

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 29 日現在

機関番号：32606
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2014
課題番号：25860337
研究課題名(和文) ウイルスセンサータンパク質RIG-I下流の新規シグナル伝達経路の探索

研究課題名(英文) Study of signal mechanism of viral sensor protein RIG-I

研究代表者
高橋 清大 (Kiyohiro, Takahasi)
学習院大学・理学部・助教

研究者番号：90399965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：IPS-1はアダプタータンパク質として自然免疫において重要な役割を果たしている。本研究ではIPS-1の機能解明を行った。多数の変異体を用いた実験の結果、ドメイン2と呼ばれる領域がIPS-1の多量体化を抑制していることが明らかとなった。今後はさらに詳細な変異体を作成し、ドメイン2内の自己抑制に必要なよりはっきりとした領域を明らかにしたい。現在論文の執筆準備中である。

研究成果の概要(英文)：IPS-1 is found as an adaptor molecule that is necessary for induction of innate immunity. We found "domain 2" is the essential region that controls the activation of IPS-1 and suggest the model of IPS-1 activation. Now we are preparing the paper to be published.

研究分野：自然免疫

キーワード：自然免疫

1. 研究開始当初の背景

我々の体はウイルスや細菌の感染時、免疫機構を用いてこれら異物の排除を行う。免疫機構は大きく分けて自然免疫と獲得免疫が存在している。

自然免疫は幅広い種が生まれながらにして持つ免疫機構であり、異物の大まかな構成成分を認識することで誘導される。構成成分はウイルスであればそのゲノムや複製の際に見られる RNA、バクテリアならば細胞壁のペプチドグリカンなどである。これにより生体は感染現象をウイルス感染やバクテリア感染等と大別し、それぞれに応じた防御機構を誘導する。これに対して獲得免疫は感染を経験する事で抗体を生産し、インフルエンザウイルス、C 型肝炎ウイルス等と異物の詳細な種に応じた高い特異性を持つ防御反応を誘導する。すなわち自然免疫による初期の曖昧さを持った迅速な免疫機構、後期の獲得免疫による詳細な免疫機構、この二つが我々の体を異物から守っている。近年の研究では、樹状細胞などの免疫細胞による自然免疫誘導が、その後の獲得免疫調節に深く関わっていることが明らかにされ、自然免疫は獲得免疫を誘導するために必要な前段階のメカニズムであることが明らかになった。

I 型インターフェロン(IFN)はウイルス感染に際して誘導されるサイトカインの一種である。転写された I 型 IFN はレセプターを通じ、翻訳の調節、ウイルス RNA の分解、アポトーシスの誘導等、様々な抗ウイルス作用を持つ遺伝子の活性化を行う。Retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I)は当研究室において同定されたタンパク質であり(参考文献 1)、I 型 IFN 誘導に直接繋がるウイルス RNA 受容体である。RIG-I は細胞質に局在しており、ウイルス感染に際しその RNA を認識することで、I 型 IFN を誘導する。よってウイルス感染に対する宿主応答において重要な因子の一つとして近年研究が進んでいる。RIG-I はアミノ末端に二つの caspase recruitment domain (CARD)を持ち、ウイルス RNA を結合すると構造変化によりこれを提示する。IFN- γ promoter stimulator protein 1 (IPS-1)は近年発見された RIG-I の下流の

因子であり、アミノ末端に RIG-I と相同性のある CARD を持ち、そのカルボキシ末端側には TNF Receptor Associated Factor (TRAF) ファミリー等様々な因子との結合部位を持つランダム領域を持つ。また、カルボキシ末端の膜貫通ドメイン (Trans membrane domain:TM)を用いてミトコンドリアに局在している(図 1)。ウイルス感染時には RIG-I の CARD と IPS-1 の CARD が相互作用することで IPS-1 周辺に様々なシグナル伝達タンパク質が集まり、I 型 IFN を含む、抗ウイルスタンパク質が誘導される。また、現在までの我々の研究では RIG-I には IPS-1 以外のアダプター分子の存在が示唆されている。



図 1 IPS-1 の構造

2. 研究の目的

RIG-I はウイルス RNA のセンサーであり自然免疫において重要な役割を果たす。IPS-1 は RIG-I の下流のアダプター因子であり、シグナル伝達の仲介を行う。本研究では RIG-I および複数の変異体を含む IPS-1 の人為的活性化の系を用い、マイクロアレイと次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析を行う予定であった。しかしながら、人為的活性化系の変異体間で発現誘導に大きな差が生じてしまい、それについて説明ができなかった。そこでテーマを変更し、大腸菌を用いて IPS-1 を発現精製し、複数の変異体を用いることで、IPS-1 の活性化機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

IPS-1 は通常は大腸菌では発現できないため、TM を除いたのちアミノ末端 GRP 融合タンパク質カルボキシ末端 His タグ融合タンパク質として発現した。GRP はタンパク質のフォールディングや可溶性を向上させることが知られており、実際にこのタグを用いて発現された IPS-1 は可溶性に発現し、His タグ精製の後、ゲルろ過で解析を行うことができた。

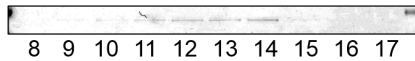
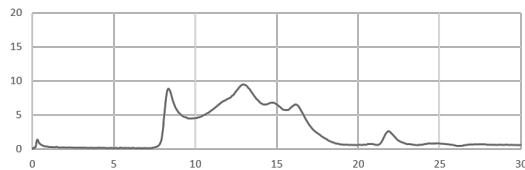
以後、本報告で述べる IPS-1 とは GRP 融合タンパク質かつ TM を除いたものとする。我々はまず 2 種類の IPS-1 を用意した。

IPS-1 FL(Full length 全長)

IPS-1 CARDのみ

これらをゲルろ過で解析したところ、FLでは単量体として観測されたIPS-1がCARDのみでは600kDa以上の巨大な多量体として観測された(図2)。そこで、一つの仮定としてIPS-1のCARDからカルボキシ末端にかけてIPS-1の多量体化を阻害する領域があるのではないかと考え、各種変異体を作成し全てにおいてゲルろ過における多量体の形成を調べた。研究成果にこれについて述べる。

IPS-1 FL(Full length 全長)



IPS-1 CARDのみ

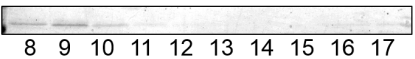
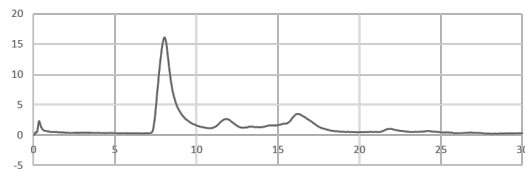


図2 ゲルろ過クロマトグラフィー

4. 研究成果

上述のようにIPS-1はCARD、ランダム領域、TMから構成されている。今まではランダム領域はいくつかのTRAF結合領域を持つ構造のない領域であると考えられていた。しかし本研究ではFLとCARDのみでゲルろ過状態での多量体化に差があることからこの領域に多量体化を制御している領域があると考えた。そこでランダム領域内のどの領域がそれを担うのかを考えランダム領域をアミノ酸単位で3等分に分割し、それぞれドメイン1、2、3とした。以下に作った変異体を示す。

- 1 IPS-1 CARD+ドメイン1,2
- 2 IPS-1 CARD+ドメイン2,3
- 3 IPS-1 CARD+ドメイン1,3

それぞれ上述のように大腸菌で発現しHisタグ精製した後濃度を揃えてゲルろ過を行った。その結果ドメイン2を持つ変異体1と2のみが単量体として観測され、ドメイン2を持たない変異体3は多量体で観測された。つまりドメイン2に多量体化を阻害する領域があると考えられる。そこで変異体4として

4 IPS-1 CARD+ドメイン2

を作成して同様に解析を行ったところ単量体として観測された。このことからドメイン2がIPS-1の多量体化抑制領域であることが示された。現在ドメイン2を更に分割して変異体を作成し、抑制領域の詳細な同定を行っている。

IPS-1はCARDが多量体化することでシグナル伝達を行いI型IFNを誘導するタンパク質であるが常に活性化体ではなく、ウイルス感染のない時はなんらかの制御を受けていると考えられる。本研究で発見したドメイン2はこの制御を行っていると考えられる。以下にモデル図を示す。

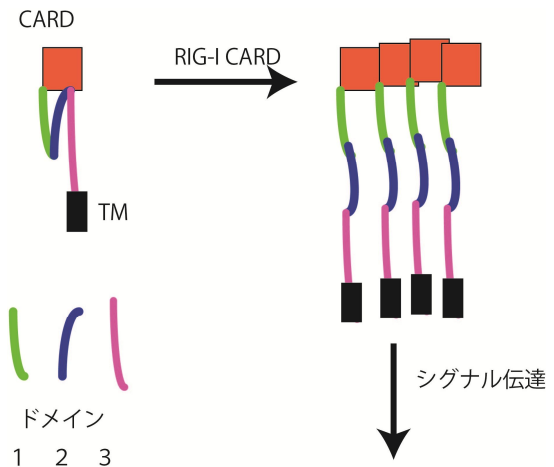


図3 IPS-1 活性化モデル

現在、追加実験を行いながら論文投稿の準備を行っている。

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 2件)

[学会発表](計 0件)

[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 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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
高橋 清大 (TAKAHASHI KIYOHIRO)
学習院大学理学部生命科学科 助教
研究者番号：90399965

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：