

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890004

研究課題名（和文） ウイルスRNA認識センサーMDA5の機能解明

研究課題名（英文） Functional analysis of viral RNA recognition sensor MDA5

研究代表者

足立 義博クリストファー（ADACHI YOSHIHIROKURISUTOFUA）

北海道大学・遺伝子病制御研究所・博士研究員

研究者番号：10616204

研究成果の概要（和文）：

ウイルスが細胞へ侵入する際、宿主細胞の細胞質においてRIG-IやMDA5がウイルス特有の二重鎖RNAを認識し、自然免疫系を賦活化させることが知られている。本研究ではこれまでに長鎖二重鎖RNAと会合するSCI2を新たに見出した。また、SCI2が細胞内RNA（poly I:C）により活性化される自然免疫経路における「正の制御因子」としての役割が示唆された。さらにRNAウイルス感染を用いてSCI2がIFN β 誘導発現に大きく関与している重要な因子である事が明らかになった。さらに同様に長鎖二重鎖RNAを認識するMDA5とSCI2は会合する事が明らかになった。この事は、SCI2はMDA5の調整因子としての働きを持っている事が考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Previous reports shown that RIG-I-like receptor, includes RIG-I, MDA5 senses the presence of virus specific double-strand RNA (dsRNA), thereby activating innate immune system in the cells invaded by virus. Here our study identified that SCI2 bind with Polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C), subsequent serve as positive regulatory molecule in the downstream innate immunity-related inflammatory pathways. Our data, moreover, not only show SCI2 plays a potent role for stimulating IFN activation during viral infection, but bind with MDA5, sensor of poly I:C, suggesting that SCI2 participate in the regulation of MDA5-mediated antiviral innate immunity.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2012年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：自然免疫、MDA5

1. 研究開始当初の背景

近年新型インフルエンザが問題となっているが、インフルエンザをはじめとする感染症はこれまで人類の歴史を支配してきたといっても過言ではないほど古くからの大きな問題である。如何に微生物をコントロールできるかが鍵であり、そのため微生物に対する感染防御機構の解明は非常に重要な課題である。このような背景のもとで、生体に感染した際に、その最前線において免疫細胞が病原微生物を認識する機構は感染防御応答を惹起する上で最も初めの重要なプロセスであると認識される。

我々脊椎動物における感染防御は、自然免疫系とそれにつづく適応免疫系の2つのシステムから構成されている。まず自然免疫系は、自らの生体分子の構造とわずかに異なる病原体の分子を精巧な分子メカニズムをもつセンサータンパク質によって認識する。この「如何にして生体は病原微生物を認識するか?」ということに関わる分子メカニズムを理解することで、病原体に対する感染予防・治療法の新しい局面からの開発が期待される。またこのような自然免疫の活性化は適応免疫系の効率のよい活性化を誘導することにつながり、より強力な免疫応答を起こすことで病原体の排除が行われることになる。本研究では、ウイルスが宿主細胞へ侵入した初期の防御反応(自然免疫系)における病原体認識機構に着目した。

多くの RNA ウイルスは宿主細胞の細胞質へ侵入した際、細胞質内のセンサータンパク質 RIG-I や MDA5 がウイルスを認識し自然免疫系を誘導させることが近年明らかになった (M. Yoneyama et al., *Nat. Immunol.* 5, 730 (2004); M. Yoneyama et al., *Immunol. Rev.* 227, 54 (2009); O. Takeuchi et al., *Immunol. Rev.* 227, 75 (2009))。RIG-I や MDA5 は、ウイルスに特有である二重鎖 RNA の構造を認識するが、RIG-I と MDA5 は認識する二重鎖 RNA の長さが異なり、それにより認識するウイルスの種類が異なることが考えられている (H. Kato et al., *Nature* 441, 101 (2006))。RIG-I の認識する二重鎖 RNA が、数 10 から 300 塩基対であるのに対し、MDA5 は数 100 塩基対以上で非常に長い (H. Kato et al., *J. Exp. Med.* 205, 1601 (2008))。

一方で、北海道大学の稲垣氏らにより RIG-I をはじめ、MDA5 の RNA 認識に関する分子機構の解析について報告されている (K. Takahashi et al., *J. Biol. Chem.* 284, 17465 (2009))。

2. 研究の目的

ウイルスが細胞へ侵入する際、宿主細胞の細胞質において RIG-I (retinoic acid-inducible gene-1) や MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) がウイルス特有の二重鎖 RNA を認識し、自然免疫系を賦活化させることが知られている。RIG-I は短鎖、MDA5 は長鎖を特異的に認識することが知られているが、RIG-I と MDA5 の二重鎖 RNA の認識に関わる領域は相同性があり、この領域だけで短鎖と長鎖を区別しているしくみは説明しがたい。おそらく MDA5 には長鎖を認識するための何らかの新しい機構がさらに存在していると考えられる。この点については十分に解明されていない。本研究では、MDA5 とともに長鎖二重鎖 RNA を認識するタンパク質が存在することを想定し、分子機構の詳細を解明する。さらに MDA5 経路を活性化させるウイルスに対する感染防御の分子基盤の一端を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 長鎖二重鎖 RNA と結合する新規タンパク質の同定。

長鎖二重鎖 RNA (poly I:C) 末端をビオチン化し、担持体ストレプトアビジン融合ビーズに固定し、pull-down assay を行った。

(2) 長鎖二重鎖 RNA を結合する新規タンパク質の自然免疫活性化に関する *in vitro* の検証。

得られた新規タンパク質のうち、自然免疫系に関わる可能性のあるタンパク質を文献やモチーフ検索を行うことで選定し、その DNA をヒトの細胞からクローニングする。培養細胞導入用のベクターや RNA 干渉用の siRNA を作製し、このタンパク質を強発現あるいはノックダウンした細胞で poly I:C 刺激後に自然免疫系が活性化されたことを示す指標となる I 型インターフェロン (IFN) や炎症性サイトカイン・ケモカインの産生量や mRNA 発現量を ELISA や定量的 RT-PCR を用いて検討する。

(3) RNA ウイルス感染における IFN β への新規タンパク質関与を検討。

siRNA を用いて SCI2 を KD したマウス胎児線維芽細胞に EMCV、NDV を感染させ IFN β の誘導発現を qPCR、ELISA で検討する。

(4) 長鎖二重鎖 RNA を認識する MDA5 と SCI2 との相互作用の検討。

4. 研究成果

(1) 長鎖二重鎖 RNA と結合する新規タンパク質の同定。

長鎖二重鎖 RNA (poly I:C) 末端をビオチン化し、担持体ストレプトアビジン融合ビーズに固定し、pull-down assay を行った (Fig. 1A)。

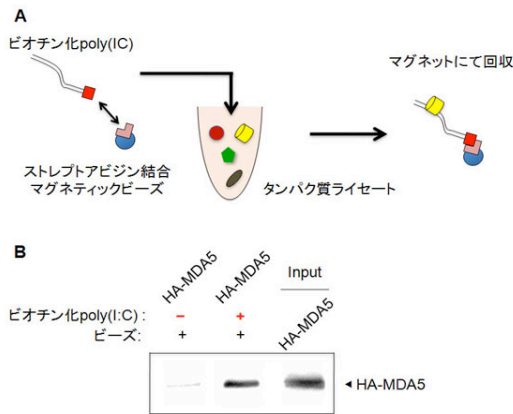


Fig. 1. Pull-down assay

また pull-down assay 機能している事を確認した (Fig. 1B)。この pull-down assay を用い長鎖二重鎖 RNA と結合する新規タンパクを検索した。さらに、得られた新規タンパク質のうち、自然免疫系に関わる可能性のあるタンパク質を文献やモチーフ検索を行うことで長鎖二重鎖 RNA と新規たんぱく質 SCI2 が会合する事を明らかにした (Fig. 2)。

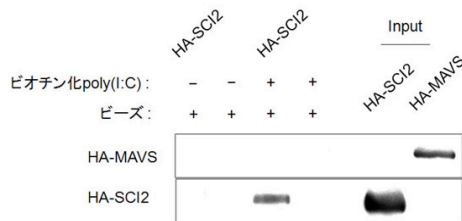


Fig. 2. pull-down assayによる新規RNA結合タンパクの同定

(2) 長鎖二重鎖 RNA を結合する新規タンパク質の自然免疫活性化に関する in vitro での検証。

ヒト胎児腎臓細胞 (HEK293T) を用い新たに見出した新規たんぱく質 SCI2 を過剰発現することで自然免疫系に与える影響を qPCR を用いて検討した。その結果 SCI2 を過剰発現すると自然免疫系のサイトカインである IFN- α 1、IFN- β 、IL-6、TNF- α が誘導され、自然免疫系が活性化する事が明らかになった (Fig. 3)。

さらに同様に HEK293T 細胞を用い SCI2 をノックダウンした系においても SCI2 をノックダウンすることで自然免疫系のサイトカイン IFN- β 、IL-6 の誘導が抑制されることが明らかになった (Fig. 4)。

これらの結果から SCI2 はウイルスが細胞に侵入を防御する自然免疫機構において非常に重要な役割を担っている事が明らかにさ

れ、SCI2 が細胞内 RNA (poly I:C) により活性化される自然免疫経路における「正の制御因子」としての役割が示唆された。

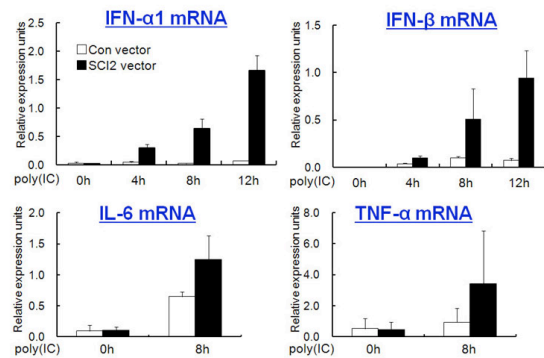


Fig. 3. 過剰発現系を用いた細胞内 RNA (POLY(I:C))によるサイトカイン誘導の検討

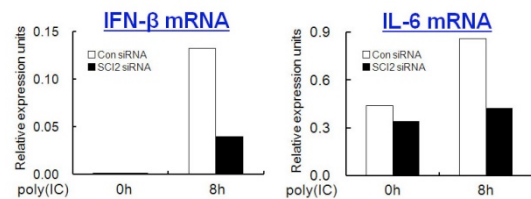


Fig. 4. ノックダウンの系での細胞内 RNA (POLY(I:C))によるサイトカイン誘導の検討

(3) RNA ウイルス感染における IFN β への新規タンパク質関与を検討。

siRNA を用いて SCI2 を KD したマウス胎児線維芽細胞 (MEF) に EMCV、NDV を感染させ IFN β の誘導発現を ELISA で検討した。その結果、SCI2 を KD した細胞株での IFN β 誘導発現が著しく低下した (Fig. 5)。

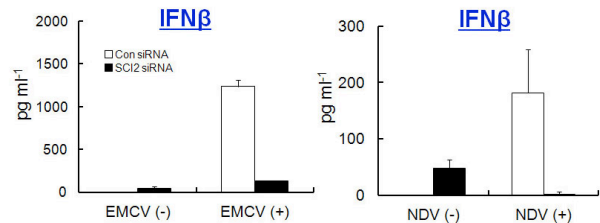


Fig. 5. RNAウイルス感染によるサイトカイン誘導の検討 (SCI2 siRNA)

この事は SCI2 がウイルス感染時の IFN β 誘導発現に大きく関与している重要な因子である事が明らかになった。

(4) 長鎖二重鎖 RNA を認識する MDA5 と SCI2 との相互作用の検討。

さらに詳細な SCI2 の機能解明のために SCI2 と MDA5 の相互作用について検討を行った結果、SCI2 と MDA5 が会合する事が明らかになった (Fig. 6)。

この事から SCI2 の機能は長鎖二重鎖 RNA を SCI2 が認識し、MDA5 へ伝達される Pathway なのか、もしくは SCI2 は MDA5 の必須アダプター因子なのかという新たな検討価値のある疑問ができた。しかし、SCI2 の自然免疫系のサイトカインを誘導能力を考えると非常に重要な因子であり、新たな MDA5 伝達経路の解明につながる事が考えられる。

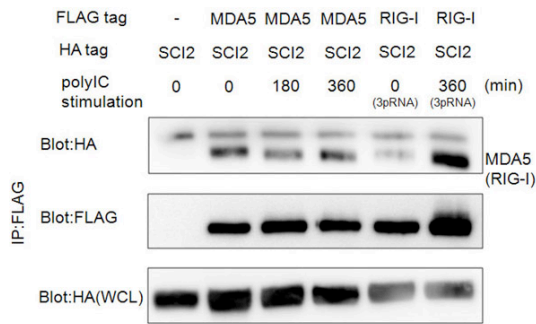


Fig. 6. MDA5とSCI2との会合検討

今回の結果から新規同定タンパクは自然免疫系に必須とも考えられる自然免疫系のサイトカインの誘導に関与している事が明らかになった。この事は自然免疫の観点から非常に大きな発見であり、新たなウイルス感染から身を守る新たなアジュバントとしても開発の価値があると考えられる。さらに自己免疫疾患や炎症瀦疾患といった病態解明にもつながる事が考えられる。

今後の検討課題としては、SCI2 と長鎖二重鎖RNAがMDA5を介して結合しているのかを検討するために、MDA5 KD を用い SCI2 と長鎖二重鎖の結合を検討。さらに MDA5 との直接結合かを明らかにするために SPR を使用して検討する事を考えている。また、その際に SCI2 と MDA5 の結合部位も検討する事を考えている。

5. 主な発表論文等
なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 義博 クリストファー

(ADACHI YOSHIHIROKURISUTOFUA)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・博士研究員

研究者番号：10616204