

IL-1 receptor type 1 による IL-1 α の細胞内分解調節に関する研究

保坂 万智

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻口腔構造機能学分野
日本大学歯学部 口腔外科学第Ⅱ講座
(指導: 米原啓之 教授, 浅野正岳 教授)

要旨

【目的】IL-1 α は傷害を受けた細胞から放出される DAMPs の代表的分子であり, 標的細胞の細胞膜上の IL-1R1 に結合することでシグナルを伝達する。しかし, これまでの研究で, IL-1R1 おもに細胞核内に局在していることが明らかとなっていることから, IL-1R1 にはこれまで知られていない機能があるのではないかとこの着想を得た。本研究では IL-1R1 の未知なる機能について探求した。

【方法】ヒト子宮頸癌由来の HeLa と CRISPR/Cas9 システムを用いて IL-1R1 を欠失させた HeLa 細胞株 (CR-R1-4) を用いた。それぞれの細胞から, total RNA を抽出し, cDNA を作製し RT-PCR によって IL-1 α 遺伝子発現を観察した。細胞における IL-1 α および IL-1R1 の強制発現は, PEI 試薬を用いた transfection により行い, タンパク質の発現は western blot により確認した。また, IL-1R1 の STOP コドンの直上に HiBiT タグを挿入した plasmid を C-R1 として transfection し, 免疫蛍光染色により細胞内局在を観察した。Transfectant の細胞溶解液を回収した後, サンプル中の IL-1 α 濃度を ELISA 法により測定した。

【結果】IL-1R1 の欠失自体が IL-1 α の遺伝子発現に及ぼす影響について検討したところ, CR-R1-4 では, HeLa に比較して, IL-1 α mRNA 発現が増強されていることが判明した。IL-1 α の transfection 48 時間後に actinomycin D を作用させることによって transgene 由来の IL-1 α mRNA 発現を停止させ, 細胞内での IL-1 α の分解について検討したところ, HeLa では CR-R1-4 に比較して, 細胞溶解液中の IL-1 α 量が少ないことが判明した。いっぽう, CR-R1-4 に IL-1R1 を transfection により再発現させたところ, IL-1 α の細胞内分解は増強されることが明らかとなった。そこで, 免疫蛍光法により両分子の細胞内局在を観察したところ, 細胞質内に分散する小胞様構造体において IL-1 α と IL-1R1 が共局在していることが明らかとなった。

【結論】本研究の結果は, IL-1R1 が細胞内で IL-1 α と結合することで IL-1 α の細胞質内分解を促進させている可能性を示唆するものであった。

キーワード: IL-1 α , IL-1R1, 細胞内タンパク質分解, actinomycin D, CRISPR/Cas9

Regulation of intercellular degradation of IL-1 α by IL-1 receptor type 1

Machi Hosaka

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Oral Structural and Functional Biology
Department of Oral and Maxillofacial Surgery II, Nihon University School of Dentistry
(Director: Prof. Yoshiyuki Yonehara and Prof. Masatake Asano)

Abstract

【Purpose】IL-1 α is a representative of the danger-associated molecular patterns released from damaged cells. It transduced signals by binding to IL-1R1 on the plasma membrane of target cells. However, previous studies have shown that IL-1R1 is mainly localized in the cell nucleus, indicating that IL-1R1 may have a previously unknown function. In this study, I explored the unknown function of IL-1R1.

【Methods】HeLa and its derivative cell (CR-R1-4) in which IL-1R1 was deleted using the CRISPR/Cas9 system were used. Total RNA was extracted from each cell, cDNA was prepared, and IL-1 α gene expression was observed by RT-PCR. Forced expression of IL-1 α and IL-1R1 in cells was performed by transfection using PEI reagent, and protein expression was confirmed by western blotting. After collecting cell lysates from the transfectants, the concentration of IL-1 α in the samples was measured by ELISA method.

【Results】The effect of IL-1R1 deletion itself on IL-1 α gene expression was examined, and it was found that IL-1 α mRNA expression was enhanced in CR-R1-4 cells compared to HeLa cells. In IL-1 α transfectants, the amount of IL-1 α in the cell lysate of HeLa cells was lower than that of CR-R1-4 cells. On the other hand, when IL-1R1 was re-expressed in CR-R1-4 by transfection, the intracellular degradation of IL-1 α was enhanced. Subcellular localization of IL-1 α and IL-1R1 was observed by immunofluorescence, and it was found that IL-1 α and IL-1R1 were co-localized in vesicle-like structures dispersed in the cytoplasm.

【Conclusion】The results of this study suggest that IL-1R1 may promote intracellular degradation of IL-1 α in the cytoplasm by binding to IL-1 α intracellularly.

Keywords: IL-1 α , IL-1R1, intracellular proteolysis, actinomycin D, CRISPR/Cas9

(受付: 令和 7 年 1 月 29 日)

責任著者: 保坂万智

日本大学歯学部 口腔外科学第Ⅱ講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

TEL: 03-3219-8355

FAX: 03-3219-8356

E-mail: dema21019@g.nihon-u.ac.jp

緒 言

細胞の壊死などに際して細胞外に放出される物質を danger-associated molecular patterns (DAMPs) と総称する¹⁾。Interleukin-1 α (IL-1 α) は代表的な DAMPs であり、細胞内で前駆体 (precursor: pIL-1 α) として産生されたのち、種々の酵素により切断され、N-末端側の propiece (pp) IL-1 α と C-末端側の mature (m) IL-1 α に分断される。このうち、pIL-1 α と mIL-1 α は細胞外に分泌され、標的細胞の細胞膜上に発現する IL-1 receptor 1 (IL-1R1) に結合することによりシグナル伝達する^{2,3)}。

IL-1R1は、細胞質内に toll/IL-1 receptor (TIR) domain を有しており^{3,4)}、IL-1R1の細胞外領域に、リガンドである pIL-1 α または mIL-1 α が結合すると、IL-1R3と会合し、IL-1R1およびIL-1R3両レセプターの TIR domain が結合することにより、シグナルが伝達される。いっぽう、IL-1R2は細胞質内に TIR domain を有しないため^{4,6)}、リガンドである IL-1 α に結合することはできても、シグナルを伝達できないことから decoy receptor とされている。したがって IL-1R1は、IL-1 α のシグナル伝達に必須の分子であるが、細胞膜表面に表出されている IL-1R1の数は少なく、市販の抗体などによる検出は極めて困難である⁶⁾。いっぽう、これまでの研究から、IL-1R1のC末端に、HiBiTタグを付与することによって、検出感度が顕著に上昇することが明らかとなった⁷⁾。これを用いた検索により、IL-1R1が細胞内ではおもに核に局在することが免疫蛍光染色によって明らかとなった。このことは、IL-1R1に未知の機能がある可能性を示唆するものである。そこで、本研究ではIL-1R1がそのリガンドである pIL-1 α に対して、細胞内でどのような機能を有しているのか検討することとした。

材料および方法

1. 細胞

実験には、ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞 (HeLa) (JCRB 細胞バンク, 大阪) および CRISPR/Cas9 システムを用いて HeLa における IL-1R1 を欠失した細胞 CR-R1-4⁸⁾ を用いた。両細胞は、10% ウシ胎児血清 (fetal calf serum; FCS), 50 μ g/ml ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 50 U/ml ペニシリン (Sigma-Aldrich) を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。また、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞 HSC3 (JCRB 細胞バンク) の培養は、10% FCS 添加 Rosewell Park Memorial Institute medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた。

2. Transfection

pIL-1 α および IL-1R1 の発現 plasmid および IL-1R1 の C 末端の STOP コドン直上に HiBiT タグを挿入した plasmid (C'-R1) は Moriyama ら⁷⁾ の作製したものをを用いた。細胞への transfection は、各 plasmid (250 ng) とポリエチレンジイミン溶液 (1 mg/ml, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 1 μ l を混和し、室温で 30 分間反応させたのち、細胞に添加し 37°C で 18 時間培養し、transfection を行った。

3. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

細胞からの RNA 抽出は、RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いた。complementary DNA は、Superscript III 逆転写酵素 (Thermo Fisher) を用いて合成した。PCR は、CFX 96 real-time system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ, 草津) を用いて行った。本研究で使用した pIL-1 α プライマー配列は以下のとおりである (forward 5'-CAA GCC TAG GTC AGC ACC TT -3' reverse 5'-ATG TAA TGC AGC AGC CGT GA-3')。

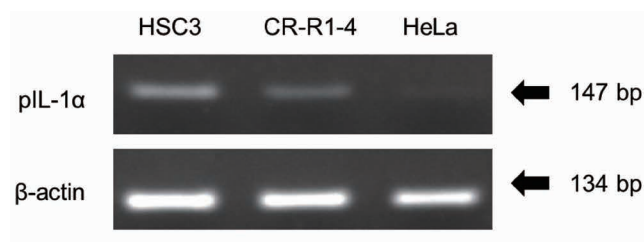
得られた PCR 産物を、臭化エチジウム (0.5 μ g/ml) 添加 1.2% アガロースゲルを用いた電気泳動で展開し、iBright1500 (Thermo Fisher Scientific) によって撮影した。また内在性コントロールとして β -actin (forward 5'-CAA CAT TGG CAA TGA GCG GTT C-3' reverse 5'-AGG TCT TTG CGG ATG TCC ACG T-3') を用いた。

4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による IL-1 α の定量

それぞれの細胞 (5 \times 10⁴ cell/24-well plate) を播種し、18 時間後に transfection を行った。その後 24 時間培養し、細胞溶解液を回収した。遠心分離後 (16,900 \times g, 1 分間) の上清中の IL-1 α 濃度を ELISA kit (BioLegend San Diego, CA, USA) を用いて測定した。

5. 免疫蛍光染色

CR-R1-4 (5 \times 10⁴ cell/well) を 24 well プレートに入れた cover slip (直径 10 mm, マツナミ, 東京) 上に播種し、上記の通り transfectant を作製した。transfectant をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS) で洗浄し、4% パラホルムアルデヒドで固定した。1% triton X-100 処理を室温で 10 分間 permeabilization した後に、1% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) 添加 PBS (1% BSA-PBS) でブロッキングを行った。免疫染色には、マウス抗 HiBiT 抗体 (\times 100 希釈, PROMEGA, Madison, WI, USA) およびウサギ抗ヒト IL-1 α 抗体 (\times 100 希釈, Proteintech, Rosemont, IL, USA) を 1% BSA-

図1 CR-R1-4における IL-1 α の発現増強

Positive control である HSC3, CR-R1-4 および HeLa から total RNA を抽出し, cDNA 作製後, PCR により IL-1 α mRNA の発現を確認した。PCR 産物をエチブロマイド添加1.2% アガロースゲル電気泳動により展開し, IL-1 α (147 bp) および internal control である β -actin (134 bp) のバンドの検出を行った。独立した3回の実験を行った, 代表的な泳動結果を示した。

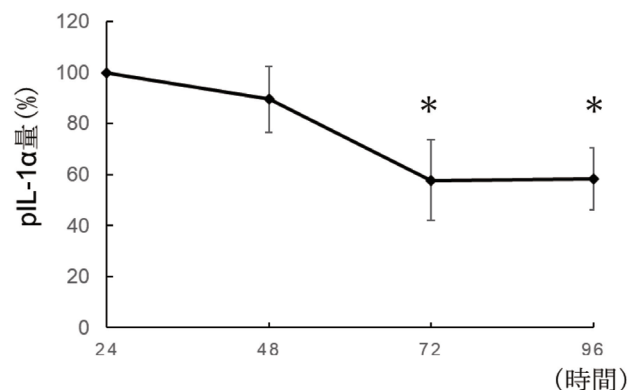
PBS で希釈し, 室温で24時間反応させた。2次抗体として FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 ($\times 100$ 希釈, Proteintech) または RITC 標識ヤギ抗ウサギ抗体 ($\times 100$ 希釈, Proteintech) を用い, 遮光し室温で1時間反応させた。さらに PBS で洗浄後, DAPI-Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) を用いてスライドガラスに封入した。観察および画像の撮影には, オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X810, キーエンス, 大阪) を使用した。

6. Western blot (WB)

Transfectant を PBS で2回洗浄した後, 100 μ l の細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100) を用いて溶解しサンプルとした。溶解サンプルを12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を用いて電気泳動した。WB は Hanayama らの方法⁸⁾ に従って行った。一次抗体として, マウス抗 HiBiT 抗体 (PROMEGA, Madison, WI, USA) を1% BSA-PBS で希釈 ($\times 1,000$) し, 室温で1時間反応させた。2次抗体として, horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) 抗体 ($\times 5,000$ 希釈, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) を用い, 室温で1時間反応させた。内在性コントロールには Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。1次抗体としてウサギ抗ヒト GAPDH 抗体 ($\times 10,000$ 希釈, Proteintech) および2次抗体として HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体 ($\times 6,000$ 希釈, Jackson ImmunoResearch) を使用した。

7. 統計

データの正規性を Kolmogorov-Smirnov 検定, 等分散性を F 検定で確認した。IL-1 α の経時的発現変化は t 検定を用いて, IL-1 α の細胞内分解の比較と IL-1R1 発現による IL-1 α の細胞内分解促進は Wilcoxon rank sum 検定を用いて有意差を検定した。p < 0.05 を有意差ありとした。す

図2 Transgene 由来 IL-1 α の経時的発現変化

HeLa に IL-1 α を transfection し, 24, 48, 72 および96時間後に, transfectant の細胞溶解液を回収した。細胞溶解液中の IL-1 α 濃度を ELISA により測定した。Transfection 24時間後の濃度を100%として, 各時間の濃度を計算した。Transfection 実験を5回行い, 平均値 \pm 標準偏差値を示した。* p < 0.05

すべてのデータは平均値 \pm 標準偏差で示した。

結 果

1. CR-R1-4における pIL-1 α 遺伝子発現の上昇

初めに, IL-1R1 を欠失させた CR-R1-4 において, pIL-1 α の遺伝子発現に変化があるか否か, PCR によって検討した。その結果, positive control である HSC3 においては明瞭な147bp のバンドを検出できたのに対し, HeLa ではバンドは検出できなかった。いっぽう, CR-R1-4 では, HSC3 と比較して発現は弱い, バンドを検出することができた (図1)。さらに ELISA によりタンパク質レベルでの発現についても確認したところ, CR-R1-4 および HeLa とともに pIL-1 α 発現を確認することができなかった。

2. Transgene 由来の pIL-1 α 発現変化

つぎに, IL-1R1 の欠失が, 細胞内での pIL-1 α 分解にどのような影響を及ぼすか検討することを目的として, transfection によって強制発現させた pIL-1 α の経時的な発現変化について検討した。Transfection 24時間後に細胞溶解液中に見られた pIL-1 α 量を100%とした時, transfection 48時間後には, 発現量の減少は見られたが, 統計的に有意差は無かった。また, transfection 72時間後には発現が著しく低下する傾向にあった (図2)。また, この傾向は HeLa と CR-R1-4 両者において変化が無かった。このことから, transfection 48時間以降の transfectant における pIL-1 α の細胞内分解に与える IL-1R1 の影響について検討することとした。

3. IL-1R1による pIL-1 α 細胞内分解調節

HeLa および CR-R1-4 に pIL-1 α を transfection し, 48時間培養後に actinomycin D の存在下または非存在下で3

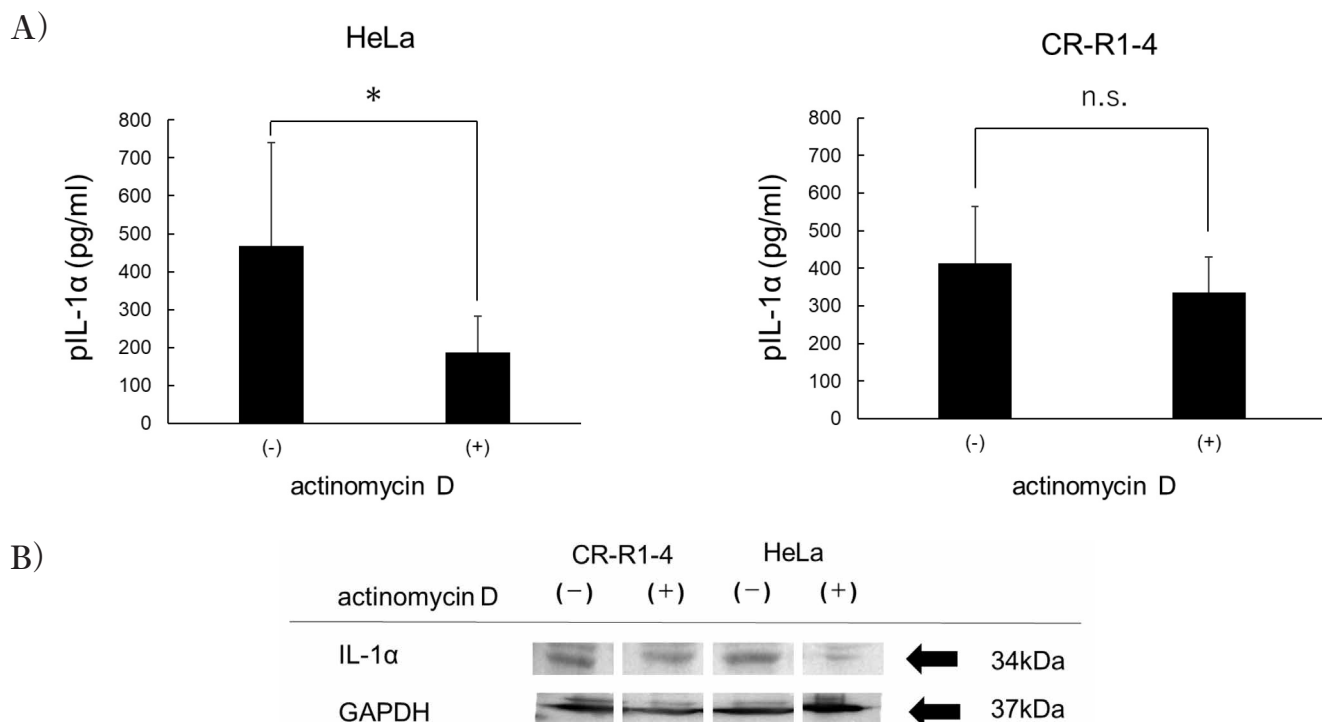


図 3 IL-1 α の細胞内分解の比較

HeLa (左図) および CR-R1-4 (右図) に IL-1 α を transfection し, 48 時間後に actinomycin D ($1 \mu\text{g/ml}$) 非存在下 (-) および存在下 (+) で 3 時間培養した。A) 培養後の細胞溶解液中の IL-1 α 濃度を ELISA により測定した。独立した実験を 6 回行い, 平均値 \pm 標準偏差により結果を示した。* $p < 0.05$, n.s.: 有意差なし

B) A) と同様に細胞を処理し, 回収した細胞溶解液を 12% SDS-PAGE により展開した。Western blot には, 1 次抗体としてウサギ抗ヒト IL-1 α 抗体 ($\times 1,000$ 希釈) を, 2 次抗体として HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 ($\times 5,000$ 希釈) を用いた。発色は ECL substrate (BioRad) を用いた。独立した実験を 4 回行い, 代表的なデータを示した。

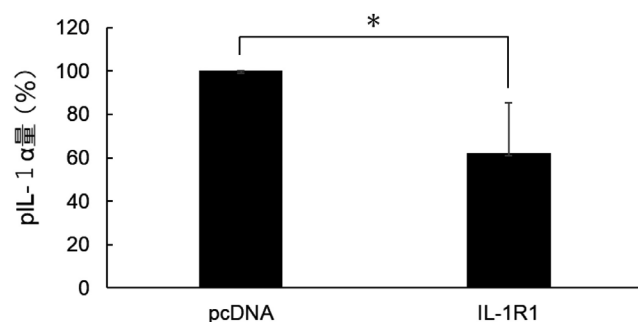


図 4 IL-1R1 発現による IL-1 α の細胞内分解促進

CR-R1-4 に IL-1 α と共に, pcDNA (左, コントロール) または IL-1R1 (右) を transfection した。図 3 と同様に処理し, 細胞溶解液中の IL-1 α 濃度を ELISA により測定した。独立した 7 回の実験の平均値 \pm 標準偏差により結果を示した。* $p < 0.05$

時間培養し, 細胞質内の pIL-1 α 量を ELISA により測定した。その結果, HeLa では未処理群で $467.9 \pm 272.9 \text{ pg/ml}$ あり, actinomycin D 処理群では $186.1 \pm 96.1 \text{ pg/ml}$ であった (図 3)。いっぽう, CR-R1-4 では, 未処理群で $413.1 \pm 150.6 \text{ pg/ml}$, 処理群で $335.9 \pm 93.6 \text{ pg/ml}$ を示した。このことから, CR-R1-4 では, 細胞内 pIL-1 α の分解が, HeLa に比較して軽度であることが明らかになった (図 3)。

そこで, CR-R1-4 に IL-1R1 を transfection することによって, pIL-1 α の分解が HeLa レベルにまで回復するかどうか検討した。その結果, IL-1R1 を CR-R1-4 に発現させることによって, pIL-1 α の分解は, pcDNA transfectant の 62.0% まで低下し, HeLa における分解までには至らなかったが統計学的に優位な低下を示した (図 4)。

4. IL-1R1 と pIL-1 α の細胞内局在

以上の結果から, pIL-1 α と IL-1R1 を transfection した CR-R1-4 において pIL-1 α と IL-1R1 が結合していることが示唆された。そこで, 両分子の会合の可能性を免疫蛍光染色によって検討した。図 5 に示した通り, pIL-1 α と IL-1R1 は細胞質全体に拡散して存在する小胞状造物において共局在した。以上のことから, IL-1R1 は細胞質内で pIL-1 α と結合し, pIL-1 α の細胞質内分解を促進している可能性が示唆された。

考 察

IL-1R1 の C 末端に HiBiT-tag を挿入することによって, 従来の手法と比べて IL-1R1 の検出感度が格段に高まった⁷⁾。これを用いて行った IL-1R1 の細胞内局在に関するこれまでの検討から, IL-1R1 はおもに核に局在することが

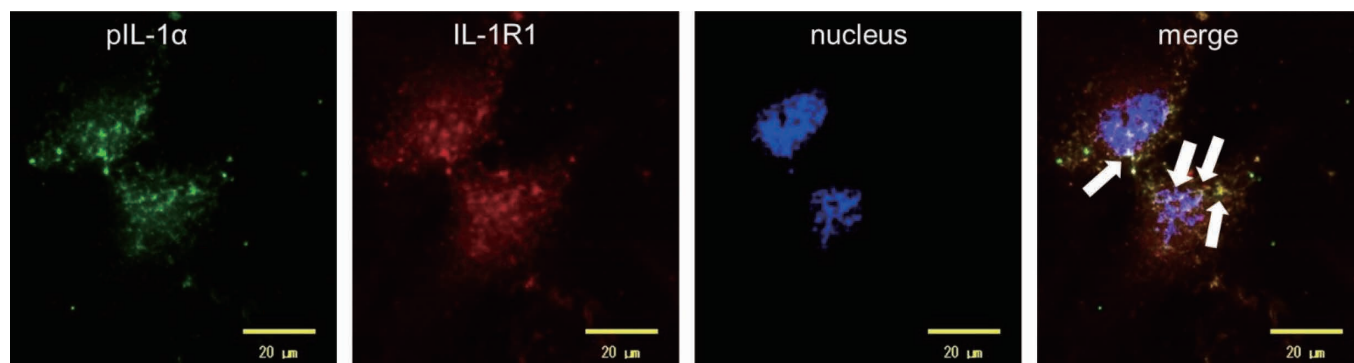


図5 CR-R1-4における IL-1 α と IL-1R1の共局在

CR-R1-4に IL-1 α と IL-1R を co-transfection し、免疫蛍光染色により両分子の細胞内局在を観察した。矢印は両分子が共局在した細胞内の小胞状構造物を示した。独立した3回の実験の代表的結果を示した。

明らかとなっている⁷⁾。また、IL-1R1には、シグナル伝達に必要な TIR ドメインが存在するのに加え、Box 1, 2, 3 という機能的な領域に分かれていることが報告されている⁹⁻¹¹⁾。そしてこれらドメインには従来から報告されている、核移行シグナル配列に類似したアミノ酸配列が複数存在している。これらの事実は、本研究を企図する極めて重要な根拠となった。

初めに HeLa と CR-R1-4 における IL-1 α の発現量の違いについて検討したところ、CR-R1-4 においては mRNA レベルで IL-1 α の発現が増強されていることが明らかとなった。この結果は、IL-1R1 が IL-1 α 発現を負にコントロールしている可能性を示すものであったが、IL-1R1 が遺伝子発現に寄与するという報告はこれまでになく、そのメカニズムについては今後検討する必要がある。

いっぽう、IL-1 α の細胞内分解に関する IL-1R1 の効果について検討することを目的として、HeLa および CR-R1-4 における transgene 由来の IL-1 α 発現の経時的变化について検討した。その結果、transfection 24 時間後に発現レベルのピークがあり、48 時間後までは同等のレベルが維持されることが明らかとなった。しかしその後、暫時減少する傾向にあり、transfection 48 時間後の時点で mRNA への転写を actinomycin D によって遮断すること¹²⁾で、細胞内 IL-1 α 分解速度を比較し得ると判断した。そこで、HeLa および CR-R1-4 に pIL-1 α を transfection し、さらに actinomycin D を作用させて IL-1 α の細胞内分解を比較した。すると、HeLa では actinomycin D 作用後に、細胞質内 IL-1 α の有意な減少が確認できたのに対して、CR-R1-4 では IL-1 α の減少を確認することができなかった。いっぽう、CR-R1-4 に IL-1R1 を transfection することによって、細胞内 IL-1 α 濃度が減少することが明らかとなった。このことは IL-1R1 が細胞における IL-1 α 分解を促進している可能性を示唆するものであった。前述の IL-1 α mRNA 発現に関する検討で、IL-1R1 が IL-1 α の遺伝子発現を抑制している可能性があり、この結果は IL-1R1 が IL-1 α の分

解を促進するという結果と同じ方向性を示すものであると考える。すなわち、IL-1R1 は細胞内の IL-1 α 量を抑制する働きを有すると予想される。

そこで、どのようなメカニズムによって IL-1 α の発現を抑制するかを調べるため、HeLa に pIL-1 α および IL-1R1 を co-transfection し、それぞれの細胞内局在について検討したところ、両分子は細胞内に分散して局在する小胞状構造物において共局在することが解った。一般的に、細胞内におけるタンパク質分解は、プロテアソーム系ないしオートファジー系でコントロールされている¹³⁾。このうち、プロテアソーム阻害剤である MG132 を作用させた実験では、IL-1R1 の発現強度に何ら変化が無いことをこれまでの実験で確認しており、メカニズムは不明である。また、IL-1 β mRNA の安定性に寄与するものとして、tristetraprolin (TTP) という分子の存在が知られており、TTP knockout cell を用いた実験では、IL-1R1 と mRNA の安定性には何ら変化は認められていない。前述のように、pIL-1 α と IL-1R1 が共局在する細胞内コンパートメントの同定は、IL-1R1 の機能解明には不可欠なものと考えている。

結 論

本研究では、HeLa および CR-R1-4 を用いて IL-1R1 の未知の機能について検討し、以下の結論を得た。

1. CR-R1-4 においては、HeLa と比較して、IL-1 α mRNA の発現が増強されていた。
2. HeLa および CR-R1-4 においては transgene 由来の IL-1 α 発現は、transfection 24 時間後にピークがあり、48 時間後までは同等のレベルが維持され、その後、暫時減少する傾向にあった。
3. HeLa では、IL-1 α は actinomycin D 作用後 3 時間で 39.8% にまで分解されたが、CR-R1-4 では、pIL-1 α の分解は統計学的に優位なレベルの分解は認められなかった。

4. CR-R1-4に IL-1R1を transfection すると, pIL-1 α の分解は促進した。
5. 免疫蛍光法にて pIL-1 α と IL-1R1は, 細胞質全体に拡散して存在する小胞状構造物において共局在していた。

以上より, IL-1R1 は pIL-1 α の細胞内分解に関与していることが明らかとなり, IL-1R1が IL-1 α の分解を介して, 炎症を負にコントロールしている可能性が示唆された。

本研究の推進にあたり, 日本大学歯学部口腔外科学第Ⅱ講座 米原啓之教授, 日本大学歯学部病理学講座 浅野正岳教授および両講座の皆様にご指導いただいた。ここに深甚なる感謝の意を表する。

本論文に関して, 開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Oppenheim JJ, Yang D (2005) Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 17, 359-365.
- 2) Di Paolo NC, Shayakhmetov DM (2016) Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol* 17, 906-913.
- 3) Boraschi D, Italiani P, Weil S, Martin MU (2018) The family of the interleukin-1 receptors. *Immunol Rev* 281, 197-232.
- 4) Curtis BM, Gallis B, Overell RW, McMahan CJ, DeRoos P, Ireland R, Eisenman J, Dower SK, Sims JE (1989) T-cell interleukin 1 receptor cDNA expressed in chinese hamster ovary cells regulates functional responses to interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 3045-3049.
- 5) Muñoz E, Zubiaga AM, Sims JE, Huber BT (1991) IL-1 signal transduction pathways. I. Two functional IL-1 receptors are expressed in T cells. *J Immunol* 146, 136-143.
- 6) Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K, Grabstein KH, Dower SK (1993) Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6155-6159.
- 7) Moriyama A, Imaoka S, Sasagawa T, Hosaka M, Kato I, Tamura H, Takeuchi R, Tsunoda M, Asano M (2024) C-terminal tagging enhances the detection sensitivity of interleukin receptor type 1. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 70, 43-48.
- 8) Hanayama M, Ishiyama Y, Sadamura M, Moriyama A, Imaoka S, Tsunoda M, Asano M (2022) Establishment of interleukin-1 receptor type 1 knockout Hela strain by CRISP/Cas9 system. *J Biomed Sci Res* 4, doi:10.36266/JBSR161.
- 9) Vigers GP, Anderson LJ, Caffes P, Brandhuber BJ (1997) Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1 β . *Nature* 386, 190-194.
- 10) Slack JL, Schooley K, Bonnert TP, Mitcham JL, Qwarnstrom E, Sims JE, Dower SK (2000) Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* 275, 4670-4678.
- 11) Radons J, Falk W, Dove S (2015) Identification of critical regions within the TIR domain of IL-1 receptor type I. *Int J Biochem Cell Biol* 68, 15-20.
- 12) Hollstein U (1974) Actinomycin, chemistry and mechanism of action. *Chem Rev* 74, 625-652.
- 13) Li Y, Li S, Wu H (2022) Ubiquitination-proteasome system (UPS) and autophagy two main protein degradation machineries in response to cell stress. *Cells* 11, doi: 10.3390/cells11050851.