

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月26日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15724

研究課題名(和文) ウイルス感染時にカギを握る新規遺伝子の同定

研究課題名(英文) Pivotal role of novel gene in viral infection

研究代表者

國吉 佳奈子 (kuniyoshi, kanako)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70747881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス感染がおこると自然免疫受容体を介してどのようなウイルスが感染したかを察知し、生体防御反応を誘導して排除する。自然免疫受容体として重要な役割を果たすのがRIG-I-like receptor (RLRs)である。本研究ではRLRsを正に制御する因子としてMEX3Cを同定し、さらに生体内での役割を解明に向けて解析が行われた。その結果、MEX3CはRIG-Iに対してこれまでに報告されていなかった修飾をすること、また免疫細胞の分化に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然免疫は病原体感染時の初期認識及び迅速な炎症反応の惹起する重要な過程である。特にウイルス感染時には自然免疫受容体であるRIG-Iがどのようなウイルスが感染したかを認識し、自然免疫応答を誘導する。本研究ではRIG-Iを正に制御する因子としてMEX3Cを同定し、さらにこの分子の詳しい制御メカニズムの解明や獲得免疫に重要な免疫細胞の分化において重要な役割を果たしていることを明らかにした。これらの成果は、いまだ不明な点が多いRIG-Iの活性機構の解明の一助となるものであり、MDA5とのウイルス認識の違いを明らかにする可能性を秘めている。今後もさらなる解析を続け病態生理的意義の解明につなげたい。

研究成果の概要(英文)：Virus infection is sensed by innate immune receptors such as RIG-I-like receptors (RLRs). In this research, we identified MEX3C as a positive regulator of RIG-I. Our results showed that MEX3C have pivotal role in virus infection and differentiation of immune cells.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 獲得免疫 ユビキチン 炎症性サイトカイン 一型インターフェロン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

自然免疫系は、病原体感染の初期認識および迅速な炎症反応の惹起を担い、さらにはその後起こる獲得免疫系の誘導にも必須な役割を果たす生体防御機構である。自然免疫は、自然免疫センサー分子が病原体に特徴的な分子パターンを認識することにより誘導される。これまでに、Toll-like receptor (TLR) ファミリーが、細菌、ウイルス、寄生虫などに特徴的なタンパク質、脂質、核酸を認識するセンサーとして機能し、自然免疫系を活性化することを見出してきた。一方、TLR に属さない自然免疫センサーとしては、細胞質内における RNA ウイルス感染を認識する RIG-I-like receptor (RLR) ファミリーが同定されている。申請者らは新規 RIG-I 制御因子として MEX3C を同定し、生体内での役割を明らかにすることを目的とした。

### 2. 研究の目的

自然免疫受容体である RIG-I を介するウイルス由来 RNA の認識は炎症性サイトカインや I 型インターフェロンといった自然免疫反応にとっても重要な役割を果たすだけでなく、抗原特異的な獲得免疫への橋渡しをする生体防御上なくてはならない過程である。本研究ではこれまで自然免疫応答との関連が報告されていなかった新規遺伝子として MEX3C を同定し、RLR を介した抗ウイルス応答誘導機構の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) MEX3C の生体内での役割を解明するために本遺伝子欠損マウスを作成し、さらに細胞レベルで解析できるように欠損マウスから取り出した MEX3C 欠損マクロファージをセルライン化した。また、細胞内での MEX3C の挙動について調べるために MEX3C のタンパク質を一過性に過剰発現させたセルラインを作製した。免疫沈降法によってそのタンパク質に結合するたんぱく質を MASS による網羅的に解析した。

(2) 遺伝子欠損マウスの生体由来の細胞を使用しウイルス感染に対するサイトカイン産生を ELISA 法によって野生型と比較した。さらに遺伝子発現の変化をマイクロアレイによって比較した。

(3) MEX3C と結合する mRNA の同定を行うためにマイクロアレイ、次世代シーケンサーを使用して優位に結合する mRNA の解析を行った。また、これらの標的因子が抗ウイルス応答に関連しているかの検討を行った。

(4) MEX3C が生体内で有する役割を調べるために、欠損マウス由来の各種免疫細胞を解析を行った。また各免疫細胞の分化異常や割合の比較を FACS や QPCR を用いて検討した。

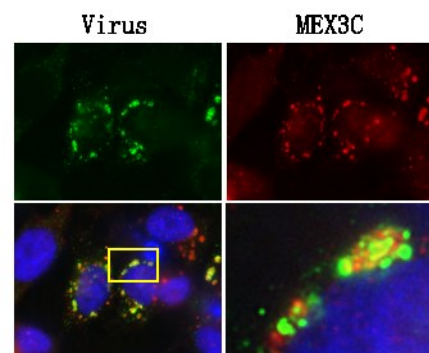
### 4. 研究成果

(1) MEX3C の細胞内での動きと関連タンパク質について 生体由来の細胞をセルライン化した細胞あるいは恒常的に MEX3C を発現させたセルラインを使用して、より正常細胞に近い状態で MEX3C の局在を確認したところ、一過性に発現させた場合と同様にウイルス感染によってその局在が変化することが明らかとなった。ウイルス感染後、MEX3C は P-BODY からストラス顆粒へ局在を移すことが明らかとなった。また、一過性に発現させた細胞に NDV を感染させたところ、MEX3C と NDV 由来 RNA はその局在が一致することが分かった(図 1)。

また、細胞内で結合するタンパク質を MASS によって網羅的に解析を行ったところ、これまでウイルス感染との関わりが知られていなかった分子が同定された。今後この分子が生体内でどのような役割を果たすかさらなる解析を進めていく予定である。

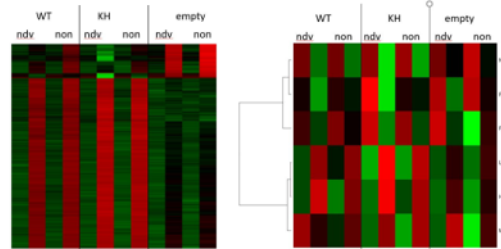
(2) ウイルス感染時に重要な MEX3C によって発現が誘導される遺伝子の同定について MEX3C 欠損マウスより腹腔マクロファージを回収してウイルス感染時の遺伝子発現解析をマイクロアレイによって網羅的に解析したところ、シグナル伝達分子をはじめとしたさまざまな遺伝子群に発現の差が認められた。

(3) MEX3C によるユビキチン化に関して



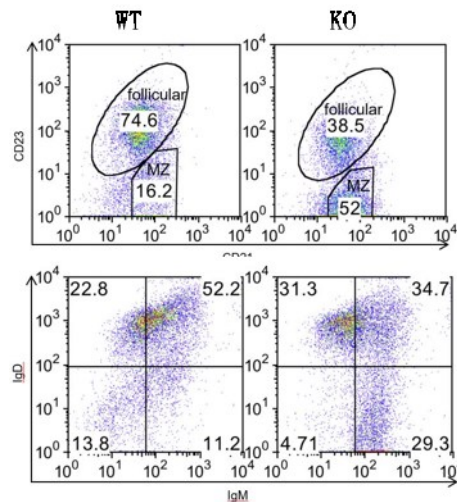
(図1)MEX3Cとウイルス感染を免疫染色によって検討した

MEX3C の発現ベクターを作成し RIG-I との相互作用を確認したところ、RIG-I のリシン残基に K63 結合型ユビキチン化を行うこと、さらにこの修飾はこれまで報告されている修飾とは異なっていることが明らかとなった。MEX3C を NDV 感染あるいは非感染下において一過性に強制発現させた後、免疫沈降法によって MEX3C あるいは MEX3C が有している KH ドメインに優位に結合する mRNA を網羅的、定量的に解析した。これらの解析より、MEX3C の KH ドメインを介して優位に結合する mRNA の配列が明らかとなりつつある (図 2)。



(図2)MEX3Cに結合したmRNAの解析結果

(4) 細胞の分化における MEX3C の役割に関して MEX3C 欠損マウスにおいて免疫細胞の分化異常が確認された。MEX3C は抗原特異的な獲得免疫の成立にとっても重要な役割を果たすことが示唆された (図 3)。



(図3)FACSによる各種免疫細胞の解析

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Kunivoshi K, Kubota H, Noguchi K, Sakanashi M, Matsuzaki T, Nakasone J, Shimokawa H, Sugahawa K, Kakinohana M, Tsutsui M The role of triple nitric oxide synthases in cerebral ischemia. 第 92 回日本薬理学会年会.2019 年 3 月 15 日大阪国際会議場. ポスター発表
- ② 國吉佳奈子、久保田陽秋、野口克彦、坂梨まゆ子、松崎俊博、仲宗根淳子、下川宏明、須加原一博、垣花学、筒井正人. 脳梗塞における NO 合成酵素の有害な作用：性差及びテストステロンの関与 第 48 回日本新脈管作動物質学会 2019 年 2 月 8 日、富山国際会議場、口頭発表
- ③ 國吉佳奈子、久保田陽秋、野口克彦、坂梨まゆ子、松崎俊博、仲宗根淳子、下川宏明、須加原一博、垣花学、筒井正人. 脳梗塞における一酸化窒素合成酵素の有害作用、第 3 回黒潮カンファレンス、2018 年 10 月 14 日、ポスター発表

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。