

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18209015

研究課題名（和文） DExD/H RNA ヘリカーゼファミリーの生理機能の研究

研究課題名（英文） Studies on the physiological functions of DExD/H RNA helicase family

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：DExD/H RNA ヘリカーゼファミリーが細胞内で複製するウイルスのセンサーとして機能し、抗ウイルス自然免疫反応を誘導することを見出した。このセンサーとしての機能は、ウイルスの複製の結果生じる特異的な構造の RNA を認識するためであることを明らかにした。また構造生物学的な解析によって比較的小さな、カルボキシル末端側のドメインがこの認識に深く関わっていることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	15,600,000	4,680,000	20,280,000
2007 年度	13,100,000	3,930,000	17,030,000
2008 年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
年度			
年度			
総計	37,500,000	11,250,000	48,750,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：免疫学、ウイルス、インターフェロン、RNA、ヘリカーゼ

1. 研究開始当初の背景

高等動物においてウイルスの感染に対抗する各種の生体防御反応が起きることが知られている。特に感染初期に活性化されるインターフェロン系をはじめとする反応はウイルスに対する自然免疫機構として重要である。またこの初期の反応は、その後の獲得免疫反応の活性化の準備段階としても機能しており、生体防御全体に多大な影響をおよぼす。

抗ウイルスの自然免疫反応はウイルスの増殖・複製を感知するセンサーによって活性化誘導されると考えられている。我々はこの分子を同定することを目的として、発現ライブラリーをヒト培養細胞 cDNA より構築し、その機能スクリーニングにより、RIG-I をクローニングした。RIG-I は DExD/H RNA ヘリカーゼの一つであり、特徴として Caspase Recruitment Domain (CARD) を有していた。

これまで変異体の作製、トランスフェクションによる機能解析、RNAiによる解析を行った結果、以下のような概要が判明した。ウイルスの複製の結果、細胞質に生じた二重鎖RNAはRIG-Iのヘリカーゼドメインと結合することにより、これら分子を活性化し、そのシグナルはCARDを介して下流シグナルを伝達する。この時ヘリカーゼのATPase活性が必須であった。CARDはアダプター分子、IPS-1(別名MAVS/VISA/Cardif)を介して下流のIRF-3キナーゼであるTBK-1を活性化する事により転写因子IRF-3、IRF-7を活性化して転写制御を行うというモデルが提唱されている。しかしながら、これら分子群の生理機能の詳細は報告によって異なっており、新たな観点での研究が必要とされている。またCARDはアポトーシスで機能する分子にも見出されるが、それらとは機能的に異なっており、別のグループに分類されることが判明した。以上のように、抗ウイルス自然免疫反応の活性化にCARD DExD/HヘリカーゼであるRIG-Iがウイルス感染のセンサーとして重要な機能を果たしていると考えられ、この発見は誰も予想し得なかった画期的なものである事が証明されつつある。さらに最近、我々はRIG-Iに構造の類似した2種類のDExD/Hヘリカーゼ、MDA5、LGP2が存在する事を見いだした。解析の結果、MDA5はRIG-Iと同様にウイルス感染による免疫反応の活性化に関与する事、LGP2は逆に免疫反応の抑制に関与することが示唆されている(Yoneyama et al., J. Immunology 175, 2851-2858, 2005)。

2. 研究の目的

本研究ではこの知見を発展させ、これらヘリカーゼファミリーの生理機能の全貌を明らかにすることを目的としている。

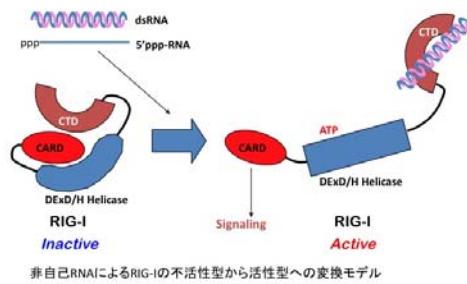
3. 研究の方法

以下の点に重点をおいて研究を進める。

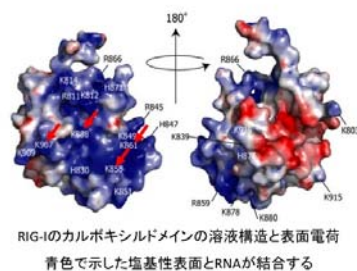
- (1) 各々のヘリカーゼファミリーの機能分担を明らかにする。それぞれのノックアウト、ノックダウンの手法による loss of function ならびに、トランスジェニックなどの過剰発現による gain of function によって表現型の解析を行う。
- (2) 解析する表現型については、ウイルス感染などによって誘導される自然免疫反応について行う
- (3) RIG-Iは通常不活性型で存在しているが、その活性抑制の分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

- (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(文献8)。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(文献3)。
- (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(文献7)。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 (文献 5) および溶液構造を NMR 法 (文献 4) 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方で保存されていた (文献 1)。



RIG-Iのカルボキシルドメインの溶液構造と表面電荷
青色で示した塩基性表面とRNAが結合する

(4) ウイルスと免疫系の攻防：ポリオウイルス (PV) のマウスの実験系ではインターフェロン系の機能によってウイルスが高率よく排除される。このマウスにインタ

ーフェロン受容体欠損を導入すると末梢でのウイルスの増殖がある程度観察されるようになり、ウイルスは最終的には脳炎を起こすようになった。各臓器での RIG-I、MDA5 遺伝子の発現を検討すると、脳以外での組織ではこれらのセンサーの発現が有意に観察されたが脳では発現が有意に低かった。このことは生体での PV の感染では脳以外での組織ではインターフェロン系の機能によってウイルスは排除されるが中枢神経系ではその効率が低いため脳炎を引き起こす可能性が強く示唆された (文献 9)。

(5) III 型インターフェロンは進化的に I 型インターフェロンとは異なり IL-10 ファミリーより進化したものと考えられるが、ウイルス感染により発現誘導されることが知られており、抗ウイルス活性を有している。III 型インターフェロンのウイルスによる活性化誘導には RIG-I ファミリーのウイルスセンサーおよび IRF-3, 7, NF- κ B 等の転写因子が関与することを示した。すなわち I 型インターフェロンと共通の機構で活性化されることが判明した (文献 6)。

(6) 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 (文献 2)。

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 15 件)

- ① Takahasi, 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* 2009 April 20. [Epub ahead of print] 査読有
- ② Shigemoto, 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] 査読有
- ③ Kato, 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) 査読有
- ④ 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 Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. *Molecular Cell.* 29, 428-440 (2008) 査読有
- ⑤ Cui, S., Eisenacher, 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
- ⑥ Onoguchi, 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) 査読有
- ⑦ 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
- ⑧ 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
- ⑨ Yoshikawa T., Iwasaki T., Ida-Hosonuma M., Yoneyama M., Fujita T., Horie H., Miyazawa M., Abe S., Simizu B., and Koike S.: Role of alpha/beta interferon response in the acquisition of poliovirus susceptibility of kidney cells in culture. *J. Virology* 80, 4313-4325 (2006) 査読有

[学会発表] (計 35 件)

- ① 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
- 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-Like Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. XIV. International Congress of Virology, August 10-15 2008 Istanbul, Turkey
- ③ 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
- ④ 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
- ⑤ 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
- ⑥ 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
- ⑦ 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

- ⑧ Fujita, T.: Sensing viruses and antiviral response. Gordon Research Conferences: Viruses and Cells 2007. 6. 5 Tilton School, Tilton NH USA
- ⑨ 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
- ⑩ Fujita, T.: Signal Transduction by Cytoplasmic Virus Receptors. Keystone Symposia: Jaks, Stats and Immunity 2007. 1.9 Steamboat Springs, CO USA
- ⑪ Fujita, T.: Triggering Antiviral Responses and host regulation by the Cytoplasmic RNA Helicase RIG-I. Cytokines 2006, 2006.8.28, Vienna, Austria

[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

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

(2) 研究分担者

米山 光俊 (YONEYAMA MITSUTOSHI)
京都大学・ウイルス研究所・准教授
研究者番号: 40260335

(3) 連携研究者