

平成21年5月8日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18073010

研究課題名（和文） ウイルス感染における細胞内二本鎖 RNA 認識受容体の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of the intracellular receptors for viral double-stranded RNA

研究代表者

藤田 尚志 (FUJITA TAKASHI)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：10156870

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：ウイルス、自然免疫、インターフェロン、遺伝子改変マウス、ヘリカーゼ

1. 研究計画の概要

自然免疫系はウイルス感染を初期に感知して抗ウイルス反応を誘導することにより生体防御に重要である。特に細胞内で増殖するウイルスを感知する二本鎖 RNA 受容体である RLR はその根幹をなすものである。本研究課題ではその認識・活性化機構野解明を目的とした。

- (1) RLR のノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析した
- (2) RLR のシグナルのスイッチとしての機能ドメインを解析した。
- (3) 増殖しているウイルスを感知している機構を解析した。
- (4) ヒト RLR の遺伝的多型を解析し、アミノ酸置換によってその活性に影響があるものを探索した。

2. 研究の進捗状況

- (1) RIG-I および MDA5 のノックアウトマウス、それに由来する細胞を用いた解析を行なった。その結果、RIG-I はインフルエンザ A ウイルスや日本脳炎ウイルスなどの多くの種類のウイルスの感染を特異的の感知に関与するが、MDA5 はピコルナウイルスの感知に特異的に関与することを解明した。その原因はそれぞれのウイルスの作り出す RNA の構造に起因していることを明らかとした。特に二重鎖 RNA の長さが重要であり、RIG-I と MDA5 は短い RNA 分子 (20-1000

bp)、長い RNA 分子 (>1000 bp) を認識していることが判明した。

- (2) RIG-I は強発現しても活性化状態にはならず、リガンドである RNA の有無に強く依存している。通常状態で RIG-I を抑制状態に保つ機能は RIG-I のカルボキシル末端側のドメインが担っていることを明らかにした。またこの機能は LGP2 の同様なドメインにも見出されるが、MDA5 には見出されなかった。

- (3) RIG-I は非自己 RNA を特異的に識別する重要な機能を果たしているが、この識別がカルボキシル末端に存在する約 17kD のドメインによって行なわれていることを明らかにした。さらにこのドメインの結晶構造および溶液構造を NMR 法によって明らかにした。また NMR を用いた RNA による滴定実験によって、このドメインの塩基性に富む片側表面が RNA の特異認識に関与していることを発見した。また、MDA5 および LGP2 のカルボキシルドメインの溶液構造を決定した。RIG-I と LGP2 の立体構造は特に良く類似しており、RNA 認識に関与していると考えられる「RNA 結合ループ」の構造が特にこの両者で保存されていた。
- (4) ヒトでの RIG-I および MDA5 の遺伝的多型がデータベースに登録されている。そのうちミスセンス変異、ナンセンス変異によって蛋白質の構造に変化を生じるものについてその機能を解析した。RIG-I については一つの

変異 (S183I) が活性を失い、ドミナントネガティブに阻害効果を示した。この変異を持つ個体は抗ウイルス自然免疫応答が顕著に低いことが予想された。MDA5 に関しては二つの変異 (E627*, I923V) が活性を失う変異であることが明らかとなった。これらの変異は I 型糖尿病の低リスクとの関連が報告されており、MDA5 の活性化と I 型糖尿病の発症の関連が強く示唆された。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由)

RLR に関して研究開始当初はほとんど未解明であったが、これまでの3年間の研究によって、RLR の機能分担が遺伝的解析に明確にすることができ、その制御機構を構造生物学の手法によって解明することができた。また予想外に、RLR の多型の解析はこの分子の変異は感染症にとどまらない、遺伝的疾患に強く関わっていることが示唆された。以上は当初予測された成果をこえるものと考えられる。

4. 今後の研究の推進方策

現在の解析をさらに推進するとともに、細胞内のウイルス認識部位、オルガネラレベルでの解析を新たに行なう。これらの結果を総合してウイルス感染症の治療法への新たな道を探索する。

5. 代表的な研究成果

(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 25 件)

- ① Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., Akira, S.: Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med.* 7, 1523-1527 (2008). 査読有
- ② Takahashi K, Yoneyama M., Nishihori T., Hirai R., Kumeta H., Narita, R., Gale Jr. M., Inagaki F. and Fujita—T.: Non-self RNA-Sensing Mechanism of RIG-I Helicase

and Activation of Antiviral Immune Responses. *Molecular Cell.* 29, 428-440 (2008). 査読有

③ Cui, S., Eisenächer, K., Kirchhofer, A., Brzozka, K., Lammens, A., Lammens, K., Fujita, T., Conzelmann, K-K., Krug, A. and Hopfner, K-P.: The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Molecular Cell.* 29, 169-179 (2008). 査読有

④ Saito, T., Hirai, R., Loo., Yueh-Ming., D, Owen., C, L. Johnson., S., C. Shinha., Akira, S., Fujita T. and Gale Jr., M.: Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 104, 582-587 (2007). 査読有

⑤ Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C-S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T. and Akira, S.: Differential role of MDA5 and RIG-I in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441, 101-105 (2006). 査読有

[学会発表] (計 39 件)

- ① Fujita, T.: Non-self RNA Sensing Mechanism of RIG-I-Like Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. *Keystone Symposia, Innate Immunity: Signaling Mechanisms.* Feb. 24-29 2008 Keystone, Colorado
- ② Fujita, T.: Triggering Antiviral responses and Cell Regulation by the Cytoplasmic RNA Helicase RIG-I. *Keystone Symposia: Intracellular and Intercellular Signaling in Dendritic Cell Function* 2007. 2. 26 Keystone, CO USA