

令和元年5月29日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15731

研究課題名(和文) 自然免疫応答を制御する新規分子群の同定と機能解析

研究課題名(英文) The role of novel molecules on innate immune response.

研究代表者

幸脇 貴久 (Kouwaki, Takahisa)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：90780784

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)：宿主の細胞内に侵入したウイルスRNAは細胞内センサーであるRIG-I like receptors (RLRs) に認識される。RLRからのシグナルはミトコンドリア膜上に発現しているMAVSタンパク質を活性化し、さらに下流へシグナルが伝達され、抗ウイルス性のインターフェロンやサイトカインを産生する。申請者はMAVSと相互作用してインターフェロン産生を制御している新規分子Zyxinを同定し、機能解析を行った。Zyxinはインターフェロン産生を正に制御しており、RIG-IとMAVSの相互作用の足場として働いていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスRNAセンサーによるインターフェロン誘導は宿主のタンパク質によって厳密に制御されている。RLRsはウイルスを認識すると、MAVSが存在するミトコンドリアまで移動することが知られている。本研究で我々は、RLRsとMAVSの相互作用の足場としてZyxinが役割を果たしていることを発見した。この発見はウイルス感染が誘導する抗ウイルス応答を制御する新たなメカニズムを提唱できたという面で意義深い。

研究成果の概要(英文)：RIG-I-like receptors (RLRs) are cytoplasmic viral RNA sensors, which induce antiviral innate immune responses. After recognition of viral RNA, RLRs bind to the MAVS adaptor molecule, resulting in downstream signaling. To reveal the molecular mechanism of MAVS-dependent signaling, we performed a yeast two-hybrid screening and identified zyxin as a protein that binds to MAVS. Zyxin interacted with MAVS in human cells. A proximity ligation assay showed that zyxin and MAVS partly co-localized on mitochondria. Ectopic expression of zyxin augmented MAVS-mediated IFN- β promoter activation, and knockdown of zyxin (ZYX) attenuated the IFN- β promoter activation. Moreover, ZYX knockdown reduced the expression of type I IFN and an interferon-inducible gene after stimulation with ligands of RLRs. Interestingly, physical interactions between RLRs and MAVS were abrogated by ZYX knockdown. These observations indicate that zyxin serves as a scaffold for the interactions between RLRs and MAVS.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 RIG-I MAVS Zyxin

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

自然免疫応答は宿主防衛の最前線で働く。宿主細胞に侵入したウイルスはウイルス核酸レセプターによって認識される。ウイルス由来の double-stranded (ds) RNA は RIG-I と MDA5 によって認識され、ミトコンドリア膜上に発現する MAVS を介して I 型インターフェロンを誘導する。RIG-I と MDA5 は 2 つの caspase activation and recruitment domains (CARD)、ヘリケースドメインと C-terminal domain (CTD) を持っている。CARD ドメインはシグナルのトリガーとして重要で、ヘリケースドメインと CTD は RNA との結合に必要である。RIG-I の CTD は RIG-I の機能を制御する役割もあり、非活性状態では CARD の活性化を抑制している。RIG-I がウイルスを認識すると、RIG-I はウイルス RNA の周囲に集まり、CTD の CARD の抑制が外れる。RIG-I-dsRNA のヌクレオフィラメント形成は RIG-I N 末端の CARD ドメインのフィラメント形成を促進する。RIG-I の CARD ドメインのフィラメント形成にはユビキチン化も必要であることが報告されている。当研究室では、RIG-I の活性化に必須なユビキチン化酵素の Riplet を同定している。ユビキチン化によりフィラメント形成した RIG-I は MAVS の CARD にリクルートされ MAVS 同士が凝集しプリオン様繊維形成を促進する。凝集体を形成した MAVS は TBK1 や IRF3 を活性化し、インターフェロンを誘導する。

2. 研究の目的

RIG-I の活性化制御は上述の様に厳密に制御されている。ある自己免疫疾患では RIG-I 遺伝子の変異によって RIG-I が自己の RNA を認識してしまい、炎症応答を惹起することが知られている。RIG-I-MAVS 経路が誘導する免疫応答の詳細なメカニズムの理解はウイルスに対する免疫応答の解明に留まらず、自然免疫が誘導する自己免疫疾患の治療法開発への切掛けとなりうる可能性を秘めている。そこで申請者は、自然免疫応答の新たな分子機構を解明することを目的とし、MAVS と相互作用する新規分子群の同定を試みた。

3. 研究の方法

MAVS と相互作用する新規分子群を同定するために酵母 two-hybrid 法によるスクリーニングを実施した。同定された分子に対して、MAVS との相互作用を免疫沈降法や共焦点顕微鏡を使った proximity ligation assay (PLA) を用いて解析した。さらに、新規分子の MAVS 依存的なインターフェロン産生に及ぼす影響を評価するため、新規分子の過剰発現や siRNA によるノックダウンに対するインターフェロン遺伝子発現を、リアルタイム PCR 法とレポーター法を用いて評価した。

4. 研究成果

酵母 two-hybrid 法によるスクリーニングの結果、MAVS と相互作用する新規分子として、Zyxin を同定した。Zyxin はアクチンフィラメントの末端に存在し接着班形成に関与する分子として報告されている。Zyxin は C 末端に 3 つの LIM を持つ分子である。LIM ドメインは蛋白質-蛋白質相互作用を媒介することが知られている。また、Zyxin は接着班以外にも有糸分裂の際の紡錘極に存在することが知られている。最近の研究では Zyxin は Hippo 経路にも関与することが報告されている。Hippo 経路において、Zyxin は Lats2 と Siah2 の相互作用の足場として働き、その結果 Lats2 がユビキチン化され、分解されることでガンの転移と増殖が促進されることが報告されている。これまで、Zyxin の抗ウイルス自然免疫応答における役割は明らかになっていなかったが、本研究で申請者は以下のことを明らかにした。

(1) Zyxin は MAVS と相互作用する

Zyxin と MAVS の生理的な相互作用を調べるために、免疫沈降法を行なった。FLAG-tag を付加した MAVS と HA-tag を付加した Zyxin を 293FT 細胞に過剰発現させ、FLAG-tag で免疫沈降した結果、Zyxin も共沈降した (図 1 a)。さらに Zyxin と MAVS の細胞内の局在を調べるために共焦点顕微鏡を用いた解析を行なった。Proximity Ligation Assay (PLA) を用いた Zyxin と MAVS の局在を調べたところ、Zyxin と MAVS は細胞質で局在することが分かった (図 1 b)。MAVS はミトコンドリア膜に存在する分子であるので、ミトコンドリアの蛍光染色と PLA を組み合わせた実験を行なった結果、MAVS と ZNF598 はミトコンドリア膜上で局在していることが分かった (図 1 c)。以上の結

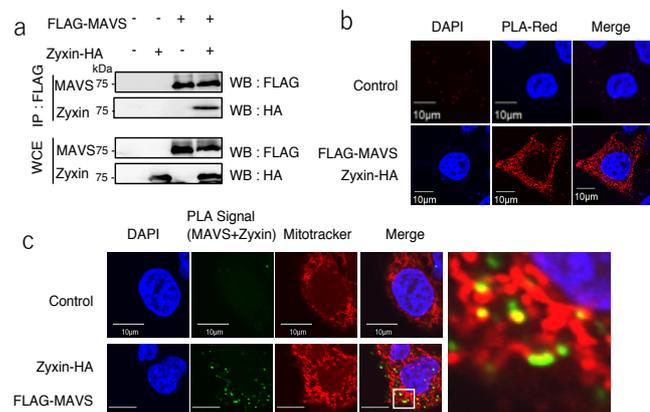


図 1 ZyxinはMAVSと相互作用する

果から、Zyxin と MAVS は細胞内のミトコンドリア近傍で相互作用していることが明らかとなった。

(2) Zyxin は MAVS を介した I 型インターフェロン産生を促進する

Zyxin は、MAVS を介した I 型インターフェロン産生に関与するかを調べるために、I 型インターフェロンのレポーター法を行なった。MAVS を介した I 型インターフェロンのプロモーター活性は MAVS と Zyxin の過剰発現で上昇した (図 2 a)。一方で、Zyxin に対する siRNA を処理した Zyxin ノックダウン細胞ではプロモーター活性は低下した (図 2 b)。また、Zyxin ノックダウン細胞において、RLRs のリガンドである poly(I:C) で刺激をした結果、Zyxin ノックダウン細胞ではインターフェロン β の mRNA 量は低下した (図 2 c)。これらの結果から、Zyxin は MAVS を介した I 型インターフェロン産生を促進することが示唆された。

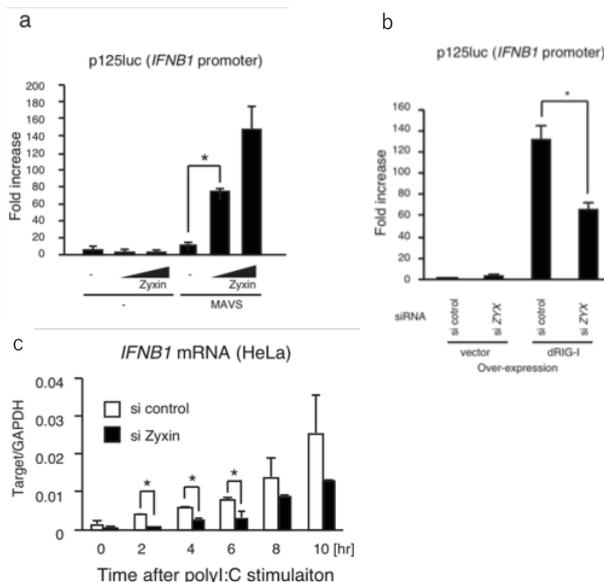


図2 ZyxinはMAVSを介したI型インターフェロン産生を促進する

(3) Zyxin は RLRs と MAVS の相互作用の足場として働く

これまでの先行研究で、Zyxin は蛋白質間の相互作用の足場として働くことが報告されていることから、Zyxin は RIG-I/MDA5 と MAVS との相互作用の足場として働いているのではないかと仮定した。RIG-I と MDA5 は Zyxin と相互作用するかどうかを免疫沈降法で調べたところ、Zyxin は両者と相互作用していることが明らかとなった (図 3 a, b)。さらに、Zyxin ノックダウン細胞では RIG-I/MDA5 と MAVS との相互作用が阻害されていることが分かった (図 3 c, d)。これらの結果から、Zyxin は RLRs と MAVS の相互作用の足場として働いていることが示唆された。

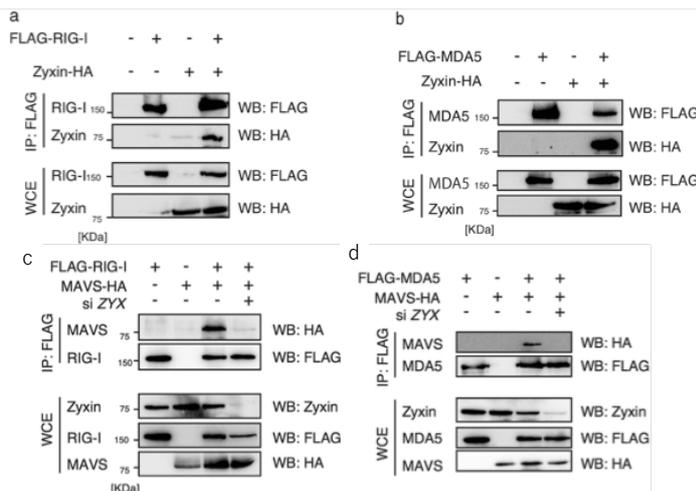


図3 ZyxinはRLRsとMAVSの相互作用の足場として働く

本研究では、MAVS と相互作用する新規分子として、Zyxin を同定した。Zyxin は接着班に存在し、アクチンフィラメント形成に必要な分子である。また、Zyxin は有糸分裂の際の紡錘極に存在する。これらの知見から、Zyxin の主な役割は、蛋白質のポリマー形成やファイバー形成を惹起することであることが予想される。Zyxin には thyroid hormone receptor interactor 6 (TRIP6)、Ajuba、LIM domain-containing preferred translocation partner in lipoma (LPP) 等のファミリー蛋白質が存在する。それらの蛋白質は LIM ドメインを持ち、蛋白質間相互作用に寄与していることが報告されている。既報において、Zyxin のノックアウトマウスを用いた実験から、Zyxin はアクチンフィラメント形成に重要な役割を担っていることが示されたにも関わらず、Zyxin ノックアウトマウスは正常に発生したことが報告されている。この結果から、Zyxin のファミリー蛋白質が Zyxin の補完的な役割を担っていることが予測される。本研究では siRNA を用いた Zyxin 遺伝子のノックダウンを行なった。RIG-I のリガンドで刺激しインターフェロン β 遺伝子の発現を観察したところ、Zyxin 遺伝子をノックダウンしてもインターフェロン β 遺伝子の発現は確認できた (図 2c)。この結果は Zyxin のファミリー蛋白質が補完的な役割を果たした可能性を示唆するものである。

本研究で、Zyxin は MAVS を介した I 型インターフェロン誘導に寄与していることが分かった。その作用機序は、RIG-I や MDA5 が MAVS と相互作用する際、Zyxin が足場として働き、下流のシグナル活性化を促進するというものである。このことから、Zyxin の LIM ドメイン上で RIG-I

と MAVS の相互作用が起き、MAVS のフィラメント形成に寄与していることが予測される。

Zyxin はウイルス由来の蛋白質と相互作用することが報告されている。ヒト免疫不全ウイルス-1 の nef 蛋白質や、ヒトパピローマウイルス 6 型の E6 蛋白質などである。E6 蛋白質は Zyxin の細胞内局在に影響を及ぼすことが分かっている。マウスを用いた実験では、Zyxin 遺伝子の欠損で細菌感染の致死率が上昇することが報告されている。この結果は Zyxin が自然免疫経路に関与していることを示唆しており、RIG-I は細菌の核酸を認識しているという報告とも矛盾しない。しかしながら、これまでの研究では Zyxin の自然免疫シグナルにおける役割は解明されていなかった。本研究は、抗ウイルス自然免疫応答における Zyxin の機能を解明することができた点で意義深い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Kouwaki T, Okamoto M, Tsukamoto H, Fukushima Y, Matsumoto M, Seya T, Oshiumi H. Zyxin stabilizes RIG-I and MAVS interactions and promotes type I interferon response. Sci Rep. 2017 Sep 19;7(1):11905. doi: 10.1038/s41598-017-12224-7. 査読有

〔学会発表〕 (計 1 件)

幸脇貴久、押海裕之、Zyxin は RIG-I と IPS-1 の相互作用を安定化させ、I 型インターフェロン応答を促進する、生体防御学会、2018

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：押海 裕之

ローマ字氏名：Hiroyuki Oshiumi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。