

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07069

研究課題名（和文）新型コロナウイルスに対する自然免疫応答の解明

研究課題名（英文）The innate immune response to novel coronaviruses

研究代表者

幸脇 貴久（Kouwaki, Takahisa）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教

研究者番号：90780784

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：新型コロナウイルス流行は社会を停滞させ国民の生命を脅かした。申請者は本研究課題において、新型コロナウイルスの自然免疫認識機構の解明と新型コロナウイルスが持つ自然免疫回避機構の解明を試みた。その結果、新型コロナウイルスはRIG-I様受容体に認識されることを見出した。さらに新型コロナウイルスの遺伝子にコードされているアクセサリータンパク質が宿主の自然免疫を抑制していることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではRIG-IとMDA5の両方が新型コロナウイルスゲノムを認識し得ることを示した。その一方で、新型コロナウイルスのゲノム由来の蛋白質は強力に宿主のインターフェロン産生を抑制していることも発見した。このようなウイルスの生存戦略を明らかにすることは、新型コロナウイルス患者の免疫応答の理解や治療戦略を策定する上で重要な知見となることから意義深いと考える。

研究成果の概要（英文）：The novel coronavirus pandemic has caused social stagnation and threatened the lives of the public. In this research project, I attempted to elucidate the innate immune recognition mechanism of novel coronaviruses and the innate immune evasion mechanism of novel coronaviruses. As a result, I found that novel coronaviruses are recognized by RIG-I-like receptors. Furthermore, I found that an accessory protein encoded in the novel coronavirus gene suppresses the innate immunity of the host.

研究分野：自然免疫

キーワード：自然免疫 新型コロナウイルス

1. 研究開始当初の背景

自然免疫応答は宿主防衛の最前線で働く。宿主細胞に侵入したウイルスはウイルス核酸レセプターによって認識される。RIG-I 様受容体 (RLR) である RIG-I と MDA5 は、細胞質ウイルス RNA センサーであり、ウイルス二本鎖 RNA を認識し、I 型インターフェロン産生を含む抗ウイルス応答を誘導するシグナルを誘導する。RIG-I と MDA5 は 2 つの caspase activation and recruitment domains (CARD)、ヘリケースドメインと C-terminal domain (CTD) を持っている。CARD ドメインはシグナルのトリガーとして重要で、ヘリケースドメインと CTD は RNA との結合に必要である。RIG-I の CTD は RIG-I の機能を制御する役割もあり、非活性状態では CARD の活性化を抑制している。RIG-I がウイルスを認識すると、RIG-I はウイルス RNA の周囲に集まり、CTD の CARD の抑制が外れる。RIG-I-dsRNA のヌクレオフィラメント形成は RIG-I N 末端の CARD ドメインのフィラメント形成を促進する。RIG-I の CARD ドメインのフィラメント形成にはユビキチン化も必要であることが報告されている。当研究室では、RIG-I の活性化に必須なユビキチン化酵素の Riplet を同定している。ユビキチン化によりフィラメント形成した RIG-I は MAVS の CARD にリクルートされ MAVS 同士が凝集しプリオン様繊維形成を促進する。凝集体を形成した MAVS は TBK1 や IRF3 を活性化し、インターフェロンを誘導する。

2. 研究の目的

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス-2 (SARS-CoV-2) は、全世界でパンデミックを引き起こした。しかし、SARS-CoV-2 に対する自然免疫応答における自然免疫の役割は完全には解明されていない。また、マウスモデルやヒト細胞における実験では、SARS-CoV-2 感染によるインターフェロン誘導が弱いことが報告されているが、その理由はわかっていない。そこで申請者は SARS-CoV-2 に対するウイルス核酸認識機構の解明を行なった。さらにインターフェロン誘導が減弱する要因として、ウイルスが宿主免疫を回避しているという仮説をたて、ウイルスによる自然免疫回避メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、SARS-CoV-2 を入手し熊本大学に設置された BSL3 施設において感染実験を行なった。具体的な手法として、SARS-CoV-2 の RNA フラグメントを合成しレポーター法でインターフェロン誘導能を評価した。また、遺伝子の発現や蛋白質への翻訳の影響を調べるために qPCR 法やウエスタンブロット法を用いた。蛋白質の相互作用を調べるために免疫沈降法を用いた。ウイルス感染における RLR の重要性を証明するために、CRISPR-Cas9 法によって遺伝子欠損細胞を作製し、自然免疫応答を評価した。

4. 研究成果

(1) SARS-CoV-2 感染細胞の細胞質 RNA は RIG-I と MDA5 を活性化させる

まず、ヒト細胞が SARS-CoV-2 感染細胞の細胞質 RNA に応答できるかどうかを調べた。VeroE6/TMPRSS2 細胞を SARS-CoV-2 (JPN/TY/WK-521) に 1 日間感染させ、SARS-CoV-2 感染細胞と模擬感染細胞から全 RNA を抽出した。次に、全 RNA を HEK293 細胞にトランスフェクトした。興味深いことに、SARS-CoV-2 感染細胞の全 RNA は、HEK293 細胞における IFN- β 、Ccl5、および IP-10 の mRNA 発現を増加させたが、非感染細胞の RNA は増加させなかった (図 1A-C)。RIG-I と MDA5 は主要な細胞質ウイルス RNA センサーであることから、CRISPR-Cas9 システムを用いて RIG-I と MDA5 のノックアウト HEK293 細胞を作製した。DNA 配列決定によって RIG-I と MDA5 の変異を確認したところ、RIG-I と MDA5 タンパク質の発現はほとんど検出できなかった (図 1D)。次に、サイトカイン発現に対する RIG-I KO および MDA5 KO の影響を調べた。興味深いことに、RIG-I KO は IFN- β と Ccl5 の mRNA 発現を著しく減少させた (図 1E-G)。MDA5

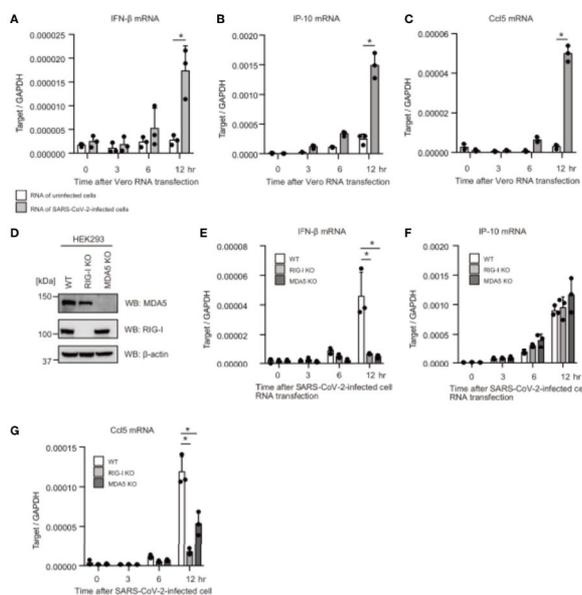


図 1 SARS-CoV-2 感染細胞の細胞質 RNA は RIG-I と MDA5 を活性化させる

KO もまた、SARS-CoV-2 感染細胞からの RNA に応答して、IFN- β と Cc15 の mRNA 発現を減少させた (図 1E-G)。これらのデータは、細胞質ウイルス RNA センサーが SARS-CoV-2 感染細胞の細胞質 RNA を認識していることを示唆している。IFN- β や Cc15 とは異なり、IP-10 の発現は RIG-I の KO や MDA5 の KO では減少しなかった (図 1F) ことから、IP-10 の発現を誘導するには RIG-I が MDA5 のどちらか一方でも十分であることが示唆された。

(2) ウイルス RNA の特定の領域が RLR に認識される

これまでの研究で、ウイルスゲノム RNA の中には、パターン認識受容体 (PRR) によって優先的に認識される病原体関連分子パターン (PAMP) RNA モチーフや構造が存在することが示されている。そこで次に、SARS-CoV-2 のウイルス RNA ゲノムのうち、PAMP モチーフや構造を含む領域について検討した。ウイルス RNA ゲノムを約 1kb ずつ 30 個の断片に分割し、各断片を T7 RNA ポリメラーゼを用いて *in vitro* で合成した。各 RNA 断片を HEK293 細胞にトランスフェクトし、RT-qPCR を用いて I 型 IFN 発現を測定した。興味深いことに、24001-25000 または 27001-28000 を含む 2 つのウイルス RNA 断片は、I 型 IFN 発現を有意に誘導した (図 2A)。

I 型 IFN を誘導する領域をさらに調べるために、24001-25000 断片をさらに約 200 塩基ずつ 5 つの断片に分割した。しかし、24401-24600 または 24801-24500 を含む断片は IFN- β mRNA 発現を誘導しなかったが、他のウイルス RNA ゲノム断片は IFN- β mRNA 発現を誘導した (図 2B)。次に、27001-28000 断片を 5 つの断片に分割し、各断片を HEK293 細胞にトランスフェクトした。27201-27400 領域は I 型 IFN 発現を誘導できなかったが、他の領域は IFN- β mRNA 発現を誘導した (図 2C)。24001-24400 および 27601-28000 断片内には、予測される長いステム領域が存在し (図 2B、C) これは RIG-I が dsRNA に沿って集合するという考え方と一致する。24001-25000 断片の最初の 200 塩基を欠失させると、IFN- β mRNA の発現が著しく減少した (図 2D)。これらのデータは、ウイルス RNA 領域 24001-24200 が RLR による認識に重要であることを示唆している。他の領域も

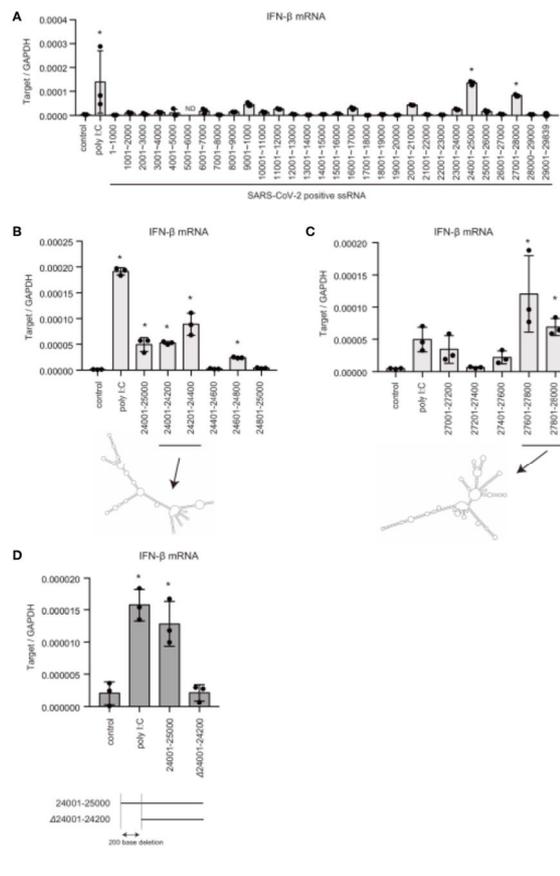


図 2 ウイルス RNA の特定の領域が RLR に認識される

PRR によって認識される可能性は否定できない。

(3) ウイルス由来の蛋白質は宿主のインターフェロン誘導に必要な蛋白質を阻害する

また、ウイルス感染後のサイトカイン発現についても検討した。コントロールには、SARS-CoV-2 と比較するために、インフルエンザ A ウイルスとセグアイウイルス (SeV) を用いた。インフルエンザ A ウイルスまたはセグアイウイルス感染後、ウイルス RNA レベルは細胞内で増加し、IFN- β mRNA 発現が誘導された (図 3A、B)。以前の研究で、HEK293T 細胞は SARS-CoV-2 感染に中程度感受性であることが示されている。我々は、SARS-CoV-2 感染後、HEK293 細胞において細胞質ウイルス RNA レベルが増加することを見いだした。しかしながら、IFN- β mRNA レベルは増加しなかった (図 3C)。IP-10 および Cc15 の mRNA レベルも、ウイルス感染によって増加しなかった (図 3C)。次に、ヒト肺上皮細胞株 A549 を用いた。SARS-CoV-2 感染もまた、A549 細胞における IFN- β mRNA レベルを増加させることができなかった (図 3D)。以前の研究で、ヒト細胞における ACE2 の過剰発現は、SARS-CoV-2 に対する感受性を増加させることが示

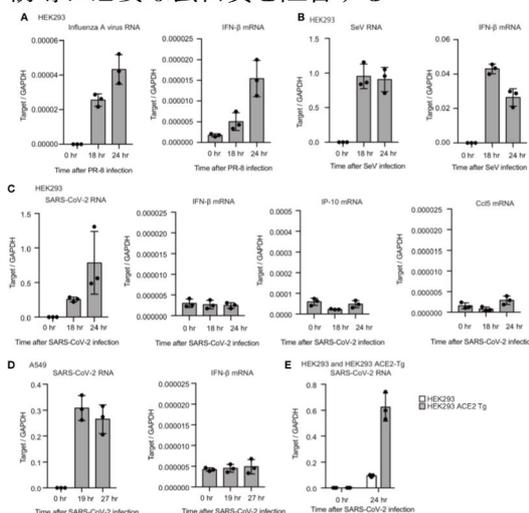


図 3 SARS-CoV-2 はインターフェロンを誘導を阻害している

された。報告されたように、ACE2 の過剰発現は、WT HEK293 細胞と比較して SARS-CoV-2 レベルを顕著に増加させた (図 3E)。SARS-CoV-2 感染は、ACE2 過剰発現 HEK293 細胞ではサイトカイン発現をわずかに増加させただけであった。

そのメカニズムを明らかにするため、ウイルスタンパク質をクローニングし、ヒト細胞で発現させ、RIG-I と MDA5 を介したシグナル伝達に対するウイルスタンパク質の影響を調べた。興味深いことに、ウイルス 7a、7b、8、9b、14 タンパク質の過剰発現は、RIG-I を介する IFN- β プロモーター活性を低下させた (図 4A)。ウイルス 3CL タンパク質もまた、RIG-I および MDA5 を介する IFN- β プロモーター活性を低下させた (図 4B)。TBK1 は、RIG-I および MDA5 を介した I 型 IFN 発現に重要な役割を果たすプロテインキナーゼである。次に、TBK1 に対するウイルスタンパク質の影響を調べた。TBK1 の過剰発現は、TBK1 の自己活性化を引き起こし、IFN- β プロモーターの活性化を誘導した (図 4C)。ウイルス 7a を発現させると、TBK1 を介した IFN- β プロモーター活性を低下させることができたが、ウイルス 7b、8、9b、14、3CL は活性を低下させることができなかった (図 4C)。ウイルス 7a、7b、8、9b、14 は、SARS-CoV-2 ウイルス RNA 断片によって誘導される IFN- β プロモーター活性を低下させることが確認された (図 4D)。これらのデータは、ウイルス 7a、8、9b、14、および 3CL タンパク質が、RLR を介したシグナル伝達を抑制できることを示唆している；また、ウイルス 7a は TBK1 またはその下流因子を標的としている (図 4E)。

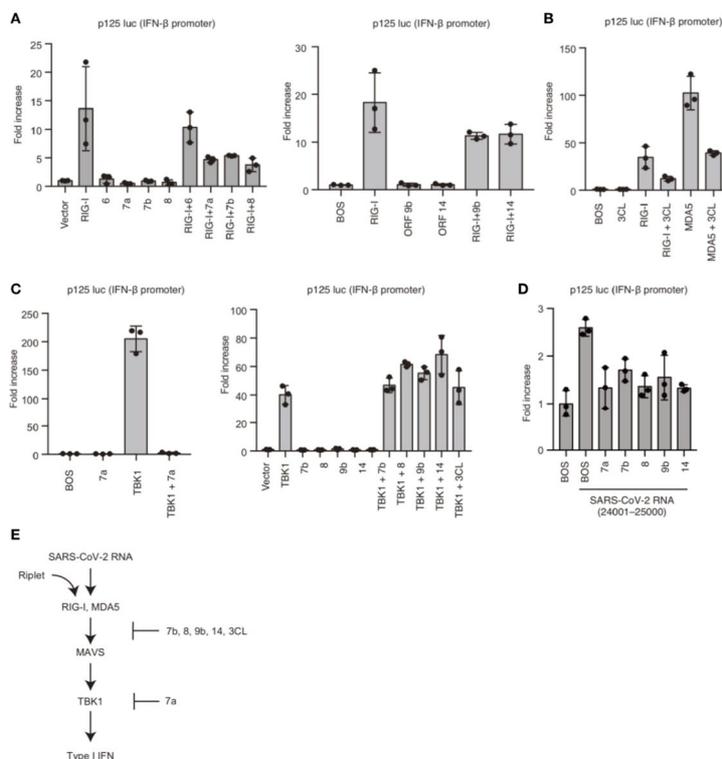


図 4 SARS-CoV-2 のタンパク質が自然免疫シグナルを阻害している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahisa Kouwaki †, Tasuku Nishimura †, Guanming Wang and Hiroyuki Oshiumi*	4. 巻 12
2. 論文標題 RIG-I-Like Receptor-Mediated Recognition of Viral Genomic RNA of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 and Viral Escape From the Host Innate Immune Responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmmu.2021.700926	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 幸脇 貴久
2. 発表標題 RIG-I様受容体によるSARS-CoV2 RNA認識機構とウイルスによる自然免疫抑制機構の解明
3. 学会等名 第32回日本生体防御学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------