

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19024

研究課題名(和文)新規セカンドメッセンジャーcGAMPの産生と炎症誘導の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of production of the novel second messenger cGAMP and its inflammatory signaling

研究代表者

茂谷 康 (MOTANI, Kou)

徳島大学・先端酵素学研究所(オープンイノベ)・助教

研究者番号：70609049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：身体の中で分解されずに蓄積したDNAは炎症を惹起し、貧血や関節炎の原因となる。本研究では、DNAの蓄積に伴い、新規炎症誘導物質cyclic GMP-AMP (cGAMP) が細胞内で生成されることを見出した。さらに、cGAMPの合成酵素であるcGAS遺伝子を欠損させると、cGAMPの生成量が低下し、DNAによる炎症を防げることがわかった。したがって、cGASおよびcGAMPはDNAの分解異常によって引き起こされる炎症性疾患の新たな治療ターゲットとなる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Self-DNA accumulating in the body causes inflammation, leading to development of lethal anemia or polyarthritis. In this study, I found that the novel pro-inflammatory molecule cyclic GMP-AMP (cGAMP) was produced in cells by accumulation of DNA. In addition, DNA-induced production of cGAMP and inflammatory cytokines were prevented by deletion of cGAMP synthase (cGAS). Thus, cGAS and cGAMP would be useful therapeutic target for the DNA-induced inflammatory diseases.

研究分野：自然免疫

キーワード：DNA 炎症 cGAMP cGAS

1. 研究開始当初の背景

DNA は生命の根源ともいえる重要な物質であるにもかかわらず、我々の生体内では DNA を積極的に分解する機構が存在する。赤芽球より脱核して不要となった核やアポトーシスを起こした死細胞はマクロファージによって貪食され、それらの DNA はマクロファージ内のリソソームに存在する DNase II によって分解される。しかしこの機構を失った DNase II 遺伝子欠損マウスでは自己の DNA がマクロファージに蓄積し、インターフェロンや炎症性サイトカインが過剰に産生されることによって重篤な貧血やヒトの関節リウマチに酷似した慢性多関節炎を発症する。すなわち、DNA は適切に分解されないと炎症を惹起し自己免疫疾患を引き起こす原因となることが明らかになってきた。従って DNA による炎症誘導機構を明らかにすることは炎症性疾患の病態を理解するために重要な課題である。

私はこれまでに、DNA によって活性化される細胞内シグナル伝達系の解析を進め、(1) 小胞体膜タンパク質 STING が二量体を形成すること、(2) 低分子化合物 cyclic GMP-AMP (cGAMP) が STING を二量体化すること、を明らかにした。以上より、自己の DNA がリソソームに蓄積すると cGAMP-STING シグナルが活性化し、炎症が惹起されると考えられた(図1)

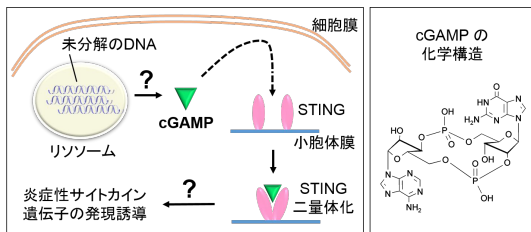


図1. 自己の DNA による炎症誘導モデル(左)と cGAMP の構造(右)

2. 研究の目的

上記の背景から、自己 DNA による炎症誘導機構における cGAMP-STING シグナルの重要性が示唆された。そこで本研究では、cGAMP の病態的意義を個体レベルで検証する。そして、cGAMP が細胞内でどのように産生されるのか、cGAMP が STING を介してどのように炎症性サイトカインを誘導するのか、といった根本的な問題に取り組み、DNA の異常蓄積が引き起こす炎症性疾患の発症機構を解明する予定である。

3. 研究の方法

本研究では、cGAMP に焦点を当てた次の3つの研究を行なった。

(1) cGAMP が合成される分子機構の解明

cGAMP 合成酵素が DNA センサー分子 cGAS である可能性を検討した。まず、DNase II 欠損マウス胎児繊維芽細胞 (MEF) において

cGAS 遺伝子を CRISPR/Cas システムでノックアウトした。そして、DNase II 欠損 MEF に死細胞を貪食させ、死細胞由来の DNA がリソソーム内に蓄積した時、野生型とノックアウト細胞における cGAMP 産生量を比較した。その際、cGAMP の量を正確に測定するため、STING の二量体化を指標とした独自の検出法を開発した。

(2) STING の下流因子の同定

STING を活性化させるため、cGAMP 類似化合物の DMXAA でマクロファージ細胞を刺激した。細胞抽出液を取り出し、カラムを用いてリン酸化ペプチドを精製し、TMT 標識と LC-MS/MS 解析を組み合わせた定量リン酸化プロテオミクスを行なった。

同定したタンパク質について、リコンビナントタンパク質を精製し、in vitro kinase アッセイ、phos-tag ウェスタンブロット法を用いてリン酸化の確認実験を行なった。

(3) cGAMP の病理的役割の解明

野生型または DNase II 遺伝子欠損マウスから肝臓や脾臓を取り出し、上記(1)で開発した cGAMP 検出法を用い、cGAMP 量を測定した。また、本病態モデルで惹起される炎症が cGAMP によるものか否かを明らかにするため、cGAMP 合成酵素と DNase II の二重欠損マウス、あるいは、STING と DNase II の二重欠損マウスを作製した。ノックアウトマウスは CRISPR/Cas9 システムと、受精卵電圧ポレーション法を利用し、ワンステップでの二重欠損マウスの作製を行なった。胎生 14.5 ~ 17.5 日目の貧血が回避されるか、あるいは、炎症性サイトカインの過剰誘導が抑制されるかを q-PCR 法で確認した。

4. 研究成果

(1) cGAMP が合成される分子機構の解明

cGAMP と STING タンパク質を試験管内で混合し、Native PAGE によって STING の二量体化を観察した結果、cGAMP の濃度依存的に STING が二量体化する様子が観察された(図2)。すなわち、STING の二量体化を指標に cGAMP の濃度を測定することができる簡便なアッセイ系の開発に成功した。

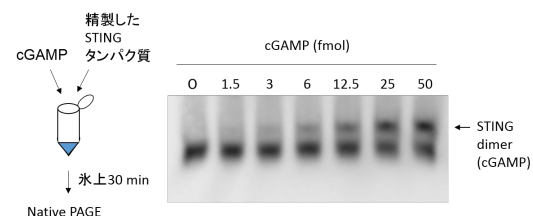


図2. STING の二量体化を指標とした in vitro cGAMP 検出法の開発

次に、この検出法を利用し、野生型と cGAS 欠損細胞における cGAMP 量を測定した結果、cGAS 欠損細胞では cGAMP が全く検出されなかった(図3)。この結果から、自己 DNA が細胞内に蓄積した際に cGAMP を合成する責任因子が cGAS であることが明らかとなった。

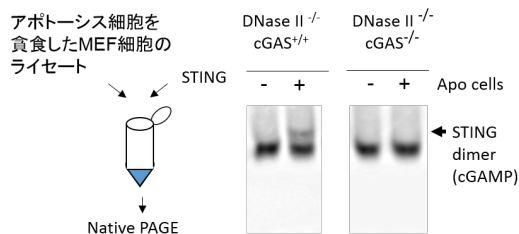


図3. cGAS KO細胞ではcGAMPが産生されない

(2) STING の下流因子の同定

TMT 標識 LC-MS/MS 解析法により約 17,000 個ものリン酸化ペプチドを定量することに成功した。コントロール群と比較して DMXAA 刺激によって 2 倍以上リン酸化が亢進し、かつ有意差 ($P < 0.01$) が認められたペプチドが 18 個あり、IRF3 や STING、TBK1 など既知の TBK1 基質に加え、オートファジー関連因子 GABARAPL2 を見出した (図4)。

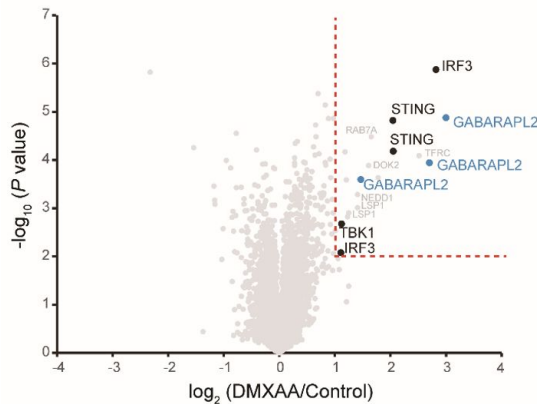


図4 TMT標識LC-MS/MS解析

STING の下流では、TBK1 キナーゼが活性化することが知られており、実際に本スクリーニングにおいてもその基質である IRF3 のリン酸化が強く認められた。そこで、GABARAPL2 が TBK1 の直接の基質であるか否かを in vitro kinase アッセイにて確認した。精製した GABARAPL2 と TBK1 を直接反応させ、phos-tag ウェスタンブロットを行なったところ、GABARAPL2 のリン酸化のバンドシフトが認められた (図5)。したがって GABARAPL2 は TBK1 の直接の基質であると考えられた。また、GABARAPL2 の 10 番目のセリン残基をアラニンに置換した変異体で同様のアッセイを行ったところ、リン酸化によるバンドシフトが起きなかった(図5)。すなわち、TBK1 は GABARAPL2 の 10 番目のセリンを直接リン酸化

することが判明した。現在 STING の下流で GABARAPL2 がリン酸化される生理的意義について解析を進めている。

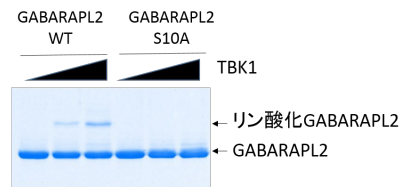


図5 In vitro kinase assay

(3) cGAMP 合成酵素の病理的役割の解明

貧血を引き起こす DNaseII 欠損マウス (胎生 14 日目胚) の肝臓において、cGAMP が特異的に検出された。一方、野生型マウスでは全く検出されなかった (図6)。また、関節炎を引き起こす生後 2 ヶ月齢の DNaseII 欠損マウスにおいても同様に cGAMP が検出された。したがって、生体内での cGAMP 生成量とこれらの病態との関連性が示唆された。

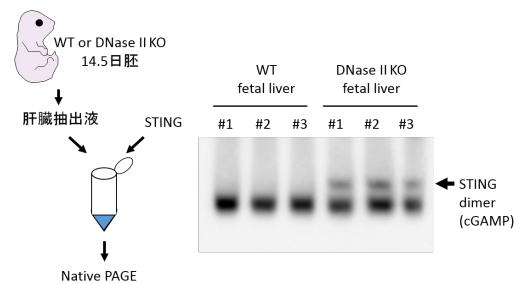


図6 DNAが細胞内に蓄積した個体ではcGAMPが生成される

DNaseII 欠損マウスはインターフェロンの過剰産生によって重度の貧血となる。このマウスにおいて cGAMP 合成酵素 cGAS や cGAMP の下流因子 STING を欠損させると、インターフェロンの発現誘導や、貧血が改善された (図7)。以上の結果から、自己の DNA が異常蓄積すると、cGAS-cGAMP-STING シグナルを介して炎症が惹起され、貧血や関節炎を引き起こすことが明らかとなった。

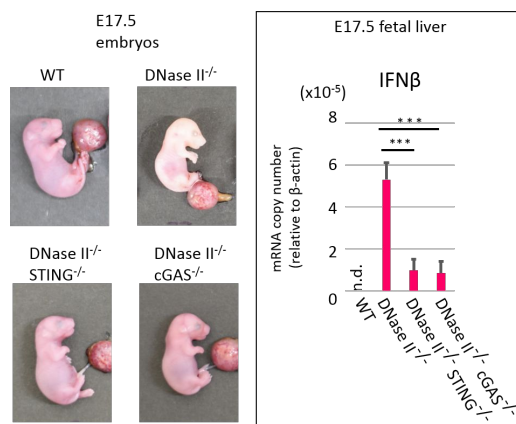


図7 自己DNAの蓄積はcGAS-cGAMP-STING 経路を活性化して炎症を惹起する

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

- (1) Motani, K., and Kosako, H.: Activation of stimulator of interferon genes (STING) induces ADAM17-mediated shedding of the immune semaphorin SEMA4D. *J Biol Chem.*, 査読有, 293, 7717-7726 (2018). (*=corresponding autor)
- (2) Kosako, H. and Motani, K.: Global identification of ERK substrates by phosphoproteomics based on IMAC and 2D-DIGE. *Methods Mol Biol.*, 査読有, 1487:136-149 (2017).
- (3) Motani, K., Ito, S. and Nagata, S.: DNA-mediated cyclic GMP-AMP synthase-dependent and -independent regulation of innate immune response. *J Immunol.*, 査読有, 194(10):4914-4923 (2015).

〔学会発表〕(計3件)

- (1) 茂谷 康, 梶本真弓美, 小迫 英尊: TBK1によるATG8ファミリー分子GABARAPL2のリン酸化の機能解析、2017年度生命科学系学会合同年次大会(神戸)、2017年12月7日
- (2) Kou Motani, Mayumi Kajimoto and Hidetaka Kosako: Identification of STING-dependent secreted proteins using quantitative proteomic analysis, The 26th Hot Spring Harbor International Symposium (Fukuoka), 2nd November 2016.
- (3) 茂谷 康, 竹本 龍也, 梶本 真弓美, 小迫 英尊: 細胞内自己DNAによるcGAMP/STING経路依存的・非依存的なサイトカイン誘導、第38回日本分子生物学学会年会/第88回日本生化学会大会合同大会(神戸)、平成27年12月3日

〔その他〕

ホームページ等

細胞情報学分野: : 藤井節郎記念医科学センター

http://www.fujii.tokushima-u.ac.jp/cell_signaling/

6. 研究組織

(1)研究代表者

茂谷 康 (MOTANI, Kou)

徳島大学・先端酵素学研究所・助教

研究者番号: 70609049