

平成 22 年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790364

研究課題名 (和文) ウイルスを認識し抑制する新規分子群の単離とその機能

研究課題名 (英文) Isolation and analysis of novel molecules that recognize viral infection

研究代表者 押海 裕之 (OSHIUMI HIROYUKI)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：50379103

研究成果の概要 (和文) : C 型肝炎ウイルスや新型インフルエンザ等のウイルス感染症は個人の健康や社会全体にとって解決されるべき切実な問題である。上記のウイルスは RNA をゲノムに持つため細胞内では、ウイルス RNA を認識する受容体によって認識され I 型インターフェロンを初めとした免疫応答が誘導されウイルスを排除する。しかし、この仕組みの多くは謎であり、この仕組みを解決することが新たな治療薬や治療法開発にとって必須である。本研究では、ウイルス感染時の I 型インターフェロン産生に必要な未知の分子の探索を行い、Riplet と名付けた新たな分子と、細胞内の DDX3 と呼ばれるヘリケースがウイルスの排除に非常に重要なことを発見した。

研究成果の概要 (英文) : Human innate immune system protect host from viral infection, such as Hepatitis C virus (HCV) or swine flu, which is very harmful. Many virus genome is encoded on RNA, and thus viral RNA is recognized by human receptor molecules, which induce innate immune responses. It is expected that there are many unknown molecule that involved in innate immune responses against viral infection. We tried to isolate novel molecules that are important for host innate immune responses. We succeed to isolate a novel molecule, which we named Riplet and identify that DDX3, an intracellular RNA helicase, is involved in type I interferon production during viral infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自然免疫・ウイルス・インターフェロン・核酸・C型肝炎

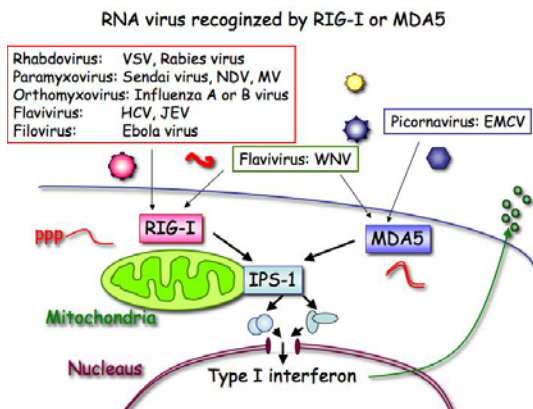
1. 研究開始当初の背景
C型肝炎訴訟問題や新型インフルエンザウイ

ルス問題、さらに数年前に流行した大学生の間での麻疹の流行。これらは全て RNA をゲ

ノムにもつウイルスの感染が原因である。また、SARS 問題やアメリカで問題になっている西ナイル熱ウイルス問題、さらに以前には、フィロウイルスを原因としたエボラ出血熱問題など、ウイルス感染に起因するこれらの問題は個人の健康や生死を脅かしさらに社会をパニックに陥れ停滞させる。このことから、これらのウイルス感染症の克服は社会的必要性が著しく高い。

本研究ではこれらのウイルス感染症の解決に大きく貢献する基礎研究を行うことを目的とした。ウイルスはヒトの細胞内に侵入すると、細胞内の RIG-I と呼ばれるヘリケース分子によって認識され、この RIG-I 分子がシグナルを出し、強い抗ウイルス作用を持つインターフェロンの産生が誘導される。一方、ウイルスはこのインターフェロン産生を阻害する機構をもつため、感染してもインターフェロンが産生されずヒトの体内から除去されずにとどまる。つまり、このインターフェロン産生機構とウイルスによる阻害機構の全容を解明すれば、ウイルスによるインターフェロン誘導阻害能力を抑えることで、ウイルスの感染を抑えることができる。

そこで、本研究では、上記の分子機構の解明を行うことを目的として研究を進めた。



2. 研究の目的

本研究の目的は上記の研究背景に記したように、1) ウイルス感染時のインターフェロン産生機構の全容の解明、また、2) ウイルスによるその阻害機構の解明を目的とした。

具体的には、上記の RIG-I がどのようにウイルスを認識しシグナルを出すかの分子機構の全容が解明されていなかったことから、まず、この RIG-I と結合する分子の単離を目的とした。さらに、そこから単離された分子の機能を試験管内の解析から明らかにすることで、ウイルス感染時のインターフェロン産生の全容の解明を試みた。

次に、そこで解明された機構をウイルスがどのように阻害するかを、同じく試験管内での解析から明らかにすることを試みた。

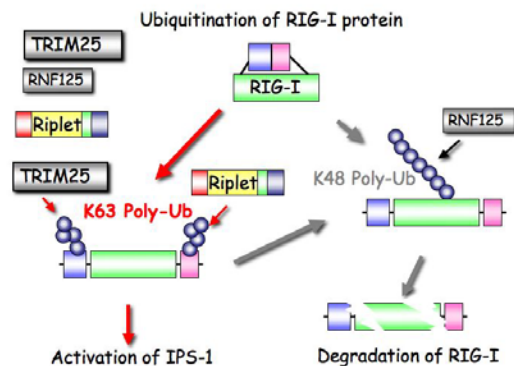
3. 研究の方法

上記の RIG-I と結合する分子の単離方法としては出芽酵母の Two-hybrid 法を用いた。これは、蛋白質間相互作用を指標に未知の分子をスクリーニングできる方法である。スクリーニングの候補分子とした h、ヒトの肺組織由来の cDNA ライブラリーを用いた。

また、試験管内での解析では、免疫沈降法により RIG-I 等との分子間の結合を確認し、また細胞内の分子の極在では、共焦点レーザー顕微鏡を用いた。インターフェロン産生の検出としては、ルシフェラーゼをレポーターとしたレポーター法による簡便な方法に加えて、細胞内のインターフェロン遺伝子 (IFN-beta, IFN-alpha) の mRNA 量を逆転写後の定量 PCR 法により測定した。

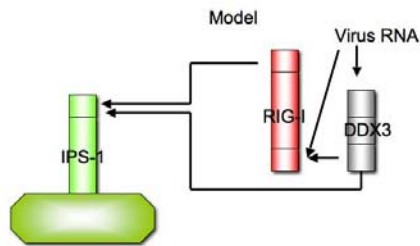
4. 研究成果

興味深いことに、RIG-I と結合する分子として新規分子を単離することに成功し、この分子を新たに Riplet と命名した。Riplet は RIG-I をユビキチンと呼ばれる小さな蛋白質修飾を行うユビキチンライゲースであることがわかった。また、興味深いことに、Riplet は RIG-I の活性化を促進し、その過程においてユビキチン活性が必要であることが解明された。

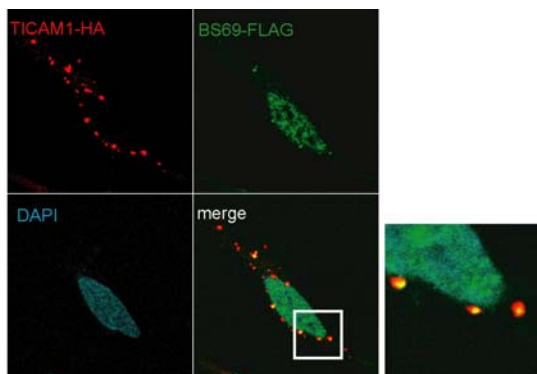


一方、細胞内の DDX3 と呼ばれる分子は以前から知られていたが、本研究では、この DDX3 分子が実は RIG-I 経路で働く因子であることを発見した。この DDX3 は RIG-I とその下流のアダプター分子の MAVS 分子と結合し、これらの分子からのシグナルの増強に働くことが明らかとなった。

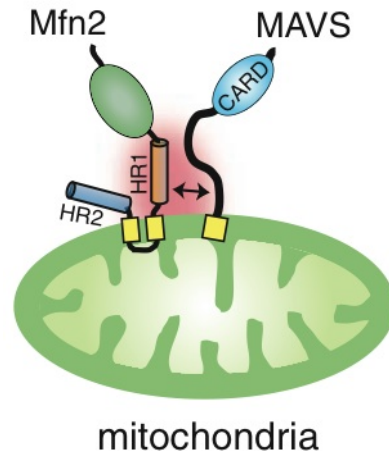
また、これら以外にも本研究では BS69 と呼ばれる分子がインターフェロン産生に関与すること等、インターフェロン産生の分子機構の解明を大きく促進した。



また、我々は EV ウイルスの LMP1 分子と結合し、EV ウイルス感染時の腫瘍形成の促進に働いてしまうヒトの BS69 分子の本来の役割として、実は、ウイルス感染時に核から細胞室へと移行し、TLR3 分子により I 型インターフェロン産生能を上昇させることを明らかにした。下の図は、細胞質に移行した BS69 分子が、細胞内の TLR3 のアダプター分子 TICAM-1 と共局在している様子を示している。細胞内の同じ場所に BS69 分子と TICAM-1 分子が存在するため、顕微鏡ではその場所が黄色く光って見える。



興味深いことに、ウイルス感染時には細胞内のミトコンドリアが重要な働きをする。これはミトコンドリア外膜上に存在する MAVS 分子が、細胞内のウイルスセンサーの RIG-I や MDA5 分子からのシグナルを伝達するからである。我々は、この過程に関わる分子としてこれまでミトコンドリアに存在すると知られていたマイトフュージン 2 (Mfn2) 分子が重要な働きをすることを明らかにした。下記の図は、その模式図である。



逆に、ウイルスによるインターフェロン産生の阻害機構に於いては現在進行中であり、本報告書では記載できないが、近々成果を発表する予定である。

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)

- 1 押海裕之 以下 3 名省略 DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN-beta inducing potential. *European Journal of Immunology*, 査読有り、40 巻、2010、940-948
- 2 笹井美和、立松恵、押海裕之、以下 4 名省略、Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Molecular Immunology* 査読あり、47 巻、2010、1283-1291
- 3 高木宏美、押海裕之 以下 4 名省略 Oligomerized TICAM-1 (TRIF) in the cytoplasm recruits nuclear BS69 to enhance NF-kappaB activation and type I IFN induction. *European Journal of Immunology*, 査読あり、39 巻、2009、3469-3476
- 4 押海裕之、他 12 名省略 (13 人中 3 番目) Collaborative action of Brcal and CtIP in elimination of covalent modifications from double-strand breaks to facilitate subsequent break repair. *Plos Genetics* 査読有り、6 巻、2009、e1000828
- 5 安川開、押海裕之、以下 6 名省略、Mitofusin 2 inhibits mitochondrial

- antiviral signaling. Science Signaling
査読有り、2巻、2009、ra47
- 6 押海裕之、以下3名省略、Riplet/RNA135,
a RING Finger Protein, Ubiquitinates
RIG-I to promote Interferon- β induction
during the Early Phase of Viral
Infection. JBC 査読有り、284巻、
2009、807-817
- 7 押海裕之、以下3名省略、Regulator of
complement activation (RCA) gene
cluster in *Xenopus tropicalis*.
Immunogenetics 査読有り、61巻、20
09、371-384
- 8 松尾綾、押海裕之、以下6名省略、Teleost
TLR22 recognizes RNA duplex to induce
IFN and protect cells from birnaviruses.
Journal of Immunology 査読有り、181
巻、2008、347-385

[学会発表] (計3件)

- 1 押海裕之、ウイルス感染時のRIG-I分子を
介したDDX3 ヘリケースによるI型インター
フェロン産生シグナルの促進機構とC型
肝炎ウイルスコア蛋白質による抑制機構
の解明、日本分子生物学会、2009年1
2月11日、神奈川県
- 2 押海裕之、DDX3 RNA helicase associates
with RIG-I and IPS-1, and Hepatitis C
virus core protein blocks the
interaction of DDX3 with IPS-1 to
suppress the type I interferon
production、日本免疫学会、2009年1
2月3日、大阪府
- 3 押海裕之、RNAヘリケースのDDX3 はウイル
ス感染時のIPS-1 分子に依存したI型イン
ターフェロン産生に関与する、日本免疫学
会、2008年12月3日、京都府

6. 研究組織

(1) 研究代表者

押海 裕之 (OSHIUMI HIROYUKI)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：50379103

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：