

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20625

研究課題名（和文）抗ウイルス免疫応答におけるユビキチン化の役割と生理的意義の解明

研究課題名（英文）Role of ubiquitination in antiviral immune response

研究代表者

加藤 一希 (Kato, Kazuki)

東京大学・先端科学技術研究センター・講師

研究者番号：10903776

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：cGASはウイルス由来DNAを認識して、宿主の免疫応答を促進する。本研究ではcGASの翻訳後修飾、特にモノユビキチン化に着目し、生化学、構造生物学を駆使して、cGASによるモノユビキチン依存的な活性化機構を詳細に明らかにすることを目指した。cGASのモノユビキチン化酵素TRIM56を調製し、in vitroでユビキチン化反応を行うことによって、ユビキチン化cGASの調製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

cGASはDNAウイルスに対する重要なDNA受容体であるにも関わらず、翻訳後修飾による活性化機構はよくわかっていない。

本研究において調製したモノユビキチン化cGASを用いることで生化学・構造生物学的解析が可能となり、TRIM56によるモノユビキチン化の生理機能が明らかになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：cGAS, an innate immune sensor, recognizes viral DNA and orchestrates host immune responses. Through a combination of biochemical assays and structural biology techniques, we aimed to unravel the underlying mechanism of mono-ubiquitin-dependent activation mediated by cGAS. To accomplish this, we employed in vitro techniques to prepare the mono-ubiquitinating enzyme TRIM56 and performed ubiquitination reactions. Notably, our efforts culminated in the successful generation of ubiquitinated cGAS through the in vitro ubiquitination reaction.

研究分野：自然免疫

キーワード：自然免疫 抗ウイルス応答 核酸認識 翻訳後修飾 ユビキチン

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

ウイルスや細菌が体内に侵入した際、これら病原体に対する一次的な防御反応は自然免疫系によっておこなわれる。病原体に由来する分子は宿主の持つ様々な受容体センサーによって認識され、炎症性サイトカインやインターフェロンの産生、細胞死を引き起こすことで、病原体は速やかに排除される。DNA ウイルスの感染に対しては、**cGAS** とよばれる細胞質 DNA センサーがウイルス由来の二本鎖 DNA を認識し、ATP と GTP から **cyclic GMP-AMP (cGAMP)** とよばれる小分子セカンドメッセンジャーを産生する (Sun et al., Science, 2012, Wu et al., Science, 2012, 図 1)。cGAMP は小胞体膜受容体 **STING** に認識され、**TBK1** キナーゼおよび転写因子 **IRF3** の活性化を促し I 型インターフェロン産生を誘導する。近年 **cGAS** はウイルス感染に応答してリン酸化、アセチル化、ユビキチン化など様々な翻訳後修飾を受けることが報告されている (Hertzog et al., EMBO Rep, 2020)。例えば、E3 ユビキチンリガーゼ **TRIM56** は **cGAS** をモノユビキチン化し、**cGAS** による免疫応答を増強する (Seo et al., Nat Commun, 2018)。TRIM56 ノックアウトマウスは単純ヘルペスウイルスの感染に対して脆弱性を示すことから、TRIM56 によるモノユビキチン化は **cGAS** の機能発現に必須であることが示されている。しかしながら、モノユビキチン化 **cGAS** の調製が困難なことから、これまでモノユビキチン化 **cGAS** の生化学的・構造生物学的解析はおこわれておらず、**cGAS** のモノユビキチン化が **cGAS** の活性を増強するメカニズムはわかっていなかった。

2. 研究の目的

申請者は、ユビキチン化が **cGAS** による DNA ウイルスに対する免疫応答において **cGAS** の活性化を制御しているのではないかと仮説を立てた。すなわち **cGAS** に付与されたモノユビキチンはウイルス DNA に対する結合を促進する、あるいは **cGAS** の酵素活性そのものを上昇させるのではないかと考えている。本研究では、まずモノユビキチン化 **cGAS** の調製を試み、生化学的解析を駆使して、**cGAS** によるユビキチン依存的な活性化機構を詳細に明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

モノユビキチン化 **cGAS** を以下の方法によって高純度に調製することを試みた。

1. ユビキチン-**cGAS** 融合タンパク質の調製
2. 細胞内における **cGAS** のモノユビキチン化、および細胞抽出液からの高純度精製
3. 精製 **TRIM56**、および **cGAS** を用いての *in vitro* ユビキチン化によるモノユビキチン化 **cGAS** の調製

さらに精製したユビキチン化 **cGAS** を用いて様々な生化学的解析を行った。以下の研究成果に示すことが明らかとなった。

4. 研究成果

まずユビキチンと **cGAS** をリンカーでつないだユビキチン-**cGAS** 融合タンパク質を高純度に精製し、様々な生化学解析を行った。申請者は非変性ポリアクリルアミド電気泳動によるゲルシフトアッセイを用いて、Ub-**cGAS** は野生型 **cGAS** に比べて DNA に対してより強く結合することを見出した。さらに申請者は **cGAS** の **cGAMP** 産生活性を定量的に測定する系を確立し、この実験系において、Ub-**cGAS** は **cGAMP** 産生活性が野生型 **cGAS** に比べて上昇することを見出した。このことから **cGAS** に結合したユビキチンは **cGAS** の活性化に関わることが示唆された。

そこで **TRIM56** によってモノユビキチン化した **cGAS** を調製するために、**HEK293** 細胞に **TRIM56** と **cGAS** を遺伝子導入し、細胞抽出液からモノユビキチン化した **cGAS** のみを精製することを試みたが、未修飾の **cGAS** からユビキチン化された **cGAS** のみを精製することができなかった。そこで **cGAS**、**TRIM56** を別々に精製したのちに、ユビキチンや **E1**、**E2** 酵素と混合し、*in vitro* で **cGAS** をモノユビキチン化することを試みた。その結果効率的な **cGAS** のモノユビキチン化が観察され、さらにその後の精製操作によってモノユビキチン化 **cGAS** のみを単離することに成功した。変性ポリアクリルアミド電気泳動による分子量から、**cGAS** は **TRIM56** によって 2 箇所、もしくは 3 箇所のリジン残基においてモノユビキチン化されることがわかった。今後はまず質量分析を行うことでユビキチン化

されるリジン残基の同定を行う。さらにこのモノユビキチン化 **cGAS** を用いて **DNA** 結合能の評価、**cGAMP** 産生能の測定、および **X** 線結晶構造解析による構造解析をおこなう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------