

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07026

研究課題名(和文) PQBP1はcGASによるI型インターフェロンの発現誘導をどのように抑制するのか

研究課題名(英文) How does PQBP1 suppress the induction of type I interferon expression by cGAS?

研究代表者

水口 峰之 (Mizuguchi, Mineyuki)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授

研究者番号：30332662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：cGASはサイトゾルDNAに対する自然免疫応答に重要なDNAセンサーである。cGASはセカンドメッセンジャーのcGAMPを合成し、cGAMPはアダプタータンパク質STINGに結合して活性化し、I型インターフェロンの発現を誘導する。PQBP1はレトロウイルスDNAに対する自然免疫応答においてcGASの補助受容体として機能する。しかし、サイトゾルDNAに対する自然免疫応答がPQBP1によって阻害されると報告している研究もある。本研究では、PQBP1のDNA結合特性を明らかにするとともに、PQBP1がさまざまな種類のDNAと相互作用することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌やウイルスが細胞に感染すると、パターン認識受容体であるcGASがサイトゾルDNAを認識することによって、STING依存性シグナル伝達経路が活性化され、I型インターフェロン産生が誘導される。PQBP1はリンパ系及び骨髄系細胞で高発現するcGASの補助受容体である。PQBP1はHIV-1由来DNAと直接結合し、cGASと相互作用することで自然免疫応答に関与すると報告されている。本研究では、PQBP1のDNA結合特性を明らかにするとともに、PQBP1がさまざまな種類のDNAと相互作用することを明らかにした。本研究成果は自然免疫応答の制御を理解するために有用な情報を与える。

研究成果の概要(英文)：Cyclic guanosine monophosphate (GMP)-adenosine monophosphate (AMP) synthase (cGAS) is a DNA sensor that is essential for innate immune responses to cytosolic DNA. cGAS synthesizes the second messenger cyclic GMP-AMP (cGAMP), which binds and activates the adaptor protein STING, leading to the expression of type I interferon. Polyglutamine tract binding protein 1 (PQBP1) has been shown to act as a co-receptor along with cGAS in innate immune responses to retroviral DNA. However, another study demonstrated controversy results showing that PQBP1 inhibits the innate immune responses to cytosolic DNA. In the present study, we examined the interaction between PQBP1 and various types of DNA. The present study revealed the DNA-binding properties of PQBP1, and demonstrated its ability to interact with various types of DNA in vitro.

研究分野：構造生物学、生物物理学、タンパク質科学

キーワード：cGAS PQBP1 DNA結合

## 1．研究開始当初の背景

細菌及びウイルス感染から生じるサイトゾル DNA の認識は、適切な宿主免疫応答を開始するために重要である。例えば、HIV-1 が細胞に感染すると、パターン認識受容体 (PRR) がサイトゾル DNA を認識することによってシグナル伝達経路が活性化され、I 型インターフェロン (IFN) 産生が誘導される。そのサイトゾル DNA の PRR としてサイクリック GMP-AMP 合成酵素 (cGAS) が同定された [1]。サイトゾル DNA に結合し活性化した cGAS は、サイクリック GMP-AMP (cGAMP) を合成し、その cGAMP がセカンドメッセンジャーとして IFN 遺伝子の刺激因子である STING に結合し、結果として STING 依存性シグナル伝達経路を活性化し、I 型 IFN 発現が誘導される [1,2]。Polyglutamine tract binding protein 1 (PQBP1) はリンパ系及び骨髄系細胞で高発現するタンパク質であり、cGAS の補助受容体として同定された [3]。PQBP1 は逆転写された HIV-1 DNA に直接結合し、cGAS と相互作用することで自然免疫応答に関与すると報告されている [3]。一方で、PQBP1 がサイトゾル DNA に対する自然免疫応答を阻害すると報告している研究もあり [4]、自然免疫応答における PQBP1 の機能については不明な点が残されている。

## 2．研究の目的

細菌及びウイルス DNA に対する自然免疫応答における PQBP1 の機能について理解するために、cGAS 依存性の I 型 IFN 産生を誘導する DNA と PQBP1 の相互作用について明らかにすることを本研究の目的とした。

## 3．研究の方法

ゲルシフトアッセイを用いて PQBP1 と DNA の相互作用を調べた。PQBP1 と DNA を混合した後、氷上で 30 分間インキュベートし、8% アクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。サンプルをアプライする前に定電圧 (100V) で 10 分間のプレランを行い、その後サンプルをアプライした。泳動後にゲルを臭化エチジウムで染色し、DNA のバンドを観測した。

## 4．研究成果

本研究では、PQBP1 の DNA 結合特性を明らかにするとともに、PQBP1 がさまざまな種類の DNA と相互作用することを明らかにした。

最初に、26 mer、70 mer の一本鎖 DNA、50 mer の二本鎖 DNA を用いて PQBP1 と DNA の相互作用解析を行った。26 mer の一本鎖 DNA は Y-form DNA と呼ばれ、一本鎖でステムループ構造をとる配列が含まれている [5]。また、Y-form DNA には不對のグアノシンが含まれており、このような DNA 配列が cGAS を高度に刺激し、その酵素活性を特異的に高めると報告されている [5]。70 mer の一本鎖 DNA は、ステムループ構造をとる HIV-1 由来の DNA 配列である。HIV-1 由来の DNA 配列は、SL1、SL2、SL3 と呼ばれる 3 つのステムループ構造を持つが、SL2 が cGAS 依存性の免疫応答を最も強く誘導する [5]。今回の実験では SL2 に相当する 70 mer の一本鎖 DNA を用いた。50 mer の二本鎖 DNA は、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 由来の DNA 配列であり、ヒト単球細胞株 THP-1 細胞において I 型 IFN 産生を誘導することが示されている [6]。この二本鎖 DNA は通常の二重らせん構造をとる。本研究では、PQBP1 がこれらの DNA と相互作用するのかを調べるために、ゲルシフトアッセイを用いた相互作用解析を行った。その結果、PQBP1 は用いた 3 つの DNA のいずれとも結合し、HIV-1 由来の一本鎖 SL2 (70 mer)、枯草菌由来の二本鎖 DNA (50 mer)、一本鎖 Y-form DNA (26 mer) の順に結合親和性が高いことが分かった。

PQBP1 の DNA 結合が DNA の配列及び長さに依存するのについても調べた。その結果、

PQBPI と DNA の相互作用に配列依存性はないが、長さ依存性があり、DNA が長くなるに伴い結合親和性が高くなることが分かった。また、全ての長さの DNA において、一本鎖 DNA は同じ長さの二本鎖 DNA より結合親和性が高いことが分かった。さらに、反応溶液中の塩濃度を変えてゲルシフトアッセイを行った結果、PQBPI と DNA の結合には静電的相互作用が重要であることが示された。

PQBPI は、WW ドメイン (WWD)、極性ドメイン (PRD) 及び C 末端ドメイン (CTD) の 3 つの機能ドメインを有する [7]。PQBPI は天然変性タンパク質 (intrinsically disordered protein; IDP) であり、生理的条件下において WWD は構造をもつが、PRD と CTD を含む C 末端側の 180 残基以上の領域は長い天然変性領域 (intrinsically disordered region; IDR) であることが分かっている [7]。265 残基の全長 PQBPI、PQBPI(1-94)、PQBPI(94-265) の DNA 結合を調べた結果、N 末端側の 1-94 残基と C 末端側の 94-265 残基の両方が一本鎖 DNA および二本鎖 DNA の結合に関与するが、構造をもつ N 末端側 1-94 残基よりも IDR の 94-265 残基のほうが DNA 結合に重要であることが示された。

#### (参考文献)

1. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*. 2013, **339**, 786-791.
2. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science*. 2013, **339**, 826-830.
3. Yoh SM, Schneider M, Seifried J, Soonthornvacharin S, Akleh RE, Olivieri KC, De Jesus PD, Ruan C, de Castro E, Ruiz PA, Germanaud D, des Portes V, García-Sastre A, König R, Chanda SK. PQBPI Is a Proximal Sensor of the cGAS-Dependent Innate Response to HIV-1. *Cell*. 2015, **161**, 1293-1305.
4. Shannon JL, Murphy MS, Kantheti U, Burnett JM, Hahn MG, Dorrity TJ, Bacas CJ, Mattice EB, Corpuz KD, Barker BR. Polyglutamine binding protein 1 (PQBPI) inhibits innate immune responses to cytosolic DNA. *Mol Immunol*. 2018, **99**, 182-190.
5. Herzner AM, Hagmann CA, Goldeck M, Wolter S, Kübler K, Wittmann S, Gramberg T, Andreeva L, Hopfner KP, Mertens C, Zillinger T, Jin T, Xiao TS, Bartok E, Coch C, Ackermann D, Hornung V, Ludwig J, Barchet W, Hartmann G, Schlee M. Sequence-specific activation of the DNA sensor cGAS by Y-form DNA structures as found in primary HIV-1 cDNA. *Nat Immunol*. 2015, **16**, 1025-1033.
6. Civril F, Deimling T, de Oliveira Mann CC, Ablasser A, Moldt M, Witte G, Hornung V, Hopfner KP. Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS. *Nature*. 2013, **498**, 332-337.
7. Takahashi M, Mizuguchi M, Shinoda H, Aizawa T, Demura M, Okazawa H, Kawano K. Polyglutamine tract binding protein-1 is an intrinsically unstructured protein. *Biochim Biophys Acta*. 2009, **1794**, 936-943.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	帯田 孝之  (Obita Takayuki)  (30578696)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・准教授    (13201)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鍋島 裕子  (Nabeshima Yuko)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・技術補佐員    (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関