

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03202

研究課題名（和文）自然免疫分子STINGのオルガネラ局在に応じた活性制御機構とその破綻による疾患

研究課題名（英文）The molecular mechanism underlying STING signalling

研究代表者

向井 康治朗 (Kojiro, Mukai)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：90767633

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：自然免疫は異物を排除するための先天的に備わっているシグナル伝達経路であり、STING経路はDNAウイルス感染など細胞質DNAに応答する主要な自然免疫応答経路の1つである。我々は本研究において、細胞内でのSTINGの活性制御機構を解析し、定常状態においてCOP-1小胞輸送を介してSTINGを小胞体に維持する機構や (Mukai et al., Nat Commun 2021など)、活性化後のSTINGをリソソームが分解する機構 (Kuchitsu & Mukai et al., Nat Cell Biol 2023) を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、定常状態において小胞体にSTINGを留める分子機構や、ゴルジ体で活性化した後のSTINGシグナルが収束する分子機構を明らかにし、それらの破綻が過剰な炎症応答に繋がることを見出した。これらの成果は、細胞内でのSTING経路の新規活性制御機構を明らかにしただけでなく、自己炎症性疾患の病態発症機序の解明やSTING特異的阻害剤の創薬研究にも貢献している。

研究成果の概要（英文）：The innate immune response is essential for efficient and rapid host defense against invading pathogens. The STING pathway is one of the major pathways of the innate immune response that responds to cytosolic microbial DNA from viruses or self-DNA from mitochondria/nuclei. In this study, we demonstrate the homeostatic regulation of STING at the resting state by the retrograde membrane traffic (Mukai et al., Nat Commun 2021). We also found that the STING signalling is terminated through ESCRT-dependent microautophagy of vesicles originating from recycling endosomes (Kuchitsu & Mukai et al., Nat Cell Biol 2023). These results suggest that the activity of STING is strictly regulated by membrane trafficking to prevent hyperactivation of innate immune signalling.

研究分野：細胞生物学

キーワード：自然免疫シグナル 細胞内物質輸送 小胞体 ゴルジ体 エンドソーム リソソーム

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

自然免疫は先天的に備わっている異物に対する応答機構であり、感染初期の生体防御において重要な役割を果たしている。近年、DNA ウイルス感染時に宿主の細胞質に持ち込まれるウイルス DNA に結合して活性化する酵素 cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) (Sun et al., *Science* 2013)、および cGAS によって産生されるセカンドメッセンジャー cyclic GMP-AMP (cGAMP) (Wu et al., *Science* 2013)、さらにその cGAMP に結合する小胞体局在の 4 回膜貫通アダプタータンパク質 STING (Ishikawa et al., *Nature* 2008) が相次いで同定された。STING は cGAMP が結合したのちに TBK1 キナーゼをリクルートし、それがきっかけとなり TBK1 は自己リン酸化して活性化する。活性化した TBK1 は転写因子である IRF3 や NF- $\kappa$ B を活性化することで、IFN $\beta$  などの I 型インターフェロン (I 型 IFN) や、IL6 などの炎症性サイトカインの発現を誘導する。この一連の STING 経路は、DNA ウイルス感染防御に必須の自然免疫応答経路である。

研究代表者は本研究開始までに、細胞内の STING の活性化機構に関して、STING が DNA 刺激依存的に小胞体からゴルジ体、リサイクリングエンドソーム、リソソームへと逐次的に移行すること、その中でも STING が TBK1 を活性化する場合はゴルジ体であること、さらに STING による TBK1/IRF3 の活性化にはゴルジ体で起きる STING のパルミトイル化が必須であることを見出していた (Mukai et al., *Nat Commun* 2016)。また、STING の点変異により引き起こされる自己炎症性疾患 SAVI (STING-associated vasculopathy with onset in infancy) の発症機構を解析し、SAVI 型 STING は DNA 刺激が無い状態でも常に小胞体を脱出し、ゴルジ体でパルミトイル化されることで下流シグナルを活性化していることを見出した (Mukai et al., *Nat Commun* 2016; Ogawa & Mukai et al., *BBRC* 2018)。このように STING の活性化機構の理解は深まった一方で、STING の活性化を負に制御する機構に関しては不明な点が多く残されていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、STING の不活性化機構に関して、(i) 定常状態で STING が小胞体に維持される機構、および (ii) DNA 刺激後ゴルジ体で活性化した STING がリソソームで分解されてシグナルが収束する機構、を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、上記の目的を達成するため、超解像顕微鏡/電子顕微鏡を用いた STING の局在解析、siRNA を用いたノックダウンスクリーニング、質量分析を用いた STING 結合タンパク質のプロテオミクス解析などを行った。

## 4. 研究成果

### (1) 定常状態で STING が小胞体に維持される機構

最近、ゴルジ体から小胞体への逆行性輸送を担う COP-I 複合体タンパク質の一つ  $\alpha$ -COP に点変異が導入されると常染色体顕性の自己炎症性疾患 (COPA syndrome) となることが発見された (Watkin et al., *Nat Genet* 2015)。さらに興味深いことに、COPA syndrome と SAVI の炎症病態 (I 型 IFN 上昇、間質性肺炎) が類似していることが報告されていた (Volpi et al., *Clin Immunol* 2018)。そこで、遺伝病型  $\alpha$ -COP を安定発現する細胞を作製して STING の局在を評価したところ、SAVI と同様に STING がゴルジ体に蓄積することを見出した。さらに、遺伝病型  $\alpha$ -COP を発現させると、STING 依存的に下流キナーゼ TBK1 がリン酸化し、I 型 IFN 関連遺伝子が発現上昇する結果を得た。これらの結果から、定常状態での COP-I 小胞体を介したゴルジ体-小胞体間の逆行性輸送が STING の小胞体局在維持に必要であり、この機構が破綻すると I 型 IFN 応答が恒常的に活性化して自己炎症性疾患となることが考えられた。

STING には  $\alpha$ -COP 結合配列 (C 末端の KxKxx または KKxx) が存在しないため、STING と  $\alpha$ -COP を繋ぐカーゴレセプターが存在すると予想し、STING、野生型  $\alpha$ -COP、病気型  $\alpha$ -COP の結合タンパク質の質量分析結果をもとにカーゴレセプター候補を 18 遺伝子に絞り込んだ。この候補遺伝子を個々に発現抑制して表現型を解析したところ、Surf4 という遺伝子を発現抑制すると、無刺激時で STING がゴルジ体へ局在に変化し、TBK1 がリン酸化することを見出した。さらに、遺伝病型  $\alpha$ -COP は野生型  $\alpha$ -COP に比べて Surf4 との結合が減弱していた。また、Surf4 の C 末端配列 KKKEW を AAAEW に変換した Surf4 変異体は  $\alpha$ -COP との結合が減弱していた。これらの結果から、Surf4 が STING と  $\alpha$ -COP を繋ぐカーゴレセプターである可能性が示唆された。

さらに、個体レベルで COA syndrome の病態発症機構を解析するために、Anthony K. Shum 博士 (University of California San Francisco 校) との共同研究を行い、遺伝病型  $\alpha$ -COP ノックインマウス (Copa<sup>+E241K</sup> マウス) の表現型解析を行った。その結果、Copa<sup>+E241K</sup> マウスにおいて、COA

syndrome 患者様の肺炎が見られること、および、胸腺と脾臓で I 型 IFN 応答が亢進していることを見出した。さらに、この *Copa*<sup>+E241K</sup> マウスの I 型 IFN 応答の亢進は、*Copa*<sup>+E241K</sup> x *Sting*<sup>-/-</sup> マウスでは見られなかった。また、COPA syndrome 患者由来細胞で見られる恒常的な I 型 IFN 応答が、STING のパルミトイル化阻害剤で抑制できる結果も得た。

以上の結果より、定常状態での COP-I 小胞を介したゴルジ体-小胞体間の逆行性輸送が STING の小胞体局在維持に必要であり、この機構が破綻すると I 型 IFN 応答が恒常的に活性化して自己炎症性疾患となることが示唆された (Mukai et al., *Nat Commun* 2021; Deng et al., *J Exp Med* 2020)。

## (2) STING がリソソームで分解されてシグナルが収束する機構

さらに、本研究では、ゴルジ体で活性化した STING シグナルが収束する分子機構の解析も行った。ゴルジ体で活性化した後の STING の動態を超解像顕微鏡と電子顕微鏡で観察したところ、リサイクリングエンドソーム上の STING がリソソームに直接飲み込まれることを見出した。リソソームが隔離膜を介さずに細胞質の物質を分解する経路はマイクロオートファジーと呼ばれ、隔離膜を必要とするマクロオートファジーとは区別される。我々はその分子機構の解析を進め、この STING のマイクロオートファジー分解に、ESCRT 複合体タンパク質 TSG101 と VPPS4 が必要であることを見出した。さらに、TSG101 を発現抑制した細胞では、STING 経路の活性化が収束せず、I 型 IFN 応答が増強していた。これらの結果より、ゴルジ体で活性化した STING が TSG101 依存的にマイクロオートファジーで分解され、その下流シグナルが収束していることが示唆された (Kuchitsu & Mukai et al., *Nat Cell Biol* 2023)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Takahashi Kanoko, Niki Takahiro, Ogawa Emari, Fumika Kiku, Nishioka Yu, Sawa Masaaki, Arai Hiroyuki, Mukai Kojiro, Taguchi Tomohiko	4. 巻 11
2. 論文標題 A cell-free assay implicates a role of sphingomyelin and cholesterol in STING phosphorylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-91562-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hasegawa Junya, Uchida Yasunori, Mukai Kojiro, Lee Shoken, Matsudaira Tatsuyuki, Taguchi Tomohiko	4. 巻 9
2. 論文標題 A Role of Phosphatidylserine in the Function of Recycling Endosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 783857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.783857	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Taguchi Tomohiko, Mukai Kojiro, Takaya Eiko, Shindo Ruri	4. 巻 12
2. 論文標題 STING Operation at the ER/Golgi Interface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.646304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kuchitsu Yoshihiko, Mukai Kojiro, Takaada Yuki, Shinojima Ayumi, Hamano Shiori, Uematsu Rei, Ogawa Emari, Suzuki Takehiro, Dohmae Naoshi, Uemura Takefumi, Arai Hiroyuki, Waguri Satoshi, Taguchi Tomohiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Lysosomal vesiculophagy terminates STING signalling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 485012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.03.20.485012	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kemmoku Haruka, Kuchitsu Yoshihiko, Mukai Kojiro, Taguchi Tomohiko	4. 巻 47
2. 論文標題 Specific association of TBK1 with the trans-Golgi network following STING stimulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 19 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.21080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Deng Zimu, Chong Zhenlu, Law Christopher S., Mukai Kojiro, Ho Frances O., Martinu Tereza, Backes Bradley J., Eckalbar Walter L., Taguchi Tomohiko, Shum Anthony K.	4. 巻 217
2. 論文標題 A defect in COPI-mediated transport of STING causes immune dysregulation in COPA syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 2128-2135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20201045	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 該当する

1. 著者名 Mukai Kojiro, Ogawa Emari, Uematsu Rei, Kuchitsu Yoshihiko, Kiku Fumika, Uemura Takefumi, Waguri Satoshi, Suzuki Takehiro, Dohmae Naoshi, Arai Hiroyuki, Shum Anthony K., Taguchi Tomohiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Homeostatic regulation of STING by retrograde membrane traffic to the ER	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 61,
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20234-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kuchitsu, Y., Mukai, K., Uematsu, R., Takaada, Y., Shinojima, A., Shindo, R., Shoji, T., Hamano, S., Ogawa, E., Sato, R., Miyake, K., Kato, A., Kawaguchi, Y., Nishitani-Isa, M., Izawa, K., Nishikomori, R., Yasumi, T., Suzuki, T., Dohmae, N., Uemura, T., Barber, G. N., Arai, H., Waguri, S., and Taguchi, T.	4. 巻 25
2. 論文標題 STING signalling is terminated through ESCRT-dependent microautophagy of vesicles originating from recycling endosomes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 453 ~ 466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-023-01098-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsumoto Kentaro, Ni Shenwei, Arai Hiroyuki, Toyama Takashi, Saito Yoshiro, Suzuki Takehiro, Dohmae Naoshi, Mukai Kojiro, Taguchi Tomohiko	4. 巻 48
2. 論文標題 A non-nucleotide agonist that binds covalently to cysteine residues of STING	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 59 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.22085	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 -

1. 著者名 Nishitani-Isa, M., Mukai, K., Honda, Y., Nihira, H., Tanaka, T., Shibata, H., Kodama, K., Hiejima, E., Izawa, K., Kawasaki, Y., Osawa, M., Katata, Y., Onodera, S., Watanabe, T., Uchida, T., Kure, S., Takita, J., Ohara, O., Saito, M. K., Nishikomori, R., Taguchi, T., Sasahara, Y., and Yasumi, T.	4. 巻 219
2. 論文標題 Trapping of CDC42 C-terminal variants in the Golgi drives pyrin inflammasome hyperactivation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20211889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20211889	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 -

1. 著者名 Shindo Ruri, Kuchitsu Yoshihiko, Mukai Kojiro, Taguchi Tomohiko	4. 巻 10
2. 論文標題 The activity of disease-causative STING variants can be suppressed by wild-type STING through heterocomplex formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1037999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.1037999	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 向井康治朗, 小川笑満里, 植松黎, 朽津芳彦, 菊史佳, 植村武文, 和栗聡, 鈴木健裕, 堂前直, 新井洋由, SHUM Anthony K, 田口友彦
2. 発表標題 自然免疫分子STINGの小胞体局在維持機構とその破綻に起因する疾患
3. 学会等名 日本細胞生物学会大会(Web) 2021年
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kojiro Mukai, Anthony K. Shum, Tomohiko Taguchi
2. 発表標題 Homeostatic regulation of STING by retrograde membrane traffic to the ER
3. 学会等名 ASBMB Annual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朽津_芳彦、高阿田_有希、向井_康治朗、田口_友彦
2. 発表標題 自然免疫分子 STING シグナルの収束機構
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 見目_悠、向井_康治朗、田口_友彦
2. 発表標題 自然免疫分子 STING は trans-Golgi network において下流キナーゼ TBK1 をリクルートする
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 進藤_瑠璃、樋野_展正、土井_健史、向井_康治朗、田口_友彦
2. 発表標題 光クロスリンク技術を用いた自然免疫分子 STING の結合タンパク質の探索
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋_花乃子、湯本_瑛亮、高谷_英子、進藤_瑠璃、高阿田_有希、篠島_あゆみ、堀口_雛、朽津_芳彦、向井_康治朗、田口_友彦
2. 発表標題 リン酸化 STING を認識するモノクローナル抗体の作製
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倪_申、向井康治朗、鈴木_健裕、堂前_直、新井_洋由、田口_友彦、河野望
2. 発表標題 ホスファチジルイノシトール -4 リン酸(PI4P)近傍タンパク質の解析
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向井_康治朗、小川_笑満里、朽津_芳彦、新井_洋由、田口_友彦
2. 発表標題 細胞内物質輸送異常が引き起こす STING の活性化に起因する自己炎症性疾患
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向井康治朗、小川笑満里、朽津芳彦、植村武文、和栗聡、鈴木健裕、堂前直、新井洋由、Anthony K. Shum、田口友彦
2. 発表標題 自然免疫分子STINGの小胞体局在性維持機構とその破綻に起因する遺伝性自己炎症性疾患
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年



〔図書〕 計2件

1. 著者名 向井 康治朗	4. 発行年 2021年
2. 出版社 (株)メディカルレビュー社	5. 総ページ数 7
3. 書名 The Lipid	

1. 著者名 向井 康治朗	4. 発行年 2021年
2. 出版社 (株)羊土社	5. 総ページ数 5
3. 書名 実験医学	

〔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
---------	---------