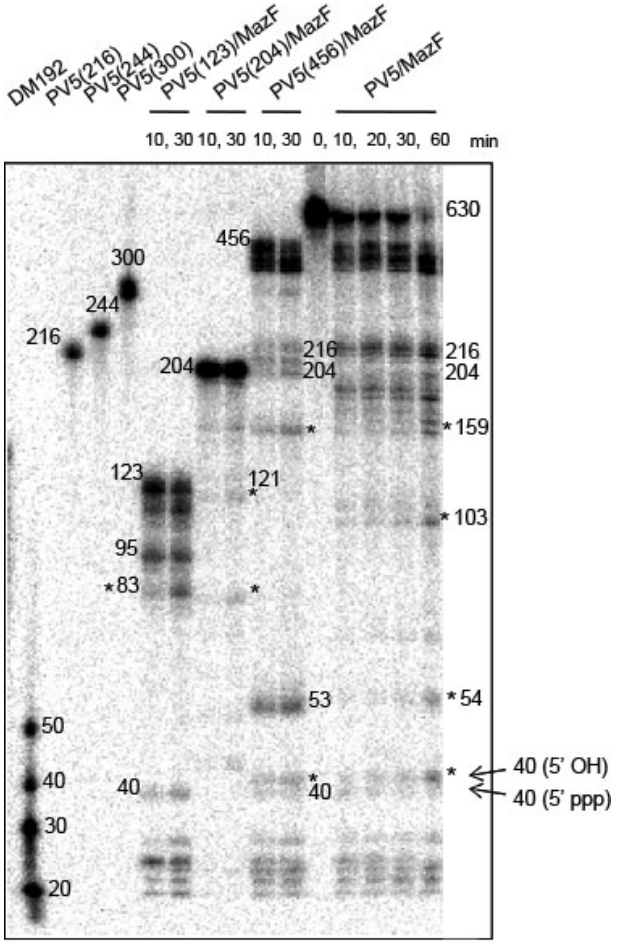
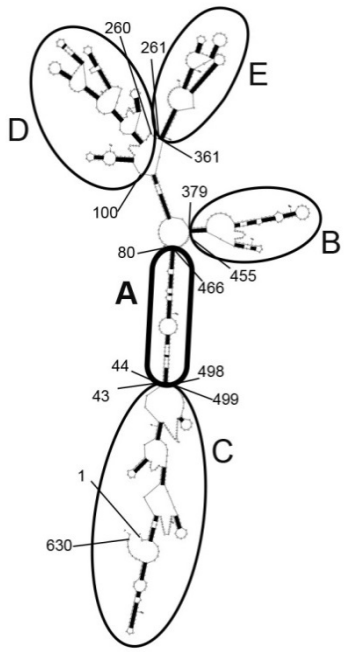


Fig.3.2.3　PV5 の MazF による切断産物

PV5 を MazF と室温で反応させ、0、10、20、30、60 分後の切断産物を 5%アクリルアミドゲルで分離した。サイズマーカーとして DM192 (Bio Dynamics Laboratory Inc.) を使用し、さらに、PV5(216)、PV5(244)、PV5(300)を作製して泳動した。また、断片の帰属のため、PV5(123)、PV5(204; 41-244)、PV5(456)について MazF と 10 分間または 30 分間反応させた。

a



	D1	D2	D3	D4	D5	region
A	○	○	○	○	○	44-80 + 466-498
B	×	×	○	○	○	379-455
C	○	×	○	×	○	1-43 + 499-630
D	○	○	×	×	×	100-260
E	○	○	○	○	×	261-361

b

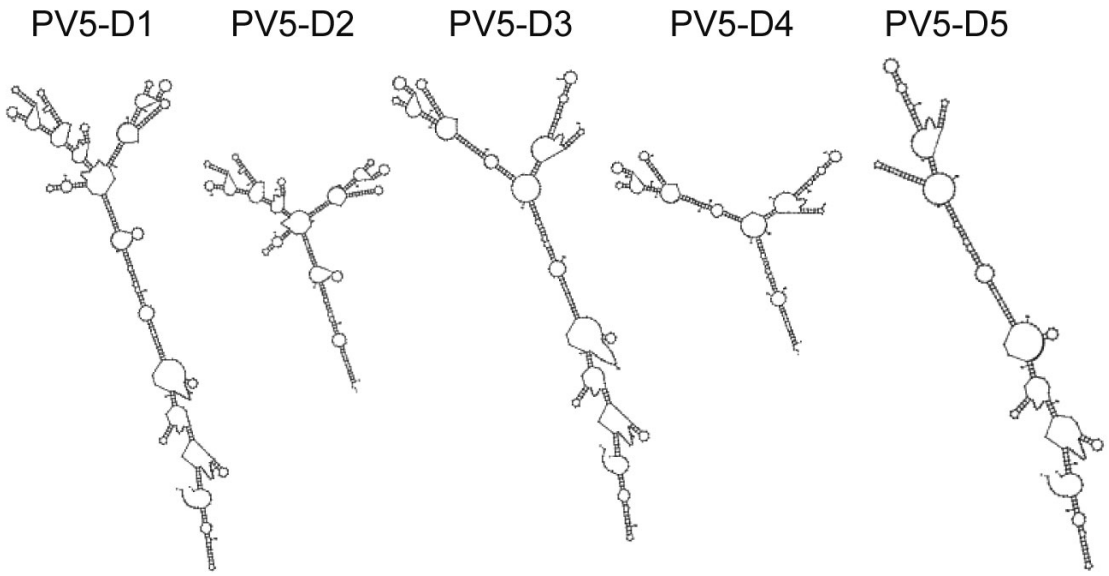


Fig.3.3.1　PV5 欠損体の作製

mfold による二次構造予測に基づき、PV5 の一部の領域を欠損させた PV5-D1 から PV5-D5 を作製した。PV5 の二次構造予測モデルにおいて、分岐して別れた部分領域を A から E で示し、それぞれの欠損体が、どの部分領域をもつかについて表にまとめた (a)。ステムが連なる中心を領域 A とし、すべての欠損体は領域 A を保存する構造として設計した。

PV5-D1 から PV5-D5 の mfold による二次構造予測モデルを示す (b)。

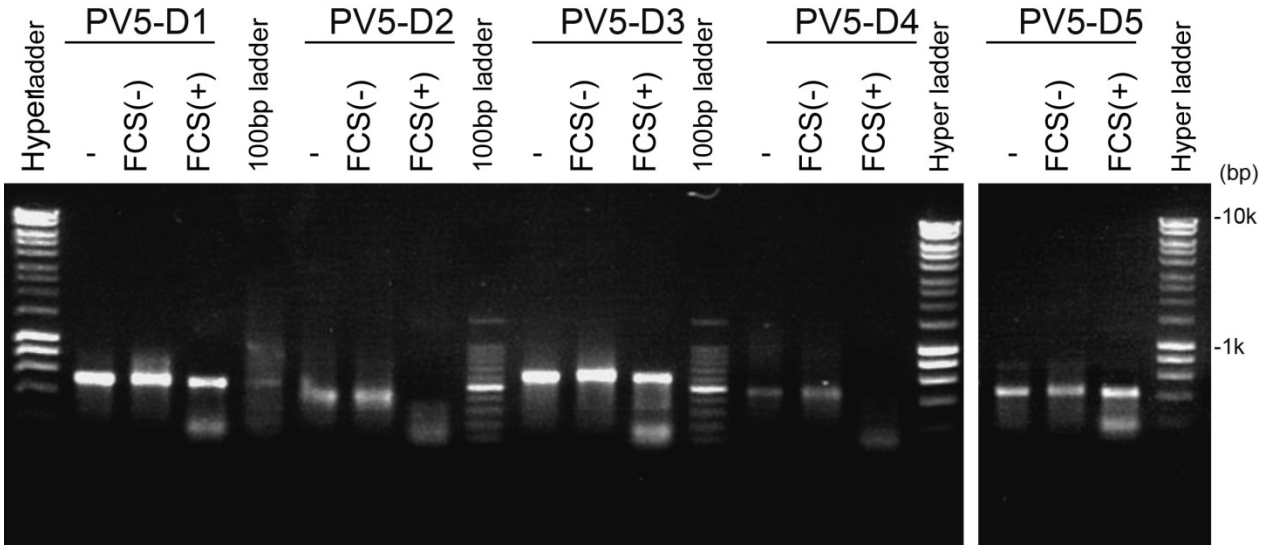


Fig.3.3.2　PV5 欠損体の培地中での分解

PV5 欠損体 (PV5-D1 から PV5-D5) (0.2 μg)を、血清を含まない培地または含む培地中で 30 分間 37℃においてインキュベートした。インキュベーションなしの RNA とともに、2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色して、UV 照射により観察した。

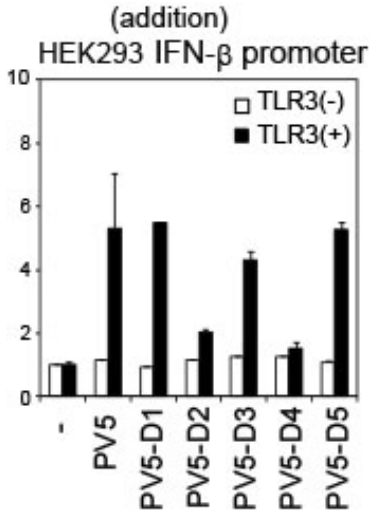


Fig.3.4.1　PV5 欠損体による IFN-βプロモータの活性化

HEK293 細胞において、p125 レポーター、内部標準ウミシイタケルシフェラーゼ プラスミドと共に、空ベクター(□) または TLR3 発現ベクター (■)を導入した。24 時間後、poly(I:C)または PV5 欠損体 RNA (10 μg/ml) を培地中に加えることで細胞外から刺激し、6 時間後に細胞を回収、可溶化した。ルミノメーターを用いて、細胞可溶化液のルシフェラーゼ活性を測定し、内部標準で補正した後、無刺激状態を基準として、プロモータ活性の相対値をグラフ化した。

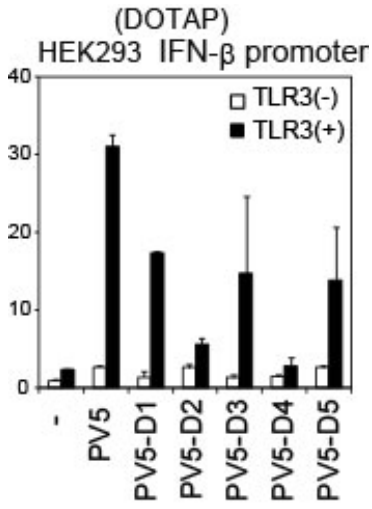


Fig.3.4.2　PV5 欠損体エンドソーム直接送達による IFN-βプロモータの活性化

HEK293 細胞において、p125 レポーター、内部標準ウミシイタケルシフェラーゼ プラスミドと共に、空ベクター(□) または TLR3 発現ベクター (■)を導入した。24 時間後に DOTAP を用いて poly(I:C)または PV5 欠損体 (10 μg/ml) をエンドソームへ送り、刺激 6 時間後に細胞を回収し、可溶化した。ルミノメーターを用いて、細胞可溶化液のルシフェラーゼ活性を測定し、内部標準で補正した後、無刺激状態を基準として、プロモータ活性の相対値をグラフ化した。

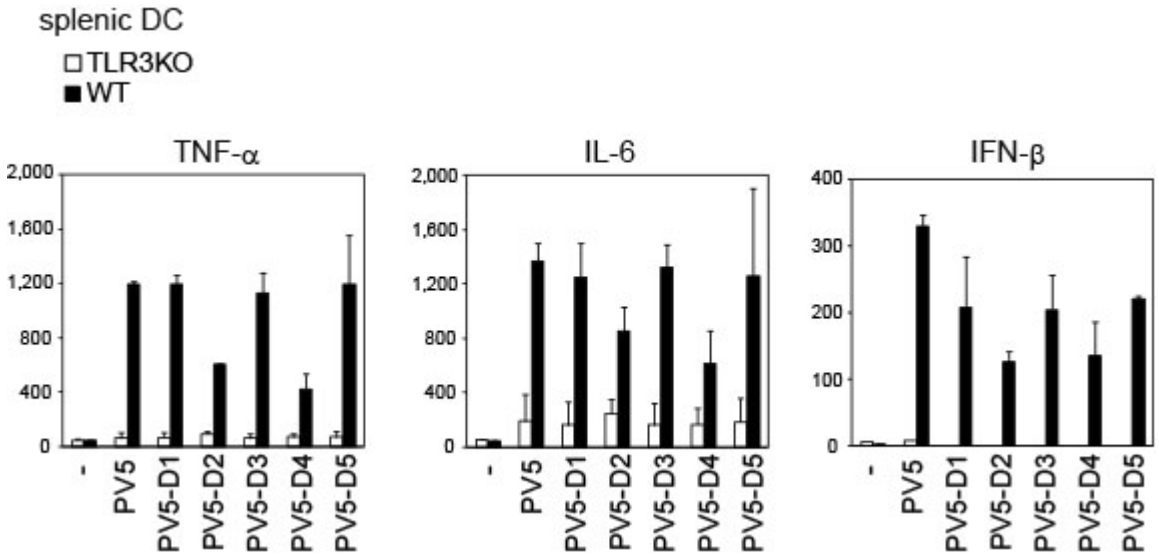


Fig.3.5.1　マウス樹状細胞における PV5 欠損体によるサイトカイン産生

野生型（■）および TLR3 KO（□）マウスの脾臓より CD11c+樹状細胞を分取し、poly(I:C)および PV5 欠損体（20 μg/ml）で刺激し、24 時間後の培養上清を回収した。上清に含まれる、TNF-αおよび IL-6 の量を CBA により測定し、IFN-βの量を ELISA で測定した。

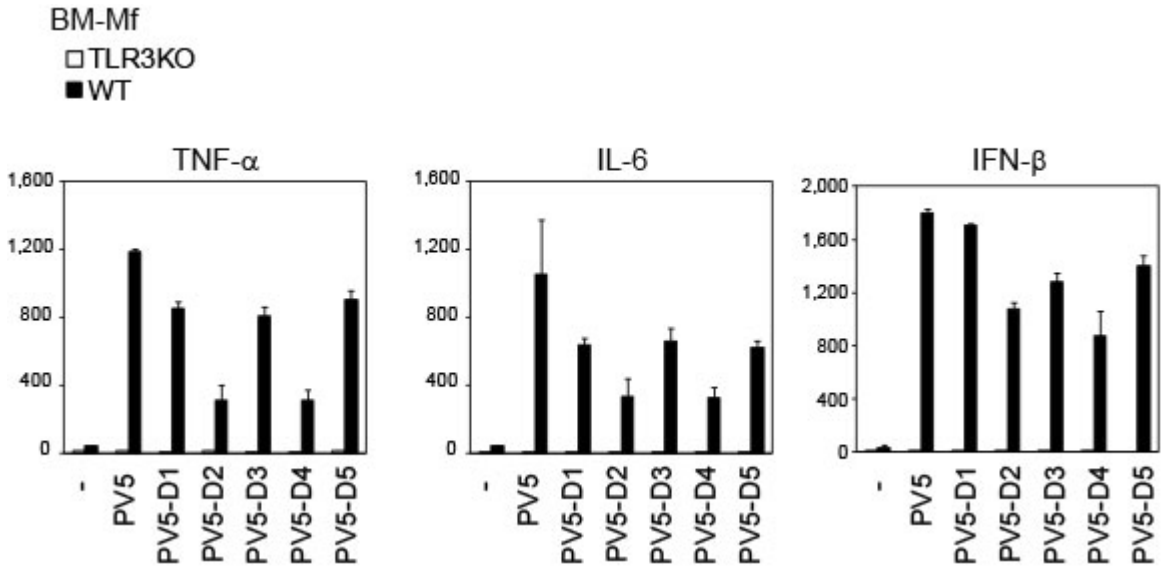


Fig.3.5.2　マウス骨髄由来マクロファージにおける PV5 欠損体によるサイトカイン産生

野生型（■）および TLR3 KO（□）マウスの骨髄細胞よりマクロファージを誘導し、poly(I:C)および PV5 欠損体（20 μg/ml）で刺激し、24 時間後の培養上清を回収した。上清に含まれる、TNF-αおよび IL-6 の量を CBA により測定し、IFN-βの量を ELISA で測定した。

考察

一本鎖 RNA による TLR3 の活性化においては、RNA の二次構造が重要であると考え、二次構造の予測ソフトを用いて cPV1、PV5 および PV6 の二次構造モデルを比較した。塩基対形成に関わる塩基の割合は TLR3 を活性化しない cPV1 と活性化する PV5 および PV6 との間で差は無かったが、cPV1 は比較大きなループ構造と多数の枝分かれステム構造を有していた。。一本鎖 RNA はさらに立体的には三次構造をとることから、二次構造から安定性を予測することは難しいが、大きなバルジやインターナルループで一本鎖が長く続く部分では RNase による分解を受けやすいはずである。PV5 や PV6 は、様々な RNase を含む血清存在下でも比較的安定であったことから、ループ部分も立体的に近い部分との相互作用により安定化されている可能性がある。

TLR3 を最も強く活性化する PV5 についてより詳細に検討するため、RNA 二次構造予測ソフトを複数用いたところ、それぞれ異なる構造が予測された。実際の PV5 の構造がいずれに相当するかをマッピングにより解析した結果、mfold が妥当であると判断した。

そこで、mfold での構造モデルから、どの領域が TLR3 により認識されるのかについて欠損体を作製して検討した。PV5 の 44 番から 80 番と 466 番から 498 番の配列で形成される、比較的ステム構造が連続する領域（A 領域）を中心構造として残し、分岐した枝部分（B から E 領域）をそれぞれ 1 か所または 2 か所欠損させて 5 種類の欠損体 PV5-D1 から PV5-D5 を作製した。PV5-D1、D3、D5 は血清を含む培地中でも安定であったのに対し、PV5-D2、D4 は分解されており、中心構造（A 領域）の両側の分枝が相互作用することで構造を維持していることが示唆された。

HEK293 細胞における IFN-βプロモータの活性化では細胞外からの刺激でも、DOTAP によるエンドソームへの送達でも PV5-D2、D4 では活性化がみられなかったことから、培地中で分解されない状態でも TLR3 により認識されないことがわかった。したがって、細胞内への取り込みではなく、TLR3 による認識の段階でも中心構造と考えた部分だけでは不十分であると言える。つまり、立体的な安定性により、不完全なステム構造が安定に存在し、TLR3 を凝集させることのできるトポロジーを持つことが、シグナル伝達に必要であると考えられる。今回用いた PV5 の欠損体では、PV5-D5 が TLR3 を活性化する最小の構造であった。

マウス細胞においては、樹状細胞、マクロファージともに PV5-D1 から D5 のすべてにより IFN、炎症性サイトカイン産生がみられ、ヒト上皮系および線維芽細胞株での結果と異なっていた。このことから、免疫系の細胞と非免疫系の細胞の間、もしくはマウス細胞とヒト細胞の間では TLR3 により認識できる RNA 構造の範囲に違いがある可能性が考えられる。

近年、TLR3 がカテプシンにより切断され、ヒト単球由来樹状細胞では全長の TLR3 と切断を受けた TLR3 C 末端側断片が存在することが報告された(82-84)。切断をうけた TLR3 は、HEK293 細胞では発現しておらず、マウスマクロファージでは発現が確認されている。未切断の TLR3 と切断された TLR3 では認識できる RNA に違いがある可能性があり、このことが PV5-D2、D4 の HEK293 細胞とマウスマクロファージおよび樹状細胞での応答の違いの要因となっていることも考えられる。

TLR3 のリガンドとして機能する一本鎖 RNA については、二次構造だけでなく三次構造（立体構造）も考慮する必要がある。しかし、今回の二次構造予測を基にした実験により、一本鎖 RNA のステム部分が安定に存在できるような揺らぎの少ない構造をとることができる RNA が、TLR3 のリガンド結合領域に結合することで TLR3 の二量体化を促す可能性が示唆された。

終章

本研究において、以下の知見が得られた。

1. ポリオウイルス感染細胞由来の RNA は、二本鎖 RNA および一本鎖 RNA を含み、マウス脾臓由来樹状細胞において TLR3 依存的な IFN 産生を引き起こす

2. 細胞外で安定な構造を有するポリオウイルス由来一本鎖 RNA は TLR3 で認識される

3. ポリオウイルス由来機能性一本鎖 RNA、PV5、は不完全なステム構造を有し、酸性条件下で二本鎖 RNA 結合部位を介して TLR3 と結合する

4. ポリオウイルス由来機能性一本鎖 RNA、PV5 は、二本鎖 RNA 同様、Raftlin 依存的に細胞内に取り込まれ、エンドソームで TLR3 と共局在し、ライソソームへ移行する

5. 短鎖の PV5 誘導体、PV-D2、D4 は、HEK293 細胞において TLR3 を活性化しないが、マウス免疫細胞では TLR3 依存的な応答を誘導する

以上の結果より、TLR3 は、完全な二本鎖 RNA だけでなく、不完全なステム構造を有する安定な構造の一本鎖 RNA (structured RNA) を認識することが明らかとなった (図 6)。

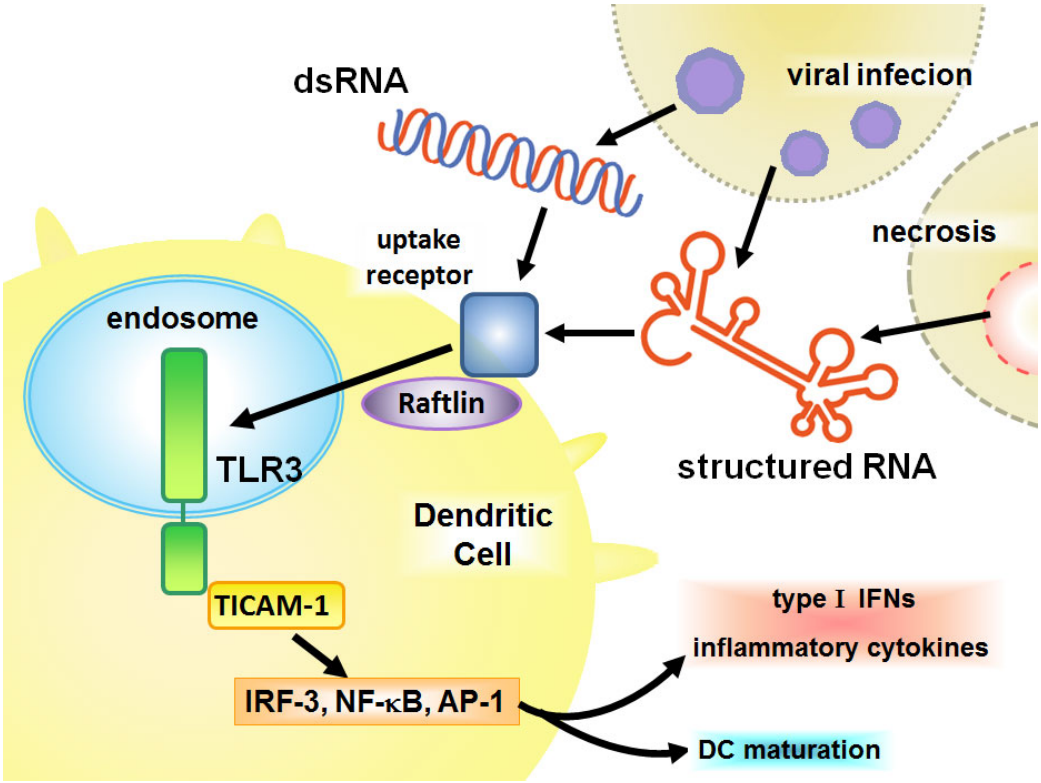


図 6

ウイルス感染時には、複製中間体として生じる dsRNA が感染細胞のアポトーシスやネクローシスなどに伴い細胞外に出た場合に、TLR3 が IFN 応答を誘導するものと考えられてきた。しかし、本研究成果により、TLR3 依存的な応答を引き起こすとき、必ずしもウイルス複製中間体として dsRNA が生成される必要はないことがわかり、(-) 鎖一本鎖 RNA ウイルス感染に対して TLR3 が活性化することも説明可能となった。

今回用いた RNA はウイルスゲノム配列を基本にしたものだが、自己由来の RNA においても TLR3 に認識される構造の一本鎖RNAが細胞外に流出した場合にはTLR3依存的なシグナル伝達が活性化すると考えられる。これまで、mRNA やネクローシス細胞由来の RNA が TLR3 を活性化するという報告があるが (57, 58)、過剰な応答を避けるため、生体にとっての非常時のみに細胞外に TLR3 を活性化できる構造の RNA が出るなどの機構により、TLR3 の活性が制御されているはずである。最近、紫外線 UVB を照射された細胞ではノンコーディング RNA の構造変化が起こり、傷害を受けた細胞の RNA が特異的に TLR3 依存的なサイトカイン産生を引き起こすことが報告された (85)。

本研究では、TLR3 がこれまで考えられていた以上に広範囲の RNA に対して応答することが明らかとなった。TLR3 は他の核酸認識レセプターである TLR7、8、.9 とは異なり、骨髄系細胞だけでなく線維芽細胞や上皮系細胞に発現していることから (86)、ウイルス感染細胞や傷害を受けた細胞から放出されたウイルス RNA や自己 RNA を周辺の細胞がすばやく検知し微小環境下で修復や炎症応答を誘導することができると考えられる。しかしながら、ウイルスや自己由来の RNA がどのような場合にどのような状態で細胞外に放出されるのか、どのように TLR3 に送達され活性化するのかなどは明らかでない。今後、より生体内での反応に近い系での実験により TLR3 によって認識される RNA 構造の詳細を明らかにし、TLR3 依存的な防御応答が惹起される個別の状況への理解を深めることで、生体における TLR3 の役割が明確になるものと考えられる。また、安定な構造の一本鎖 RNA も合成二本鎖 RNA である poly(I:C) と同様の取り込み機構によってエンドサイトーシスされることがわかったが、この取り込みの過程において TLR3 リガンドが第一段階の選択を受ける可能性も残されている。現在のところ、TLR3 リガンドの取り込みレセプターについては、細胞種によりいくつかの報告があるものの(87-89)、上皮細胞や樹状細胞で共通に利用されるレセプターは同定されていない。取り込みレセプターの同定により、TLR3 が発現するエンドソームへ送達される RNA の構造が明らかになると考えられる。

骨髄系樹状細胞における TLR3 からのシグナルは、副刺激分子の発現上昇、NK 細胞活性化分子の発現誘導による NK 細胞活性化、抗原のクロスプライミングによる細胞障害性 T 細胞の活性化を誘導する(90)。また、線維芽細胞において、TLR3-TICAM-1 からのシグナルでクロマチンのリモデリングがおきやすくなり核のリプログラミングが促進されることが最近報告されている (91)。これらの研究では、TLR3 リガンドとして合成 dsRNA の poly(I:C)を用いている。本研究で明らかにした RNA 構造が生体内で poly(I:C)と同様の細胞応答を引き起こすかどうかは今後の検討課題である。TLR3 リガンドは、がんや感染症ワクチンの次世代アジュバントとして期待されている。、poly(I:C)は TLR3 と MDA5 の両経路を活性化して強力な免疫応答を引き起こすため、副作用が強く、臨床応用には至っていない。副作用の少ない免疫アジュバントの開発に向けて、RNA が誘導する細胞応答の詳細な解析により TLR3 リガンド構造を最適化することが求められる。

謝辞

本研究の遂行において、終始適切なご指導、ご討論を賜り、本論文作成にあたって惜しみないご助力をいただきました北海道大学大学院医学研究科免疫学分野、松本美佐子准教授に深く感謝いたします。

終始有益なご指導、ご助言をいただきました北海道大学大学院医学研究科免疫学分野、瀬谷司教授に深く感謝いたします。

RNA 実験の基礎から丁寧にご指導いただき、本研究に多大なご協力を賜りました、産業技術総合研究所、西川富美子先生に心より感謝いたします。

本論文を審査していただきました、北海道大学大学院医学研究科分子病理学分野、笠原正典教授、北海道大学大学院医学研究科感染病態分野、志田壽利教授、北海道大学大学院医学研究科病原微生物分野、森松組子准教授に深く感謝いたします。

研究生活のあらゆる面でお世話になりました、北海道大学免疫学分野の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、長い学生生活を見守り、精神的に支え続けてくれた両親に深く感謝します。

2013 年 9 月

参考文献

1. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. Reichhart, and J. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 86: 973-983.
2. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. J. Janeway. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397.
3. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335-376.
4. Takeda, K., and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17: 1-14.
5. Dunne, A., M. Ejdeback, P. Ludidi, L. O'Neill, and N. Gay. 2003. Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J Biol Chem* 278: 41443-41451.
6. Alexopoulou, L., A. Holt, R. Medzhitov, and R. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-738.
7. Matsumoto, M., S. Kikkawa, M. Kohase, K. Miyake, and T. Seya. 2002. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 1364-1369.
8. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085-2088.
9. Chow, J., D. Young, D. Golenbock, W. Christ, and F. Gusovsky. 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 274: 10689-10692.
10. Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3: 196-200.
11. Heil, F., P. Ahmad-Nejad, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, T. Gellert, H. Dietrich, G. Lipford, K. Takeda, S. Akira, H. Wagner, and S. Bauer. 2003. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 33: 2987-2997.
12. Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303: 1526-1529.
13. Hemmi, H., T. Kaisho, K. Takeda, and S. Akira. 2003. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol* 170: 3059-3064.
14. Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-745.

15. Doyle, S., S. Vaidya, R. O'Connell, H. Dadgostar, P. Dempsey, T. Wu, G. Rao, R. Sun, M. Haberland, R. Modlin, and G. Cheng. 2002. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 17: 251-263.

16. Janssens, S., and R. Beyaert. 2002. A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem Sci* 27: 474-482.

17. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301: 640-643.

18. Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya. 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4: 161-167.

19. Fitzgerald, K., D. Rowe, B. Barnes, D. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. Pitha, and D. Golenbock. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198: 1043-1055.

20. Oshiumi, H., M. Sasai, K. Shida, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2003. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 278: 49751-49762.

21. Kaisho, T., O. Takeuchi, T. Kawai, K. Hoshino, and S. Akira. 2001. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 166: 5688-5694.

22. Kawai, T., O. Takeuchi, T. Fujita, J. Inoue, P. Mühlradt, S. Sato, K. Hoshino, and S. Akira. 2001. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 167: 5887-5894.

23. Maniatis, T., J. Falvo, T. Kim, T. Kim, C. Lin, B. Parekh, and M. Wathelet. 1998. Structure and function of the interferon-beta enhanceosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63: 609-620.

24. McWhirter, S., K. Fitzgerald, J. Rosains, D. Rowe, D. Golenbock, and T. Maniatis. 2004. IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 233-238.

25. Sasai, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, N. Inoue, F. Fujita, M. Nakanishi, and T. Seya. 2005. Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J Immunol* 174: 27-30.

26. Sasai, M., M. Shingai, K. Funami, M. Yoneyama, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2006. NAK-associated protein 1 participates in both the TLR3 and the cytoplasmic pathways in type IIFN induction. *Journal of Immunology* 177: 8676-8683.

27. Häcker, H., V. Redecke, B. Blagoev, I. Kratchmarova, L. Hsu, G. Wang, M. Kamps, E. Raz, H. Wagner, G. Häcker, M. Mann, and M. Karin. 2006. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439: 204-207.

28. Oganesyan, G., S. Saha, B. Guo, J. He, A. Shahangian, B. Zarnegar, A. Perry, and G. Cheng. 2006. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 439: 208-211.

29. Tatematsu, M., A. Ishii, H. Oshiumi, M. Horiuchi, F. Inagaki, T. Seya, and M. Matsumoto. 2010. A molecular mechanism for Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation. *J Biol Chem* 285: 20128-20136.

30. Cario, E., and D. K. Podolsky. 2000. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 68: 7010-7017.

31. Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 171: 3154-3162.

32. Bsibsi, M., R. Ravid, D. Gveric, and J. M. van Noort. 2002. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 1013-1021.

33. Farina, C., M. Krumbholz, T. Giese, G. Hartmann, F. Aloisi, and E. Meinl. 2005. Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes. *J Neuroimmunol* 159: 12-19.

34. Jack, C. S., N. Arbour, J. Manusow, V. Montgrain, M. Blain, E. McCrea, A. Shapiro, and J. P. Antel. 2005. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* 175: 4320-4330.

35. Jackson, A. C., J. P. Rossiter, and M. Lafon. 2006. Expression of Toll-like receptor 3 in the human cerebellar cortex in rabies, herpes simplex encephalitis, and other neurological diseases. *J Neurovirol* 12: 229-234.

36. Préhaud, C., F. Mégret, M. Lafage, and M. Lafon. 2005. Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *J Virol* 79: 12893-12904.

37. Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzózka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres, and G. Hartmann. 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314: 994-997.

38. Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5: 730-737.

39. Yoneyama, M., M. Kikuchi, K. Matsumoto, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, E. Foy, Y. Loo, M. J. Gale, S. Akira, S. Yonehara, A. Kato, and T. Fujita. 2005. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 175: 2851-2858.

40. Kawai, T., K. Takahashi, S. Sato, C. Coban, H. Kumar, H. Kato, K. Ishii, O. Takeuchi, and S. Akira. 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6: 981-988.

41. Seth, R., L. Sun, C. Ea, and Z. Chen. 2005. Identification and characterization of MAVS, a

mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122: 669-682.

42. Xu, L., Y. Wang, K. Han, L. Li, Z. Zhai, and H. Shu. 2005. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 19: 727-740.

43. Meylan, E., J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager, and J. Tschopp. 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437: 1167-1172.

44. Hardarson, H. S., J. S. Baker, Z. Yang, E. Purevjav, C. H. Huang, L. Alexopoulou, N. Li, R. A. Flavell, N. E. Bowles, and J. G. Vallejo. 2007. Toll-like receptor 3 is an essential component of the innate stress response in virus-induced cardiac injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H251-258.

45. Negishi, H., T. Osawa, K. Ogami, X. Ouyang, S. Sakaguchi, R. Koshiba, H. Yanai, Y. Seko, H. Shitara, K. Bishop, H. Yonekawa, T. Tamura, T. Kaisho, C. Taya, T. Taniguchi, and K. Honda. 2008. A critical link between Toll-like receptor 3 and type II interferon signaling pathways in antiviral innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20446-20451.

46. Oshiumi, H., M. Okamoto, K. Fujii, T. Kawanishi, M. Matsumoto, S. Koike, and T. Seya. 2011. The TLR3/TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. *J Immunol* 187: 5320-5327.

47. Abe, Y., K. Fujii, N. Nagata, O. Takeuchi, S. Akira, H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya, and S. Koike. 2012. The toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J Virol* 86: 185-194.

48. Le Goffic, R., V. Balloy, M. Lagranderie, L. Alexopoulou, N. Escriou, R. Flavell, M. Chignard, and M. Si-Tahar. 2006. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS Pathog* 2: e53.

49. Gowen, B. B., J. D. Hoopes, M. H. Wong, K. H. Jung, K. C. Isakson, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, and R. W. Sidwell. 2006. TLR3 deletion limits mortality and disease severity due to Phlebovirus infection. *J Immunol* 177: 6301-6307.

50. Daffis, S., M. A. Samuel, M. S. Suthar, M. Gale, and M. S. Diamond. 2008. Toll-like receptor 3 has a protective role against West Nile virus infection. *J Virol* 82: 10349-10358.

51. Wang, T., T. Town, L. Alexopoulou, J. F. Anderson, E. Fikrig, and R. A. Flavell. 2004. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 10: 1366-1373.

52. Casrouge, A., S. Y. Zhang, C. Eidenschenk, E. Jouanguy, A. Puel, K. Yang, A. Alcais, C. Picard, N. Mahfoufi, N. Nicolas, L. Lorenzo, S. Plancoulaine, B. Sénéchal, F. Geissmann, K. Tabeta, K. Hoebe, X. Du, R. L. Miller, B. Héron, C. Mignot, T. B. de Villemeur, P. Lebon, O. Dulac, F. Rozenberg, B. Beutler, M. Tardieu, L. Abel, and J. L. Casanova. 2006. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* 314: 308-312.

53. Pérez de Diego, R., V. Sancho-Shimizu, L. Lorenzo, A. Puel, S. Plancoulaine, C. Picard, M. Herman, A. Cardon, A. Durandy, J. Bustamante, S. Vallabhapurapu, J. Bravo, K. Warnatz, Y. Chaix, F.

Cascarrigny, P. Lebon, F. Rozenberg, M. Karin, M. Tardieu, S. Al-Muhsen, E. Jouanguy, S. Y. Zhang, L. Abel, and J. L. Casanova. 2010. Human TRAF3 adaptor molecule deficiency leads to impaired Toll-like receptor 3 response and susceptibility to herpes simplex encephalitis. *Immunity* 33: 400-411.

54. Guo, Y., M. Audry, M. Ciancanelli, L. Alsina, J. Azevedo, M. Herman, E. Anguiano, V. Sancho-Shimizu, L. Lorenzo, E. Pauwels, P. B. Philippe, R. Pérez de Diego, A. Cardon, G. Vogt, C. Picard, Z. Z. Andrianirina, F. Rozenberg, P. Lebon, S. Plancoulaine, M. Tardieu, Valérie Doireau, E. Jouanguy, D. Chaussabel, F. Geissmann, L. Abel, J. L. Casanova, and S. Y. Zhang. 2011. Herpes simplex virus encephalitis in a patient with complete TLR3 deficiency: TLR3 is otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med* 208: 2083-2098.

55. Sancho-Shimizu, V., R. Pérez de Diego, L. Lorenzo, R. Halwani, A. Alangari, E. Israelsson, S. Fabrega, A. Cardon, J. Maluenda, M. Tatematsu, F. Mahvelati, M. Herman, M. Ciancanelli, Y. Guo, Z. AlSum, N. Alkhamis, A. S. Al-Makadma, A. Ghadiri, S. Boucherit, S. Plancoulaine, C. Picard, F. Rozenberg, M. Tardieu, P. Lebon, E. Jouanguy, N. Rezaei, T. Seya, M. Matsumoto, D. Chaussabel, A. Puel, S. Y. Zhang, L. Abel, S. Al-Muhsen, and J. L. Casanova. 2011. Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency. *J Clin Invest* 121: 4889-4902.

56. Qi, R., S. Hoose, J. Schreiter, K. V. Sawant, R. Lamb, C. T. Ranjith-Kumar, J. Mills, L. San Mateo, J. L. Jordan, and C. C. Kao. 2010. Secretion of the human Toll-like receptor 3 ectodomain is affected by single nucleotide polymorphisms and regulated by Unc93b1. *J Biol Chem* 285: 36635-36644.

57. Cavassani, K. A., M. Ishii, H. Wen, M. A. Schaller, P. M. Lincoln, N. W. Lukacs, C. M. Hogaboam, and S. L. Kunkel. 2008. TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J Exp Med* 205: 2609-2621.

58. Karikó, K., H. Ni, J. Capodici, M. Lamphier, and D. Weissman. 2004. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* 279: 12542-12550.

59. Tabeta, K., P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozat, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, and B. Beutler. 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3516-3521.

60. Zhang, S. Y., E. Jouanguy, V. Sancho-Shimizu, H. von Bernuth, K. Yang, L. Abel, C. Picard, A. Puel, and J. L. Casanova. 2007. Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. *Immunol Rev* 220: 225-236.

61. Mizushima, S., and S. Nagata. 1990. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res* 18: 5322.

62. Fukuda, K., T. Watanabe, T. Tokisue, T. Tsujita, S. Nishikawa, T. Hasegawa, T. Seya, and M. Matsumoto. 2008. Modulation of double-stranded RNA recognition by the N-terminal histidine-rich region of the human toll-like receptor 3. *J Biol Chem* 283: 22787-22794.

63. Fujita, T., J. Sakakibara, Y. Sudo, M. Miyamoto, Y. Kimura, and T. Taniguchi. 1988. Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN-beta gene regulatory elements. *EMBO J* 7: 3397-3405.

64. Ida-Hosonuma, M., T. Iwasaki, T. Yoshikawa, N. Nagata, Y. Sato, T. Sata, M. Yoneyama, T. Fujita, C. Taya, H. Yonekawa, and S. Koike. 2005. The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. *J Virol* 79: 4460-4469.

65. Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita, and S. Akira. 2006. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441: 101-105.

66. Giachetti, C., and B. L. Semler. 1991. Role of a viral membrane polypeptide in strand-specific initiation of poliovirus RNA synthesis. *J Virol* 65: 2647-2654.

67. Novak, J. E., and K. Kirkegaard. 1991. Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J Virol* 65: 3384-3387.

68. Itoh, K., A. Watanabe, K. Funami, T. Seya, and M. Matsumoto. 2008. The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN-beta production. *J Immunol* 181: 5522-5529.

69. Watanabe, A., M. Tatematsu, K. Saeki, S. Shibata, H. Shime, A. Yoshimura, C. Obuse, T. Seya, and M. Matsumoto. 2011. Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation. *J Biol Chem* 286: 10702-10711.

70. Jelinek, I., J. N. Leonard, G. E. Price, K. N. Brown, A. Meyer-Manlapat, P. K. Goldsmith, Y. Wang, D. Venzon, S. L. Epstein, and D. M. Segal. 2011. TLR3-specific double-stranded RNA oligonucleotide adjuvants induce dendritic cell cross-presentation, CTL responses, and antiviral protection. *J Immunol* 186: 2422-2429.

71. Leonard, J. N., R. Ghirlando, J. Askins, J. K. Bell, D. H. Margulies, D. R. Davies, and D. M. Segal. 2008. The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 258-263.

72. Kleinman, M. E., K. Yamada, A. Takeda, V. Chandrasekaran, M. Nozaki, J. Z. Baffi, R. J. Albuquerque, S. Yamasaki, M. Itaya, Y. Pan, B. Appukuttan, D. Gibbs, Z. Yang, K. Karikó, B. K. Ambati, T. A. Wilgus, L. A. DiPietro, E. Sakurai, K. Zhang, J. R. Smith, E. W. Taylor, and J. Ambati. 2008. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 452: 591-597.

73. Pirher, N., K. Ivicak, J. Pohar, M. Bencina, and R. Jerala. 2008. A second binding site for double-stranded RNA in TLR3 and consequences for interferon activation. *Nat Struct Mol Biol* 15: 761-763.

74. Bell, J. K., J. Askins, P. R. Hall, D. R. Davies, and D. M. Segal. 2006. The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8792-8797.

75. Choe, J., M. S. Kelker, and I. A. Wilson. 2005. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* 309: 581-585.

76. Krieg, A. M. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20: 709-760.

77. Ranjith-Kumar, C. T., K. E. Duffy, J. L. Jordan, A. Eaton-Bassiri, R. Vaughan, S. A. Hoose, R. J. Lamb, R. T. Sarisky, and C. C. Kao. 2008. Single-stranded oligonucleotides can inhibit cytokine production induced by human toll-like receptor 3. *Mol Cell Biol* 28: 4507-4519.

78. Edwards, A. D., S. S. Diebold, E. M. Slack, H. Tomizawa, H. Hemmi, T. Kaisho, S. Akira, and C. Reis e Sousa. 2003. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur J Immunol* 33: 827-833.

79. Crick, F. H. 1966. Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J Mol Biol* 19: 548-555.

80. Ladner, J. E., A. Jack, J. D. Robertus, R. S. Brown, D. Rhodes, B. F. Clark, and A. Klug. 1975. Structure of yeast phenylalanine transfer RNA at 2.5 A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 4414-4418.

81. Quigley, G. J., and A. Rich. 1976. Structural domains of transfer RNA molecules. *Science* 194: 796-806.

82. Garcia-Cattaneo, A., F. X. Gobert, M. Müller, F. Toscano, M. Flores, A. Lescure, E. Del Nery, and P. Benaroch. 2012. Cleavage of Toll-like receptor 3 by cathepsins B and H is essential for signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 9053-9058.

83. Qi, R., D. Singh, and C. C. Kao. 2012. Proteolytic processing regulates Toll-like receptor 3 stability and endosomal localization. *J Biol Chem* 287: 32617-32629.

84. Toscano, F., Y. Estornes, F. Virard, A. Garcia-Cattaneo, A. Pierrot, B. Vanbervliet, M. Bonnin, M. J. Ciancanelli, S. Y. Zhang, K. Funami, T. Seya, M. Matsumoto, J. J. Pin, J. L. Casanova, T. Renno, and S. Lebecque. 2013. Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor. *J Immunol* 190: 764-773.

85. Bernard, J. J., C. Cowing-Zitron, T. Nakatsuji, B. Muehleisen, J. Muto, A. W. Borkowski, L. Martinez, E. L. Greidinger, B. D. Yu, and R. L. Gallo. 2012. Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat Med*.

86. Matsumoto, M., and T. Seya. 2008. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev* 60: 805-812.

87. Lee, H. K., S. Dunzendorfer, K. Soldau, and P. S. Tobias. 2006. Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity* 24: 153-163.

88. Limmon, G. V., M. Arredouani, K. L. McCann, R. A. Corn Minor, L. Kobzik, and F. Imani. 2008. Scavenger receptor class-A is a novel cell surface receptor for double-stranded RNA. *FASEB J* 22: 159-167.

89. Dansako, H., D. Yamane, C. Welsch, D. R. McGivern, F. Hu, N. Kato, and S. M. Lemon. 2013. Class A Scavenger Receptor 1 (MSR1) Restricts Hepatitis C Virus Replication by Mediating

Toll-like Receptor 3 Recognition of Viral RNAs Produced in Neighboring Cells. *PLoS Pathog* 9: e1003345.

90. Seya, T., M. Azuma, and M. Matsumoto. 2013. Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer. *Expert Opin Ther Targets* 17: 533-544.

91. Lee, J., N. Sayed, A. Hunter, K. F. Au, W. H. Wong, E. S. Mocarski, R. R. Pera, E. Yakubov, and J. P. Cooke. 2012. Activation of innate immunity is required for efficient nuclear reprogramming. *Cell* 151: 547-558.