creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

이학석사 학위논문

미세소관 연관 단백질 MAP7에 의한 제 1형 인터페론 반응의 음성 조절에 관한 연구

2019년 8월

서울대학교 대학원

생명과학부

김 의 민

미세소관 연관 단백질 MAP7에 의한 제 1형 인터페론 반응의 음성 조절에 관한 연구

지도교수 안 광 석

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함
2019년 6월

서울대학교 대학원
생명과학부
김 의 민

김의민의 석사 학위논문을 인준함
2019년 6월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국 문 초 록

바이러스 감염 상황에서 바이러스의 핵산은 면역 센서에 의해 인지되어 제1형 인터페론 반응을 일으킨다. 특히 RNA 매개 핵산 면역반응은 Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)에 의해 인지되어 TANK-binding kinase 1 (TBK1)가 인산화되고, TBK1이 IFN-regulatory factor 3 (IRF3)의 공간 재배열을 촉진시킴으로써 제1형 인터페론 신호 경로를 활성화시킨다. 이 과정에서 조절 인자들의 정확한 공간적 배열이 중요하지만, 이와 관련한 기전은 규명된 바가 없다. 본 연구에서는 물질의 공간적 배열 조절에 관여하는 미세소관 연관 단백질(Microtubule associated proteins, MAPs)이 제 1형 인터페론 반응 조절에 관여할 수 있음을 확인하였다. 특히 선행 연구에서 미세소관 연관 단백질을 siRNA-screening 하여 찾아낸 Microtubule-associated protein 7 (MAP7)이 RNA 핵산 매개 제1형 인터페론 반응의 음성 조절 인자로 작용할 수 있음을 확인하였다. 구체적으로, RNA 간섭 혹은 CRISPR/Cas9 system을 이용하여 MAP7의 발현을 저해 시켰을 때 RNA 핵산 매개 제1형 인터페론 반응의 활성이 증가되는 것을 확인하였다. 나아가 이러한 현상은 RIG-I 유전자의 전사 인자 중 하나인 IRF3의 핵 내로의 이동이 MAP7에 의해 저해되어, RIG-I 유전자의 전사가 억제됨으로 인한 결과임을 확인하였다. 특히 RNA 핵산 자극이 없는 상황에서도 MAP7은 IRF3의 핵 내로의 공간 이동을 억제하여 RIG-I유전자의 발현이 억제됨으로써 면역 항상성을 유지한다. 이를 통해 MAP7의

기능에 문제가 생겨 항원 자극이 없는 상황에서 제 1형 인터페론 반응이 적절하게 저해되지 않았을 때 자가면역 질환과 같은 질병으로 이어질 수 있는 가능성을 생각해볼 수 있다. 따라서 본 연구를 통해 선천성 면역 반응 조절 기전에서 조절 인자의 공간적 재배열에 MAP7이 핵심적으로 기여하고 있다는 사실을 규명하였고, 이를 바탕으로 감염성 질병 치료에 있어 새로운 의약적 접근 가능성을 시사하였다.

주요어: 제 1형 인터페론 반응, MAP7, IRF3, RIG-I, 핵산, RLR pathway,

학 번: 2017-27005

목 차

I. 서론 6
1. 제 1형 인터페론 반응 6
2. 미세소관 연관 단백질 11
3. 연구 목표 12

II. 재료 및 실험 방법 13
1. 시약과 항체 13
2. 세포 주와 바이러스 13
3. 면역 블롯팅 14
4. 면역 형광 검사법 15
5. RNA 간섭 16
6. qRT-PCR 16
7. 프로모터 어세이 19
8. MAP7 낙아웃 세포 주 제작 19
9. Cytosol-Nucleus Fractionation 20
10. 통계적 분석 21

III. 결과 22
1. MAP7은 제 1형 인터페론 반응의 음성조절자로써 기능한다 22
2. MAP7은 RIG-I 발현과 IRF3의 활성을 억제한다. 24
3. MAP7은 IRF3의 이동을 억제함으로써 RIG-I의 전사를 억제한다 25

IV. 토의 28

V. 참고문헌 49

I. 서론

1. 제 1형 인터페론 반응

제 1형 인터페론 반응(type I interferon response)은 바이러스 감염에 대한 숙주 세포의 선천성 방어 기작 중 가장 중요하고 강력한 반응이다. 제 1형 인터페론(Interferon)은 감염된 숙주세포에서 분비되는 폴리펩타이드로, 병원체를 다른 세포로 퍼져나가는 것을 막기 위해 염증사이토카인 (pro-inflammatory cytokine)의 분비를 촉진시키는 역할을 할 뿐만 아니라, 항원 제시 반응 촉진 등을 통해 후천선 면역반응에 관여하는 B세포와 T세포의 활성을 돕는 역할을 한다(Ivashkiv and Donlin, 2014). 이러한 제 1형 인터페론 반응은 주로 병원체의 PAMPs (pathogen-associated molecular patterns)가 숙주 세포의 PRRs (pattern-recognition receptors)에 의해 인지되면서 시작하게 된다. 세균의 펩티도글리칸, LPS (lipopolysaccharides)등을 인지하는 TLRs (toll-like receptors)의 발견을 시작으로 (Medzhitov et al., 1997) 다양한 PRR들이 발견되고, 그 기능에 대한 연구가 진행되어 왔다. 특히 세포질 내에 존재하는 핵산은 제 1형 인터페론을 유발하는 주요 PAMPs 중 하나이기 때문에, 이러한 핵산을 인지하는 PRR에 대한 연구가 활발하게 진행되어왔다. 5 '-triphosphate dsRNA를 인지하는 RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) 와 긴 dsRNA를 인지하는 MDA5 (melanoma differentiation-associated

gene-5)를 포함한 RLR(RIG-I like receptors) family (Yoneyama et al., 2004; Yoneyama et al., 2005; Kato et al., 2008) 와 cytosolic DNA를 인지하는 cGAS (cGMP-AMP synthase), IFI16(IFNgamma-inducible protein 16)은 핵산 자극에 의해 시작되는 제 1형 인터페론 반응에 중요하게 작용하는 수용체이다(Sun et al., 2013).

그림 1에서와 같이 RLR family, cGAS에 의해 시작되는 핵산 자극 매개 제 1형 인터페론 반응은 각각 MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein), STING (stimulator of interferon genes)에 수렴하게 되고, 이들은 결과적으로 TBK1 (Tank-binding kianse 1)을 활성화시키게 되고 활성화된 TBK1은 전사 인자인 IRF3 (interferon regulatory factor 3) 인산화시킴으로써 제 1형 인터페론의 발현을 촉진하게 된다(Zevini et al., 2017). 이 신호전달 과정에서 다양한 인자들의 위치 변화 (translocation)가 일어난다. 가령 STING의 경우, 항원 자극에 의해 활성화되었을 때 소포체 (endoplasmic reiculum, ER)에서 골지체 (Golgi apparatus)로의 이동이 일어나게 되며 이로 인해 TBK1의 위치 조정이 일어나게 된다. (Dobbs et al., 2015) 뿐만 아니라, TBK1에 의해 인산화된 IRF3는 인산화 이후 이합체화 반응 (dimerization)이 일어나게 되고, 이후 세포질에서 핵 내로의 이동이 야기되며, 핵 내로 이동한 IRF3 이형질체는 제 1형 인터페론 유전자의 발현을 촉진한다(Hu et al., 2018). 이처럼 제 1형 인터페론 반응의 신호전달 과정에서 각 요소들의 적절한 위치 변화는 중요하다. 바이러스

침입 시 인터페론 반응이 작용하지 않으면 세포에 침입한 바이러스를 제거할 수가 없다. 반대로 인터페론 반응이 적절하게 조절되지 않고 지나치게 강하게 일어나면 자가 면역 질환 등의 문제가 발생할 수 있다. (Banchereau et al., 2006; McNab et al., 2015) 때문에 인터페론 반응의 조절에 관여하는 주요 분자들에 대한 연구는 중요하며, 어떤 분자들이 인터페론 반응 조절에 관여하는지에 대한 연구는 비교적 활발하게 진행되어 왔다. 하지만, 이렇게 밝혀진 분자들이 면역 반응을 위해 세포 내에서 공간적, 시간적으로 어떻게 정렬되고 조화되는지에 대한 연구는 비교적 많이 이루어지지 않았다.

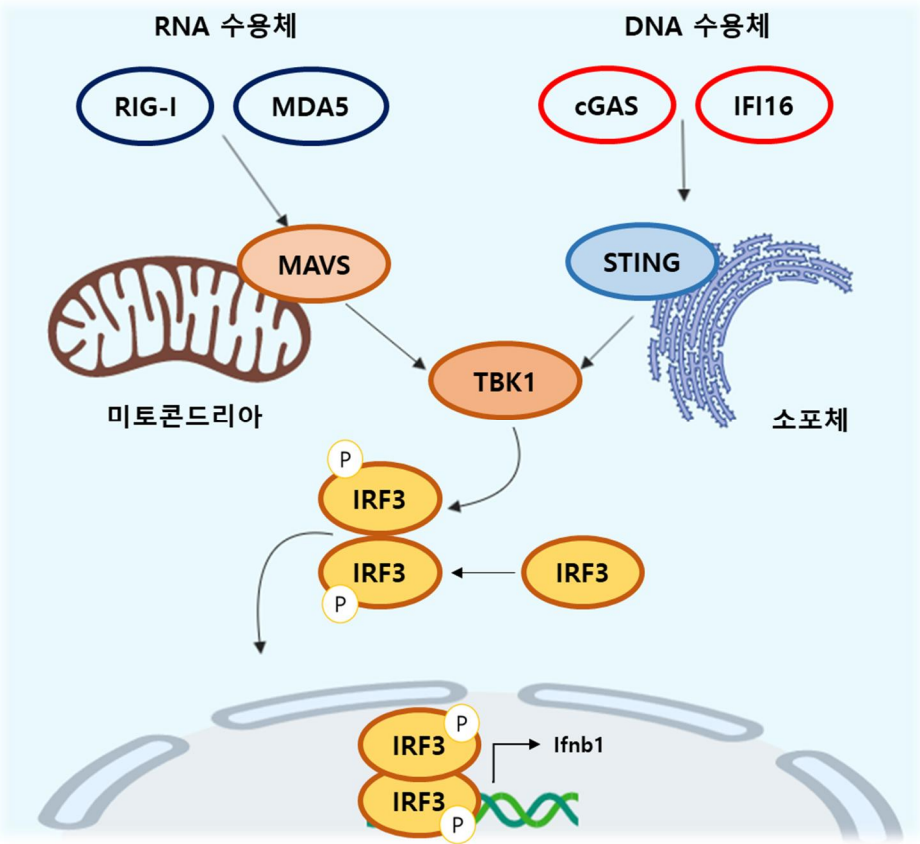

RNA 수용체
DNA 수용체
RIG-I
MDA5
cGAS
IFI16
MAVS
STING
TBK1
미토콘드리아
소포체
P
IRF3
IRF3
IRF3
P
P
IRF3
IRF3
P
Ifnb1

그림 1. 세포질 내 핵산에 의해 유도되는 제 1형 인터페론 반응

RIG-I(Retinoic acid-inducible gene I)와 MDA5(Melanoma differentiation associated protein 5)는 세포 내에 존재하는 주요 RNA 수용체로, ssRNA와 dsRNA를 인지한 후 MAVS(Mitochondrial antiviral signaling protein), TBK1(TANK-binding kinase 1), IRF3(Interferon-regulatory factor 3) 축을 거쳐 제 1형 인터페론 유전자의 전사를 유발한다. 반면 cGAS(cGMP-AMP synthase) 와 IFI16(Interferon gamma-inducible protein 16)은 세포질 내에 존재하는 DNA를 인지한 후 STING(Stimulator of Interferon genes protein), TBK1, IRF3축을 거쳐 제 1형 인터페론 유전자의 전사를 유발한다. 이 때 IRF3는 TBK1에 의해 인산화되어 이형질체가 된 후 핵 내로 이동하게 된다.

2. 미세소관 연관 단백질

미세소관 (microtubules)은 MTOC(microtubule-organizing center)를 중심으로 바깥방향으로 뻗어나가는 등의 변화를 통해 세포 내에서 여러 소낭 (vesicles)와 소기관 (organelles)의 운반 및 위치 조정에 역동적으로 관여하고 있다 (Mitchison and Kirschner, 1984). 이 때 kinesin과 dynein과 같은 motor protein이 미세소관과 연관하여 소낭이나 소기관의 운반에 관여를 하게 된다. 뿐만 아니라, 미세소관은 다양한 종류의 미세소관 연관 단백질 (microtubule-associated prorteins, MAPs)에 의해 조절되고 있는 것으로 밝혀져 있다. 미세소관 연관 단백질은 미세소관 및 dynein, kinesin과 같은 motor protein 뿐만 아니라 다양한 분자들과 상호작용 하면서 미세소관의 역동성과 안정성에 많은 영향을 미치게 된다. 그 결과 미세소관 연관 단백질은 세포 분열 (cell division), 세포 형태 형성(cell morphogenesis)에 영향을 미칠 뿐만 아니라 미세소관을 세포 내 특정 위치로 유도하면서 세포 내 물질 운반 (intracellular trafficking) 과정에서 영향을 주게 된다(Lee, 1993).

미세소관, 그리고 미세소관 연관단백질이 세포 내 물질 운반에 중요하게 작용 한다는 점, 그리고 제 1형 인터페론 반응에서 필요한 요소들의 적절한 위치 변화가 중요하다는 점으로 미루어 보아 미세소관 및 미세소관 연관 단백질이 제 1형 인터페론 반응 경로에서 중요하게 작용할 것이라 미루어 짐작할 수 있다. 하지만 지금까지 미세소관과

미세소관 연관 단백질이 제 1형 인터페론 반응에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 비교적 활발하게 이루어지지 않았다.

3. 연구 목표

바이러스 침입 시 세포질 내에 노출된 핵산에 의해 제 1형 인터페론 반응이 적절하게 유도되지 않으면 침입한 병원균을 제대로 제거할 수가 없다. 반대로 제 1형 인터페론 반응이 정상적으로 조절되지 않고 지나치게 강하게 일어나면 오히려 자가 면역 질환 등의 문제가 발생할 수 있다(Banchereau et al., 2006; McNab et al., 2015). 때문에 인터페론 반응의 조절에 관여하는 주요 분자들에 대한 연구는 중요하며, 어떤 분자들이 인터페론 반응 조절에 관여하는지에 대한 연구는 비교적 활발하게 진행되어 왔다. 하지만, 이렇게 밝혀진 분자들이 면역 반응을 위해 세포 내에서 공간적으로 어떻게 정렬되고 조화되는지에 대한 연구는 비교적 많이 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서 제 1형 인터페론 반응에 관여하는 물질의 세포 내에서의 위치 조절과 제 1형 인터페론 반응의 관계를 밝혀내고자 하였다. 이를 위해 siRNA를 이용하여 제 1형 인터페론 반응에 관여하는 미세소관 연관단백질을 찾아내고자 하였다. 이후 이러한 미세소관 연관단백질이 제 1형 인터페론 반응 조절에 관여하는 물질의 공간 이동에 관여하는지를 확인하고자 하였고, 반응 조절의 구체적인 기전을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약과 항체

Poly I:C, poly dA:dT, nocodazole, colchicine, bafilomycin, chloroquine, MG-132, 항-FLAG 항체는 Sigma에서 구입하였다; ciliobrevin D는 Merck에서 구입하였다; SB743921은 Santa Cruz에서 구입하였다; 항-IRF3 항체, 항-Histone H3 항체, 항-MAVS 항체는 Abcam에서 구입하였다; 항-phospho-IRF3 (S386)은 Protein tech에서 구입하였다; 항-RIG-I 항체, 항-MAP7항체는 Novus Biologicals에서 구입하였다; 항-GAPDH 항체와 항-α-tubulin 항체는 Ab Frontier에서 구입하였다; 항-HA 항체는 Cell signaling에서 구입하였다.

2. 세포 주와 바이러스

HeLa 세포와 HEK293T 세포는 37℃, 5% CO2 환경에서 10% fetal bovine serum (FBS; HyClone Laboratories), 2mM GlutaMAX-

I(Invitrogen)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen)에서 배양했다.

Sendai virus는 10-11일된 계란의 요막 내에 약 10^6개의 바이러스를 접종한 후 37℃에서 72시간 배양했다. 72시간 후 요막강액을 모아 원심분리한 후 펠렛을 제거했고, 소분한 후 사용할 때까지 -80℃에 보관하였다.

3. 면역 블롯팅

PBS를 이용하여 세포를 두 번 워시한 후 50mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton X-100에 PMSF와 Leupeptin (Sigma), phosphatase inhibitor cocktail(Cell signaling)을 첨가한 완충 용액으로 4℃에서 15분간 반응시킴으로써 세포를 용해시켰다. 용해액을 4℃, 13000rpm에서 30분간 원심분리 시킨 뒤 상층 액을 분리하였다. 상층액은 SDS sample buffer을 처리한 뒤 98℃에서 10분간 끓였다.

SDS-sample buffer에 녹아 있는 단백질들을 SDS-PAGE를 통하여 크기별로 분리하였고, 100V에서 1시간 동안 니트로셀룰로스 막으로 이동시켰다. 니트로셀룰로스 막은 5% 탈지 분유 혼합액 혹은 5% 소

혈청 알부민으로 30분동안 블로킹하였고, 표시된 1차 항체(1:1000)로 4°C에서 16시간동안 반응시킨 후, 0.1% Tris buffered saline with TritonX-100 (TBST)로 워시하였다. 그 후 HRP가 부착되어있는 2차 항체를 상온에서 1시간 반응시켰고, 0.1% TBST를 이용하여 워시한 후 ECL 검출 시약을 이용하여 관찰하였다.

4. 면역 형광 검사법

12-well 플레이트 각 well에 커버슬립을 깔고 HeLa 세포 주를 하루 동안 키웠다. 다음 날 poly I:C 혹은 Sendai virus 자극을 4시간 동안 처리 한 후 PBS로 워시 하였다. 이후 3.7% formaldehyde를 이용하여 시료를 10분간 고정시킨 후 50mM Ammonuim chloride 를 처리하여 고정을 중단시켰다. 이후 0.1% Triton X-100을 이용하여 세포 막의 투과성을 높였다. 2% 소혈청 알부민이 포함된 PBS (2% PBA)를 이용하여 시료를 블로킹 한 후 표시된 1차 항체를 2% PBA에 1:200 비율로 녹인 후 시료와 상온에서 1시간 반응시켰다. 다시 2% PBA를 이용하여 워시한 후 Alexa Flour 488 혹은 Alexa Flour 568 2차 항체를 2% PBA에 1:200 비율로 녹인 후 시료와 1시간 반응시켰다. PBS로 워시한 후 Antifade mounting solution with DAPI (Vector Laboratories)로 시료를 슬라이드에 마운팅 한 후 Zeiss LSM 700

공초점 레이저 현미경으로 분석하였다.

5. RNA 간섭

MAP7의 번역 서열(Coding sequence)을 표적으로 하는 siRNA는 Dharmacon으로부터 구입하였다(L-051284-02-0005). 서열은

siRNA #1: CACCAUGAAUCUUUCGAAA;

siRNA #2: ACGAGAAACCGUCUGGCUA;

siRNA #3: AGAGUGAGCGGAAGGUAUU;

siRNA #4: GCAAAGAAAUGGUGACAUA;

12-well 플레이트에 HeLa 세포를 분주한 후 다음 날 siRNA를 각각 20nM 농도로 처리하였다. 실험 방법은 제조사 에서 제공하는 실험방법을 따랐다. (Dharmacon)

MAP7의 번역 서열을 표적으로 하는 short hairpin RNA를 제작하여 pLKO.1 puro 운반체에 삽입하였다. 서열은

shRNA #3: GGACAAAGAACGCCACGAA

shRNA #4: TCAGAGAAACGGTGATATA

6. qRT-PCR

HeLa 세포에 siRNA 트렌스펙션한 후 48시간 후 Trizol(Sigma)을 이용하여 세포 내 RNA를 추출하였고, phenol-chloroform 추출을 통해 정제 하였다. 정제한 RNA를 ReverTra ACE® qPCR RT

Kit(Toyobo)로 역전사하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA는 SYBR Green Kit(Enzynomics)을 이용하여 qRT-PCR을 진행하였다. 이 때 사용한 프라이머는 **표 1**과 같다.

표 1. qRT-PCR에 사용된 프라이머의 서열

표적 유전자	방향	서열(5'-3')
GAPDH	정방향	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
	역방향	TTGATTTTGGAGGGATCTCG
IFN-ß	정방향	ATGACCAACAAGTGTCTCCTCC
	역방향	GCTCATGGAAAGAGCTGTAGTG
IRF1	정방향	AGCTCAGCTGTGCGAGTGTA
	역방향	TAGCTGCTGTGGTCATCAGG
IRF3	정방향	GAGGTGACAGCCTTCTACCG
	역방향	TGCCTCACGTAGCTCATCAC
RIG-I	정방향	AGAGCACTTGTGGACGCTTT
	역방향	TGCAATGTCAATGCCTTCAT
STAT1	정방향	CCGTTTTCATGACCTCCTGT
	역방향	TGAATATTCCCCGACTGAGC
MAP7	정방향	GGAAGAGCGGAAGAAGAGGT
	역방향	ACGACCAACGGTTATGCTTC

7. 프로모터 어세이

HeLa 세포에서 유전체 DNA를 추출하여 RIG-I 프로모터를 클로닝하였다. 이 때 RIG-I 유전자의 프로모터 서열은 human genome database에서 획득했다.

프라이머 서열은 정방향: 5'-GAGATGAGGTTTCACCATGT-3'; 역방향: 5'- AAGGGAAAATCGAAAGTGCAAC-3'이며 PCR 조건은: 98℃ 2분; 98℃ 45초, 58℃ 1분, 72℃ 3분을 35순환동안 진행하였고, 마지막 72℃ 10분을 진행하였다. 클로닝한 RIG-I 프로모터(-1902~-1)은 KpnI 와 XhoI 제한효소를 이용하여 pGL3-basic 운반체(Promega)에 삽입하였다. 완성된 운반체는 pRL Renilla Luciferase Control 운반체(Promega)와 함께 HeLa세포에 Lipofectamine-2000(Invitrogen) 트렌스펙션 시약을 이용하여 트렌스펙션하였다. 다음 날 Dual-Luciferase reporter 1000 assay system (Promega)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 어세이를 진행하였다. Firefly luciferase 활성도는 renilla luciferase 활성도에 의해 정규화 되었다.

8. MAP7 낙아웃 세포 주 제작

CRISPR-Cas9 유전체 편집 기술을 이용하여 HeLa 세포에서 MAP7 낙아웃 세포 주를 제작하였다. MAP7의 번역부위를 표적하는 single guide RNA (sgRNA)를 제작하여 Lentiviral CRSPIR-Cas9 V2 운반체

(Addgene)에 삽입하였고, 이를 HEK293T 세포에 트렌스펙션하였다. 2일 후, 렌티바이러스가 포함되어있는 상층 액을 모아 HeLa 세포에 형질 도입하였다. 세포는 한계 희석법을 통해 각각의 클론으로 나누었고, 각각의 클론은 면역 블롯팅 방법을 통해 표적 단백질인 MAP7의 결핍 여부를 확인하였다. 이후, 각 클론의 유전체 DNA를 추출하여 PCR을 통해 증폭시킨 후 성공적인 표적 절단 여부를 T7E1 어세이를 통해 확인하였다. 추가적으로 Cas9에 의해 돌연변이가 일어난 표적 서열 부분을 TOPcloner Blunt Core Kit (Enzynomics)을 통해 증폭시킨 후 Sanger 시퀀싱을 통해 각각의 서열을 확인했다.

9. Cytosol-Nuclear Fractionation

핵막을 분해하지 않고 세포막만 분해하기 위해 다음과 같은 버퍼를 사용하였다; 10mM HEPES, 10mM KCl, 1.5mM MgCl2, 0.34M Sucrose, 10% glycerol, 1mM DTT. 0.1% Triton X-100. PBS를 이용하여 세포를 워시한 후, 위 버퍼를 이용하여 세포막을 용해시킨 후 4°C, 13000rpm에서 10분 원심분리 하였다. 세포질 부분에 해당하는 상층 액을 따로 모은 후 SDS-sample buffer를 이용하여 98°C에서 끓였다. 펠렛은 위 버퍼를 이용하여 워시한 이후 2X SDS-sample buffer에 넣은 후 4°C, 16000rpm에서 원심분리 하였다. 상층 액을

모아 98℃에서 끓였다.

10. 통계적 분석

Prism version 5.0 software (GraphPad Software)를 이용했다. 모든 값은 mean ± SD로 표현되었고, two-tailed Student's t test 방법을 통해 $P<0.05$ 에서 차이의 중요도를 결정하였다.

III. 결과

1. MAP7은 제 1형 인터페론 반응의 음성조절자로써 기능한다.

선행 연구에서 미세소관 연관 단백질이 제 1형 인터페론 반응의 조절에 관여를 할 수 있다는 가능성을 확인하였다. 특히 여러 미세소관 연관 단백질 중 MAP4와 MAP7이 제 1형 인터페론 반응의 조절인자로써 기능할 수 있다는 가능성을 확인하였고, MAP4의 경우 BTN3A1과 상호작용하며 제 1형 인터페론을 양성적으로 조절하고 있다는 사실을 확인하였다(Seo et al., 2016; Portilho et al., 2016). 따라서 본 연구에서는 MAP7이 제 1형 인터페론 반응 조절 과정에서 어떤 영향을 주는지를 확인하고자 하였다. MAP7의 역할을 확인하기 위해 HeLa 세포에 MAP7의 번역 부위를 표적하는 siRNA를 트렌스펙션 하였다. 이후 DNA, RNA 합성체(poly dA:dT, poly I:C), RNA 바이러스인 Sendai 바이러스를 각각 처리하여 제 1형 인터페론의 발현 변화를 확인하였다. 그 결과 RNA 수준과 단백질 수준에서 각각 MAP7의 발현이 효과적으로 억제되는 것을 확인하였고(그림 2A, 그림 2B), MAP7의 발현이 억제되었을 때, RNA 합성체와 Sendai 바이러스를 처리하였을 때 특이적으로 제 1형 인터페론인 IFN-ß의 mRNA양이 증가하는 것을 확인하였다(그림 2B).

MAP7 발현 저해에 따른 IFN-ß mRNA 발현 증가 현상을 명확히

하기 위해, short hairpin RNA와 CRISPR-Cas9 시스템을 이용하여 MAP7을 각각 낙다운, 낙아웃 시킨 후 표현형을 관찰하고자 하였다. 두 시스템 모두 Lenti 바이러스 시스템을 활용하였다. shRNA에 의한 낙다운의 경우, MAP7의 번역부위에 특이적인 shRNA를 제작하였고, Lenti 바이러스를 이용하여 HeLa세포에서 지속적으로 발현되도록 하였다. qRT-PCR과 면역 블롯법을 통해 MAP7 mRNA와 단백질 모두 효과적으로 제해된다는 사실을 확인하였으며(그림 3A, 그림 3B), 이 때 IFN-ß의 mRNA양이 증가하는 것을 확인하였다(그림 3C).

CRISPR-Cas9 낙아웃의 경우 Lenti 바이러스를 통해 HeLa 세포에의 유전체에서 MAP7 유전자 번역 부위를 절단하였고, 효과적인 낙아웃 여부를 T7E1 assay와 면역 블롯법, 그리고 Sanger 시퀀싱을 통해 확인하고자 하였다. T7E1 assay는 DNA 이중 가닥의 미스매치를 인지하여 자르는 T7 endonuclease 1 효소를 이용하는 방법이다(Vouillot et al., 2015). CRISPR-Cas9에 의해 DNA 절단이 일어나면, PCR 증폭체에 이러한 미스매치가 유도되므로 T7 endonuclease 1 효소에 의해 절단이 일어난다(그림4A). 따라서 이를 DNA gel에서 확인하면 2개 이상의 PCR 밴드로 확인이 되는지 여부를 통해 CRISPR-Cas9에 의한 낙아웃이 일어났는지를 확인할 수 있는 것이다. 서로 다른 번역 부위를 표적하는 KO #1와 KO#2를 T7E1 assay를 진행하였을 때, 두 세포 주 모두 효과적으로 낙아웃이 되었음을 확인할 수 있었다(그림4B). 보다 명확하게 낙아웃 여부를 확인하기 위해, 절단 부위의 서열을 Sanger 시퀀싱을 통해 확인하였고

(Fig 4C), 면역 블롯법, qRT-PCR을 통해 KO #1와 KO #2 세포 주 모두에서 MAP7의 발현이 일어나지 않는 것을 각각 단백질, mRNA수준에서 확인하였다(그림 5A, 그림 5B). siRNA, shRNA를 통해 발현을 저해시켰을 때와 마찬가지로, RNA 합성체를 통한 자극이 주어졌을 때, WT에 비해 MAP7이 낙아웃 된 세포 주에서 제 1형 인터페론인 IFN-ß의 mRNA양이 증가하는 것을 확인하였다(그림4C). 이를 통해 MAP7은 RNA 항원 자극 특이적으로 제 1형 인터페론 반응을 음성적으로 조절하고 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

2. MAP7은 RIG-I 발현과 IRF3의 활성을 억제한다.

앞선 결과에서 MAP7의 발현 저해에 의한 효과가 RNA 자극 특이적으로 일어났기 때문에, MAP7이 RLR pathway의 조절 인자 중 어떤 물질에 영향을 주는지 확인할 필요가 있다고 생각했다. 따라서 RLR pathway의 주요 조절 인자인 RIG-I, MDA5, MAVS의 양, 그리고 IRF3의 인산화 (phosphorylation) 여부가 MAP7 발현 저해 상황에서 변화하는지를 관찰하였다. 그 결과 MAP7 발현 저해 시 IRF3의 인산화 정도가 증가하는 것을 확인하였으며, RIG-I의 발현 역시 증가하는 것을 확인하였다(그림6A). 특히 RIG-I의 경우, mRNA양에서도 그 증가가 확인되었다(그림 6B, 그림 6C). RLR pathway에서 RNA 항원은 RIG-I에 의해 인지되고, IRF3의 인산화를 유도한다. 인산화된 IRF3는 핵

내로 이동하여 IFN-β의 발현을 촉진한다. 따라서 MAP7 발현 저하에 따른 제 1형 인터페론 반응의 증가는, MAP7의 발현 저해에 의해 RIG-I의 발현이 증가하고, 이로 인해 RLR pathway가 촉진되어 IRF3의 인산화가 촉진된 결과라 생각할 수 있다.

3. MAP7은 IRF3의 이동을 억제함으로써 RIG-I의 전사를 억제한다.

MAP7 발현 저하에 따른 RIG-I 발현의 증가 기전을 파악하기 위해, 우선 RIG-I의 발현 증가가 어느 수준에서 일어나는지를 파악할 필요가 있었다. MAP7의 발현이 저해되었을 때 RIG-I의 mRNA가 증가했기 때문에, 전사과정에서 프로모터 활성도의 증가 혹은 전사 이후 mRNA의 안정성 증가에 의한 결과 중 하나일 것으로 추측할 수 있었다. 먼저 MAP7 발현 저해에 따른 RIG-I mRNA의 증가가 전사 후 과정에 의한 것인지를 확인하기 위해, RNA 중합체 II의 작용을 저해하는 Actinomycin D 을 처리한 후 시간별로 mRNA의 상대적 양의 변화를 확인하였다. 그 결과 대조군과 비교하였을 때, MAP7 발현 저하에 따른 RIG-I mRNA의 상대적 양에 차이가 없었다(그림 7A). 따라서 MAP7 발현 저하에 따른 RIG-I mRNA의 증가는 전사 후 mRNA의 안정화 촉진에 의한 결과가 아님을 알 수 있다. 다음으로 MAP7 발현 저하에 따른 RIG-I mRNA 발현의 증가가 전사 수준에서 일어나는지를 확인하기 위해 Luciferase 프로모터 어세이를 수행하였다. RIG-I 프로모터를 클로닝한 후 Luciferase 유전자 앞에 붙여줌으로써 MAP7 발현 저하에 따른 RIG-I 프로모터의 활성도를 측정하였다. 그 결과

MAP7 발현 저하에 따라 RIG-I 프로모터의 활성도가 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다(그림 7B). 이 데이터를 통해, MAP7 발현 저하에 따른 RIG-I 발현의 증가는 RIG-I mRNA의 전사가 촉진됨으로 인한 결과라는 것을 알 수 있었다.

MAP7은 미세소관 연관 단백질로써, 세포 내에서 여러 물질의 운반에 관여한다고 알려져 있다. 따라서 MAP7이 RIG-I의 전사 인자의 운반에 관여를 하고 있고, 그로 인해 MAP7 발현 저해 시 RIG-I의 발현이 증가할 것이라는 가설을 세웠다. 알려진 바에 따르면 IRF1과 IRF3가 RIG-I의 전사인자로 기능할 수 있다(Su et al., 2007; Hayakari et al., 2016). IRF1과 IRF3 중 어떤 전사인자가 RIG-I 발현 조절에 있어 MAP7에 의존적인지를 확인하기 위해 siRNA를 이용하여 RIG-I의 mRNA 발현을 비교하였다. IRF1의 경우, MAP7과 동시에 발현을 저해시켰을 때 RIG-I의 발현이 어느정도 회복되는 것으로 보아, MAP7과 별개의 pathway로 기능을 할 것이라는 것을 알 수 있었고, IRF3의 경우, MAP7과 함께 저해시킴에도 RIG-I의 발현이 회복되지 않는 것으로 보아, MAP7 의존적으로 RIG-I의 발현을 조절하고 있음을 알 수 있었다(그림8A). 이 데이터를 통해 MAP7이 IRF3의 이동 및 활성에 영향을 줌으로써 RIG-I의 발현을 조절하고, 이로 인해 제 1형 인터페론 반응을 조절할 것이라는 가능성을 확인할 수 있었다. 실제로 IRF3의 위치가 MAP7 발현 전후로 변화하는지를 확인하기 위해 Cytosol-Nuclear fractionation 실험을 수행하였다. 이 때, IRF3의 위치 이동이 제 1형 인터페론 반응이 촉진되기 전에 일어나는 것임을 명확히

하기 위해, 인터페론 수용체를 항체를 이용하여 막은 상황에서 실험을 수행하였다. 그 결과 MAP7의 발현이 저해되었을 때 IRF3의 핵 내로의 이동이 증가하는 것을 확인하였다(그림 8B, 그림 8C). 똑같이 인터페론 수용체를 막은 상황에서 현미경을 통해 IRF3의 위치를 관찰하였을 때도 마찬가지로, MAP7의 발현이 저해된 상황에서 IRF3의 핵 내로의 이동이 증가한 것을 확인할 수 있었다(그림 8D).

지금까지의 결과를 바탕으로, MAP7은 IRF3의 이동을 억제함으로써 RIG-I의 발현을 저해하고, 그로 인해 제 1형 인터페론 반응의 음성 조절인자로써 기능을 하고 있다는 결론을 내렸다.

IV. 고찰

세포 신호 전달 기전에는 여러 분자들이 관여한다. 이러한 분자들은 세포 내에서 무작위로 펼쳐져 있는 것이 아니라, 미세소관 혹은 미세소관 연관 단백질과 결합하여 적절하게 정렬되고 운반된다(Drewes, G et al., 1998; Metzger et al., 2012; Barlan and Gelfand, 2017)). 이러한 분자의 정렬과 운반은 정상적인 신호 전달 기전에 필수적이며, 세포 내에서 조절 인자들의 위치 배열에 문제가 생겼을 때 비정상적인 신호전달 과정을 초래할 수 있다(Hunter and Nixon, 2006). 제 1형 인터페론 반응의 조절과 관련하여 많은 분자들이 동정이 되었지만, 이러한 분자들의 공간적 배열이 어떻게 조절되는지에 대한 연구는 많이 이루어지지 않았다. 다른 신호전달 조절 기전과 마찬가지로, 제 1형 인터페론 반응 조절 과정에 있어 미세소관 혹은 미세소관 연관 단백질에 의한 분자의 위치 조절이 중요하다는 것이 보고되고 있다(Seo et al., 2016; Portilho et al., 2016).

본 연구에서는 미세소관 연관 단백질 중 하나인 MAP7이 제 1형 인터페론 반응의 음성 조절인자로써 기능할 수 있다는 사실을 밝혔다. 구체적으로, MAP7이 IRF3의 핵 내로의 이동을 억제하고 있고, 이로 인해 IRF3에 의한 RIG-I의 전사가 억제되고 있음을 밝혔다, 결과적으로 RIG-I 발현의 억제로 인해 제 1형 인터페론의 반응이 억제되는 기전을 밝힐 수 있었다.

MAP7의 기전을 보다 구체적으로 밝히기 위해, MAP7과 상호작용하는

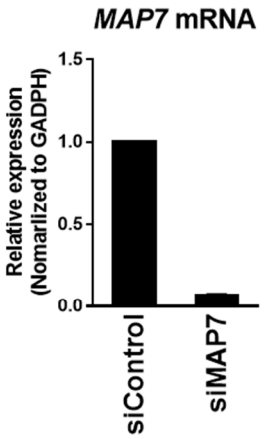
단백질을 찾아내는 추가 연구가 필수적이다. 공동 면역 침강법을 통해 MAP7과 IRF3의 상호작용 여부를 확인했을 때, MAP7과 IRF3가 직접적인 상호작용을 하지 않는 것을 볼 수 있었다. 따라서 MAP7에 의한 IRF3의 이동 기전에는, 매개체가 되는 다른 단백질의 존재가 중요할 것이라 유추할 수 있다. 특히 미세소관 연관 단백질의 경우, 모터 단백질과의 상호작용을 통해 물질 운반을 조절하는 경우가 많기 때문에, 이러한 모터 단백질이 MAP7-IRF3의 매개체로써 기능할 수 있다. 이러한 가능성을 확인하기 위해, 모터 단백질인 dynein과 kinesin의 기능을 각각 Ciliobrevin D와 SB743921을 통해 억제한 상황에서 RIG-I의 mRNA양을 확인해 보았고, kinesin 억제제인 SB743921을 처리하였을 때 특이적으로 RIG-I의 mRNA발현이 증가하는 사실을 확인할 수 있었다(그림 9A). 특히 알려진 바에 따르면, MAP7은 kinesin-1 및 kinesin-3와 미세소관과의 affinity에 영향을 줄 수 있다(Monroy et al., 2018; Metivier et al., 2019). 따라서 kinesin-1 혹은 kinesin-3, 혹은 다른 kinesin이 MAP7-IRF3의 매개체로 작용하여, 제 1형 인터페론 조절에 관여할 것이라 생각해 볼 수 있다. 이와 관련하여 MAP7의 cofactor로 규명된 Kinesin-3의 heavy chain인 KIF1A가 MAP7과 함께 발현이 저해되었을 때 IRF3의 활성도가 감소하는 것을 확인하였다(그림 9B). 이후 면역 형광법 실험 등을 통해 이를 보다 명확하게 확인할 필요가 있다. Kinesin 이외에도 밝혀지지 않은 다른 단백질이 MAP7과 상호작용하여 IRF3의 이동을 조절할 가능성도 있다. 이러한 가능성을 확인 하기 위해서는, MAP7을

bait로 하여 pull-down한 뒤, 상호작용하는 단백질을 액체 질량 분석법을 통해 확인해볼 수 있다. 이런 식으로 MAP7과 IRF3의 매개체가 되는 단백질을 동정한다면, 본 연구에서 밝힌 기전으로 보다 구체적으로 규명할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

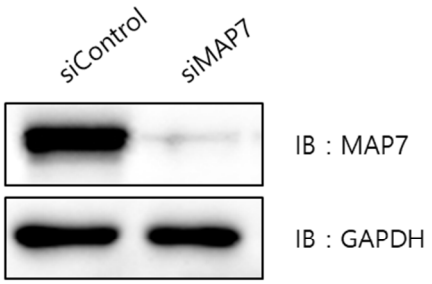
본 연구에서는 RNA 자극 상황에서 MAP7의 기능에 주목하였다. 하지만 그림 6, 그림 7에서 나온 바와 같이 RNA자극을 비롯한 항원 자극이 없는 상황에서도, MAP7의 발현이 저해되었을 때 IRF3의 인산화 정도와 RIG-I의 발현이 증가하는 현상을 확인할 수 있다. 이러한 결과를 통해, MAP7은 basal 상태에서 비정상적인 면역 반응이 일어나지 못하도록 억제하면서 면역 항상성을 유지하는 기능을 하고 있다고 생각할 수 있다. 선행 연구에서 밝혀낸 MAP4의 경우, 제 1형 인터페론의 양성 조절인자로써, MAP7과 반대의 기능을 하고 있다. 이와 관련하여 RNA 항원 자극 전후로 MAP7의 발현에 변화가 없음에도 IRF3의 이동 및 인터페론 반응의 증가가 야기되는 기전에 대하여, 바이러스 등 핵산 항원 자극에 따라 MAP4와 MAP7이 경쟁적으로 작용함으로써 인터페론의 음성 조절 상태에서 양성 조절 상태로의 전이가 일어날 가능성을 생각해볼 수 있다(그림10). 즉, 항원 자극이 없는 basal 상황에서 MAP7이 인터페론 반응을 억제하며 면역 항상성을 유지하고 있다가, 항원 자극이 오면 MAP4의 작용이 촉진되어 인터페론 반응을 시작 시키는 기전을 생각해볼 수 있다. 비정상적인 면역 반응이 억제되지 못하면 자가면역 질환을 비롯하여 여러가지 면역 질환을 일으킬 수 있기 때문에(Banchereau et al., 2006; McNab et al., 2015),

basal 상태에서 면역 항상성을 유지하는 것은 중요하다. 따라서 MAP7에 의한 제 1형 인터페론 반응의 음성 조절 기전을 보다 구체적으로 규명한다면, 자가면역 질환의 이해에 한 걸음 더 나아갈 수 있을 것으로 기대된다.

A


MAP7 mRNA
Relative expression
(Nomarlized to GADPH)
1.5
1.0
0.5
0.0
siControl
siMAP7

B


siControl
siMAP7
IB : MAP7
IB : GAPDH

C

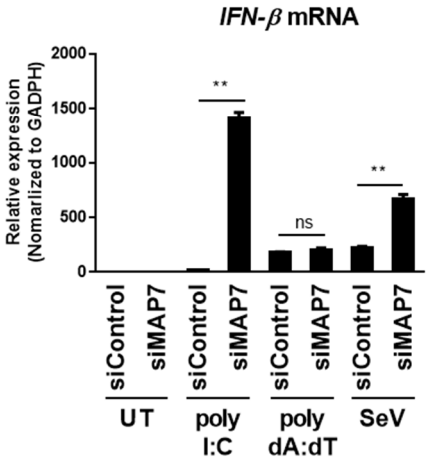
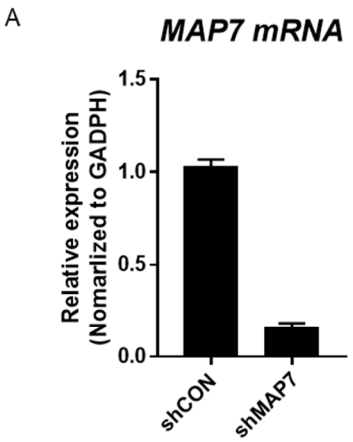

IFN-β mRNA
Relative expression
(Nomarlized to GADPH)
2000
1500
1000
500
0
**
ns
**
siControl
siMAP7
siControl
siMAP7
siControl
siMAP7
siControl
siMAP7
UT
poly
I:C
poly
dA:dT
SeV

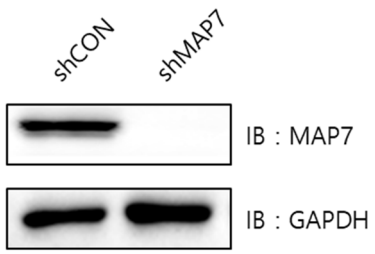
그림 2. siRNA를 이용한 MAP7의 발현 저하와, MAP7 발현 저하에 따른 IFN-ß 발현 증가

A. Scrambled 혹은 MAP7 번역 부위에 대한 siRNA를 HeLa 세포에 트렌스펙션 하였다. MAP7의 mRNA 발현을 qRT-PCR을 통해 확인한 결과이다. Scrambled siRNA를 트렌스펙션한 세포 주는 siControl, MAP7을 표적하는 siRNA를 트렌스펙션한 세포 주는 siMAP7로 표시하였다.

B. siControl에 대비하여 siMAP7의 단백질 발현을 면역 블롯법을 통해 확인한 결과이다.

C. RNA 합성체인 poly I:C, DNA 합성체인 poly dA:dT, RNA 바이러스인 sendai 바이러스 자극 상황에서 MAP7 발현 저하에 따른 IFN-ß 발현 증가를 qRT-PCR을 통해 확인하였다. Student's t-test를 통해 분석하여 $P<0.05$일 때 *로 표시하였다.


A
MAP7 mRNA
Relative expression
(Nomarlized to GADPH)
1.5
1.0
0.5
0.0
shCON
shMAP7


B
shCON
shMAP7
IB : MAP7
IB : GAPDH

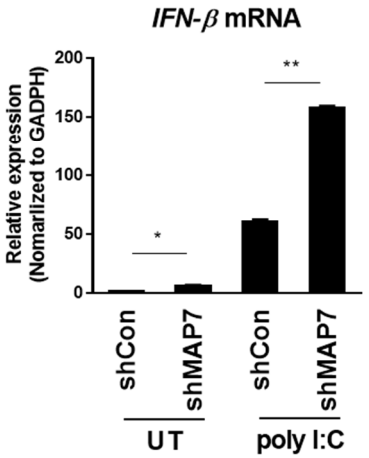

C
IFN-β mRNA
Relative expression
(Nomarlized to GADPH)
200
150
100
50
0
*
**
shCon
shMAP7
shCon
shMAP7
UT
poly I:C

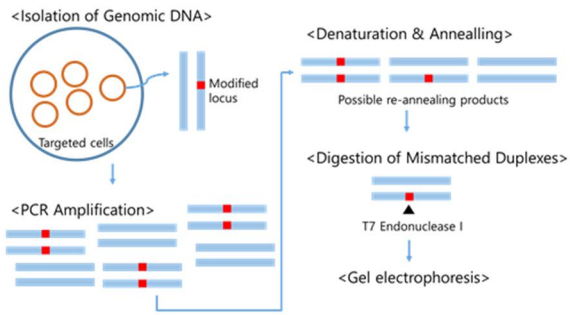
그림 3. shRNA를 이용한 MAP7의 발현 저하와, MAP7 발현 저하에 따른 IFN-ß 발현 증가

A. Scrambled 혹은 MAP7 번역 부위에 대한 shRNA를 레트로 바이러스 감염을 통해 HeLa 세포에 형질주입 하였다. MAP7의 mRNA의 발현을 qRT-PCR을 통해 확인한 결과이다. Scrambled shRNA를 형질주입한 세포 주는 shCON, MAP7을 표적하는 shRNA를 형질 주입한 세포 주는 shMAP7로 표시하였다.

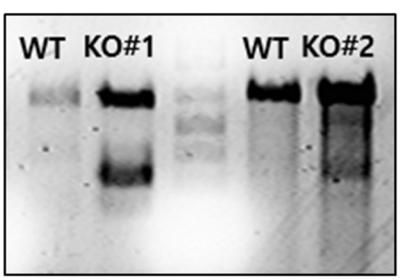
B. shCON에 대비하여 shMAP7의 단백질 발현을 면역 블롯법을 통해 확인한 결과이다.

C. RNA 합성체인 poly I:C 자극 상황에서 MAP7 발현 저하에 따른 IFN-ß 발현 증가를 qRT-PCR을 통해 확인하였다. Student's t-test를 통해 분석하여 $P<0.05$일 때 *로 표시하였다.

A


<Isolation of Genomic DNA>
Targeted cells
Modified locus
<PCR Amplification>
<Denaturation & Annealing>
Possible re-annealing products
<Digestion of Mismatched Duplexes>
T7 Endonuclease I
<Gel electrophoresis>

B


WT
KO#1
WT
KO#2

C

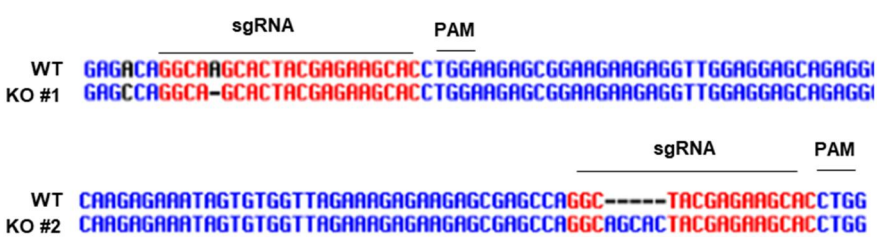

sgRNA
PAM
WT GAGACAGGCAAGCACTACGAGAAGCACCTGGAAGAGCGGAAGAAGAGGTTGGAGGAGCAGAGG
KO #1 GAGCCAGGCA-GCACTACGAGAAGCACCTGGAAGAGCGGAAGAAGAGGTTGGAGGAGCAGAGG
sgRNA
PAM
WT CAAGAGAAATAGTGTGGTTAGAAAGAGAAGAGCGAGCCAGGC-----TACGAGAAGCACCTGG
KO #2 CAAGAGAAATAGTGTGGTTAGAAAGAGAAGAGCGAGCCAGGCAGCACTACGAGAAGCACCTGG

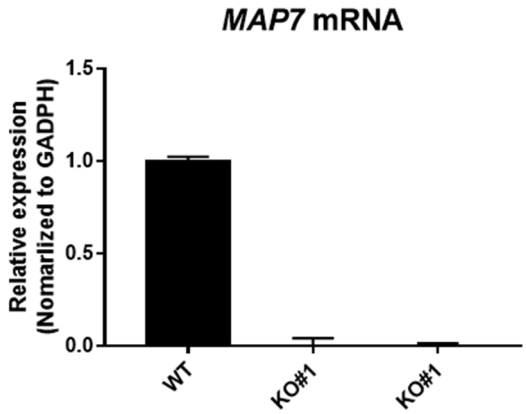
그림 4. T7E1 어세이와 sanger 시퀀싱을 통한 MAP7 낙아웃 여부 확인

A. T7E1 어세이 실험 모식도.

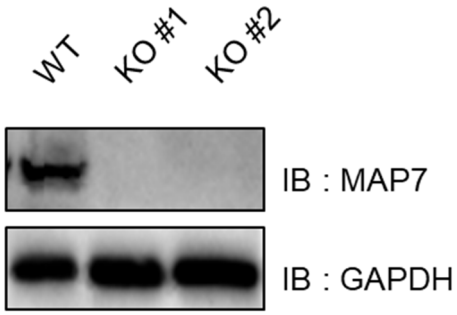
B. T7E1 어세이 결과. 서로 다른 번역 부위를 표적하는 sgRNA를 이용하여 만든 두 세포 주 KO #1, KO #2 모두 CRISPR-Cas9에 의해 DNA 절단이 일어나 T7E1 효소에 의해 미스매치가 절단되어 DNA 젤 상에서 두개의 밴드로 나타나는 것을 확인할 수 있다.

C. Sanger 시퀀싱 결과. 각각 KO #1와 KO #2 에서 사용한 sgRNA와 PAM 서열, 그리고 이로 인해 절단된 DNA 서열을 확인할 수 있다.

A


MAP7 mRNA
Relative expression
(Nomarlized to GADPH)
1.5
1.0
0.5
0.0
WT
KO#1
KO#1

B


WT
KO #1
KO #2
IB : MAP7
IB : GAPDH

C

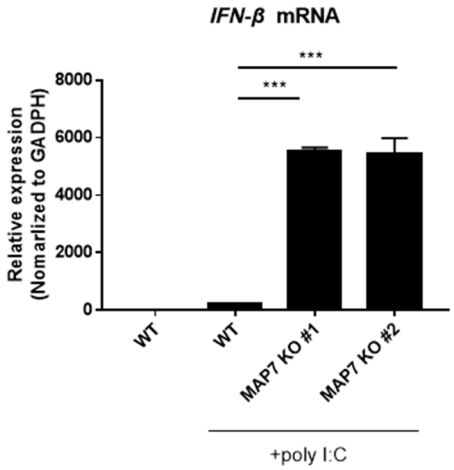

IFN-β mRNA
Relative expression
(Nomarlized to GADPH)
8000
6000
4000
2000
0
***
***
WT
WT
MAP7 KO #1
MAP7 KO #2
+poly I:C

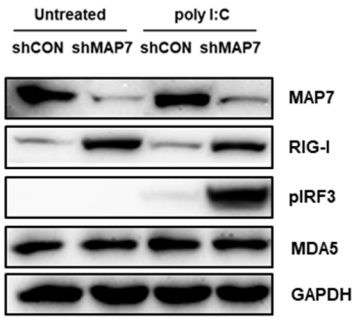
그림 5. CRISPR-Cas9를 이용한 MAP7 낙아웃과, MAP7 낙아웃에 의한 IFN-ß mRNA 발현 증가

A. Non-target 혹은 MAP7 서로 다른 번역 부위에 대한 sgRNA를 레트로 바이러스 감염을 통해 HeLa 세포에 형질주입 하였다. MAP7의 mRNA의 발현을 qRT-PCR을 통해 확인한 결과이다. Non-target sgRNA를 형질주입한 세포 주는 WT, MAP7을 서로 다른 번역부위를 표적하는 sgRNA에 대한 세포 주를 각각 KO #1, KO #2로 표기하였다.

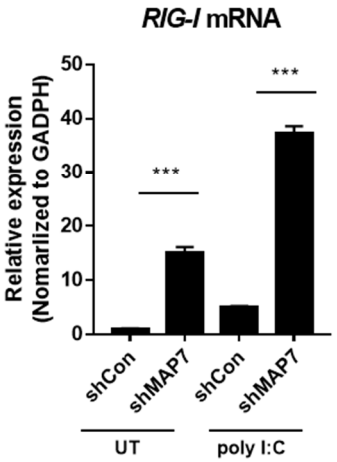
B. WT에 대비하여 KO #1, KO #2 세포 주에서 MAP7의 발현량을 면역 블롯법을 통해 확인한 결과이다.

C. RNA 합성체인 poly I:C 자극 상황에서 MAP7 낙아웃에 따른 IFN-ß 발현 증가를 qRT-PCR을 통해 확인하였다. Student's t-test를 통해 분석하여 $P<0.05$일 때 *로 표시하였다.

A


Untreated
poly I:C
shCON shMAP7 shCON shMAP7
MAP7
RIG-I
pIRF3
MDA5
GAPDH

B


RIG-I mRNA
Relative expression
(Nomarlized to GADPH)
50
40
30
20
10
0
***
***
shCon
shMAP7
shCon
shMAP7
UT
poly I:C

C

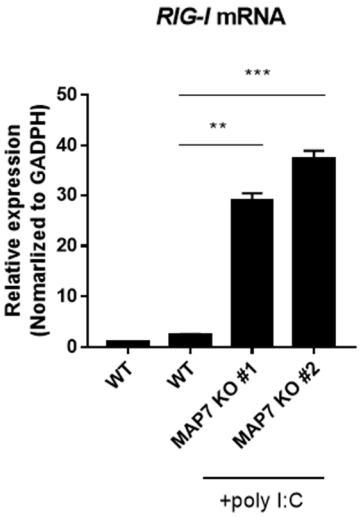

RIG-I mRNA
Relative expression
(Nomarlized to GADPH)
50
40
30
20
10
0
***
**
WT
WT
MAP7 KO #1
MAP7 KO #2
+poly I:C

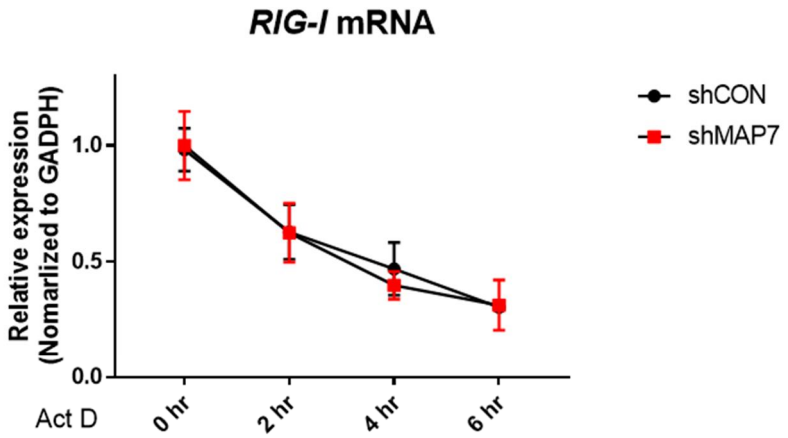
그림 6. MAP7 발현 저해에 따른 RIG-I발현의 증가

A. MAP7 발현 저해에 따른 RLR pathway에 관여하는 분자들의 발현량을 면역 블롯법을 통해 확인하였다. 이 때, RNA 항원 자극이 없을 때와 있을 때 모두 RIG-I 단백질의 발현량과 IRF3의 인산화 정도가 증가하는 것을 확인하였다.

B. shRNA를 통해 MAP7의 발현량을 저해시켰을 때, RNA 항원 자극이 없을 때와 있을 때 모두 RIG-I의 mRNA양이 유의미하게 증가하는 것을 qRT-PCR을 통해 확인하였다. Student's t-test를 통해 분석하여 $P<0.05$일 때 *로 표시하였다.

C. CRISPR-Cas9을 통해 MAP7을 낙아웃 시켰을 때, RNA 항원 자극이 없을 때와 있을 때 모두 RIG-I의 mRNA양이 유의미하게 증가하는 것을 qRT-PCR을 통해 확인하였다. Student's t-test를 통해 분석하여 $P<0.05$일 때 *로 표시하였다.

A


RIG-I mRNA
Relative expression
(Nomarlized to GADPH)
1.0
0.5
0.0
Act D
0 hr
2 hr
4 hr
6 hr
shCON
shMAP7

B

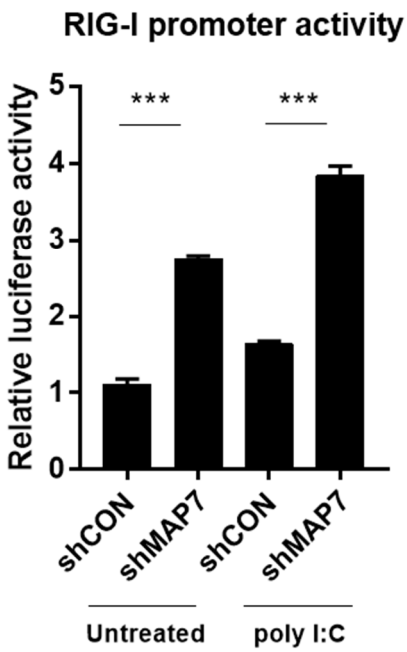

RIG-I promoter activity
Relative luciferase activity
5
4
3
2
1
0
***
***
shCON
shMAP7
shCON
shMAP7
Untreated
poly I:C

그림 7. MAP7에 의한 RIG-I의 발현 조절이 전사 수준에서 일어남을 확인

A. Actinomycin D를 통해 RNA 중합효소 ll의 작용을 억제시킨 후 시간에 따른 mRNA의 상대적 변화량을 qRT-PCR을 통해 확인하였다. shRNA에 의해 MAP7의 발현이 저해되어도, 대조군인 shCON에 대비하여 mRNA의 안정성에 큰 차이가 없는 것을 확인할 수 있다.

B. 프로모터 어세이를 통해 RIG-I의 프로모터 활성도를 확인하였다. shRNA에 의해 MAP7의 발현이 저해되었을 때 RIG-I의 프로모터 활성도가 증가하는 것을 확인할 수 있다. Student's t-test를 통해 분석하여 $P<0.05$일 때 *로 표시하였다.

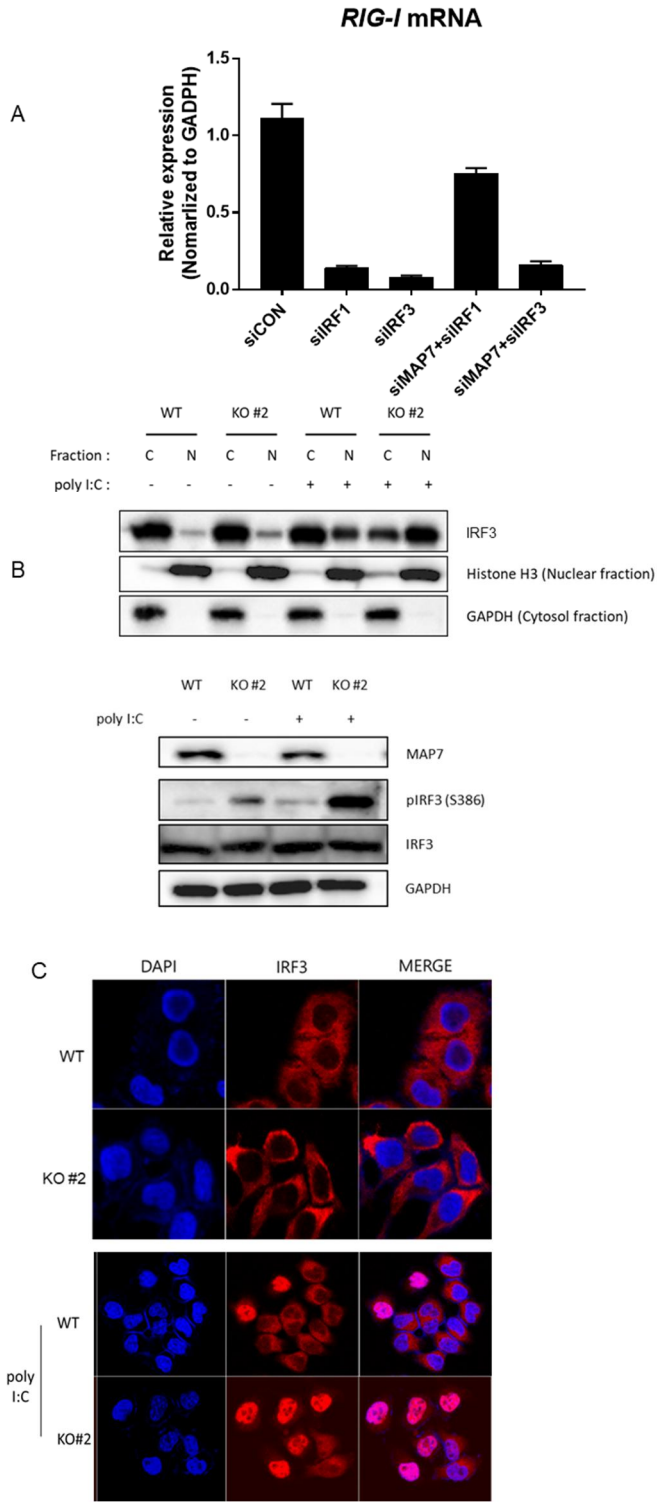

A
RIG-I mRNA
Relative expression (Nomarlized to GADPH)
1.5
1.0
0.5
0.0
siCON
siIRF1
siIRF3
siMAP7+siIRF1
siMAP7+siIRF3
B
WT
KO #2
WT
KO #2
Fraction :
C N C N C N C N
poly I:C :
- - - - + + + +
IRF3
Histone H3 (Nuclear fraction)
GAPDH (Cytosol fraction)
WT
KO #2
WT
KO #2
poly I:C
- - + +
MAP7
pIRF3 (S386)
IRF3
GAPDH
C
DAPI
IRF3
MERGE
WT
KO #2
poly I:C
WT
KO#2

그림 8. IRF3가 MAP7의존적으로 RIG-I의 전사를 조절함

A. siRNA를 이용하여 IRF1, IRF3의 발현을 각각 저해하거나 혹은 IRF1과 MAP7, IRF3와 MAP7의 발현을 동시에 저해했을 때 RIG-I mRNA의 양을 qRT-PCR을 통해 확인하였다. IRF1과 MAP7의 발현을 동시에 저해하였을 때는 IRF1만 저해했을 때와 비교하여 RIG-I mRNA양이 회복되었지만, IRF3와 MAP7의 발현을 동시에 저해하였을 때는 IRF3만 저해했을 때와 비교하여 RIG-I mRNA양이 회복되지 못했다. 이 결과를 통해 IRF1이 아닌 IRF3가 MAP7 의존적으로 RIG-I의 전사를 조절하고 있음을 알 수 있다.

B. Cytosol-Nuclear Fractionation 결과. WT에 비해 MAP7이 낙아웃 되었을 때 IRF3의 핵 내로의 이동이 증가함을 면역 블롯법을 통해 확인하였다. Histone H3는 핵 내에만 존재하는 단백질, GAPDH는 세포질에만 존재하는 단백질이다. IFNAR1 항체를 이용하여 인터페론 수용체를 막은 후 진행한 실험이다.
C: cytosol(세포질), N: nucleus(핵)을 의미한다.

C. 면역 형광 검사법을 통해 IRF3의 위치를 확인하였다. WT에 비해 MAP7이 낙아웃 되었을 때 IRF3의 핵 내로의 이동이 촉진됨을 확인할 수 있다(붉은 색 : IRF3, 푸른 색 : DAPI). IFNAR1 항체를 이용하여 인터페론 수용체를 막은 후 진행한 실험이다.

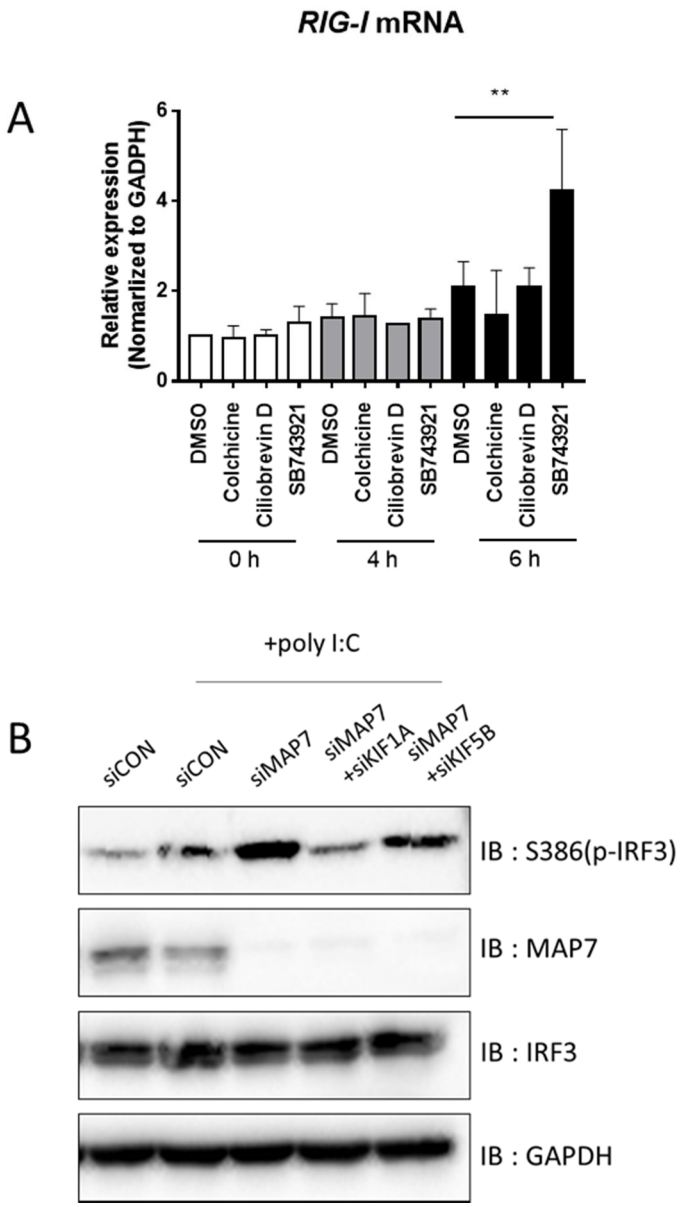

RIG-I mRNA
A
Relative expression
(Nomarlized to GADPH)
6
4
2
0
**
DMSO
Colchicine
Ciliobrevin D
SB743921
DMSO
Colchicine
Ciliobrevin D
SB743921
DMSO
Colchicine
Ciliobrevin D
SB743921
0 h
4 h
6 h
+poly I:C
B
siCON
siCON
siMAP7
siMAP7
+siKIF1A
siMAP7
+siKIF5B
IB : S386(p-IRF3)
IB : MAP7
IB : IRF3
IB : GAPDH

그림 9. Kinesin의 제 1형 인터페론 반응 조절자로서의 가능성 확인

A. 튜불린 중합 억제제(colchicine), dynein 억제제(ciliobrevin D), kinesin 억제제(SB743921)을 각각 처리한 후 표시된 시간 이후에 RIG-I mRNA양을 qRT-PCR을 통해 확인하였다. Kineisn 억제제를 처리했을 때 특이적으로 RIG-I mRNA양이 증가함을 확인할 수 있었다. Student's t-test를 통해 분석하여 $P<0.05$일 때 *로 표시하였다.

B. siRNA를 이용하여 kinesin-1의 heavy chain(KIF5B)와 Kinesin-3의 heavy chain(KIF1A)을 MAP7과 함께 발현량을 감소시킨 후 IRF3의 활성도(S386)을 측정한 결과. MAP7과 KIF1A의 발현을 함께 감소시켰을 때 RIG-I의 발현이 대조군 수준으로 감소하는 것을 확인할 수 있다.

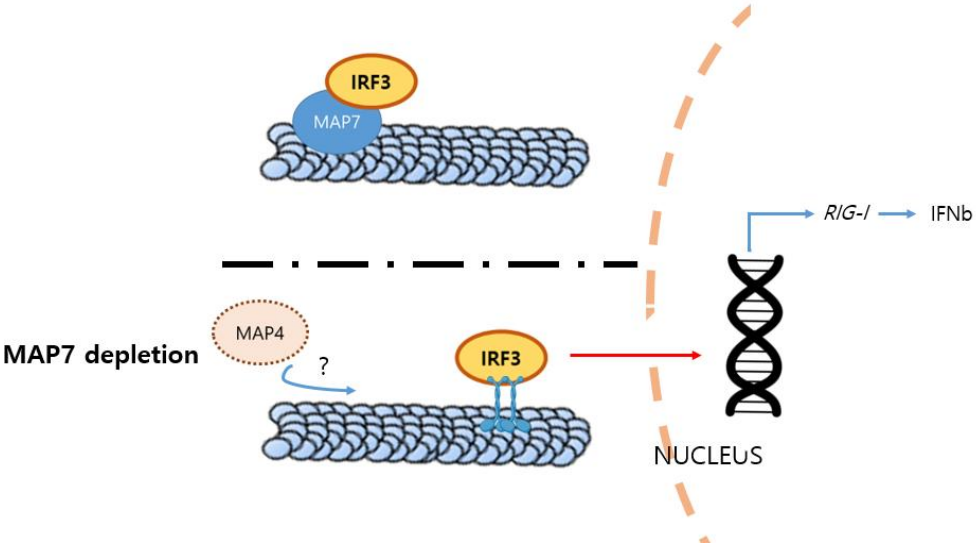


그림 10. 그림 요약

본 연구를 통해 확인한, MAP7에 의한 제 1형 인터페론 반응 조절 과정을 그림으로 나타내었다.

V. 참고문헌

[1] Arimoto, K., Takahashi, H., Hishiki, T., Konishi, H., Fujita, T., and Shimotohno, K. (2007). Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 7500-7505

.

[2] Banchereau, J., and Pascual, V. (2006). Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. Immunity 25, 383-392.

[3] Barlan, K., and Gelfand, V.I. (2017). Microtubule-Based Transport and the Distribution, Tethering, and Organization of Organelles. Cold Spring Harb Perspect Biol 9.

[4] Barlan, K., Lu, W., and Gelfand, V.I. (2013). The microtubule-binding protein ensconsin is an essential cofactor of kinesin-1. Curr Biol 23, 317-322.

[5] Dobbs, N., Burnaevskiy, N., Chen, D., Gonugunta, V.K., Alto, N.M., and Yan, N. (2015). STING Activation by Translocation from the ER Is Associated with Infection and Autoinflammatory Disease. Cell Host

Microbe 18, 157-168.

[6] Drewes, G., Ebneth, A., and Mandelkow, E.M. (1998). MAPs, MARKs and microtubule dynamics. Trends Biochem Sci 23, 307-311.

[7] Faire, K., Waterman-Storer, C.M., Gruber, D., Masson, D., Salmon, E.D., and Bulinski, J.C. (1999). E-MAP-115 (ensconsin) associates dynamically with microtubules in vivo and is not a physiological modulator of microtubule dynamics. J Cell Sci 112 (Pt 23), 4243-4255.

[8] Hayakari, R., Matsumiya, T., Xing, F., Yoshida, H., Hayakari, M., and Imaizumi, T. (2016). Critical Role of IRF-3 in the Direct Regulation of dsRNA-Induced Retinoic Acid-Inducible Gene-I (RIG-I) Expression. PLoS One 11, e0163520.

[9] Hu, Y.W., Zhang, J., Wu, X.M., Cao, L., Nie, P., and Chang, M.X. (2018). TANK-Binding Kinase 1 (TBK1) Isoforms Negatively Regulate Type I Interferon Induction by Inhibiting TBK1-IRF3 Interaction and IRF3 Phosphorylation. Front Immunol 9, 84.

[10] Hunter, I., and Nixon, G.F. (2006). Spatial compartmentalization

of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1-dependent signaling pathways in human airway smooth muscle cells. Lipid rafts are essential for TNF-alpha-mediated activation of RhoA but dispensable for the activation of the NF-kappaB and MAPK pathways. J Biol Chem 281, 34705-34715.

[11] Ivashkiv, L.B., and Donlin, L.T. (2014). Regulation of type I interferon responses. Nat Rev Immunol 14, 36-49.

[12] Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., and Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. J Exp Med 205, 1601-1610.

[13] Lee, G. (1993). Non-motor microtubule-associated proteins. Curr Opin Cell Biol 5, 88-94.

[14] McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. Nat Rev Immunol 15, 87-103.

[15] Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 388, 394-397.

[16] Metivier, M., Monroy, B.Y., Gallaud, E., Caous, R., Pascal, A., Richard-Parpaillon, L., Guichet, A., Ori-McKenney, K.M., and Giet, R. (2019). Dual control of Kinesin-1 recruitment to microtubules by Ensconsin in Drosophila neuroblasts and oocytes. Development 146.

[17] Metzger, T., Gache, V., Xu, M., Cadot, B., Folker, E.S., Richardson, B.E., Gomes, E.R., and Baylies, M.K. (2012). MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. Nature 484, 120-124.

[18] Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Lee, H., Zou, J., Saitoh, T., and Akira, S. (2013). Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. Nat Immunol 14, 454-460.

[19] Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. Nature 312, 237-242.

[20] Monroy, B.Y., Sawyer, D.L., Ackermann, B.E., Borden, M.M., Tan, T.C., and Ori-McKenney, K.M. (2018). Competition between microtubule-associated proteins directs motor transport. Nat Commun 9, 1487.

[21] Portilho, D.M., Persson, R., and Arhel, N. (2016). Role of non-motile microtubule-associated proteins in virus trafficking. Biomol Concepts 7, 283-292.

[22] Seo, M., Lee, S.O., Kim, J.H., Hong, Y., Kim, S., Kim, Y., Min, D.H., Kong, Y.Y., Shin, J., and Ahn, K. (2016). MAP4-regulated dynein-dependent trafficking of BTN3A1 controls the TBK1-IRF3 signaling axis. Proc Natl Acad Sci U S A 113, 14390-14395.

[23] Su, Z.Z., Sarkar, D., Emdad, L., Barral, P.M., and Fisher, P.B. (2007). Central role of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) in controlling retinoic acid inducible gene-I (RIG-I) expression. J Cell Physiol 213, 502-510.

[24] Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. Science 339, 786-791.

[25] Vouillot, L., Thelie, A., and Pollet, N. (2015). Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. G3 (Bethesda) 5, 407-415.

[26] Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.M., Gale, M., Jr., Akira, S., et al. (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.

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

[28] Zevini, A., Olagnier, D., and Hiscott, J. (2017). Crosstalk between Cytoplasmic RIG-I and STING Sensing Pathways. Trends Immunol 38, 194-205.

Abstract

Negative Regulation of Type I Interferon Response by Microtubule-associated protein 7

Yeumin Kim

School of Biological science

The Graduate School

Seoul National University

The type I Interferon (IFN) responses are the most important innate immune response induced by viral infection. The innate immune sensors detect viral nucleic acids and induce type I IFN. Especially, RNA-mediated innate immune responses are triggered by RNA sensors such as retinoic acid-inducible gene I(RIG-I) and melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5), which phosphorylate TANK-binding kinase 1 (TBK1). Phopho-TBK1 activates IFN-regulatory factor 3 (IRF3), resulting in its translocation to the nucleus. Like this, redistribution of key signaling molecules triggered by the IFN signaling pathway is important. However, the mediators of this spatial regulation have yet to be defined. Here, we identify microtubule associated protein 7 (MAP7) as a negative regulator of

RNA mediated type I IFN responses. Knockdown using RNAi or CRISPR-Cas9 based knockout of MAP7 result in upregulation of IFN-ß mRNA. We show that depletion of MAP7 promotes phosphorylation and translocation to the nucleus of IRF3, which is known as the transcription factor of RIG-I. Translocated IRF3 then upregulates RIG-I transcription and induces type I IFN response. Furthermore, we found that MAP7 inhibit IRF3 translocation even in the resting station to maintain immune homeostasis. Our findings demonstrate a critical role for MAP7 in the spatial regulation of IRF3, which regulate RIG-I transcription and type I IFN signaling.

Keywords: Type I Interferon response, MAP7, IRF3, RIG-I, nucleic acid, RLR pathway,

Student Number: 2017-27005