

## 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 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770113

研究課題名（和文） ウイルスセンサータンパク質 RIG-I の機能解明および医学的応用

研究課題名（英文） Functional analysis of RIG-I and its medical application

研究代表者

高橋 清大 (Takahashi Kiyohiro)

京都大学・大学院薬学研究科・特定助教

研究者番号：90399965

研究成果の概要（和文）：RIG-I は我々の体においてウイルスの RNA を結合することで、初期のウイルス感染を察知し、迅速な免疫活動を誘導する因子である。本研究では、RIG-I の機能解明を行った。その結果、RIG-I の中に自己抑制を行うドメインを発見し、この結果から RIG-I の活性化機構を提唱した。RIG-I はウイルス非感染時には活性化されない、これは免疫誘導が我々の体にとっても有害な場合があるためである。このメカニズムを解明した点は大きな発見であると考えている。

研究成果の概要（英文）：RIG-I is a sensor protein that specifically recognize viral RNA and induce early immunity. In the absence of virus RIG-I forms resting form not to induce antiviral activities. Because, those activities are also toxic for our body. I performed functional analysis of sensor protein RIG-I and identified suppression domain of RIG-I that controls RIG-I activation. From this result I suggested the mechanism that how RIG-I is self-controlled its activity.

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 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学 構造生物化学

キーワード：自然免疫 RIG-I

## 1. 研究開始当初の背景

自然免疫は幅広い種が生まれながらにして持つ免疫機構であり、異物の大まかな構成成分を認識することで誘導される。この構成成分とは、ウイルスの場合はそのゲノムや複製の際に見られる RNA であり、バクテリアの場合は細胞壁のペプチドグリカンなどである。これらは我々の体に存在するセンサータンパク質によって検出される。それにより感染現象はウイルス感染やバクテリア感染等と大別して認識され、生体はそれぞれに応じた防御機構を誘導する。

インフルエンザウイルスや C 型肝炎ウイルス (HCV) と言った重篤な症状を引き起こす

ウイルスが感染すると、我々の体はそれらを検出するセンサーを用いて感染初期の生体防御(自然免疫)を誘導する。RIG-I(Retinoic acid inducible gene-I)は RNA ウイルス感染に対するセンサータンパク質であり、ウイルス RNA を細胞質で感知することで、生体防御を誘導する。本研究の目的は、RIG-I のウイルス RNA 認識メカニズムや下流へのシグナル伝達メカニズムを、X 線結晶構造解析で解明することである。また、これまでに RIG-I の構造解析から得られた知見と我々の発見した候補薬剤を元に、創薬、医療への技術応用を目指す。

I 型インターフェロン(IFN)はウイルス感染

によって誘導されるサイトカインの一種であり、様々な抗ウイルス作用を持つ自然免疫の切り札となるタンパク質である。RIG-Iは当研究室で同定されたタンパク質であり、ウイルス感染に際しウイルス RNA を認識することで、I型 IFN を誘導する。RIG-IはN末端から二つの CARD (caspase recruitment domain)、Helicase ドメイン、C末端ドメイン(C-terminal domain : CTD)のドメインから構成されている(図 1)。CARD は下流のタンパク質 IPS-1(CARD を持つ)と CARD 同士で相互作用することで、シグナルを伝達する。Helicase ドメインは ATP を分解し構造変化を誘導することで活性の調節を行っている。ウイルス非感染時の RIG-I はこれらドメインが互いに相互作用して『閉じた構造』を形成している。しかしウイルス感染時は、CTD のウイルス RNA 認識により Helicase ドメインの構造変化が誘導され、RIG-I は『開いた構造』へ移行する。この時 RIG-I は CARD を露出し、さらにウイルス RNA の周りで多量体化し、IPS-1 へと結合することでシグナルが伝達される。

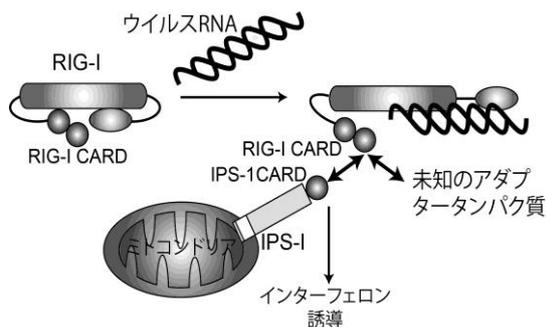


図 1 RIG-I の活性化機構

我々は RIG-I の活性化機構の解明を目指し研究を行ってきた。RIG-I が認識し活性化されるのがウイルス由来の RNA のみであり、宿主由来の RNA は認識せず活性化もされない、この特異性のメカニズムの解明に取り組んだ。その結果、我々は新規の RNA 結合ドメインである CTD を発見した。さらに、このドメインが宿主の一重鎖 RNA を結合せず、ウイルス由来の二重鎖 RNA を特異的に結合する事を明らかにした。また、我々は核磁気共鳴(NMR)で RIG-I CTD の立体構造を解析し、CTD には広い塩基性の表面があり、この表面が RNA と結合する事を明らかとした。RIG-I に関しては様々な研究がなされていたが、いかにして RIG-I が活性を制御されているかの知見はなかった。そこで本研究ではそのメカニズム解明を目指し、さらには医学的応用を目指した。

## 2. 研究の目的

RIG-I の活性化には(1)CTD とウイルス RNA の結合、(2)Helicase ドメイン内に存在する ATPase による ATP の分解、(3)構造変化にともなった CARD の露出、(4)多量体化が必要である。これらの段階を踏み、RIG-I は『閉じた構造』から『開いた構造』へと移行する(図 1)。このメカニズムの解明は「いかに我々の体が異物であるウイルスを認識し生体防御を誘導するか」を明らかにするものであり、ウイルス治療の方向性を示すものである。この移行過程には、分子内や分子間の多様な相互作用が関わっているため、原子レベルの立体構造解析を行う事がその機構を浮き彫りにする近道である。この為には X 線結晶構造解析が最も適した方法である。本研究では X 線結晶構造解析を用いて RIG-I の立体構造を決定し、いかに『閉じた構造』から『開いた構造』へと移行するのか、その機構の解明を目指す。

現在までの研究により『閉じた構造』は、CARD と Helicase ドメインによるタンパク質内相互作用によって形成されることが明らかとなった。よって『閉じた構造』を明らかにするために、これらドメインを含むリコンビナントタンパク質の X 線結晶構造解析を行う。同様に『開いた構造』の形成には、CTD と RNA との結合の他に、Helicase ドメインによる構造変化が必要であることが明らかとなっている。よって、『開いた構造』の解明には CTD と Helicase ドメインを含むリコンビナントタンパク質と RNA の複合体の X 線結晶構造解析を行う。最終的にはこれら二つの構造を比較する事で、RIG-I の活性化機構を解明する。

## 3. 研究の方法

研究開始早々に他グループにより RIG-I の結晶構造が報告された。そこで、RIG-I の活性化機構の解明には大きく方向転換せざるを得なかった。

そこで本研究では、RIG-I の自己抑制機構の解明を目指すことで、結晶構造とは違うアプローチでの機構解明を目指した。

注目したのは RIG-I がいかにしてウイルス非感染時に活性を自己阻害しているかについてである。本研究では RIG-I について多数の変異体を作成し、これを細胞に発現させて I 型 IFN の活性化を見ることで、どの変異体が恒常的活性化体になるかを観察した。この結果 RIG-I の自己阻害に関わるドメインを発見し更なる研究を行った。RIG-I の機能である、RNA 結合能、ATPase 活性、また構造変化について自己阻害ドメインの働きを調べ、これをまとめて論文とした。



*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 415 (1),  
75-81 (2011). (査読有)  
doi: 10.1016/j.bbrc

〔学会発表〕 (計 2 件)

高橋清大「ウイルス感染における自然免疫の  
役割」第三回革新的ナノバイオシンポジウム,  
2012年3月4日, 京都大学薬学部 記念講堂  
(京都府)

〔図書〕 (計 1 件)

高橋清大, メディカルドゥ, トランスレーシ  
ョナルリサーチを支援するナノバイオ技術  
と最新創薬応用研究 自然免疫における構造  
・機能相関, 2012, 4 頁

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/bunshii  
den2012/Japanese/99\\_blank.html](http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/bunshii<br/>den2012/Japanese/99_blank.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋清大 (Takahasi kiyohiro)  
京都大学大学院薬学研究科特定助教  
研究者番号: 90399965

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし