

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07168

研究課題名（和文）ウイルス感染時のインターフェロンと細胞死の使い分け機構の解析

研究課題名（英文）Differential control of the interferon and apoptotic responses against viral infection

研究代表者

岡崎 朋彦（Okazaki, Tomohiko）

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：50724598

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々はこれまで、ウイルス複製を制限する Ⅰ型インターフェロン(IFN)産生と、感染細胞除去を担う細胞死という二つの異なる応答を使い分ける機構を見出し、更にこの二つの応答の使い分けが宿主の恒常性維持とウイルス排除を両立するという可能性を示してきたが、抗ウイルス応答の使い分けによって実際にウイルス排除が達成されるかは不明であった。本研究において、抗ウイルス応答の使い分けによってウイルス排除が行われていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内の翻訳後修飾を介した新たなシグナル伝達機構が存在する可能性を見出した。今後様々な生命現象において、この翻訳後修飾が機能を果たすことが明らかになると期待できる。また、ウイルス排除を担う新たな分子機構を見出すことが出来た。これらの分子機構をターゲットとした新たなウイルス感染症治療法や予防法の基盤を提供することで、成果を社会に還元できる。

研究成果の概要（英文）：We previously found a mechanism by which the host cells differentially utilized two different responses, type I interferon (IFN) production to limit viral replication and cell death to eliminate infected cells. However, it was not clear whether viral elimination could actually be achieved by the usage of two differential antiviral responses. In this study, we found that viral elimination is indeed achieved by the differential usage.

研究分野：免疫学

キーワード：インターフェロン ウイルス感染症

1. 研究開始当初の背景

高等哺乳動物は、ウイルス感染の初期応答として自然免疫系を活性化しウイルス排除を行う。自然免疫応答においては、抗ウイルス作用のある I 型インターフェロン(IFN)を産生したり、あるいは感染細胞が細胞死を誘導したりすることによってウイルスの伝播を防いでいる。これら二つの応答は自然免疫応答における重要な防御機構であるが、個体や細胞のおかれた状況によっては宿主にダメージを与え有害となることも分かっている。即ち、ウイルス感染時には二つの応答を誘導しつつも状況に応じて使い分けることで宿主へのダメージを回避することが出来るにも関わらず、その仕組みはほとんど解明していない。

我々は以前、ウイルス感染に対して誘導される I 型 IFN の産生とアポトーシス誘導の選択に MAPKKK の ASK1 と ASK2 が重要な役割を果たすことを報告した(Okazaki et al., Science Sig., 2015)。具体的には、ASK1 は I 型 IFN 産生とアポトーシス誘導の両方に関わるのに対し、ASK2 は I 型 IFN 産生には関与せずアポトーシス誘導に選択的に関わることを見出した。しかしながら、感染細胞において ASK2 がどのようなコンテキスト、どのような分子機構により選択性を制御するかは分かっていた。

2. 研究の目的

細胞内に侵入したウイルス由来の RNA は、核酸受容体による認識の後、その情報がミトコンドリア上アダプター分子 IPS-1 へと伝えられる。IPS-1 はウイルス感染による I 型 IFN 産生と細胞死の誘導に必須であり、実際 IPS-1 欠損マウスは様々なウイルス感染に対し高い脆弱性を示す。しかしながら、IPS-1 の機能がいかに制御されているかはほとんど明らかでない。

予備の結果より、IPS-1 が ASK2 の下流でリン酸化制御を受けている可能性を見出している。そこで本研究では、IPS-1 のリン酸化部位を決定し、リン酸化の機能を明らかにすることを目的とした(目的 1)。

更に、IPS-1 のリン酸化が IPS-1 の他の翻訳後修飾も変化させる可能性を示す予備の結果も得ていることから、他の翻訳後修飾変化によって IPS-1 の機能がどのように制御されているか調べることも目的とした(目的 2)。

3. 研究の方法

-目的 1

細胞に IPS-1 と ASK1 及び ASK2 を発現させた後、IPS-1 を精製して質量分析(MS)に供し、IPS-1 のリン酸化部位を探索した。また、リン酸化部位にアラニンを導入した変異体や、リン酸化模倣変異を導入した変異体 IPS-1 を作製した後それを細胞に発現し、機能解析を試みた。

更に、見つかった IPS-1 のリン酸化残基に対する特異的抗体の作製を行った。

-目的 2

IPS-1 ノックアウトマウス由来繊維芽細胞(IPS-1 KO MEFs)に対し、ASK2 を介したリン酸化によって変化する他の翻訳後修飾の修飾部位に変異を入れた IPS-1 または野生型 IPS-1 を発現させた。それらの細胞にウイルス感染を模倣する二本鎖 RNA 刺激またはウイルス感染を行い細胞の機能を解析した。具体的には、刺激に対する細胞の I 型 IFN の誘導を定量 PCR 法により定量し、アポトーシスの誘導をカスパーゼ活性化としてモニターした。また、抗ウイルス応答の指標としてウイルス増殖を評価した。更に、野生型 IPS-1 と修飾の入らない IPS-1 変異体の結合因子を MS により網羅的に探索・比較を行った。

4. 研究成果

-目的 1

ASK2 が IPS-1 を直接リン酸化する可能性を考え、IPS-1 上に存在する ASK ファミリーのリン酸化コンセンサス配列の変異を導入したところ、IPS-1 のバンドシフトが一部消失するも大部分が残ることが判明した。そこで、MS を行って ASK2 によって制御される IPS-1 のリン酸化部位の網羅的探索を行なった結果、新たな候補部位が得られた。そこで次に、それらの候補部位にアラニン変異を導入した後、ウエスタンブロッティング法により IPS-1 のバンドシフトを観察したところ、完全にシフトが消失することが分かった。

-目的 2

申請者は変異体の解析から IPS-1 の翻訳後修飾が IPS-1 の I 型 IFN 誘導に必要であり、細胞死誘導能の抑制に必要である可能性を見出していた。しかしながら、この IFN 産生能と細胞死誘導能の切り替えがウイルス感染防御に重要であるかは明らかでなかった。そこで、IPS-1KO

細胞に対し野生型 IPS-1 または IPS-1 変異体を発現させた後、水疱性口内炎ウイルス(VSV)を感染した後ウイルスの増殖を評価した。すると、野生型 IPS-1 を発現する細胞に比べて変異体 IPS-1 を発現する細胞においては VSV の増殖が有意に亢進していた。このことから、IPS-1 の翻訳後修飾がウイルス感染防御に重要である可能性が示唆された。

また、野生型 IPS-1 と修飾の入らない IPS-1 変異体の結合因子を網羅的に探索・比較を行ったところ、IPS-1 の機能切り替えの責任候補分子(ミトコンドリア局在の IFN 制御因子 NUDT21、細胞死誘導制御因子等)が多数得られた(Aoyama-Ishiwatari and Okazaki* et al., *Journal of Immunology*, 2021)。このうち NUDT21 は実際にウイルス感染に対する IFN 誘導に必要なことも明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aoyama-Ishiwatari Saeko, Okazaki Tomohiko, Iemura Shun-ichiro, Natsume Tohru, Okada Yasushi, Gotoh Yukiko	4. 巻 206
2. 論文標題 NUDT21 Links Mitochondrial IPS-1 to RLR-Containing Stress Granules and Activates Host Antiviral Defense	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 154 ~ 163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2000306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 岡崎朋彦
2. 発表標題 ウイルス感染細胞におけるアポトーシスとインターフェロン産生の使い分け戦略
3. 学会等名 千里ライフサイエンスセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohiko Okazaki, Yukiko Gotoh
2. 発表標題 First line defense mechanisms against viral infection
3. 学会等名 AMED-CREST International Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiko Okazaki, Moe Inoue, Shinpei Toyoda, Yukiko Gotoh
2. 発表標題 A division of labour for the type Interferon and apoptosis induction after viral infection
3. 学会等名 17th International Congress of Immunology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡崎朋彦、井上萌、後藤由季子
2. 発表標題 A division of labour for the type interferon and apoptosis induction after viral infection
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡崎朋彦、井上萌、後藤由季子
2. 発表標題 A division of labour for the type interferon and apoptosis induction after viral infection
3. 学会等名 TOLL2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------