

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08517

研究課題名(和文) 自然免疫を介した宿主とウイルスの新たな相互作用の解明

研究課題名(英文) Novel interaction between virus and host innate immune system

研究代表者

押海 裕之(OSHIUMI, HIROYUKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：50379103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： エボラ出血熱や新型インフルエンザなどウイルス感染症は個人の健康と生命を損なうだけでなく社会の停滞やパニックの原因になる深刻な問題である。自然免疫は感染初期の生体防御に必須である。

本研究では、この自然免疫に焦点をあて、その分子機構を研究することで、1)細胞内ウイルスRNAセンサーであるRIG-Iの活性制御に関与するDDX60分子の生体内での役割、2)DDX60分子をEGF受容体が制御するメカニズム、3)RIG-I下流のシグナル伝達機構、4)細胞外小胞が自然免疫応答に果たす役割、等について解明した。これらの成果は、今後、創薬の新たな分子標的の同定や新たな治療法開発の基礎基盤になると期待される。

研究成果の概要(英文)： Viral infection is a serious threat to our life and society. The innate immune system is a first line of defence against viral infection and is also required for the activation of adaptive immune response. We have been studying about the molecular mechanisms underlying the innate immune response during viral infection. We revealed that: 1) DDX60 played a crucial role in RIG-I-dependent and -independent antiviral activities in vivo; 2) Epidermal growth factor receptor (EGFR) mediated phosphorylation of DDX60, thereby attenuating DDX60 antiviral function; 3) The Zyxin protein stabilized the interaction between RIG-I and its adaptor MAVS and promoted RIG-I-mediated type I interferon production; 4) Extracellular vesicles were required for the innate immune response to hepatitis B virus. These findings elucidated novel molecular mechanisms of the innate immune responses against viral infection.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 ウイルス

1. 研究開始当初の背景

自然免疫はウイルスの抑制に重要な働きをする。申請者らは、これまでに、細胞質内のウイルス RNA センサーである RIG-I 分子の制御機構の研究を進め、Riplet ユビキチンリガーゼが RIG-I の C 末端領域を K63 ポリユビキチン化することが、生体内に於ける、ウイルス感染時の RIG-I 依存的な自然免疫応答に必須であることを解明し、さらに、DDX60 ヘリケース分子等が RIG-I の活性化に重要であることを試験管内の解析で解明した。しかし、この DDX60 ヘリケースの生体内における役割は十分に解明されていない。

RIG-I と同じく、細胞質内のウイルス RNA を認識する MDA5 分子は、麻疹ウイルスやデングウイルスに対する自然免疫応答に重要な働きをする。しかし、この MDA5 の制御機構も、まだ十分には解明されていない。特に、MDA5 分子がリン酸化を受けることが、その活性の制御に重要であることは示唆されているものの、そのリン酸化酵素は未同定である。申請者らは、タンパク質間相互作用を指標に、MDA5 をリン酸化する蛋白質として RIOK3 分子を同定し、これが、MDA5 の異常な活性化を抑制することを予備実験から明らかとしている。

自然免疫応答は、ウイルスの抑制に重要である一方で、多くのウイルスは感染を成立させるために、宿主の自然免疫応答を抑制する能力をもつ。申請者らはこれまでの解析から、C 型肝炎ウイルスの NS3-4A プロテアーゼが、上記の Riplet 分子を分解することで、RIG-I 依存的な自然免疫応答を抑制することを解明した。上記の DDX60 と RIOK3 がウイルスに対する自然免疫応答に重要であることを申請者らは発見したことから、この DDX60 と RIOK3 をウイルスが抑制する可能性を検討したところ、興味深いことに、細胞表面の EGF 受容体をウイルスが活性化した際に、DDX60 蛋白質のリン酸化を誘導し、DDX60 依存的な自然免疫応答を抑制することを示唆する結果を得た。

一方で、自然免疫には未解明の課題も多く存在する。RIG-I や MDA5 下流のシグナル伝達についても未解明の問題が存在し、また、近年明らかになった細胞外小胞による細胞間情報伝達について、これが自然免疫にどのような影響を与えるのかは未解明である。

このように、ウイルス感染に対する自然免疫応答において：

- ・ DDX60 ヘリカーゼの生体内での役割
- ・ EGF 受容体による DDX60 の制御機構
- ・ RIOK3 キナーゼの MDA5 制御機構
- ・ RIG-I シグナルの未知の分子機構
- ・ 細胞外小胞の自然免疫に於ける役割

が明らかとなっていない。本研究ではこれ

らの課題に取り組み、ウイルス感染に対する自然免疫応答の新たな分子機構の解明に取り組む。

2. 研究の目的

1) DDX60 ヘリカーゼの生体内での役割の解明

申請者らは、ウイルス RNA 認識センサーである RIG-I の活性化に重要な DDX60 分子を同定し、その生体内での役割を解明するため、DDX60 ノックアウトマウスを作製した。本研究では、この DDX60 ノックアウトマウスを用い、生体内でのウイルスに対する自然免疫応答に DDX60 が果たす役割を解明する。この計画を実施することで、ウイルスに対する自然免疫応答の新たなメカニズムの解明につながる。

2) EGF 受容体による DDX60 の制御機構

プロテオーム解析から、DDX60 が EGF 受容体によりリン酸化されることが報告されている。EGF 受容体は多くのウイルスが感染の為に補助的に結合し、活性化することが知られている。A 型インフルエンザウイルスや HCV も EGF 受容体に結合することが知られている。申請者らは予備実験から、これらのウイルスが EGF 受容体の活性化を通して、DDX60 の機能を抑制することを発見した。本研究では、この詳細なメカニズムを解明することで、ウイルスによる自然免疫応答抑制の新たなメカニズムの解明を行う。

3) RIOK3 キナーゼの MDA5 制御機構の解明

MDA5 は麻疹ウイルスやデングウイルス感染に対する自然免疫応答に於いて重要な役割を果たす。申請者らは酵母の two-hybrid 法を用い、MDA5 と結合するリン酸化酵素として RIOK3 分子を同定した。また、予備実験から、RIOK3 遺伝子を CRISPR 法でノックアウトした細胞株では MDA5 の活性化が亢進することを発見した。本研究では、RIOK3 が MDA5 の活性化を制御する仕組みを解明し、自然免疫応答の新たなメカニズムを解明する。

4) RIG-I シグナルの未知の分子機構の解明

RIG-I はウイルス由来の RNA 上に重合し、ヌクレオプロテインフィラメントを形成する。これが、ミトコンドリア外膜上の IPS-1 分子と結合すると、IPS-1 が TBK1 キナーゼなどの分子を活性化し、サイトカイン産生を誘導する。我々は、この IPS-1 と結合する分子として Zyxin と呼ばれる分子を既に同定しているが、その自然免疫に於ける役割は未知である。そこで、本研究では、Zyxin が IPS-1 と結合する意味を解明し、新たな分子機構を解明する。

5) 細胞外小胞が自然免疫に果たす役割の解明

細胞外小胞は microRNA などの機能的

な RNA を細胞から細胞へと伝達することが最近になり明らかとなった。しかし、この細胞外小胞が自然免疫応答に果たす役割は十分には解明されていない。我々は、B型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus: HBV) 感染時の自然免疫応答に於いて、細胞外小胞が重要な役割を果たすことを示唆する結果を得ており、本研究では HBV 感染時の自然免疫応答に焦点をあて、細胞外小胞の役割を解明する。

3. 研究の方法

DDX60 ノックアウトマウスは我々が独自に作成した。DDX60 ノックアウトマウスのマウス胎児線維芽細胞、骨髄由来樹状細胞を用い解析した。ヒト培養細胞としては HeLa 細胞、HEK293 細胞、HepG2 細胞、HuH-7、HuH-7.5、THP-1 細胞を用いた。

ウイルスとして A 型インフルエンザウイルス (H1N1; PR8 株)、牛水疱性口内炎ウイルス (VSV; インディアナ株)、センダイウイルス (HVJ 株) と単純ヘルペス I 型ウイルスを用いた。

siRNA として、DDX60、Zyxin、RIOK3 に対する siRNA と、コントロールの siRNA を Thermo Fisher より購入し用いた。組換えヒト EGF 蛋白質は Wako より購入した。

遺伝子の発現量の測定では、細胞から RNA を TRIZOL (Thermo Fisher) を用いて抽出した。Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) を用いて逆転写反応を行い、STEP ONE Real-time PCR System (ABI) を用いて測定した。

細胞外小胞の調整は Total Exosome isolation kit (from cell culture) (Thermo Fisher) を用いた。

HBV のウイルス RNA の分解速度を測定するために、HBV 発現ベクターを細胞へ形質導入した後、アクチノマイシン D で処理し転写を阻害した。転写阻害後のウイルスの RNA の分解速度を、定量 PCR 法により測定した。

HCV のウイルス RNA の分解速度を測定するために試験管内で HCV ウイルスの RNA を T7 RNA ポリメラーゼにより合成し、これを細胞へエレクトロポレーション法により形質導入した。形質導入後のウイルス RNA 量の減少を定量 PCR 法で測定し、ウイルス RNA 分解速度を求めた。

4. 研究成果

1) DDX60 ヘリカーゼの生体内での役割の解明

野生型マウスと DDX60 ノックアウトマウスよりマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を作成し、ウイルス感染後や、RIG-I のリガンドで細胞を刺激した後の、サイトカイン発現量を測定

した。結果、DDX60 をノックアウトすることで、RIG-I 依存的な I 型インターフェロンが部分的に減少することが明らかとなった。これは、RIG-I の活性化には DDX60 依存的な経路と非依存的な経路が存在することを示唆する。

この RIG-I 非依存的な経路について詳細に調べたところ、DDX60 がウイルス RNA の分解に関与することを明らかとした。

DDX60 が関与する自然免疫応答の、ウイルス感染時の生体防御における重要性を検証するため、野生型のマウスと DDX60 ノックアウトマウスを VSV で感染させ、その後の生存率を比較した。結果、DDX60 ノックアウトマウスは野生型のマウスと比較して、ウイルス感染後の生存率が低くなった。これは、DDX60 の自然免疫に於ける役割が、生体内でのウイルスに対する生体防御に重要であることを示唆する。

2) EGF 受容体による DDX60 の制御機構

他のグループの網羅的解析より EGF 受容体が DDX60 の 793 番目と 796 番目のチロシンをリン酸化することが報告された。そこで、このチロシンのリン酸化の意義について調べた。

まず、細胞の培養液に組換え EGF タンパク質を添加し、RIG-I 依存的な I 型インターフェロン産生に与える影響を調べたところ、EGF を添加することで、I 型インターフェロンの発現量が低下した。一方で、EGF 添加により DDX60 タンパク質がリン酸化されることをウェスタンブロット法により観察した。EGF 添加は、DDX60 と RIG-I のタンパク質間相互作用には影響を与えないことが明らかとなった。ATP が結合したアガロースゲルで、DDX60 と ATP との結合を調べたところ、EGF を添加することで、DDX60 と ATP との結合が減少した。これらのことは、EGF 受容体による DDX60 のリン酸化が、DDX60 の ATP 結合能を低下させることを示唆する。

次に、EGF 添加が、DDX60 依存的な RNA の分解経路に与える影響について調べたところ、EGF 受容体の阻害剤である elrotinib の添加により、ウイルス RNA の分解が促進した。これらは、EGF 受容体による DDX60 のリン酸化が、DDX60 の RNA 分解能にも影響を与えることを示唆する。

3) RIOK3 キナーゼの MDA5 制御機構の解明

MDA5 の C 末端領域と結合する因子の網羅的探索を、酵母 two-hybrid 法を用いて実施したところ、RIOK3 キナーゼが MDA5 と結合することを発見した。ヒト培養細胞での RIOK3 と MDA5 との結合についても免疫沈降法により確認された。

RIOK3 キナーゼは主に細胞質に存在し、RIOK3 を過剰発現させることで、MDA5 がリン酸化されることがウェスタンブロット法に

より観察された。

RI0K3の過剰発現ではMDA5依存的なI型インターフェロン産生が減少し、RI0K3に対するsiRNAがI型インターフェロン産生能を上昇させたことから、RI0K3がMDA5を負に調節する因子であることが示唆された。

MDA5のC末端領域のセリン・スレオニンの変異タンパク質を作成したところ、828番目のセリンをアラニンに変化することでMDA5のリン酸化が減少した。そこで、RI0K3キナーゼによる828番目のセリンのリン酸化が重要かどうかを検証するために、リン酸化を模したアスパラギン酸への変異タンパク質を作成したところ、828番目のセリンをアスパラギン酸へと変異させることで、MDA5依存的なI型インターフェロン産生能が減少した。一方で、リン酸化できないようにセリンからアラニンへと変化させたところ、MDA5依存的なI型インターフェロン産生が大きく上昇した。これらは、RI0K3キナーゼがMDA5の828番目のセリンをリン酸化することで、MDA5依存的なI型インターフェロン産生を抑制することを示唆する。

4) RIG-I シグナルの未知の分子機構の解明

RIG-Iのアダプター分子であるIPS-1の制御機構に着目し、IPS-1と結合する分子の探索を酵母 two-hybrid 法により実施したところ Zyxin 分子を同定した。ヒト細胞内での Zyxin 分子と IPS-1 分子との結合は免疫沈降法により観察された。Zyxin は細胞質内に存在するが、IPS-1 が局在するミトコンドリア上にも部分的に存在することが共焦点レーザー顕微鏡の解析から明らかとなった。

IPS-1のI型インターフェロン産生誘導能に与える影響について調べたところ、Zyxinを過剰発現すると、I型インターフェロン産生能が上昇し、siRNAを用いてZyxinをノックダウンすると逆に、I型インターフェロン産生は低下した。

Zyxinの142番目のセリンはリン酸化されることが知られているが142番目のセリンをアラニンに置換した場合でも、グルタミン酸に置換した場合でもIPS-1によるI型インターフェロン産生能に与える影響は、観察されなかった。これはZyxinのリン酸化は、IPS-1の制御には関与しないことを示唆する。

ZyxinによるIPS-1活性化の分子メカニズムを詳細を解析したところ、ZyxinはRIG-IとIPS-1との結合の足場として働き、これらの結合を促進する働きがあることが示唆された。

5) 細胞外小胞が自然免疫に果たす役割の解明

B型肝炎ウイルス(Hepatitis B virus: HBV)感染時の生体内での自然免疫応答を解明するために、HBVに感染する小型動物のツパイ(Tree shrew)を用いて実験を実施し

た。ツパイにHBV感染させた後、各臓器のサイトカイン産生を調べたところ、肝臓で、IFN- γ の産生が上昇することを明らかとした。

ヒトやマウスの細胞を用いた解析から肝臓のNK細胞がHBVに対してIFN- γ を産生することが示唆された。しかし、この時、NK細胞が直接HBVを認識する経路の他に、マクロファージが感染肝細胞から放出される細胞外小胞内のウイルスRNAを認識しNK細胞を活性化することが示唆された。

一般的に、ウイルスは持続感染するために、宿主の自然免疫を抑制する。HBVはヒト肝臓内で持続感染することから、そのメカニズムについて調べたところ、HBV感染時に肝細胞から放出される細胞外小胞にはmiR-21やmiR-29などのIL-12産生を抑制するmicroRNAが含まれることが明らかとなった。これは、細胞外小胞を介して、自然免疫がウイルスを認識する一方で、ウイルスは細胞外小胞を介して宿主の自然免疫を抑制しようとしていることを示唆する。

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 8 件)

Okamoto M, Kouwaki T, Fukushima Y, Oshiumi H. Regulation of RIG-I Activation by K63-Linked Polyubiquitination. *Frontiers in Immunology* 査読有、8: 1942, 2018 doi: 10.3389/fimmu.2017.01942

Takashima K, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. *Journal of Innate Immunity* 査読有、10: 44-55, 2018 doi: 10.1159/000480740.

Kouwaki T, Okamoto M, Tsukamoto H, Fukushima Y, Matsumoto M, Seya T, Oshiumi H. Zyxin stabilizes RIG-I and MAVS interactions and promotes type I interferon response. *Scientific Reports* 査読有、7: 11905, 2017 doi: 10.1038/s41598-017-12224-7

Shibata Y, Tokunaga F, Goto E, Komatsu G, Gohda J, Saeki Y, Tanaka K, Takahashi H, Sawasaki T, Inoue S, Oshiumi H, Seya T, Nankano H, Tanaka Y, Iwai K, Inoue JI. HTLV-1 Tax induces Formation of the Active Macromolecular IKK Complex by Generating Lys63- and Met10Linked Hybrid Polyubiquitin Chains. *PLoS Pathogens* 査読有 13: e1006162, 2017 doi: 10.1371/journal.ppat.1006162.

Kouwaki T, Fukushima Y, Daito T, Sanada T, Yamamoto N, Mifsud EJ, Leong CR, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, Matsumoto M, Seya T, Oshiumi H.

Extracellular Vesicles Including Exosomes Regulate Innate Immune Responses to Hepatitis B virus infection. *Frontiers in Immunology* 査読有 7: 335, 2016 doi: 10.3389/fimmu.2016.00335
Oshiumi H, Kouwaki T, Seya T. Accessory Factors of Cytoplasmic Viral RNA Sensors Required for Antiviral Innate Immune Response. *Frontiers in Immunology* 査読有 7: 200, 2016 doi: 10.3389/fimmu.2016.00200
Oshiumi H, Miyashita M, Okamoto M, Morioka Y, Okabe M, Matsumoto M, Seya T. DDX60 Is Involved in RIG-I-Dependent and Independent Antiviral Responses, and Its Function is Attenuated by Virus-Induced EGFR Activation. *Cell Reports* 査読有、11: 1193-1207, 2015 doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.047.
Takashima K, Oshiumi H, Takaki H, Matsumoto M, Seya T. RIOK3-mediated phosphorylation of MDA5 interferes with its assembly and attenuates the innate immune response. *Cell Reports* 査読有、11: 192-220, 2015

〔学会発表〕(計 5 件)

Hiroyuki Oshiumi and Masaaki Okamoto, miR-451a in blood-circulating extracellular vesicles controls the innate immune response of macrophages. *Keystone Symposium* 2017年2月 フェアマウントホテルバンクーバー (カナダ)

押海裕之、岡本将明、福島好 細胞外小胞による細胞間情報伝達における補体の役割 第54回 日本補体学会学術集会 2017年9月 コラッセ福島(福島)

押海裕之 インフルエンザ全粒子ワクチンに対する自然免疫応答での細胞外小胞の役割 第28回日本生体防御学会学術総会 2017年6月 相模女子大学グリーンホール (相模原市)

押海裕之 Exosome-mediated regulation of innate immune response against HBV infection 第45回日本免疫学会学術集会 2016年12月 沖縄コンベンションセンター(那覇)

押海裕之 DDX60, a cytoplasmic RNA helicase, enhances RIG-I-dependent and -independent antiviral innate immune response 第44回日本免疫学

会学術集会 2015年11月 札幌コンベンションセンター(札幌)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: ワクチン接種後副反応を予測する検査方法
発明者: 押海裕之
権利者: 熊本大学
種類: 特許
番号: 特願 2017-177767
出願年月日: 2017年9月15日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<https://www.immunology-kumamoto.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

押海 裕之 (OSHIUMI hiroyuki)
熊本大学・大学院生命科学研究部。教授
研究者番号: 50379103