

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659231
 研究課題名（和文）
 ウイルス増殖阻害活性を有する新たな宿主因子群の解析
 研究課題名（英文）
 Analysis of novel host antiviral factors
 研究代表者
 齊藤 達哉 (SAITOH TATSUYA)
 大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授
 研究者番号：60456936

研究成果の概要（和文）：ヒト免疫不全ウイルス-1（HIV-1）とマウス白血病ウイルス（MLV）は、それぞれヒトにおける後天性免疫不全症候群とマウスにおける癌の発症要因となる病原体である。自然免疫機構は、HIV-1 や MLV の感染から宿主の身を守る役割を果たす。本研究では、これらのレトロウイルスに対して誘導される自然免疫応答の分子機序を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：HIV-1 and MLV are causative agents of AIDS and murine cancer, respectively. Innate immune system protects hosts from infection of HIV-1 and MLV. In the present study, we have demonstrated molecular mechanisms underlying innate immune responses to these retroviruses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：感染防御、自然免疫、レトロウイルス

1. 研究開始当初の背景

宿主の細胞は RNA ウイルスの特徴的な RNA 構造をパターン認識受容体により感知し、自然免疫を誘導する。しかしながら、レトロウイルスの RNA を認識して活性化する自然免疫応答には、不明な点が多く残されていた。

(1) マウス白血病ウイルス（MLV）は、宿主であるマウスに感染した際に、腫瘍形成を引き起こすレトロウイルスである。一本鎖 RNA を感知するパターン認識受容体である Toll-like receptor 7 (TLR7) が、細胞外部（例えばエンドソーム内）の MLV ゲノム RNA を認識して自然免疫応答を誘導することが、近年の解析から明らかになっている。一方で、細胞質内に進入した MLV ゲノム RNA を感知するパターン認識受容体に関してはよく分かっておらず、その同定が求められていた。

(2) 後天性免疫不全症候群の発症要因となるヒト免疫不全ウイルス Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 に対する感染防御機構は、感染症分野における極めて重要な研究課題となっている。好中球は、ミエロパーオキシダーゼやアルファデフェンシンなどの強力な抗 HIV-1 因子を産生することが知られている。一方で、好中球がこれらの因子により細胞外の HIV-1 を失活させる機序についてはよく分かっておらず、その解明が求められていた。

2. 研究の目的

前述の背景を踏まえて、次の二つの研究課題の達成を目指した。

(1) ZAP による MLV 排除の分子機序解明

Zinc finger Antiviral Protein (ZAP: 正式名は ZC3HAV1) は、MLV の RNA を認識し、過剰発現により MLV の RNA の分解を促す因子として同定されている。しかしながら、内在性の ZAP が MLV の複製を抑制することが出来るかについては定かではなかった。また、ZAP による MLV の RNA の分解が細胞質内のどのような場所で起こっているのかについては、まったく不明であった。本研究では ZAP に着目することで、細胞質内に進入した MLV に対する自然免疫応答の空間制御のメカニズムを明らかにした。

(2) NET による HIV-1 排除の分子機序解明

Neutrophil Extracellular Traps (NET) は、活性化した好中球から放出されるクロマチン（主成分はゲノム DNA とヒストン）により形成される高粘着性の網目状構造体である。NET は、細菌や真菌を捕捉してこれらの病原体に対する感染防御に関わることが知られているが、ウイルス感染に関わるかどうかは不明であった。また、好中球は HIV-1 の認識に関わる Toll-like receptor 7 (TLR7) や TLR8 を発現しているが、その役割についても不明であった。本研究では、NET に着目した解析から、自然免疫機構が細胞外に存在する HIV-1 を排除するメカニズムを明らかにした。

3. 研究の方法

(1) ZAP による MLV 排除の分子機序解明

①細胞質内においてウイルス二重鎖 RNA を認識して I 型インターフェロンを介した感染防御を誘導する RIG-I-like receptor (RLR) が、MLV の排除に関わるかどうかを検討した。実験には、RIG-I/MDA5 を共に欠損したマウス繊維芽細胞を用いた。また、MLV により I 型インターフェロンの産生が誘導されるかどうかについて、検討した。MLV 感染により I 型インターフェロンが誘導される際には、ZAP の産生が誘導されるかどうか、そしてインターフェロン応答に RLR が関わっているかどうかについて検討した。

②MLV に対して、内在性の ZAP が抗ウイルス因子として働くかどうかを検討した。実験には、ZAP を欠損したマウス繊維芽細胞を用いた。ZAP が MLV の複製に関わっていたので、CCCH 型 Zinc-finger ドメインと WWE ドメインの中から、MLV の排除に関わるドメインを決定する。

③ZAP が MLV の RNA の排除を行うコンパートメントを同定した。ZAP は RNA 結合蛋白質であるので、P-body やストレス顆粒といった RNA 顆粒に局在する可能性が示唆された。ZAP がどのような細胞質内局在をとるのか、特に RNA 顆粒に存在する可能性について、免疫蛍

光染色法を用いた解析を行った。さらに、ZAP の細胞質内局在に大きく関わるドメインを、CCCH 型 Zinc-finger ドメインと WWE ドメインの中から決定した。

④ZAP はヒト細胞株において、RIG-I 依存的なインターフェロン応答を促進することが報告されている。そこで、RIG-I のシグナル伝達を制御することにより、ZAP がインフルエンザウイルスをはじめとした RNA ウイルスに対する感染防御に与える影響を解析した。実験には、ZAP を欠損したマウス繊維芽細胞と樹状細胞を用いた。

(2) NET による HIV-1 排除の分子機序解明

①NET が HIV-1 を補足するかどうかを検討した。PMA で刺激した好中球から産生された NET と HIV-1 を共に培養し、NET 上に HIV-1 が補足されているかどうかについて、免疫蛍光染色法により検討した。HIV-1 が補足されていたため、NET がエンベロープ糖蛋白質を認識しているのか、ウイルス粒子そのものを捕捉しているのかについての検討をさらに行った。続いて、NET による補足が HIV-1 を失活させるか否かについて検討した。

②好中球が野生型の HIV-1 を認識し NET の産生を誘導するかどうかについて、免疫蛍光染色法を用いた解析を行った。好中球は HIV-1 に反応したので、既に樹状細胞において HIV-1 を認識することが知られている TLR7 および TLR8 が好中球を介した NET 産生に関わるかどうかを検討した。好中球に対するウイルスベクターを用いた遺伝子導入やトランスフェクション法による遺伝子導入は困難であると予想されたため、阻害剤を中心にした解析を行った。

③TLR7/8 の刺激により NET の産生が誘導される機序を解明した。NADPH オキシダーゼを介した活性酸素種の産生は NET の放出に関わることが知られている。そこで、HIV-1 により誘導される NET の放出に対して NADPH オキシダーゼ阻害剤や抗酸化剤が与える影響を検討した。NADPH オキシダーゼの関与が認められた際には、NADPH オキシダーゼ複合体の活性とよく相関する NCF1 のリン酸化状態について、ウェスタンブロット法を用いて解析した。さらに、NET の放出には好中球エラスターゼが重要な役割を果たすことが知られているため、免疫蛍光染色法を用いて、TLR7/8 刺激前後の好中球エラスターゼの細胞質内局在を解析した。

4. 研究成果

(1) ZAP による MLV 排除の分子機序解明

二重鎖 RNA を感知するパターン認識受容体である RLR は、細胞質内に進入した様々な RNA

ウイルスを認識して I 型インターフェロンを介した抗ウイルス応答を促進することが知られている。しかしながら、細胞質内に進入した MLV に対する感染防御には関わっていなかった。そこで、他の RNA センサーについての解析を進めた結果、Zinc finger Antiviral Protein (ZAP) が細胞質内に進入した MLV の RNA を感知し、RNA 分解機構であるエキソソームを介してその分解を誘導することを見出した。ZAP を欠損したマウス繊維芽細胞においては MLV の増殖が亢進し、一方で ZAP を過剰発現した細胞においては MLV の増殖が抑制された。ZAP は、自身の CCCH 型 Zinc finger ドメインを介して、P-body やストレス顆粒のマーカータンパク質が集まる細胞質内 RNA 顆粒に局在した。ZAP は、MLV の RNA やエキソソーム構成因子をこの RNA 顆粒へ引き寄せることで、MLV の RNA の分解を誘導すると考えられた。また、マウスの胎生繊維芽細胞や樹状細胞において、ZAP は RIG-I を介したインターフェロン応答には関わっていなかった。以上から、ZAP は細胞質内に進入した RNA ウイルスを感知する新たなパターン認識受容体であり、TLR や RLR の認識から逃れたウイルスの排除を行う役割を担うことが明らかとなった (図 1. Lee H et al, *Proc Natl Acad Sci U S A*, in press)。

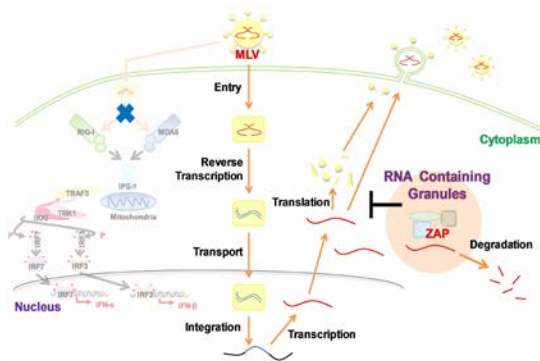


図 1. ZAP による MLV 排除

(2) NET による HIV-1 排除の分子機序解明

100 nm の空間分解能を有する超解像度顕微鏡 SR-SIM を用いて、NET 上に存在する一つの HIV-1 粒子を可視化することに成功し、NET がウイルス粒子などの非常に小さな病原体をも捕捉することを明らかにした。野生型の HIV-1 粒子と同様に、Gag 蛋白質のみから形成される HIV-1 様粒子が NET に捕捉されていたことから、NET はエンベロープ糖蛋白質ではなくウイルス粒子そのものを捕捉すると考えられる。ゲノム DNA と共に NET を形成しているヒストンは、プラスの電荷をもつ構造体であるため、表面にマイナスの電荷をもつ

ウイルス粒子を引き付けると予想された。パターン認識受容体である TLR7 と TLR8 は、HIV-1 のゲノム RNA を認識し、NADPH オキシダーゼを介した活性酸素種の産生を誘導した。活性酸素種は、分泌小胞・リソソームの膜に脂質過酸化による障害を与え、様々な基質を分解する強力なプロテアーゼである好中球エラスターゼの細胞質内流入を惹起した。好中球エラスターゼは、核膜や細胞膜、さらにはヒストンの障害を引き起こして、NET の形成を誘導した。NET に捕捉された HIV-1 の感染力は、NET 上に存在しているミクロパーオキシダーゼやアルファデフェンシンの抗ウイルス作用により、大幅に低下した。これらの解析結果から、よく知られている B 細胞による抗体産生 (獲得免疫応答) に加えて、好中球による NET 産生 (自然免疫応答) が、細胞外 HIV-1 の排除に関わることが明らかとなった (図 2. Saitoh T et al, *Cell Host Microbe*, 2012)。

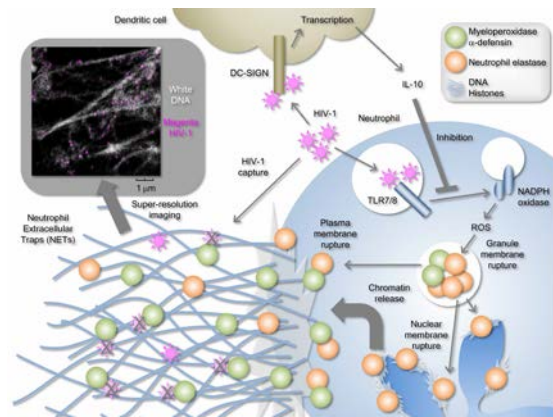


図 2. NET による HIV-1 排除

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 2 件)

(1) Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Uehata T, Iwasaki H, Omori H, Yamaoka S, Yamamoto N, Akira S. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe*. 査読有、2012, 12, 109-116.

(2) Lee H, Komano J, Saitoh Y, Yamaoka S, Kozaki T, Misawa T, Takahama M, Satoh T, Takeuchi O, Yamamoto N, Matsuura Y, Saitoh T*, Akira S*.

(*Co-corresponding authors).
Zinc-finger antiviral protein mediates
RIG-I-like-receptor-independent
antiviral response to murine leukemia
virus.
Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有、in press.

〔学会発表〕（計1件）

Tatsuya Saitoh, Takuma Misawa, Tatsuya
Kozaki, Takuya Uehata, Shizuo Akira
Neutrophil extracellular traps mediate a
host defense response to human
immunodeficiency virus-1.
第41回日本免疫学会総会、ワークショップ口
頭発表、神戸、2012年12月6日.

〔その他〕

ホームページ等
<http://hostdefense.ifrec.osaka-u.ac.jp/ja/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 達哉 (SAITOH TATSUYA)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授
研究者番号：60456936

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし