

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25713032

研究課題名(和文) 気道上皮におけるZAPSを介した新規抗ウイルスメカニズムの解析

研究課題名(英文) Novel mechanisms of cellular antiviral defense through the PARP-13 shorter isoform, ZAPS

研究代表者

早川 清雄 (HAYAKAWA, Sumio)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：00368292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円

研究成果の概要(和文)：「感染」から生体を防御するためには、自然免疫系の活性化が重要な役割を果たしている。自然免疫系は、病原体を構成する構造の一部(PAMPs)がパターン認識受容体(PRRs)によって認識されることによって活性化される。ウイルス感染の中でもインフルエンザウイルスの感染は、その核酸がセンサー分子RIG-Iによって認識され自然免疫応答が活性化される。一方で、ウイルスの遺伝子にコードされているNS1タンパク質により、宿主の免疫応答は抑制される。本研究では、NS1とRIG-Iの活性化因子、ZAPSの競合が自然免疫応答調節のキーとなることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Type I IFN are produced in response to viral infection and are key cytokines for the activation of innate immunity. The pathogen invasion is sensed by pattern-recognition receptors(PRRs) of innate immune system through the recognition of pathogen associated molecular patterns(PAMPs). The PRRs trigger the activation of intracellular signaling pathway, which leads to the induction of antimicrobial genes. RIG-I is the key PRR for detection of positive- and negative strand RNA viruses in the cytoplasm of cells and has an important triggering response to viruses, such as influenza A virus. However, the NS1 from influenza virus counters host antiviral defenses. In this study, the interaction of RIG-I and ZAPS is one of the keypoints, wherein NS1 inhibits RIG-I-mediated antiviral activity.

研究分野：生化学

キーワード：インターフェロン インフルエンザウイルス 抗ウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

人は、いかにウイルス感染を防ぐことができるのか、感染をコントロールすることができるのか。これは、人類にとって大きな課題である。現在世界的にインフルエンザウイルスの感染が流行し、日本国内においても今シーズン(2011/2012 シーズン)に 1648 万人が感染したことが報告されている(厚生労働省、疫学情報 2012.5.25)。感染症の拡大を防ぐためには、どのようにしたらよいのか? これはとても大きな課題であるが、生体が備える感染防御メカニズムの詳細を明らかにすることが、生体にとって「敵」となるウイルスから身体を守ることにつながるのではないだろうか。申請者は、自然免疫系の中でも抗ウイルス作用をもつ I 型インターフェロン(IFNs)の発現誘導について研究をおこなってきた。自然免疫は、ウイルスや細菌の感染などによっておこる感染病原体の初期の認識とその後続く炎症反応の惹起や獲得免疫系の誘導に重要な役割をはたしている生体防御システムである。自然免疫系の活性化は、病原体を構成する構造(PAMPs; Pathogen-associated molecular pattern)がパターン認識受容体(PRRs; Pattern-recognition receptors)によって認識されることから始まる。さらに、自然免疫系の異常は、免疫不全、自己免疫疾患など様々な疾患の原因となりうるが、これまでの多くの研究によって明らかとなってきた。

自然免疫系に関する研究の中でも京都大学の藤田先生らは、インフルエンザウイルスなど RNA ウイルスが感染した細胞において、細胞質に局在するセンサー分子「RIG-I: retinoic acid-inducible gene 1」がウイルス由来の核酸 RNA を認識し、IFNs やサイトカインを強く誘導することを見出した(*Nature Immunology*, 5, 730-737, 2004)。さらに、RIG-I ノックアウトマウス由来のMEFs (mouse embryonic fibroblasts)に RNA ウイルスを感染させても、IFN- $\beta$ の産生がみられないことを報告した(*Nature Immunology*, 441, 101-105, 2006)。すなわち、インフルエンザウイルスのような RNA ウイルス認識経路において RIG-I が、生体防御系の最前線で働き、生体にとって必須な分子であることを示している。この RIG-I 発見以降、世界中の研究者によって RIG-I の構造解析(*J. Biol. Chem.*, 284, 17465-17474, 2009)や機能解析(*Nature*, 446, 916-920, 2007)に関する論文が報告され、RNA 認識経路の詳細が次第に明らかにされつつあるように、現在、RIG-I を介する細胞質核酸認識経路に関する研究が世界的に注目されている。このような背景の中、申請者らは、この RIG-I 経路に参与する新しい調節分子を発見した。その分子を申請者らは、ZAPS (Zinc finger Antiviral Protein 1, Short isoform)として報告した(*Nature Immunology*, 12, 37-44,

2011)。

### 2. 研究の目的

ZAPS は、非常に強力な RIG-I の活性化調節分子で、HEK293T 細胞に過剰発現させると、RIG-I のリガンドである 3pRNA 刺激で、IFNB mRNA 発現がコントロールと比較して約 10 倍増加することがわかった。また、CompoZr ZFN を用いて、ヒト細胞株の ZAPS をノックアウトすると IFNB mRNA 発現が強く抑制されることを見いだした。さらに、ZAPS は、ウイルス RNA の分解系に参与することも報告されていることから(*RNA Biol.* 5, 65-67, 2008)、IFN 産生とウイルス RNA の分解といった二つの側面から生体を防御する(Dual-mode defence)非常にユニークかつ重要な分子であることがわかってきた。そこで、今回申請者は、ZAPS の機能解析をさらに深め、インフルエンザウイルス感染時の自然免疫応答を分子レベル・個体レベルで詳細に検討することにより、ZAPS を中心とした新しい生体防御メカニズムを見いだすことができるのではないかと考え検討した。さらには、ZAPS と同じファミリーに属する分子が有する自然免疫応答に対する作用についても検討を行った。

### 3. 研究の方法

HEK293T 細胞に ZAPS またはインフルエンザウイルス由来 NS1 を過剰発現させた後、RIG-I のリガンドである 3pRNA やインフルエンザウイルス RNA, flu vRNA をリポフェクション法によって細胞内へ導入し、IFNs やサイトカインの mRNA 発現量を qRT-PCR 法を用いて解析を行う。さらに、IFN- $\beta$ の promoter 領域を含む p-125Luc または NF- $\kappa$ B の結合配列で drive するルシフェラーゼアッセイで検討を行う。この実験系で、IFNs の発現上昇および抑制効果が確認されたら、ZAPS と NS1 を発現誘導する vector を co-transfection し、NS1 による IFNs の抑制効果が ZAPS によって回復するかどうかを検討する。ZAPS を過剰発現させることにより、IFNs やサイトカインの mRNA 発現量またはルシフェラーゼ活性の増強が認められたら、Immunoprecipitation/Western Blotting 法を組み合わせて RIG-I と NS1 または ZAPS との会合性を調べる。最終的に、RIG-I と NS1 の結合性を ZAPS が抑制するかどうかを検討する。上記の結果に基づき、HeLa 細胞に異なる蛍光タグをつけた ZAPS と NS1 を過剰発現させて、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内局在の変化など動的な解析を行う。具体的には、pCAGGS-YFP vector, pCAGGS-CFP vector を用いることを計画している。*in vivo* の実験においては、マウス ZAPS 遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し、インフルエンザウイルス感染に対するインターフェロン誘導活性について検討する。マウスにインフルエンザウイルス(X-31 株または PR8 株)を経鼻感染させた後、

経時的に体重変化を観察する。感染したマウスにおいては体重減少が認められるので、感染を体重で評価した後に肺胞洗浄液または血清を用いて、インターフェロンの産生を評価する。さらに、RIG-I への ZAPS/NS1 の会合ドメインを詳細に検討する。具体的には、変異させた ZAPS 発現 vector (N 末・C 末・PARP domain 欠損など)を用いて、RIG-I への結合性と活性の相関関係を明らかにする。また、ZAPS と同じファミリーに属する分子 Tiparp についても、ウイルス感染に対する機能解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1) HEK293T 細胞に ZAPS とインフルエンザウイルス由来 NS1 を過剰発現させた後、RIG-I のリガンドである 3pRNA やインフルエンザウイルス由来の RNA (flu vRNA) をリポフェクション法により細胞内へと導入し、インターフェロンやサイトカインの mRNA 発現量を qRT-PCR または転写活性をルシフェラーゼアッセイで解析した。その結果、NS1 によってインターフェロンやサイトカインの発現や転写活性が有意に抑制される状況において、ZAPS を過剰発現させた場合、NS1 による抑制効果が阻害されることがわかった。

(2) HeLa 細胞を用いた共焦点レーザー顕微鏡による蛍光イメージングの解析結果から、2 つのタンパク質を細胞に過剰発現させることにより NS1 と RIG-I の会合性が見られた。さらに、その細胞に対して ZAPS を過剰発現させると、NS1 と RIG-I の会合性が阻害された。また、HEK293T 細胞へ RIG-I/NS1/ZAPS を過剰発現させた細胞溶解液を用いて、免疫沈降法 (IP) による会合性の検討を行った結果、RIG-I に対する NS1 の会合性が、ZAPS により阻害されたことから、NS1 と ZAPS は競合的に RIG-I に対して作用することが示唆された。

(3) ZAPS を過剰発現させたトランスジェニックマウス由来のマウス胎児繊維芽細胞 (MEFs) を調整し、核酸刺激またはウイルス感染をした結果、コントロールの MEFs と比較してインターフェロンやサイトカイン等の mRNA 発現が増強した。

(4) MEFs を用いた実験から、核酸やウイルス感染に伴うインターフェロンの誘導・増強効果が認められたことから、個体レベルでインフルエンザウイルスを用いた感染実験について検討した。その結果、肺におけるインターフェロンの発現量は有意に増強された一方、ウイルス由来の RNA 量は減少していた。

インフルエンザウイルスの遺伝子は分節化されており、その遺伝子の 1 つに非構造タンパク質の NS1 がコードされている。これまでに、NS1 タンパク質は、宿主の免疫システム、特にウイルス感染に伴う自然免疫応答の活性化に重要なセンサー分子である RIG-I の働きを抑制するタンパク質として報告されているが、その詳細な抑制メカニズムについては明らかにされていなかった。今回、本研

究を通して、インフルエンザウイルス感染に伴い細胞内で発現誘導される NS1 タンパク質による自然免疫応答の抑制効果は、RIG-I に対するウイルス由来の NS1 と、宿主由来の ZAPS の両者が競合的に働くことにより誘導される現象であることが示唆された。現在、これらの情報をもとに論文投稿を準備している。

さらに、ウイルス感染による免疫応答の抑制のみならず、ダイオキシン等の化学物質による自然免疫応答の抑制メカニズムについて詳細な検討を行った。これまでに、ダイオキシンなどの化学物質による自然免疫応答の抑制効果、特にウイルス感染時における受容体 (AhR) を介したシグナルメカニズムの詳細は明らかにされていない。そこで、AhR を欠損させた細胞やマウスに対して、インフルエンザウイルス等のウイルス感染実験を行った結果、インターフェロンの誘導は増強し、ウイルスの複製は有意に抑制された。さらに、AhR 下流の活性化により発現が誘導される TIPARP が自然免疫応答のシグナル分子の 1 つである TBK1 を ADP リボシル化することによりそのキナーゼ活性を阻害することで、インターフェロンの誘導を抑制していることが明らかとなった。

自然免疫応答は、病原微生物や異物から生体を保護するためウイルス感染等により速やかに活性化され、ウイルス複製を抑制するために必須な免疫システムである。その免疫システムは、本来厳密に調整されているが、ウイルス由来のタンパク質または化学物質等により誘導された宿主由来のタンパク質を介して免疫応答が抑制される機構が存在すること、その抑制メカニズムの 1 つとして PARP ファミリー分子が関与していることがわかってきた。これらの研究成果から、自然免疫応答の活性化・不活性化に関わる分子の会合性を阻害することは、抗ウイルス応答を増強する新しい治療ターゲットとなりうることを示唆された。

#### 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 1 件)

Taisho Yamada<sup>#</sup>, Hiromasa Horimoto<sup>#</sup>, Takeshi Kameyama, Sumio Hayakawa, Hiroaki Yamato, Masayoshi Dazai, Ayato Takada, Hiroshi Kida, Debbie Bott, Angela C Zhou, David Hutin, Tania H Watts, Masahiro Asaka, Jason Matthews, Akinori Takaoka

<sup>#</sup> These authors contributed equally to this work.

Constitutive aryl hydrocarbon receptor signaling constrains type I interferon-mediated antiviral innate defense

*Nat. Immunol.*, 17 (6), 687-94, 2016 (査

読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) Yamada T., Horimoto H., Kameyama T., Hayakawa S. and Takaoka A.

Constitutive aryl hydrocarbon receptor signaling constrains antiviral IFN response through TIPARP induction.

The 24<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages(MMCB2016)

Sola City Conference Center(Chiyoda-ku,Tokyo) 2016

(2) 早川清雄, 今野大貴, 星野由紀子, 大石由美子,

炎症シグナルが調節する脂質代謝調節機構  
第38回日本分子生物学会/第88回日本生化学大会 合同大会, 神戸ポートアイランド (兵庫県, 神戸市) 2015

(3) 早川清雄, 山田大翔, 亀山武志, 喜田宏, 宮崎忠昭, 高岡晃教

ZAPS と IAV 由来 NS1 の競合による自然免疫回避機構の検討

第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会 学術集会, 北海道大学(北海道, 札幌市) 2014

(4) S.Hayakawa, T.Kameyama, T.Yamada, A.Takaoka

Influenza virus NS1 protein counteracts ZAPS function to evade RIG-I-mediated antiviral defence

15<sup>th</sup> international congress of immunology, Milan, Italy, 2013

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川清雄(HAYAKAWA, Sumio)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号: 00368292

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )