

平成23年6月3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） Function of cytoplasmic double-stranded RNA sensor in viral infection

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

研究成果の概要（和文）：細胞内二本鎖 RNA 認識受容体である（RIG-I-Like receptors, RLR と総称される）の機能を分子から個体のレベルで解析を行ない、RLR の認識するウイルス、それらに由来する RNA の構造、受容体の構造を明らかにした。またシグナル伝達の分子機構の解明を行なった。これらの成果はウイルス感染症の診断、治療への基礎を築くものである。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the function of RIG-I-Like receptor (collectively termed as RLR). RLR functions as cytoplasmic receptors for RNA derived from viral replication. Our results elucidate virus specificity of each RLR, the RNA structures recognized by RLR and molecular mechanism of viral RNA recognition. These result will be critical bases for developing diagnosis and treatment of viral infections.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	20,400,000	0	20,400,000
2007年度	20,400,000	0	20,400,000
2008年度	34,000,000	0	34,000,000
2009年度	28,700,000	0	28,700,000
2010年度	18,700,000	0	18,700,000
総計	122,200,000	0	122,200,000

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：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. 研究開始当初の背景

細胞質で増殖するウイルスの RNA を感知してインターフェロン産生を中心とした抗ウイルス反応を誘導するセンサー分子の存在は予測されていたが、長い間その実態が明らかになっていなかった。RIG-I, MDA5, LGP2

(RIG-I-Like receptors, RLR と総称される) が探し求めているセンサーであることが明らかになり、それらの機能解析が開始された。

2. 研究の目的

本研究の目的は RLR の機能の解析を原子から動物個体のレベルまで広く進め、抗ウイルス

自然免疫反応を解明すること、その成果を基にウイルス感染症の診断法、治療法の開発への道を開くことである。

3. 研究の方法

解析の方法はRLR蛋白質のNMR法を中心とした立体構造解析に始まり、生化学、分子生物学、細胞生物学を駆使して行われた。特に動物個体での解析にはノックアウトマウスを作製して免疫機能の解析を行った。

4. 研究成果

(1) ノックアウトマウスおよびそれに由来する細胞の解析によりRIG-I, MDA5, LGP2は感知するウイルスに特異性がある事を発見した(文献16)。この事は幅広い増殖様式を持つウイルス群を効率的に感知する事に役立っていると考えられる。また、このウイルス特異性は各ウイルスの増殖過程で産生するRNAの構造(二重鎖構造、5'三リン酸構造、鎖長など)に由来することを明らかにした(文献4, 7, 10)。

(2) RLRのウイルスRNA認識に関わるドメイン(カルボキシル末端側ドメイン、CTD)の構造を解明した。このドメインは分子モデリングによって二重鎖RNA構造の認識に関与する事が強く示唆された(文献7, 10)。

(3) ウイルス感染によって発現誘導される標的遺伝子としてI型インターフェロンが知られておりその分子機構の解析が進んでいた。近年新たに進化的に全く異なるIII型インターフェロンが発見され、その抗ウイルス応答における役割が注目されている。我々はRLRがウイルスRNAを感知し、シグナルを伝達するとI型のみならずIII型インターフェロンも効率的に誘導される事を明らかにした(文献14)。

(4) インターフェロンは平常時には全く発現していないが、ウイルス感染時に迅速に発現誘導される。恒常的なインターフェロン産生は生体機能に害を与えると考えられてお

り、抗ウイルスシグナルは厳密に制御されていると考えられる。宿主の負の制御因子としてRNF125を同定した(文献12)。またパンデミック流行を引き起こすインフルエンザウイルスは非構造蛋白質であるNS1をコードしており、それがRIG-Iによるシグナルを強く阻害してウイルスの増殖を助けている事を明らかにした(文献13)。

(5) RLRが活性化されるとミトコンドリア上に発現するアダプター分子、IPS-1にシグナルが伝達される事が報告されていた。IPS-1はミトコンドリア上に発現する事がその機能に必須である。我々はウイルス感染によってIPS-1が実とミトコンドリア上を移動して凝集体を形成する事、それにはミトコンドリアの融合を制御する事が知られているMitofusin1が必須であることを明らかにした(文献2)。我々はミトコンドリアがその表面積、融合/分裂の能力によってIPS-1を効率的に凝集するプラットフォームとして機能しているというモデルを提唱する。

(6) RLRがウイルス感染に対する防御に重要である事が次々と明らかになり、その機能異常が原因となる疾患の存在が予測された。RLRのアミノ酸置換を伴う遺伝子多型についてその抗ウイルス機能を解析したところ、幾つかの機能喪失変異を同定した(文献8)。1型糖尿病への抵抗性を獲得する遺伝子多型が幾つか報告されていたが、それらとMDA5の機能喪失変異が一致した。また、自己免疫疾患である皮膚筋炎の特定のタイプではMDA5に対する自己抗体が産生されていることを見出した(文献6)。これらのことはMDA5の機能亢進と自己免疫疾患の関連を示唆している。

(7) 5'三リン酸を有するRNAが1918年および2009年のパンデミックインフルエンザウイルスの増殖を抑制することを見出した(文献

3)。同様に RIG-I の活性化の結果、エボラウイルスの増殖が抑制されることを見出した (文献 5)。ヒトの呼吸器に感染して喘息などを引き起こすライノウイルスは RLR および TLR の協調した機能によって排除されることを見出した (文献 1)。

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 28 件)

①Slater L, Bartlett NW, Haas JJ, Zhu J, Message SD, Walton RP, Sykes A, Dahdaleh S, Clarke DL, Belvisi MG, Kon OM, Fujita T, Jeffery PK, Johnston SL, Edwards MR.: Co-ordinated role of TLR3, RIG-I and MDA5 in the innate response to rhinovirus in bronchial epithelium. *PLoS Pathog.* 2010 Nov 4;6(11):e1001178.

②Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, Julkunen I, Namiki H, Yoneyama M and Fujita T.: Virus-Infection or 5'ppp-RNA Activates Antiviral Signal through Redistribution of IPS-1 Mediated by MFN1. *PLoS Pathog.* 2010 Jul 22;6(7):e1001012.

③Ranjan P, Jayashankar L, Deyde V, Zeng H, Davis WG, Pearce MB, Bowzard JB, Hoelscher MA, Jeisy-Scott V, Wiens ME, Gangappa S, Gubareva L, García-Sastre A, Katz JM, Tumpey TM, Fujita T, Sambhara S. :5'PPP-RNA induced RIG-I activation inhibits drug-resistant avian H5N1 as well as 1918 and 2009 pandemic influenza virus replication, *Virology Journal.* 7, 102 (2010)

④Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O. :LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 1512-7 (2010)

⑤Spiropoulou CF, Ranjan P, Pearce MB, Sealy TK, Albariño CG, Gangappa S, Fujita T, Rollin PE, Nichol ST, Ksiazek TG, Sambhara S.: RIG-I activation inhibits ebolavirus replication. *Virology.* 392, 11-15 (2009)

⑥Sato, S., Hoshino, K., Satoh, T., Fujita, T., Kawakami, Y., Fujita, T. and Kuwana, M.: RNA helicase encoded by melanoma differentiation-associated gene 5 is a major autoantigen in patients with clinically amyopathic dermatomyositis: association with rapidly progressive interstitial lung disease. *Arthritis & Rheumatism.* 60, 2193-2200 (2009)

⑦Takahasi, K., Kumeta, H., Tsuduki, N., Narita, R., Shigemoto, T., Hirai, R., Yoneyama, M., Horiuchi, M., Ogura, K., Fujita, T., Inagaki, F.: Solution Structures of MDA5 and LGP2 C-terminal Domains: Identification of the RNA Recognition Loop in RIG-I Like Receptors. *J. Biol. Chem* 284, 17465-17474 (2009)

⑧Shigemoto, T., Kageyama, M., Hirai, R., Zheng, J-P., Yoneyama, M., Fujita, T.: Identification of loss of function mutations in human genes encoding RIG-I and mda5: Implications for resistance to type I diabetes. *J. Biol. Chem* 2009 Mar 26. [Epub ahead of print]

⑨Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, TS., 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)

⑩Takahasi 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)

⑪Cui, 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)

⑫Arimoto K., Takahashi H., Hishiki T., Konishi H., Fujita T., Shimotohno K.: Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 7500-5 (2007)

⑬Guo, Z., Chen, L.M., Zeng, H., Gomez, J.A., Plowden, J., Fujita, T., Katz, J.M., Donis, R.O. and Sambhara, S.: NS1 Protein of Influenza A Virus Inhibits the Function of Intracytoplasmic Pathogen Sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 36, 263-9 (2007)

⑭Onoguchi, K., Yoneyama, M., Takemura, A., Akira, S., Taniguchi, T., Namiki, H., and Fujita, T. : Viral Infections Activate Types I and III Interferon Genes through a Common Mechanism. *J. Biol. Chem.* 282, 7576-7581 (2007)

⑮Saito, 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)

⑩ 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)

[学会発表] (計 69 件)

① Fujita T.: Virus-infection or 5'ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1. Cytokines 2010: Cancer in Infectious Diseases, Autoimmune Disorders and Cancer. October 3-7, 2010 Chicago, USA

② Fujita T.: Regulation of the innate antiviral response by local condensation of IPS-1 mediated by mitochondrial dynamism. 50th ICAAC. September 12-15, 2010 Boston, USA

③ Fujita T.: Regulation of the innate antiviral response by local condensation of IPS-1 mediated by mitochondrial dynamism. 14th International Congress of Immunology. August 22-27, 2010 Kobe, Japan

④ Fujita T.: Recognition of viral nucleic acids by RLRs in antiviral innate immunity. 3rd International Workshop on Cell Communication in Health and Disease. February 17-18, 2010 Vienna, Austria

⑤ Fujita T.: Mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors and activation of antiviral program: 2nd International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology Workshop on Human RNA viruses. 2010.2.10-2.12 New Dehli, India

⑥ Takashi Fujita: Activation of an antiviral program through the cytoplasmic Recognition of non-self RNA patterns by RLR. October 19, 2009

Tri-Society Annual Conference, Lisbon Portugal

⑦ Takashi Fujita: Sensing Viral Replication by RIG-I-Like Receptors and Antiviral Innate Immunity. May 19 2009 109th General Meeting of American Society for Microbiology, Philadelphia, USA

⑧ Fujita T.: Solution Structures of MDA5 and LGP2 C-Terminal Domains: Identification of the RNA Recognition Loop in RIG-I Like Receptors. Keystone Symposia, Pattern Recognition Molecules and Immune Sensors of Pathogens. 2009.4.1 Banff, Canada

⑨ Fujita T.: Mechanism of Foreign RNA Recognition in the Cytoplasm. 7th Joint Conference of the International Cytokine Society and the International Society for Interferon and Cytokine Research. 2008.10.12-16 Montreal Quebec, Canada

⑩ Fujita T.: Non-self RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses.: 1st International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology Workshop on Human RNA viruses. 2008.9.30-10.3 Trieste, Italy

⑪ Takahasi 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-Like Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. XIV. International Congress of Virology, August 10-15 2008 Istanbul, Turkey

⑫ 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

⑬ Fujita, T.: Regulation of interferon gene

expression and virus infection of the liver. Hepatic Inflammation and Immunity. Jan. 25-27 2008 Moody Gardens Resort, Galveston, Texas

⑭ Fujita, T.: Non-self RNA Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. 3rd Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Society 2007. 10.5 Langenbeck-Virchow Auditorium, Berlin, Germany

⑮ Fujita, T.: Non-self RNA Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. ISICR 2007. Sept. 16-19 2007 Oxford, UK

⑯ Fujita, T.: RIG-I family helicases: Cytoplasmic sensor for non-self RNA. Viral Immunology Symposium 2007. 7.23 Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, MD USA

⑰ Fujita, T.: Sensing viruses and antiviral response. Gordon Research Conferences: Viruses and Cells 2007. 6. 5 Tilton School, Tilton NH USA

⑱ 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

⑲ Fujita, T.: Signal Transduction by Cytoplasmic Virus Receptors. Keystone Symposia: Jaks, Stats and Immunity 2007. 1.9 Steamboat Springs, CO USA

⑳ Fujita, T. : Triggering Antiviral Responses and host regulation by the Cytoplasmic RNA Helicase RIG-I. Cytokines 2006, 2006.8.28, Vienna, Austria

[図書] (計 1 件)

Kazuhide Onoguchi, Kiyohiro Takahasi,

Mitsutoshi Yoneyama, and Takashi Fujita: Chapter 2 Type I interferon production by viruses, in Viruses and Interferon: Current Research, Ed. Karen Mossman, Caister Academic Press (2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/bunshiiden/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

審良 静男 (AKIRA SHIZUO) 06-07 年度
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・教授

研究者番号 : 50192919

藤田 尚志 (FUJITA TAKASHI) 08-10 年度
京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号 : 10156870

(2) 研究分担者

藤田 尚志 (FUJITA TAKASHI) 06-07 年度
京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号 : 10156870