

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590477

研究課題名(和文) コアヒストンを介する抗ウイルス自然免疫応答機構の解明と応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism underlying core histone-mediated antiviral innate immune response

研究代表者

武下 文彦 (TAKESHITA FUMIHIKO)

横浜市立大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：60333572

研究成果の概要(和文)：

ヒストン H2B はウイルス由来二本鎖 DNA を認識し、抗ウイルス自然免疫を誘導することをあきらかとしてきた。本研究では、H2B を介した核外 DNA 認識機序の解析、新規免疫調節薬開発の基盤的研究を行った。成果として、H2B は IPS-1 と相互作用し、I 型インターフェロン (Type I IFNs) 産生を誘導する事をあきらかとした。また、H2B に結合する新規分子 CIAO を同定し、H2B-CIAO-IPS-1 複合体が Type I IFNs 産生に関与していることをあきらかとした。更に、H2B-CIAO-IPS-1 シグナルを活性化する N' -CARD は強力に type I IFNs 産生を誘導し、新規免疫調節薬の候補となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Previous our research has clarified that H2B could sense viral double stranded DNA (dsDNA), and induce antiviral innate immune response. The goal of current research is to elucidate molecular mechanism of H2B-mediated recognition of cytoplasmic DNA.

The results showed that extranuclear H2B interacts with IPS-1 upon sensing cytoplasmic DNA. We also identified the novel adaptor molecule, named as CIAO, to connect H2B with IPS-1, and showed that H2B-CIAO-IPS-1 complex has an important role to induce type I IFNs upon antiviral innate immune response. Furthermore, chimera protein N' -CARD, that is constructed by fusion of H2B fragment to IPS-1 fragment, could induce strong type I IFNs production, suggesting that H2B-CIAO-IPS-1 complex could be useful target to develop the novel immunomodulating drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：感染防御・ウイルス学・基礎医学

1. 研究開始当初の背景

RNA ウイルス感染に対して、宿主はウイルス由来の核酸分子を認識し抗ウイルス応答を起動することがあ

きらかにされた。これに対し我々は、ワクシニアウイルスのように細胞質で複製する DNA ウイルスに対してはウイルス由来の2本鎖 DNA (B-DNA)を

認識し、TBK1 や IKKi を活性化して Type I IFNs 産生を誘導することをあきらかとした (Nat Immunol 7:40, 2006)。更に DNA ウイルスに対しての感染認識機序を解明するため、naked DNA 結合分子を探索した結果、ヒストン H2B が同定された。一方、発現ライブラリースクリーニングにおいても、ヒストン H2B が同定された。実際に、ヒストン H2B をノックダウンさせた細胞においては DNA ウイルス複製が増強され、H2B は DNA ウイルス感染のセンサーとして働いている可能性が示唆された。またトランスフェクションされた外来 DNA は細胞内ヒストン H2B と相互作用することが免疫沈降法により確認され、ウイルス由来の DNA は細胞内で H2B により認識されていることが想定された。しかしながら、H2B を介した naked DNA (ヌクレオソームに取り込まれていないフリーな DNA) 認識機序の分子メカニズムは詳細に検討されていない。

H2B は遺伝子発現制御、ゲノム DNA の収納といった役割の他に、抗ウイルス応答の誘導にも関わっている。この他に、これまでの我々の研究より、RNA ウイルス感染における抗ウイルス応答がオートファジーと呼ばれるタンパク質分解系により制御されていることをあきらかにされた (Proc Natl Acad Sci USA 104:14050, 2007)。つまり、タンパク質分解系であるオートファジーも自然免疫制御系として重要な役割を果たしている。実際、オートファジーは不要なタンパク質のリサイクルとして機能するだけでなく、細胞内侵入性細菌の排除も担う。オートファジーと自然免疫分子の相互作用に関わる他の報告として、Nod like receptors (NLRs) 分子である NLRC4 欠損マウス腺維芽細胞においてオートファジー誘導が亢進されていることがあきらかとされた (PLoS Pathogens 3:8 2007)。NLRC4 を含むいくつかの NLRs 分子は IL-1 β や IL-18 産生のプラットフォームであるインフラマソームの構成分子である。しかしながら、NLRs ファミリー分子とオートファジーとの相互作用は未だ未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

本研究においては、ヒストン H2B と相互作用する分子を網羅的にスクリーニングすることから着手する。その中で、実際にインターフェロン誘導シ

グナル分子群と相互作用する分子を機能的に解析し、ヒストン H2B を介するシグナル伝達経路を解明する。我々の以前の報告より、アダプター分子 IPS-1 がヒトの細胞において外来 DNA による I 型インターフェロン産生に関わることから (Nat Immunol 7:40, 2006)、IPS-1 との相互作用についても検討を行う。また、核外の H2B の存在、そして核外 H2B による naked DNA の認識をイメージングにより解析する。更に、H2B を介したシグナル経路を用いた新規免疫調節薬の開発が可能であるか、基盤的な研究も併せて行う。

自然免疫制御系を多角的に解析するため、H2B による抗ウイルス応答の解析と併せて NLRs ファミリー分子とオートファジーの相互作用解析も行う。オートファジーは細胞内に侵入した A 郡連鎖球菌 (GAS) の排除を担うため、GAS 感染モデルを用いてオートファジーと NLRs 分子の相互作用を検討する。

3. 研究の方法

* ヒストン H2B による naked DNA の認識

核外のヒストン H2B の存在と、H2B による核外 DNA の認識を共焦点顕微鏡により解析する。

* ヒストン H2B 相互作用分子群の同定

ヒストン H2B 分子をベイトとした酵母ツーハイブリッド法によりライブラリーを網羅的にスクリーニングする。

* 同定された分子の機能解析

ヒストン H2B との相互作用があるか免疫沈降法により確認する。その後 siRNA を用いたノックダウン法により、インターフェロン産生シグナルにおける役割を確認する。また、ヒトとマウスの両方で H2B を介した naked DNA 認識シグナルが機能しているか、検討する。

* H2B による naked DNA 認識機序を利用した免疫調節薬候補の作製

H2B を介した naked DNA の認識機序に着目し、インターフェロン産生を誘導するタンパク質ベースの免疫調節薬の作製を試みる。シグナル伝達に必要な領域を融合させたキメラタンパク質を作製し、自然免疫活性化能を評価する。その際に、キメラタンパク質を細胞内へ効率よく導入するため、protein transduction domain を融合

し評価する。

* オートファジー分子 Beclin1 と NLRs 分子 NLRP4 の相互作用解析

過剰発現系を用いた解析により、我々は既に NLRs 分子である NLRP4 がオートファジー分子 Beclin1 に結合することを確認している。本研究では、内在性の NLRP4 と Beclin1 の相互作用を解析する。また、ゲル濾過解析により、Beclin1 と NLRP4 が複合体を形成しうるかを検討した。

* GAS の細胞内侵入に応じて誘導されるオートファジーと NLRP4 の相互作用

siRNA を用い NLRP4 発現量を低減させ、GAS 感染時に誘導されるオートファジーの程度を LC3II 蓄積マーカーにより評価する。また NLRP4 siRNA 処理後のオートファジーによる GAS 排除効率を検討する。

4. 研究成果

* ヒストン H2B による naked DNA の認識

免疫染色により、微量ながら核外 H2B の存在が認められた (図 1A)。核外 H2B の染色像は siRNA により消失することから、H2B の局在であることを確認した (図 1A)。H2B による細胞質内 naked DNA 認識を共焦点顕微鏡により解析した。結果から、刺激後 1 2 時間後に細胞質内 H2B の集積が認められた。また、核外の一部 H2B は IPS-1 と共局在していることが認められた (図 1B)。これらの結果から、核外 H2B は DNA 刺激に応じて局在を変化させ、naked DNA を認識すると考えられた。

* ヒストン H2B 相互作用分子群の同定

酵母ツーハイブリット法により、H2B と相互作用する分子として 欠損型 Importin 9 (COOH 末端側の 250 アミノ酸、遺伝子名 KIAA1192 として登録済み、機能不明) を同定した。他に Chloride channel nucleotide sensitive 1A が同定されたが、以後の解析では欠損型 Importin 9 に焦点を置いて解析を進めた。

* 欠損型 Importin 9 (CIAO) 分子の機能解析

欠損型 Importin 9 のヒストン H2B、または IPS-1 との相互作用を免疫沈降法により調べた。その結果、欠損型 Importin 9 はヒストン H2B や IPS-1 と複合体を形成することが認められた (図 2A)。一方、細胞内 RNA センサーである RIG-I には結合しないこと

から、欠損型 Importin 9 は H2B、IPS-1 シグナルにおいて機能するタンパク質であると示唆された。そこで、この欠損型 Importin 9 は H2B、IPS-1 と相互作用することから、COOH-terminal importin 9-related adaptor organizing histone H2B and IPS-1 (CIAO) と名付けられた。この相互作用は、FRET を用いた分子間距離測定においても同様に確認された (図 2B)。また、CIAO は H2B と IPS-1 の橋渡し分子として機能していることが示唆された (図 2B)。

siRNA を用いて CIAO の機能を解析したところ、CIAO 発現量低下に伴い naked DNA 刺激による IFN- β プロモーター活性化が減弱した (図 2C)。また、CIAO の発現量増加とともに IPS-1 を介した IFN- β プロモーター活性化が増強することから、H2B-CIAO-IPS-1 複合体が type I IFNs 産生に重要であると示唆された (図 2D)。

H2B-CIAO-IPS-1 複合体がマウスにおいても認められるか、免疫沈降法により検討した。その結果、マウスにおいては H2B-CIAO-IPS-1 複合体が認められなかった (図 2E)。ヒトの IPS-1 をマウスの細胞に発現させると naked DNA 刺激による *ifnb1* mRNA レベルが上昇することから、H2B-CIAO-IPS-1 シグナルはマウスでは存在しないことが示唆された (図 2F)。

* H2B による naked DNA 認識機序を利用した免疫調節薬候補の作製

H2B-CIAO-IPS-1 複合体のヒストン H2B と IPS-1 の一部を融合することにより、キメラタンパク質 N'-CARD を作製した。細胞内輸送のために PTD を融合し、N'-CARD-PTD とした。N'-CARD-PTD で HeLa 細胞を処理すると、LPS に比べ高い IFN- α の発現が認められた (図 3A)。また抗原提示細胞である樹状細胞においても、N'-CARD-PTD は type I IFNs 産生を誘導することから N'-CARD-PTD のアジュバントとしての有用性が示唆された。

* オートファジー分子 Beclin1 と NLRs 分子 NLRP4 の相互作用解析

HeLa 細胞における NLRP4 と Beclin1 の相互作用を免疫沈降法により解析した結果、内在性 NLRP4 と Beclin1 は結合していることがあきらかとなった (図 4A)。またゲル濾過の結果から、Beclin1 と NLRP4 は複合体を形成する可能性が示唆された (図 4B)。

* GAS の細胞内侵入に応じて誘導され

オートファジーと NLRP4 の相互作用

siRNA を用い NLRP4 発現量を低減させ、GAS 感染時に誘導されるオートファジーの程度を LC3II 蓄積マーカーにより評価した結果、LC3II 蓄積が NLRP4 発現量低減により顕著に増加していることが認められた (図 5)。また NLRP4 siRNA 処理後に GAS を感染させると、NLRP4 発現量低減により細胞内に残存する GAS 生菌数が顕著に減少していた (図 6)。

<結論>

本研究により、H2B を介した naked DNA 認識機序があきらかとなった。また、H2B 分子シグナルを利用した免疫調節薬開発の基礎研究も遂行された。更に、細菌感染におけるオートファジー制御機構の一因子として NLRs ファミリー分子 NLRP4 を同定した。本研究の成果により、新規免疫調節薬開発の一助となることを期待する。

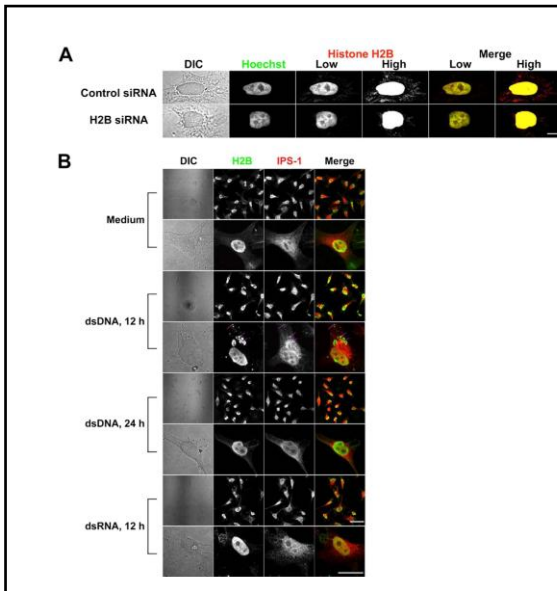


図 1

A) siRNA で処理した後、HeLa 細胞を Hoechst で核染色および抗 H2B 抗体で染色した。H2B 染色における二次抗体は Alexa488 標識された抗マウス抗体を用いた。解析は共焦点顕微鏡を用いて行われた。B) HeLa 細胞を dsDNA、dsRNA 処理後、ヒストン H2B、IPS-1 を免疫染色した。核は Hoechst により染色した。H2B は Alexa488 標識二次抗体を用い、IPS-1 は Alexa546 二次抗体を用いた。

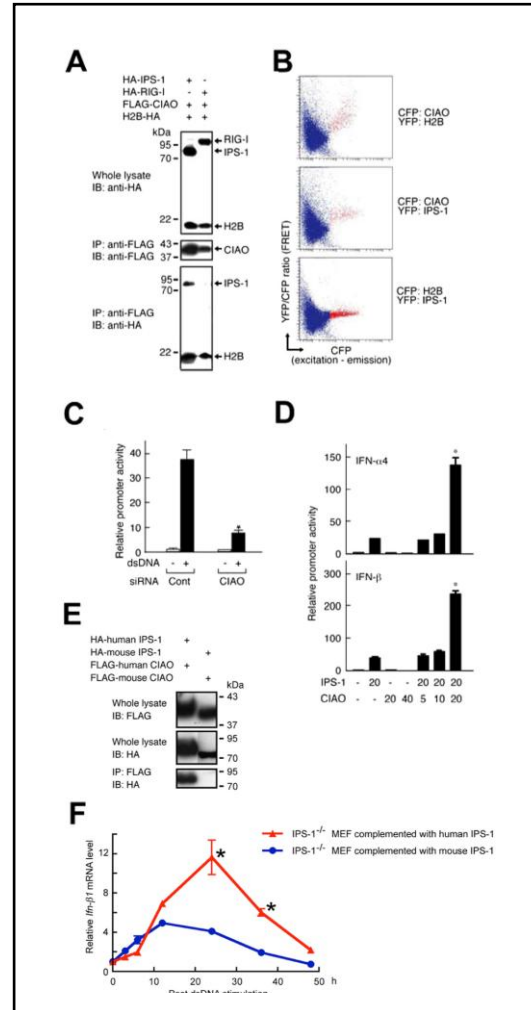


図 2

A) IPS-1, CIAO, H2B 発現プラスミド、あるいは IPS-1, CIAO, RIG-I 発現プラスミドを HEK293 細胞に導入し、免疫沈降を行った。B) YFP 融合、または CFP 融合タンパク質を 293F に発現させ、FRET 解析を行った。C) HeLa 細胞に IFN- β プロモータープラスミドを導入後、siRNA により CIAO 発現量を低下させた。その後、dsDNA 刺激し、IFN- β プロモーターのレポーターアッセイを行った。D) HeLa 細胞にレポータープラスミドと共に IPS-1、CIAO 発現プラスミドを導入し、レポーターアッセイを行った。E) HEK293 細胞にそれぞれのプラスミドを導入し、免疫沈降を行った。F) マウス IPS-1 ノックアウト胎児線維芽細胞にマウス IPS-1、またはヒト IPS-1 を遺伝子導入し、dsDNA 刺激後の *ifnb1* mRNA 量を比較検討した。

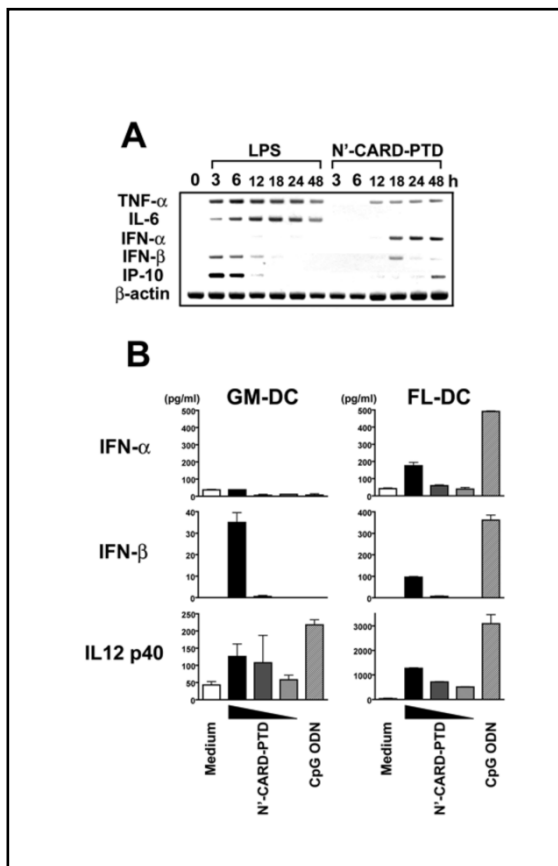


図 3

A) RAW264.7 を LPS もしくは N'-CARD-PTD で刺激し、RT-PCR で TNF- α 、IL-6、IFN- α 、IFN- β 、IP-10 の mRNA の発現を解析した。B) B6 マウス骨髄細胞より GM-CSF または Flt3L で樹状細胞 (GM-DC または FL-DC) を誘導した。N'-CARD-PTD、もしくは CpG ODN で刺激後に培養上清中の IFN- α 、IFN- β 、IL-12 p40 の発現量を ELISA にて定量した。

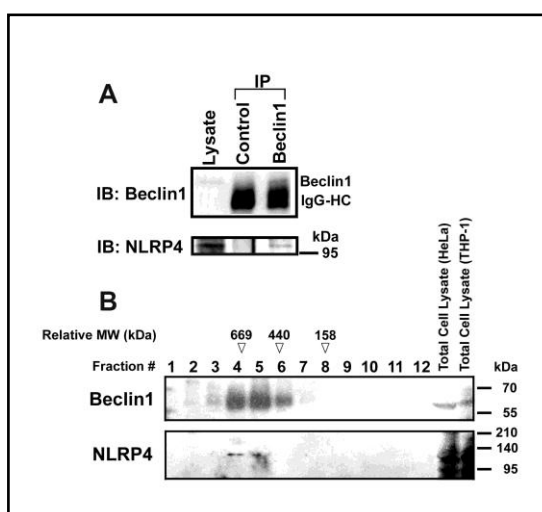


図 4

A) HeLa 細胞を溶解後に抗 Beclin1 抗体により免疫沈降を行った。免疫沈降

コントロールとしてウサギ血清を用いた。共沈した NLRP4 は抗 NLRP4 抗体により検出した。B) HeLa 細胞を溶解後にゲル濾過による分画精製を行った。抗 Beclin1 抗体、抗 NLRP4 抗体により Beclin1、または NLRP4 が含まれる分画を検出した。

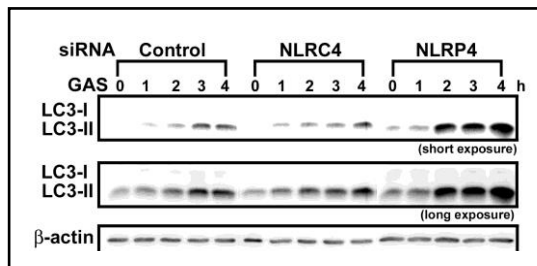


図 5

ヒト臍帯血上皮細胞を siRNA で処理後、LC3-II 蓄積量を western blotting 法により検討した。

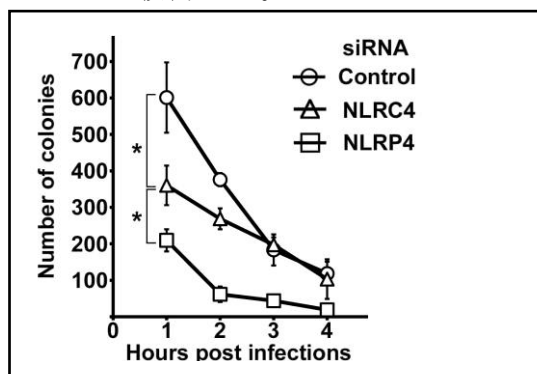


図 6

ヒト臍帯血上皮細胞を siRNA で処理後、GAS を感染させ、細胞内生菌数を計測した。

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 8 件)

1. Kobiyama, K., N. Jounai, K. J. Ishii, T. Horii, K. Suzuki, A. Ryo, and F. Takeshita. 2010. Modulation of intracellular signaling using protein-transduction technology. *Crit Rev Immunol* 30:395-421.

2. Coban, C., Y. Igari, M. Yagi, T. Reimer, S. Koyama, T. Aoshi, K. Ohata, T. Tsukui, F. Takeshita, K. Sakurai, T. Ikegami, A. Nakagawa, T. Horii, G. Nunez, K. J. Ishii, and S. Akira. 2010. Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin

and host TLR9. *Cell Host Microbe* 7:50-61.

3. Kobiyama, K., **F. Takeshita**, N. Jounai, A. Sakaue-Sawano, A. Miyawaki, K. J. Ishii, T. Kawai, S. Sasaki, H. Hirano, N. Ishii, K. Okuda, and K. Suzuki. 2010. Extrachromosomal histone H2B mediates innate antiviral immune responses induced by intracellular double-stranded DNA. *J Virol* 84:822-832.

4. Tanooka, H., K. Tatsumi, H. Tsuji, Y. Noda, T. Katsube, H. Ishii, A. Ootsuyama, **F. Takeshita**, and T. Ochiya. 2010. Mutant mouse p53 transgene elevates the chemical induction of tumors that respond to gene silencing with siRNA. *Cancer Gene Ther* 17:1-10.

5. Tanigawa, K., K. Suzuki, H. Kimura, **F. Takeshita**, H. Wu, T. Akama, A. Kawashima, and N. Ishii. 2009. Tryptophan aspartate-containing coat protein (COR01A) suppresses Toll-like receptor signalling in Mycobacterium leprae infection. *Clin Exp Immunol* 156:495-501.

6. Kobiyama, K., **F. Takeshita**, K. J. Ishii, S. Koyama, T. Aoshi, S. Akira, A. Sakaue-Sawano, A. Miyawaki, Y. Yamanaka, H. Hirano, K. Suzuki, and K. Okuda. 2009. A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class of vaccine adjuvant. *J Immunol* 182:1593-1601.

7. **F. Takeshita**, and K. J. Ishii. 2008. Intracellular DNA sensors in immunity. *Curr Opin Immunol* 20:383-388.

8. Coban, C., S. Koyama, **F. Takeshita**, S. Akira, and K. J. Ishii. 2008. Molecular and cellular mechanisms of DNA vaccines. *Hum Vaccin* 4:453-456.

[学会発表] (計 4 件)

1. Kobiyama K, Ishii KJ, **Takeshita F**. A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class of vaccine adjuvant. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. March 29-April 3. 2009.

Banff, Alberta, Canada.

2. **Takeshita F**, Kobiyama K. A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class of vaccine adjuvant. International Workshop co-sponsored by Yokohama City University & FDA. March 4. 2009. Yokohama.

3. **武下文彦** 自然免疫活性化機序の解明と応用. 第 8 回プロテオーム医療創薬研究会. 横浜. 2009. 1.

4. 小檜山康司、**武下文彦**、石井健、鈴木幸一、奥田研爾 IPS-1 変異体による新規自然免疫活性化メカニズムの解析および免疫調節薬への応用. 第 19 回日本生体防御学会学術総会. 札幌. 2008. 7.

[産業財産権]

○ 取得状況 (計 2 件)

1. 名称: 染色体外ヒストン H2B を介する二本鎖 DNA 認識機構の利用
発明者: **武下文彦**、小檜山康司、吉田篤司
権利者: 公立大学法人 横浜市立大学
種類:
番号: 特開 2011-109982
出願年月日: 平成 21 年 11 月 27 日
国内外の別: 国内

2. 名称: カスパーゼリクルートメントドメインを応用した新規リコンビナントタンパク及びその用途
発明者: **武下文彦**、小檜山康司、奥田研爾
権利者: 公立大学法人 横浜市立大学
種類:
番号: 特許出願 2009JP064218
出願年月日: 平成 21 年 8 月 12 日
国内外の別: 国内外

6. 研究組織

(1) 研究代表者
武下文彦 (TAKESHITA FUMIHIKO)
横浜市立大学・医学研究科・客員教授
研究者番号: 60333572

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし