

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590560

研究課題名(和文) RLRs を介した自然免疫機構における細胞内小器官ネットワークの解明

研究課題名(英文) Elucidation of interorganelle network in RLRs-mediated innate immunity

研究代表者

松宮 朋穂 (Matsumiya, Tomoh)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30344592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：最近、RLRs (RIG-I-like receptors) を介した抗ウイルス経路における、ミトコンドリアの重要性が明らかになった。ミトコンドリアを含む細胞小器官は、ネットワークを形成することが知られている。本課題では、RLRs 依存的な抗ウイルスシグナルにおける細胞小器官ネットワーク形成の解明を目指して研究を行った。本研究の結果から、一部の細胞小器官は抗ウイルスシグナルの活性化に伴いミトコンドリアと近接したが、golgi など、ミトコンドリアとの空間的位置関係が変化しない小器官も存在したことから、ネットワーク形成はシグナル分子の伝達によって行われていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Crucial role of mitochondria has been proven in RLRs (RIG-I-like receptors)-mediated antiviral signaling pathway. Organelles including mitochondria are known to form interorganelle network. We investigated the formation of the interorganelle network in the RLRs-mediated antiviral signaling. We found that some organelles were close upon activation of the antiviral signaling; however no contact between golgi or endosomes and mitochondria was observed in response to dsRNA introduction. These results suggested that transduction of signaling molecules may be essential in the interorganelle network.

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 ウイルス学 細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) RNA ウイルスの細胞内ウイルスセンサーである RLRs (RIG-I-like receptors) は細胞内へ侵入したウイルスの核酸を認識後に下流のアダプター分子である IPS-1 (interferon-beta promoter stimulator 1) ヘシグナルを伝達する。IPS-1 はミトコンドリア外膜に局在しており、ミトコンドリア局在ドメインを欠失した IPS-1 は RLRs からのシグナルを下流へ伝達できないことから、ミトコンドリア外膜は抗ウイルスシグナルに重要な場であると考えられていた。

(2) 申請者らは RIG-I (retinoic acid-inducible gene-1) を制御する因子の解明、および RIG-I の細胞内機能の解明を目指していた。特に、研究分担者(今泉)らが RIG-I の細胞内ウイルスセンサーとしての機能を解明以降、そのセンサーの破綻がもたらす病態を念頭においた研究を行い、これまでに、関節リウマチや糸球体腎炎における RIG-I の発現亢進を見出してきた。一方で、RIG-I の細胞内機能の解明に関しては、唯一のアダプター分子とされている IPS-1 についても検討することが不可欠であると考えた。

(3) 研究開始当初、RLRs を介した抗ウイルス作用におけるミトコンドリアの重要性は認識されていた一方で、他の細胞小器官との関連については不明であった。

2. 研究の目的

(1) 申請者らは、研究開始当初の研究背景から、抗ウイルスシグナル応答がミトコンドリアではなく、他の細胞小器官上でも実行されていることを予測した。また、抗ウイルスシグナルを介して細胞小器官がネットワークを形成している可能性を考えた。

(2) 本課題では、RLRs/IPS-1 抗ウイルスシグナルと、研究開始時点で報告されている以外の細胞内小器官との関連の解明を研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) はじめに免疫学的にノンプロフェッショナルな細胞において抗ウイルスシグナルの中心的な役割を果たす RIG-I/IPS-1 の細胞内動態を継続的に観察することを目的に、蛍光タンパク質融合 RIG-I/IPS-1 発現ベクターを作製した。

(2) 蛍光タンパク質融合 RIG-I/IPS-1 の細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡下に継続的に観察した。

(3) 抗ウイルスシグナル活性化に伴う RIG-I/IPS-1 と細胞小器官との空間的な変化

を観察した。

(4) ミトコンドリアの機能異常に伴う抗ウイルスシグナルの変化を生化学的、分子生物学的に観察した。

(5) 293 細胞に対して、IPS-1 特異的な microRNA を恒常的に発現することによる IPS-1 安定的発現抑制株を作製した。

4. 研究成果

(1) HeLa 細胞から抽出した mRNA を鋳型として作製した cDNA を用いて RIG-I および IPS-1 の翻訳部位全長をクローニングした。

(2) RIG-I/IPS-1 cDNA を蛍光タンパク質発現ベクターへ挿入し、融合タンパク質発現ベクターを作製した。

(3) 蛍光タンパク質融合 RIG-I/IPS-1 を強制発現した細胞では、2本鎖 RNA の細胞内導入による抗ウイルスシグナルが増強することや、局在が内因性の RIG-I/IPS-1 と同一であることから、融合タンパク質は内因性の RIG-I/IPS-1 と同様の機能を有すると考えられた。

(4) 融合タンパク質を用いた検討では、RIG-I と IPS-1 は 2本鎖 RNA の細胞内導入後に近接したが、局在が完全に一致しないことから、RIG-I と IPS-1 は一定の分子間距離を保っていることが予測された。

(5) IPS-1 は通常ミトコンドリア上に均一に存在しているが、2本鎖 RNA の細胞内導入後にミトコンドリア上で凝集する傾向があったことから、抗ウイルスシグナルを認識後に何らかの構造的な変化をしていることが考えられた。

(6) RIG-I/IPS-1 は細胞小器官である golgi やエンドソームと空間的位置関係が変化しなかったことから、少なくともこれらの細胞小器官と RIG-I/IPS-1 とは直接的な作用がないと考えられた。さらにこの結果から、小器官のネットワークは小器官の近接によることよりも、シグナル分子の伝達によって行われている可能性が示唆された。

(7) ミトコンドリアの呼吸鎖阻害は抗ウイルスシグナルに影響を与えることが明らかになった。現在その詳細について解析中である。

(8) IPS-1 の安定抑制株を用いて抗ウイルスシグナルを観察した結果、一過性の IPS-1 抑制により観察された抗ウイルスシグナルの減弱が同程度見られたことから、IPS-1 の抗ウイルスシグナルにおける重要性を再確

認できた。

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10件)

以下の論文は全て査読有

1. Ito R, Matsumiya T, Kon T, Narita N, Kubota K, Sakaki H, Ozaki T, Imaizumi T, Kobayashi W, Kimura H. Periosteum-derived cells respond to mechanical stretch and activate Wnt and BMP signaling pathways. **Biomed Res.** 2014; 35(1):69-79.
2. Kon T, Matsumiya T, Hayakari R, Narita N, Ito R, Kubota K, Sakaki H, Yoshida H, Imaizumi T, Kobayashi W, Kimura H. Role of type I- and type II-interferon in expression of melanoma differentiation-associated gene-5 in HSC-3 oral squamous carcinoma cells. **Biomed Res.** 2014;35(1):9-16.
3. Yoshida H, Meng P, Matsumiya T, Tanji K, Hayakari R, Xing F, Wang L, Tsuruga K, Tanaka H, Mimura J, Kosaka K, Itoh K, Takahashi I, Imaizumi T. Carnosic acid suppresses the production of amyloid- β 1-42 and 1-43 by inducing an α -secretase TACE/ADAM17 in U373MG human astrocytoma cells. **Neurosci Res.** 2014; 79:83-93. doi: 10.1016/j.neures.2013.11.004.
4. Matsumiya T, Xing F, Ebina M, Hayakari R, Imaizumi T, Yoshida H, Kikuchi H, Topham MK, Satoh K, Stafforini DM. Novel Role for Molecular Transporter Importin 9 in Posttranscriptional Regulation of IFN- ϵ Expression. **J Immunol.** 2013;191(4): 1907-15. doi: 10.4049/jimmunol.1201925.
5. Matsumiya T, Imaizumi T. How are STAT1 and cholesterol metabolism associated in antiviral responses? **JAK-STAT** 2013; 2(3): e24189. doi: 10.4161/jkst.24189.
6. Xing F, Matsumiya T, Onomoto K, Hayakari R, Imaizumi T, Yoshida H, Yoneyama M, Fujita T, Satoh K. Foreign RNA Induces the Degradation of Mitochondrial Antiviral Signaling Protein (MAVS): The Role of Intracellular Antiviral Factors. **PLoS One.** 2012; 7(9):e45136. doi: 10.1371/journal.pone.0045136.
7. Dempoya J, Matsumiya T, Imaizumi T, Hayakari R, Xing F, Yoshida H, Okumura K, Satoh K. Double-stranded RNA induces biphasic STAT1 phosphorylation by both type I IFN-dependent and type I IFN-independent pathways. **J Virol.** 2012; 86(23):12760-9. doi: 10.1128/JVI.01881-12.
8. Imaizumi T, Sato F, Tanaka H, Matsumiya T, Yoshida H, Yashiro-Aizawa T, Tsuruga K, Hayakari R, Kijima H, Satoh K. Basic-helix-loop-helix transcription factor DEC2 constitutes negative feedback loop in IFN- β -mediated inflammatory responses in human mesangial cells. **Immunol Lett.** 2011; 136(1):37-43. doi: 10.1016/j.imlet.2010.11.
9. Imaizumi T, Tanaka H, Mehti N, Matsumiya T, Yoshida H, Sato F, Aizawa-Yashiro T, Tsuruga K, Hayakari R, Satoh K. Polyinosinic-polycytidylic acid induces the expression of interferon-stimulated gene 20 in mesangial cells. **Nephron Exp Nephrol.** 2011; 119(2):e40-8. doi: 10.1159/000328923.
10. Yoshida H, Mimura J, Imaizumi T, Matsumiya T, Ishikawa A, Metoki N, Tanji K, Ota K, Hayakari R, Kosaka K, Itoh K, Satoh K. Edaravone and carnosic acid synergistically enhance the expression of nerve growth factor in human astrocytes under hypoxia/reoxygenation. **Neurosci Res.** 2011; 69(4):291-8. doi: 10.1016/j.neures.2010.12.016.

[学会発表](計3件)

1. Matsumiya T, Dempoya J, Xing F, Hayakari R, Yoshida H, Imaizumi T. Multi-step regulation of STAT1 phosphorylation in response to double-stranded RNA. 15th International Congress of Immunology. Aug 22-27, 2013, Milan, Italy.
2. Matsumiya T, Dempoya J, Xing F, Hayakari R, Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K. Biphasic STAT1 phosphorylation in response to double-stranded RNA. Immunology 2013, American Association of Immunologists Annual Meeting. May 3-7, 2013, Hawaii, USA
3. Matsumiya T, Hayakari R, Imaizumi T, Yoshida H. Involvement of neuronal differentiation in intracellular antiviral responses. 第35回日本神経科学大会(名古屋市) 2012年9月18日~9月21日

6. 研究組織

(1)研究代表者

松宮 朋穂 (MATSUMIYA TOMOH)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 30344592

(2)研究分担者

今泉 忠淳 (IMAIZUMI TADAATSU)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90232602

佐藤 敬 (SATOH KEI)

弘前大学・事務局・学長

研究者番号：20125438