

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790450

研究課題名（和文）ウイルス感染時の蛋白質修飾を介した新規自然免疫活性化機構の生体内での重要性

研究課題名（英文）In vivo role of novel innate immune factors during viral infection

研究代表者

押海 裕之（OSHIUMI HIROYUKI）

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：50379103

研究成果の概要（和文）：

新型インフルエンザや C 型肝炎ウイルス等のウイルス感染症の問題は個人の健康を脅かし、時に社会にパニックを引き起こす深刻な問題である。ウイルス感染時にはヒトの自然免疫が働きウイルスを排除する。我々は自然免疫で働く新規分子 Riplet を発見し、その遺伝子改変マウスを作製し、その機能を詳細に調べたところ、Riplet 分子がウイルス感染時に産生される強い抗ウイルス作用をもつ I 型インターフェロンの産生に必須であることが解明された。

研究成果の概要（英文）：

Innate immune response is essential for the protection against viral infection, such as novel flu or Hepatitis C virus. We have previously isolated a novel protein, Riplet. We constructed Riplet deficient mice and examined its phenotype. We found that Riplet is essential for type I interferon production, which possesses strong antiviral activity, in response to viral infection in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自然免疫・ウイルス・インターフェロン・核酸・ユビキチン

## 1. 研究開始当初の背景

C 型肝炎ウイルスや新型インフルエンザウイルス等、ウイルス感染症の問題は個人の健康や生命を脅かし、時に社会を停滞させパニックを引き起こす等深刻な問題である。ウイルス感染時にはヒトの自然免疫が最初に働く。自然免疫系は、強い高ウイルス作用を持つ I 型インターフェロンの産生等を介してウイルスを排除する。

自然免疫系では、ウイルスは細胞質内のウ

イルスセンサーである RIG-I 等により認識される。RIG-I は繊維芽細胞や樹状細胞やマクロファージ等の自然免疫で働く細胞に発現している分子である。RIG-I はウイルス由来の核酸を認識すると下流のアダプター分子である IPS-1 を介してシグナルを伝え I 型インターフェロンを含む炎症性サイトカインの産生を誘導する。しかし、この RIG-I の制御機構は未知の部分が多く含む。

我々はこれまでに、RIG-I の未知の制御機

構を解明することを目的として研究を行い、RIG-I の C 末端領域と結合する新規分子 Riplet を発見した。Riplet は RIG-I の C 末端領域をユビキチン化することを既に見いだしていたが、その生体内に於ける役割は未解明であった。

また、ヒトの樹状細胞を用いたマイクロアレイ解析から我々は機能未知の DDX60 分子に着目した。DDX60 はウイルス感染時に RIG-I と同様に速やかに発現が誘導されるがその機能は全く解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

自然免疫システムはウイルスの排除を行うがウイルスはこの自然免疫を阻害する機能を持つ。例えば C 型肝炎ウイルスの非構造蛋白質である NS3-4A は、RIG-I のアダプター分子である IPS-1 を切断することで自然免疫応答を遮断する。ウイルス感染に対する自然免疫機構については未解明の部分が多い。このような未解明のメカニズムを解明することは、ウイルスが自然免疫を抑制する仕組みの解明につながる。これは、ウイルスが自然免疫を抑制する仕組みを阻害する薬剤を開発すれば、ウイルスに対する新たな治療薬となることを意味する。本研究では、このような長期的な戦略のもと、ウイルス感染に対する自然免疫の未知の分子機構を解明することで、新たな治療薬開発の重要な基礎データを得ることを目的とする。

具体的には、本研究では我々が世界に先駆けて発見した Riplet 分子の遺伝子改変マウスを作製し、その機能解析からウイルス感染に対する生体内の自然免疫の新たなメカニズムの解明を行う。さらに我々がマイクロアレイ解析から発見した機能未知の DDX60 の機能を試験管内の解析により解明し、自然免疫の新たな分子機構の解明を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

Riplet 遺伝子をノックアウトするためのベクターを作製し、マウスの 129 系統の ES 細胞を用いてノックアウトマウスを作製する。作製したマウスより、繊維芽細胞、樹状細胞、マクロファージ等の細胞群を単離し、野生型のマウスの細胞とウイルス感染時の自然免疫応答を比較する。さらに、マウス個体への感染実験を行い生体内での自然免疫応答における Riplet 分子の役割を解明する。

DDX60 の機能解析に於いては HEK293 細胞や HeLa 細胞等のヒト株化細胞を持ちい、過剰発現系や、shRNA を用いたノックダウン実験を行い、DDX60 の機能と役割を評価する。またその機能の解明に於いては、生化学的手法や分子生物学的手法を積極的に用いる。

## 4. 研究成果

作製した Riplet ノックアウトマウスは、樹状細胞や CD4 陽性細胞や CD8 陽性細胞等の細胞の発生には影響はなかった。また Riplet ノックアウトマウスはメンデル遺伝の法則に従って生まれたことから、発生に於ける顕著な欠損は観察されなかった。

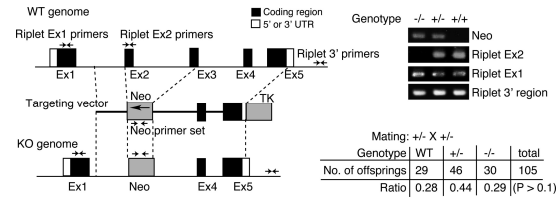


図 Riplet ノックアウトマウスの作製  
Riplet 遺伝子のエクソン 2 と 3 をネオマイシン耐性遺伝子と置換し遺伝子を破壊した (左)  
ノックアウトマウスの確認をマウステールよりゲノムを抽出し PCR 法により確認した (右上)  
Riplet ノックアウトマウスはメンデル遺伝の法則にしたがい生まれた (右下)

一方、Riplet ノックアウトマウスより繊維芽細胞を単離し、ウイルス感染時の I 型インターフェロン産生を野生型の細胞と比較したところ、牛水泡性口内炎ウイルス感染、A 型インフルエンザウイルス感染時の I 型インターフェロンの産生が、Riplet をノックアウトすることでほぼ完全に消失した。

さらに、マウスより骨髄由来樹状細胞とマクロファージを単離し、ウイルス感染時の I 型インターフェロンの産生を調べると、繊維芽細胞と同様に Riplet をノックアウトすると、I 型インターフェロン産生が大きく減少していた。

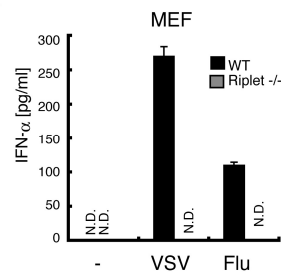


図 繊維芽細胞に於ける I 型インターフェロン産生  
マウスより胎児繊維芽細胞を単離し、水泡性口内炎ウイルス (VSV)、インフルエンザウイルス (Flu) を感染させ、24 時間後の培養上清中の I 型インターフェロン量を ELISA 法により測定した。

また、マウス個体への感染実験を行ったところ、Riplet ノックアウトマウスは、牛水泡性口内炎ウイルス感染時の死亡率が野生型と比較し非常に高く、この時血中のインターフェロン量が減少していた。また、感染一週間後の脳内のウイルス量は Riplet ノックアウトマウスで著しく上昇していた。これらのことは、Riplet が生体内に於いて、ウイルス感染時の自然免疫応答である I 型インターフェロン産生に必須であることを示している。

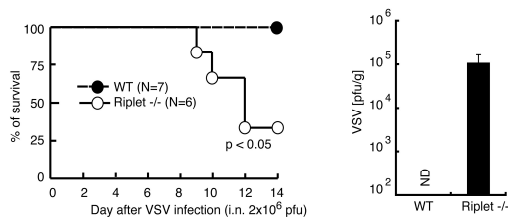


図 マウス個体への感染実験  
野生型とRipletノックアウトマウスに水溶性口内炎ウイルスを経鼻感染させ、生存率を調べた。Ripletノックアウトマウスや野生型のマウスと比較し速やかに死亡した(左)。感染7日後の脳内のウイルス量をブランク法により測定した。Ripletノックアウトマウスではウイルス量が著しく増加していた。

樹状細胞を用いてウイルス感染時に速やかに発現する遺伝子をマイクロアレイ解析により調べたところ、DDX60と名付けられている分子が、ウイルス感染後速やかに発現上昇することを発見した。このDDX60の機能は全く報告されておらず、DDX60が未知のウイルス抑制因子である可能性を考え、我々はDDX60分子の機能解析を行った。

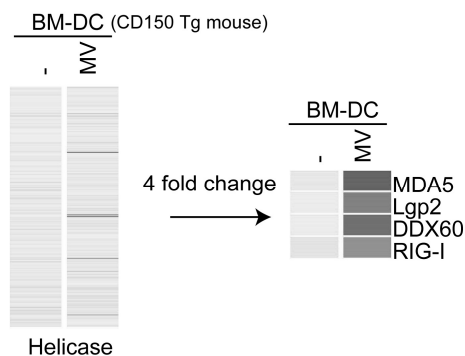


図 樹状細胞を用いたマイクロアレイ解析  
骨髄由来樹状細胞に麻疹ウイルスを感染後感染前後で4倍以上発現が変化するヘリケース分子の探索を行いDDX60分子を発見した。

DDX60はRNAヘリケースドメインを持ち、ウイルスセンサーであるRIG-Iと部分的に相同性を示すことが分子系統樹解析から明らかとなった。また、DDX60はRIG-IやMDA5等の細胞質内ウイルスRNAセンサー分子と結合することを発見した。さらに、DDX60のRNAヘリケースドメインがウイルスRNAと結合すること、RIG-IとウイルスRNAとの結合を促進することを発見した。

そこで、DDX60の発現を、shRNAを用いてノックダウンし機能解析したところ、DDX60をノックダウンすることで、ウイルス感染時のI型インターフェロン産生が大きく減少することを発見した。

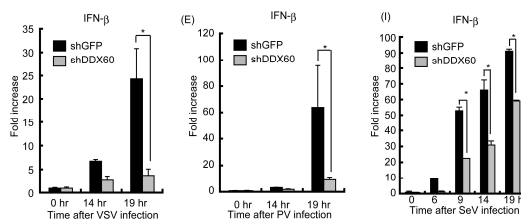


図 DDX60ノックダウンによるI型インターフェロン産生に対する影響  
shRNAを用いてDDX60をノックダウン後、水溶性口内炎ウイルス(VSV)、ポリオウイルス(PV)センダイウイルス(SeV)感染後のI型インターフェロン遺伝子の発現上昇を比較した。DDX60をノックダウンするとコントロールと比較し、I型インターフェロン遺伝子の発現が減少した

## 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4件)

① Oshiumi H, Matsumoto M, and Seya T Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. *J Biochem.* 2012 151(1): 5-11 DOI: 10.1093/jb/mvr111 査読有り

② Abe Y, Fujii K, Nagata N, Takeuchi O, Akira S, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T, Koike S. The toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J Virol.* 2012 Jan;86(1):185-94. DOI: 10.1128/JVI.05245-11 s 査読有り

③ Oshiumi H, Okamoto M, Fujii K, Kawanishi, Matsumoto M, Koike S, and Seya T The TLR3-TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection *J. Immunol* 2011 Nov 15;187(10):5320-7 DOI: 10.1128/MCB.01368-10 査読有り

④ Oshiumi H, Miyashita M, Inoue N, Okabe M, Matsumoto M, and Seya T. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection *Cell Host & Microbe* 8: 496-509. 2010 DOI: org/10.1016/j.chom.2010.11.008 査読有り

[学会発表] (計3件)

① 押海 裕之 ウイルスによる自然免疫活性化とその抑制機構 日本薬学会(招待講演) 2012. 3. 31 北海道大学(札幌市)

② 押海 裕之 Regulatory mechanism of RIG-I by Riplet ubiquitin ligase 日本免疫学会(招待講演) 2011. 11. 27 幕張メッセ(千葉県)

③押海 裕之 The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I dependent type I interferon production in response to RNA virus infection 日本分子生物学会 2011.12.14 バシフィコ横浜 (神奈川)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~e20536/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

押海 裕之 (OSHIUMI HIROYUKI)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：50379103

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：