

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590570

研究課題名(和文) ウイルスによる自然免疫の活性化と抑制の新たなメカニズム

研究課題名(英文) Novel molecular mechanisms of antiviral innate immune response

研究代表者

押海 裕之(Oshiumi, Hiroyuki)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・准教授

研究者番号：50379103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：パンデミックインフルエンザやエボラ出血熱など、ウイルス感染症の問題は個人の健康だけではなく、社会の停滞やパニックを引き起こす親告な問題である。強い抗ウイルス作用を持つI型インターフェロン(I FN)は、ウイルス感染後に、自然免疫応答により産生される。本研究では、この自然免疫応答の分子機構の研究を進め、ウイルス感染時にはRipletユビキチンリガーゼやR10K3キナーゼ分子が自然免疫応答を制御することを発見した。これらの成果は、創薬の為の新たな分子標的の同定に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Innate immune response is essential for controlling viral infection. Cytoplasmic viral RNA is recognized by RIG-I-like receptors (RLRs) including RIG-I and MDA5. RLRs trigger the signal to induce type I IFN production, which possesses strong antiviral activities. We revealed that the Riplet ubiquitin ligase mediates K63-linked polyubiquitination of RIG-I C-terminal region, resulting in type I IFN expression. Interestingly, we found that Hepatitis C virus, which is a major cause of hepatocellular carcinoma, suppress Riplet activity in order to escape host innate immune response. R10K3 is a protein kinase, and our study revealed that R10K3 phosphorylates MDA5 C-terminal region, which resulted in abrogation of MDA5 multimer formation required for type I IFN expression. These findings provided an important insight into the molecular mechanism of antiviral innate immune response.

研究分野：分子生物学

キーワード：ウイルス 自然免疫 インターフェロン C型肝炎

1. 研究開始当初の背景

パンデミックインフルエンザやエボラ出血熱、また、ヒトの肝癌の約7割の原因として知られるC型肝炎ウイルス等、ウイルス感染症は個人の健康と生命を脅かすだけでなく、社会の停滞や混乱を引き起こす深刻な問題である。

I型インターフェロンは強い抗ウイルス作用を持つサイトカインであり、自然免疫応答により産生される。一方で、ウイルスはこの自然免疫応答を抑制するため、宿主に感染できる。しかし、このウイルスに対する自然免疫応答と、ウイルスによるその抑制のメカニズムは十分には解明されていない。このメカニズムを解明することは、創薬の新たな分子標的の同定と、新たな治療法の開発に繋がると期待される。

C型肝炎ウイルスは、ヒトの肝癌の約7割の原因として知られる。肝癌の治療薬として使用されているI型インターフェロンは、副作用の為、これに変わる治療法が模索されている。このウイルスは、ヒトの自然免疫応答を抑制することで持続感染することが知られている一方で、その詳細なメカニズムには不明な点がまだ残っている。また、最近、C型肝炎の治療成績とIII型インターフェロン遺伝子の多型に相関があることが報告された。しかし、このIII型インターフェロンの産生機序や、その作用機序については十分に解明されていない。

細胞質内のウイルスRNAはRIG-I様受容体と呼ばれるRIG-IとMDA5により主に認識される。C型肝炎ウイルス、A型インフルエンザウイルス等は主にRIG-Iにより認識され、麻疹ウイルス等はMDA5により認識される。このRIG-IやMDA5の異常な活性化は、自己免疫疾患の原因となることが報告されており、その活性化が厳密に制御されている。我々はこれまで、RIG-Iの翻訳後修飾をになうRiplet ユビキチンリガーゼを単離し、これが、K63-ポリユビキチン鎖をRIG-Iに結合することでRIG-I活性化を誘導することを報告した。一方で、MDA5分子はリン酸化による活性制御が重要であることが報告されているが、そのリン酸化酵素は未知である。

ヘルペスウイルス等のDNAをゲノムに持つウイルスは、細胞質内のDNAセンサー分子により認識され自然免疫応答が誘導される。これまで、RNAの認識に關与するRIG-Iが、ヒト細胞ではウイルスDNAの認識を行うとの報告がある一方で、cGAMPを合成するcGAS分子のノックアウトマウスでは、DNAウイルスに対する自然免疫応答が消失することが報告されるなど、不明な点が多く残っている。

2. 研究の目的

自然免疫はウイルス増殖の抑制に必須である。しかし、その分子機構は十分には解明

されていない。一方で、ウイルスはこれらの自然免疫応答を抑制する。

このウイルスに対する自然免疫応答と、ウイルスによる自然免疫抑制の分子機構を解明することは、ウイルス感染症の新たな治療法の開発や創薬の基礎として重要である。我々はこれまで、細胞質内のウイルス認識の分子機構の研究を進め、本研究では、我々の研究成果をさらに発展させ、ウイルスに対する自然免疫応答の新たな分子機構の解明と、ウイルスによる抑制の新たな分子機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

ウイルスとしてC型肝炎ウイルスやA型インフルエンザウイルスや水泡性口炎ウイルスを用い、培養細胞としては、ヒトやマウスの株化した細胞や、マウスより単離した脾細胞などを用いた。解析方法として、免疫沈降や共焦点顕微鏡による細胞内局在の観察などの分子生物学的手法に加え、産生されるサイトカイン量の定量や、免疫細胞の活性化の測定などの免疫学的手法により研究を行った。

4. 研究成果

(1) Riplet ユビキチンリガーゼによるRIG-I活性化機構

細胞質内のウイルスRNAセンサーであるRIG-Iは、ウイルス由来の二重鎖RNAを認識すると、ポリユビキチン修飾を受ける。この時、ユビキチンの63番目のリジンを介したポリユビキチン鎖が付加されると、RIG-Iは活性化し、I型インターフェロンの産生が誘導される。このポリユビキチン化にはTRIM25と呼ばれるユビキチンリガーゼと、我々がRipletと名付けたユビキチンリガーゼの両方が関与する。しかし、その役割分担は不明確であった。

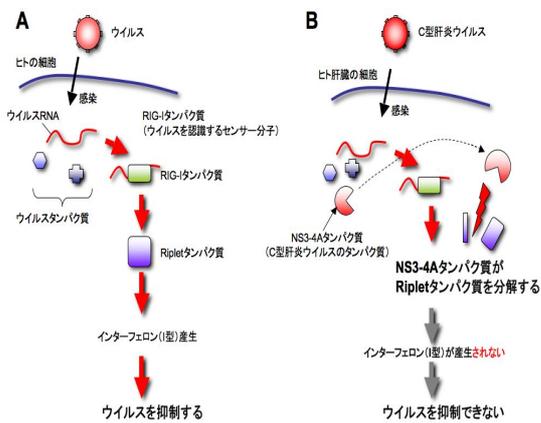
そこで、この役割の違いを詳細に調べたところ、RIG-IがウイルスRNAと結合すると、まず、RIG-IのC末端が、Ripletによりポリユビキチン化され、その後、TRIM25によりさらに、RIG-IのN末端のCARDs領域がポリユビキチン化されることが明らかとなった。

(2) C型肝炎ウイルスによるRiplet ユビキチンリガーゼの分解機構の解明

このRIG-Iは、ヒトの肝癌の約7割の原因となるC型肝炎ウイルス(Hepatitis C virus: HCV)を認識する。RIG-IがHCVの3'非翻訳領域に存在するpolyU/UC配列を認識しI型インターフェロン産生を誘導するが、HCVのNS3-4AプロテアーゼはこのRIG-IによるI型インターフェロン産生を抑制することが知られている。これまで、このNS3-4Aプロテアーゼは、RIG-Iのアダプター分子であるMAVS分子を切断し、MAVSをミトコンドリア外膜上から遊離させることで、RIG-I依存的なシグナルを阻害すると考えられ、これが、

HCV がヒトの肝細胞内で数十年に亘り持続感染する原因であると思われていた。しかし、最近の研究から、持続感染しない A 型肝炎ウイルスのタンパク質も、MAVS タンパク質を切断することが明らかとなり、HCV の NS3-4A による MAVS の切断だけでは、HCV が自然免疫応答を抑制し持続感染する理由を説明できないことが指摘されていた。

そこで、我々はこの詳細なメカニズムを検討したところ、上記の Riplet ユビキチンリガーゼの活性中心が、HCV の NS3-4A により切断されることを発見した。これは、HCV が MAVS だけではなく、Riplet ユビキチンリガーゼ等の他の分子をも切断することで持続感染できるように自然免疫応答を抑制していることを示唆する。



図の説明
A ウイルスが感染すると、ヒトの細胞内にウイルスのRNAやタンパク質が現れます。ヒトの細胞内でウイルスを認識するセンサーはRIG-Iタンパク質です。RIG-Iタンパク質がウイルスRNAを発見すると、今度はRipletタンパク質が活性化し、Ripletタンパク質はウイルスを抑制するインターフェロン(β)の産生を誘導することでウイルスを抑制します。
B C型肝炎ウイルスは、このRipletタンパク質を分解するために、I型インターフェロンが産生されず持続感染します。

(3) C型肝炎ウイルスによる III 型インターフェロン産生機構

C型肝炎の治療効果と相関する SNP の解析から、抗ウイルス作用を持つ III 型インターフェロンの遺伝子多型が、治療効果と相関することが報告されている。

治療に用いられる I 型インターフェロンは鬱などの副作用がある。そのため、III 型インターフェロンを用いることで、I 型インターフェロンの副作用を引き起こさず治療に用いることができる可能性がある。しかし、一方で、この III 型インターフェロンの産生機構やその作用機序は十分には解明されていない。

我々は、マウス動物モデルを用い III 型インターフェロン産生機構を調べたところ、細胞質内の HCV RNA を RIG-I が認識し、III 型インターフェロン産生を誘導することを発見した。HCV に感染した肝細胞は、その放出されるエクソソーム内にウイルス RNA を含むことが知られている。興味深いことに我々はこのエクソソーム内の HCV RNA は古典的樹状細胞の TLR3 により認識され III 型インターフェロンが産生されることを発見した。

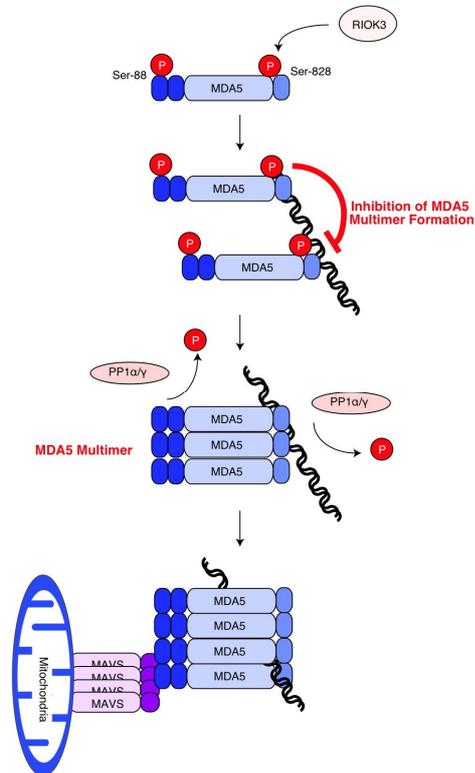
III 型インターフェロンは I 型インターフ

ェロンと同様に抗ウイルス作用を持つ。I 型インターフェロンは、NK 細胞の活性化等を介した細胞傷害活性を誘導するが、我々は、III 型インターフェロンにはこの細胞傷害活性の誘導能は無いことを発見した。一方で、III 型インターフェロンはヒト肝細胞の抗ウイルスヌクレアーゼ等の分子の発現を誘導することで、HCV を排除することを発見した。

(4) MDA5 の活性を抑制する RIOK3 分子の同定

MDA5 分子はリン酸化されることで抑制状態にある。ウイルスに感染すると、PP1 等のホスファターゼによる脱リン酸化を受け、活性化される。一方で、定常状態でのリン酸化を行うキナーゼ分子は未同定であった。我々はこのキナーゼ分子の探索を、酵母 two-hybrid 法によるスクリーニングにて実施し、RIOK3 分子を同定した。

この RIOK3 分子は、MDA5 の C 末端領域をリン酸化することで、MDA5 の重合を阻害し、その活性化を抑制することを解明した。



(5) 自然免疫に於ける細胞特異的な DNA 認識機構

ヘルペスウイルス等の DNA をゲノムに持つウイルスの DNA は細胞質内の DNA センサーにより認識される。これまで、DNA センサーとして、ウイルス RNA を認識する RIG-I や、cGAMP を合成する cGAS 分子が報告されている。

RIG-I が、ミトコンドリア上の MAVS 分子を介してシグナルを伝えるのに対し、cGAS 分子は小胞体上に存在する STING 分子を介してシグナルを伝える。何れの分子も、TBK1 と呼ばれるリン酸化酵素を活性化し I 型インターフ

エロン産生を誘導する。この TBK1 は活性化すると自己リン酸化することが知られている。そこで、この TBK1 の自己リン酸化される場所を指標に、ヒトやマウス等の細胞で、TBK1 がミトコンドリア上で活性化するのか、小胞体上で活性化するのかを調べた。

興味深いことに、ヒトの肝細胞や HeLa 細胞等では、細胞質内の DNA 刺激により、主にミトコンドリア上にリン酸化した TBK1 が観察された。これは、TBK1 が RIG-I 依存的な経路で活性化していることを示唆している。一方、マウスのマクロファージ用の細胞や、肝細胞等では主にミトコンドリア以外の場所に局在し、STING 分子と共局在することが発見し、マウス細胞では主に cGAS 経路が活性化していることが示唆された。これらは、自然免疫に於ける DNA 認識機構が、ヒトやマウスの細胞ごとに異なることを示唆している。

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 9 件)

1. Takashima K, Oshiumi H, Takaki H, Matusmot M, Seya T. RIOK3-mediated phosphorylation of MDA5 interferes with its assembly and attenuates the innate immune response. *Cell Reports* 11: 192-200 (2015) 査読有
2. Leong CR, Oshiumi H, Okamoto M, Azuma M, Takaki H, Matsumoto M, Chayama K, Seya T. A MAVS/TICAM-1-independent interferon-induction pathway contributes to regulation of hepatitis B virus replication in the mouse hydrodynamic injection model. *J Innate Immun.* 7: 47-58 (2015) 査読有
3. Kasamatsu J, Azuma M, Oshiumi H, Morioka Y, Okabe M, Ebihara T, Matsumoto M, Seya T. INAM plays a critical role in IFN- γ production by NK cells interacting with polyinosinic-polycytidylic acid-stimulated accessory cells. *J Immunol.* 193: 5199-5207 (2014) 査読有
4. Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, Seya T. IPS-1 is essential for type III IFN production by hepatocytes and

dendritic cells in response to hepatitis C virus infection. *J Immunol.* 192: 2770-2777 (2014) 査読有

5. Takaki H, Honda K, Atarashi K, Kobayashi F, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Shingai M, Seya T. MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon β -induction restricts the response to measles infection in CD150 Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Mol. Immunol.* 57: 100-110 (2014) 査読有
6. Shime H, Kojima A, Maruyama A, Saito Y, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic:polycytidylic acid treatment in mouse tumor models. *J Innate Immun.* 6: 293-305 (2014) 査読有
7. Suzuki T, Oshiumi H, Miyashita M, Aly HH, Matsumoto M, Seya T. Cell-type-specific subcellular localization of phospho-TBK1 in response to cytoplasmic viral DNA. *PLoS One* 8: e83649 (2013) 査読有
8. Takaki H, Takeda M, Tahara M, Shigai M, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. The MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4+ dendritic cells primarily triggers type I IFN production against measles virus in a mouse infection model. *J Immunol.* 191: 4740-4747 (2013) 査読有
9. Oshiumi H, Miyashita M, Matsumoto M, and Seya T. A Distinct Role of Riplet-Mediated K63-Linked Polyubiquitination of the RIG-I Repressor Domain in Human Antiviral Innate Immune Responses. *PLoS Pathogens* 9, e1003533 (2013) 査読有

[学会発表](計 2 件)

1. 押海 裕之 ユビキチンによるウイルス RNA 認識センサー RIG-I の活性化制御機構 第 25 回日本生体防御

学会学術総会 東北大学・片平さく
らホール(仙台) 2014年7月10
日

- 2 Oshiumi H, Matsumoto M, and
Seya T. Hepatitis C virus degrades
Riplet ubiquitin ligase to escape
host innate immune response. 15th
International Congress of
Immunology (ICI) Milan (Italy)
August 24, 2013

〔図書〕(計 1 件)

- 1 押海裕之 他 16名 監訳 下遠
野邦忠 瀬谷司 生命科学のための
ウイルス学 南江堂(第7章ウイル
スの有効利用(177-190 ページ)の
翻訳を担当) 2015年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

押海 裕之 (OSHIUMI HIROYUKI)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセン
ター・准教授
研究者番号：50379103