

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659214

研究課題名(和文) 分子進化から予測される新規インターフェロン誘導経路

研究課題名(英文) An alternative interferon inducing pathway predicted through phylogenetic analyses

研究代表者

瀬谷 司 (SEYA, Tsukasa)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10301805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外にIgドメイン、細胞内にToll-IL-1 homology domain (TIR)を持つ1型膜蛋白質Ig-TIRをサカナ(zebrafish database)で2種同定し、cDNA cloningした。Overexpression とsiRNAでその自然免疫パターン認識分子としての機能を調べたが、予想に反してNF- $\kappa$ B活性化、IFN誘導、サイトカイン誘導のどれも検知できなかった。本分子群はTLRのようなパターン認識機能ではない別な機能を担う分子と想定された。

研究成果の概要(英文)：Two membrane proteins having N-terminal extracellular domain Ig (immunoglobulin domain) and C-terminal Toll-IL-1 homology domain (TIR) were identified from the zebrafish database. We called these proteins Ig-TIR. We have cloned the cDNAs of these proteins and their functional properties were determined with overexpression and siRNA analysis using rainbow trout cell lines. We could not detect any activity affecting NF- $\kappa$ B activation, IFN induction or cytokine assays. We suppose that the Ig-TIR proteins have functions other than the known TLR proteins that sense microbial pattern molecules.

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 パターン認識レセプター インターフェロン

## 1. 研究開始当初の背景

Toll-like receptor (TLR) は細胞外に leucine-rich repeats (LRR), 細胞内に Toll-IL-1 homology domain (TIR)を持つ1型膜蛋白質である。Database 検索の結果、ウニの TIR 蛋白質の中に LRR でなく immunoglobulin (Ig) ドメインをもつ Ig-TIR 分子が存在することが判明した。この分子の ortholog がサカナでも2種見つかった。サカナにはインターフェロン (IFN) 誘導系がある。これらが IFN 誘導機能を持つかどうかを解明する。

## 2. 研究の目的

外来 RNA (ウイルス) の識別と排除応答は生物が保持する自己保存システムであり、脊椎動物では type I IFN が強力にこの防御機能を発揮する。生物に普遍的な RNA 認識機構として、Dicer-siRNA 系、自然免疫のパターン認識系がある。自然免疫のパターン認識系は脊椎動物では type I interferon (IFN) の産生に連結し、強力な免疫応答を誘起する。本研究ではヒトで失われたウイルス検知系の存在を発掘することを目指す。例として Ig-TIR 分子の機能を探索する。

## 3. 研究の方法

Ig-TIR 分子2種をゼブラフィッシュのライブラリーから cDNA cloning する。これらをサカナ細胞に発現させてサカナ IFN が発現するかを見る。サカナ IFN 誘導経路は TICAM-1 を活性化することが知られている。再構成実験をカエル、サカナの TLR (TLR22 など)を用いて行い、Ig-TIR の機能と比較する。必要があればウイルス感染系を用いて Ig-TIR の生理的機能にもアプローチする。

サカナ細胞は TLR22 の発現実験に用いたニジマスの細胞培養系を用いた (Matsuo et al., *J Immunol* 2008 )。

## 4. 研究成果

Ig-TIR のドメイン構成からヒト SIGIRR や遊離型の Ig ファミリー分子と相同な部分があると判明した。これらの RNAi 実験から RNA/DNA 認識にこれらの分子が関与しないことが判明した。従って、哺乳類に Ig-TIR の相同分子は無いことになる。

Ig-TIR をニジマス細胞に強制発現させたが、TLR22 や TLR3 に見るような RNA (polyI:C) 応答は見られなかった。また、RNAi による loss-of-function の実験でも polyI:C による IFN 誘導が阻害されなかった。従って、Ig-TIR は TIR ドメインを持つにも拘わらず TICAM-1 を活性化しない分子であることが明らかになった。

自然免疫パターン認識分子としての機能を解析するため、ヒトで知られる TLR のリガンドを Ig-TIR 発現細胞に振りかけて NF-kB 応答をレポーターで見たが、どのリガンドにも殆ど応答しなかった。

さらに発現効率の良い HEK293 細胞にこれらの Ig-TIR 分子を発現させて種々の刺激を加えたが、サイトカイン誘導を含めて大きな変化は起きなかった。このことは種間の差のある細胞でのデータなので結論的ではないが、Ig-TIR は TLR のようなパターン分子の認識に関与する分子とは異なった機能分子である可能性を示唆する。

可能性の幅が広がり、本来の目的を逸脱するため、本分子の機能同定を断念した。

## 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 19 件)(全て査読有)

1. Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, Seya T. IPS-1 Is Essential for Type III IFN Production by Hepatocytes and Dendritic Cells in Response to Hepatitis C Virus Infection. *J Immunol*. 2014 Feb 14. [Epub ahead of print]
2. Tatematsu M, Seya T, Matsumoto M. Beyond dsRNA: Toll-like receptor 3 signalling in RNA-induced immune responses. *Biochem J*. 2014 Mar 1;458(2):195-201.
3. Takaki H, Honda K, Atarashi K, Kobayashi F, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Shingai M, Seya T. MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon  $\beta$ -induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Mol Immunol*. 2014 Feb;57(2):100-10.
4. Shime H, Kojima A, Maruyama A, Saito Y, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya

- T. Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic:polycytidylic acid treatment in mouse tumor models. **J Innate Immun.** 2014; 6: 293-305.
5. Tatematsu M, Seya T, Matsumoto M. Beyond dsRNA: Toll-like receptor 3 signalling in RNA-induced immune responses. **Biochem J.** 2014; 458(2): 195-201.
  6. Suzuki T, Oshiumi H, Miyashita M, Aly HH, Matsumoto M, Seya T. Cell type-specific subcellular localization of phospho-TBK1 in response to cytoplasmic viral DNA. **PLoS One.** 2013 Dec 9;8(12):e83639.
  7. Enokizono Y, Kumeta H, Funami K, Horiuchi M, Sarmiento J, Yamashita K, Standley DM, Matsumoto M, Seya T, Inagaki F. Structures and interface mapping of the TIR domain-containing adaptor molecules involved in interferon signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2013 Dec 3;110(49):19908-13.
  8. Takaki H, Takeda M, Tahara M, Shingai M, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. The MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4+ dendritic cells primarily triggers type I IFN production against measles virus in a mouse infection model. **J Immunol.** 2013 Nov 1;191(9):4740-7.
  9. Oshiumi H, Miyashita M, Matsumoto M, Seya T. A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. **PLoS Pathog.** 2013;9(8):e1003533.
  10. Tanaka Y, Suenaga T, Matsumoto M, Seya T, Arase H. Herpesvirus 6 glycoproteins B (gB), gH, gL, and gQ are necessary and sufficient for cell-to-cell fusion. **J Virol.** 2013 Oct;87(19):10900-3.
  11. Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross talk between hepatocytes and stellate cells. **J Virol.** 2013; 87: 8169-78.
  12. Tatematsu M, Nishikawa F, Seya T, Matsumoto M. Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA. **Nat Commun.** 2013;4:1833.
  13. Seya T, Azuma M, Matsumoto M. Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer. **Expert Opin Ther Targets.** 2013 May;17(5):533-44.
  14. Oshiumi H, Funami K, Aly HH, Matsumoto M, Seya T. Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz).** 2013 Apr;61(2):127-38.
  15. Matsumoto M, Funami K, Tatematsu M, Azuma M, Seya T. Assessment of the Toll-like receptor 3 pathway in endosomal signaling. **Methods Enzymol.** 2014;535:149-65.
  16. Toscano F, Estornes Y, Virard F, Garcia-Cattaneo A, Pierrot A, Vanbervliet B, Bonnin M, Ciancanelli MJ, Zhang SY, Funami K, Seya T, Matsumoto M, Pin JJ, Casanova JL, Renno T, Lebecque S. Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor. **J Immunol.** 2013 Jan 15;190(2):764-73.
  17. Shime H, M. Matsumoto, H. Oshiumi, S. Tanaka, A. Nakane, Y. Iwakura, H. Tahara, N. Inoue, and T. Seya. TLR3/TICAM-1 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2012. 109: 2066-2071.
  18. Abe, Y., K. Fujii, N. Nagata, O. Takeuchi, S. Akira, H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya, and S. Koike. Toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. **J Virol.** 2012. 86: 185-194.
  19. Yamazaki, S., A. Maruyama, K. Okada, M. Matsumoto, A. Morita, and T. Seya. Dendritic cells from oral cavity induce Foxp3+ regulatory T cells upon antigen stimulation. **PLoS ONE** 2012. 7:e51665.

〔学会発表〕(計 0 件)  
省略

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

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

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

瀬谷 司 (SEYA TSUKASA)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 10301805

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし