

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460553

研究課題名(和文) TLR7/9経路におけるシグナル伝達複合体形成とパラミクソウイルスの阻害機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism for the inhibition of TLR7/9-dependent signaling pathway by human metapneumovirus.

研究代表者

北川 善紀 (Kitagawa, Yoshinori)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：00444448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：パラミクソウイルス科のヒトメタニューモウイルスは、M2-2蛋白質にTLR7/9依存性IFN- α 産生経路を阻害する能力を備えている。しかし、その分子機構については未詳であった。本研究では、M2-2蛋白質が転写因子IRF7に結合して、TLR7/9経路依存的なIRF7の二量体形成を阻害することを見いだした。さらに、M2-2蛋白質が同経路依存的なIRF7のリン酸化の一部を阻害することを明らかにした。以上の結果から、M2-2蛋白質はTLR7/9経路依存的なIRF7のリン酸化抑制を通じて二量体形成を阻害し、IFN- α の産生を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Human metapneumovirus is a member of the family Paramyxoviridae, and its M2-2 protein has the ability to inhibit TLR7/9 dependent signaling pathway leading to alpha interferon production by plasmacytoid dendritic cells. However, detailed molecular mechanism for the inhibition remained unclear. Here we found that the M2-2 protein interacted with IRF7, and inhibited IRF7 homodimerization induced by stimulation of the TLR7/9 pathway. In contrast to this inhibition, interaction of the M2-2 protein with IRF7 did not result in inhibition of IRF7 homodimerization induced by stimulation of the RIG-I/MDA5 pathway, suggesting that the inhibition of homodimerization is not caused by steric effect of the M2-2 binding. Instead, M2-2 was found to inhibit phosphorylation of IRF7 on Ser477. These results suggest that M2-2 blocks the TLR7/9 pathway by inhibiting IRF7 homodimerization possibly through inhibition of its serine phosphorylation.

研究分野：ウイルス学

キーワード：パラミクソウイルス インターフェロン IFNアンタゴニスト アクセサリー蛋白質 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) ウイルスなどの病原体の侵入を感知して、細胞はI型インターフェロン(IFN)を産生する。その中でもIFN- α は、形質細胞様樹状細胞(pDC: plasmacytoid dendritic cell)によって大量に産生されることが知られていた。pDCにはエンドソームに存在するToll様受容体(TLR)7/9をセンサー分子とするシグナル伝達経路(TLR7/9経路)が発達しており、TLR7/9がウイルス核酸を認識することにより大量のIFN- α を産生することが知られていた(図1)。

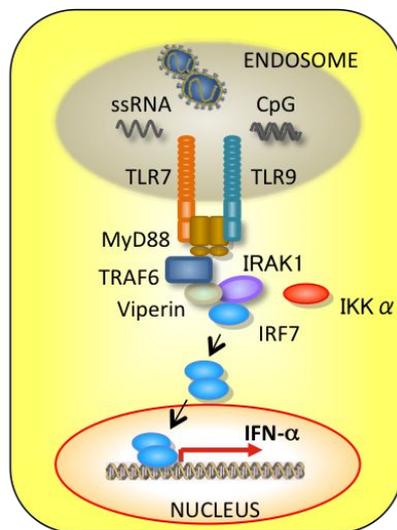


図1 pDC特異的なTLR7/9依存性IFN- α 産生シグナル伝達経路
pDCでは、エンドソーム内に局在するセンサー分子TLR7またはTLR9がウイルス由来の核酸を認識することで、IFN- α の産生が誘導される。

(2) パラミクソウイルス科に属するヒトメタニューモウイルス(HMPV)は、M2-2蛋白質にTLR7/9依存性IFN- α 産生経路を阻害する能力を備えることを見いだしていた。しかし、その阻害機構についてはほとんど分かっていなかった。

(3) pDC特異的なTLR7/9依存性IFN- α 産生経路は、その経路に関わるシグナル伝達分子(MyD88、TRAF6、IKK、およびIRF7)を過剰発現させることで通常の培養細胞でも再構成できることが知られていた。私たちは、この再構成系においてTLR7/9経路が活性化されると、IFN- α の転写因子IRF7がTriton X-100などの界面活性剤に

対して不溶性になることを見いだしていた。活性化IRF7が不溶化するという現象は、対象蛋白質が可溶化していることを前提とした免疫沈降法やNative-PAGE等による分子間相互作用の解析を困難にしていた。

2. 研究の目的

- (1) HMPVのM2-2蛋白質が相互作用するシグナル伝達分子を探索し、TLR7/9経路上のどのステップをどのように阻害するのか分子レベルで明らかにする。
- (2) TLR7/9経路によって活性化されたIRF7の二量体化を定量するための解析方法と条件を検討する。
- (3) パラミクソウイルスには、アクセサリ蛋白質VにTLR7/9経路を阻害する能力を備えるウイルスも存在する。M2-2蛋白質とV蛋白質の阻害機構を比較して、共通した機構があるのか検証する。

3. 研究の方法

(1) M2-2蛋白質と相互作用するTLR7/9経路上のシグナル伝達分子の探索

HMPVのM2-2蛋白質の標的分子を探索するため、培養細胞にM2-2蛋白質とTLR7/9依存性IFN- α 産生経路に関わるシグナル伝達分子をそれぞれ発現させ、免疫沈降法により相互作用を解析した。また、これらの相互作用が直接的な結合であることを確認するため、コムギ胚を用いた*in vitro*転写翻訳系を用いて当該蛋白質を合成し、免疫沈降法により同様に解析を行った。

(2) TLR7/9経路によって誘導されるIRF7二量体形成の解析

本研究では、不溶化した活性化IRF7の二量体形成を評価するため、BRET(Bioluminescence resonance energy transfer)法およびSLA(Split luciferase assay)法を用いた。

BRET法で使用するために、IRF7のN末端あるいはC末端にYFP(黄色蛍光蛋白質)

またはNluc (Nanoluc) を、SLA法で使用するためにRlucN (ウミシイタケ由来ルシフェラーゼのN末端側) またはRlucC (同C末端側) を融合させた発現プラスミドを作製した。作製した融合IRF7発現プラスミドを、シグナル伝達分子 (MyD88、TRAF6、およびIKK) 発現プラスミドと共に293T細胞に導入し、エネルギー転移やルシフェラーゼ活性を測定することで、IRF7の二量体形成の程度を定量した。また、ウイルス蛋白質発現プラスミドを同時に導入することで、IRF7二量体形成に対する阻害能を評価した。

(3) M2-2蛋白質のTLR7/9依存性IFN-α産生阻害機構の分子学的解析

M2-2蛋白質がどのステップをどのようにに阻害するのか調べるために、シグナル伝達分子のリン酸化やユビキチン化等の修飾、degradation、細胞内局在などを、ウェスタンブロット法や蛍光抗体法にて解析した。

4. 研究成果

(1) HMPV M2-2蛋白質と相互作用するTLR7/9経路上のシグナル伝達分子の探索

M2-2蛋白質は、TLR7/9経路に関わるシグナル伝達分子のうち、TRAF6、IKK、およびIRF7と結合することが示された(図2)。IRAK1、IRAK4およびViperinとの結

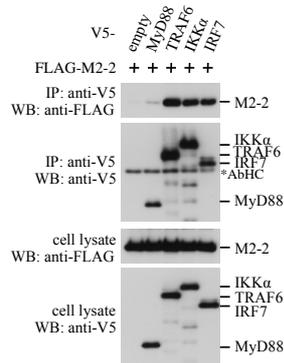


図2 M2-2とTLR7/9経路に関わるシグナル伝達分子との結合
293T細胞にM2-2蛋白質とTLR7/9経路に関わるシグナル伝達分子を発現させ免疫沈降法にて評価した。M2-2蛋白質は、TRAF6、IKK、およびIRF7と結合することが示された。

合は認められなかった (data not shown) 。

細胞内ではシグナル伝達分子は複合体を形成すると予想されたので、*in vitro*転写翻訳系を用いてM2-2蛋白質と各シグナル伝達分子を合成し、直接的に結合するか検討した結果、M2-2蛋白質はIRF7とのみ結合することが確認された (図3) 。

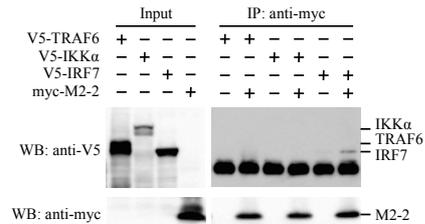


図3 *in vitro*転写発現系におけるM2-2とIRF7の結合
コムギ胚芽を用いた *in vitro*転写翻訳系にて、M2-2蛋白質とTLR7/9経路に関わるシグナル伝達分子を合成した。各蛋白質を混合した後、免疫沈降法にて結合を評価した。M2-2蛋白質はIRF7と結合することが明らかになった。

(2) M2-2蛋白質のTLR7/9経路依存性IRF7二量体形成阻害能の解析

M2-2蛋白質が結合するIRF7の結合領域を調べたところ、IRF7のホモ二量体形成に関わるinhibitory domainと結合することが分かった。上流シグナル伝達分子によって誘導されるIRF7の二量体はIFN-α産生に重要であることが知られていたことから、M2-2蛋白質によるIRF7の二量体化阻害について検討した。TLR7/9経路における活性化IRF7は、界面活性剤に対して不溶化

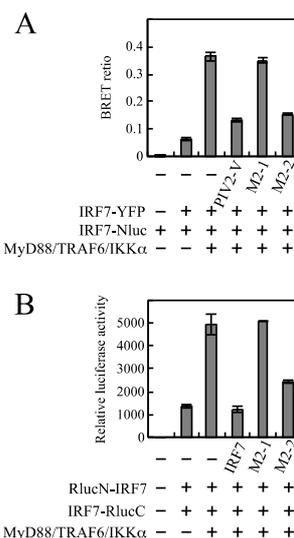


図4 M2-2蛋白質によるIRF7の二量体化阻害
BRET法 (A)、またはSLA法 (B) により、M2-2蛋白質のIRF7二量体形成阻害能を検討した結果、M2-2蛋白質は、TLR7/9経路依存性のIRF7二量体形成を阻害した。

するため、BRET法およびSLA法を用いた

解析を行った。その結果、どちらの方法でも、M2-2蛋白質はIRF7の二量体形成を阻害することが明らかになった(図4)。

(3) M2-2蛋白質のRIG-I/MDA5経路阻害の評価

IRF7は、TLR7/9経路だけでなく、細胞質内のウイルス核酸を認識するRIG-I/MDA5依存性のIFN- α 産生にも関与することが知られていた。そこで、M2-2蛋白質が同経路のIFN- α 産生シグナルを阻害するか検討した。その結果、M2-2蛋白質はRIG-I/MDA5経路依存性のIFN- α 産生シグナルを抑制せず、IRF7の二量体形成も阻害しなかった(図5)。

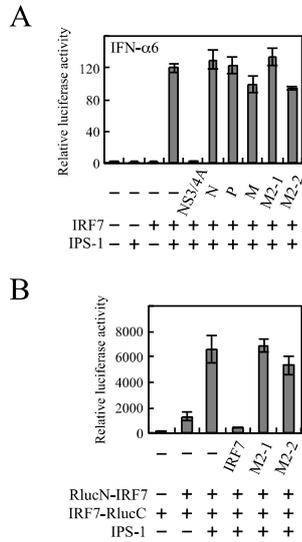


図5 M2-2蛋白質のRIG-I/MDA5経路阻害能の評価
(A) M2-2蛋白質によるRIG-I/MDA5依存性IFN- α 産生シグナル抑制を検討した結果、抑制は認められなかった。(B) SLA法により、M2-2蛋白質のRIG-I/MDA5経路依存性IRF7二量体形成阻害能を検討した結果、M2-2蛋白質は二量体形成を阻害しなかった。

以上の結果から、M2-2蛋白質は、IRF7と結合することで単に立体障害的にIRF7の二量体形成を阻害しているのではなく、TLR7/9経路特異的な過程を阻害する可能性が示唆された。

(4) M2-2蛋白質によるTLR7/9依存性IRF7リン酸化阻害

IRF7の二量体化は、上流シグナル伝達分子による活性化が引き金になることから、IRF7のリン酸化に対するM2-2蛋白質の影響を検討した。その結果、TLR7/9経路にお

けるIRF7の活性化では、477位のセリン残基(S477)、およびS471/472のリン酸化が誘導されたが、M2-2蛋白質はS477のリン酸化のみを特異的に阻害することが確認された。S471/472のリン酸化阻害は認められなかった(図6)。一方、RIG-I/MDA5

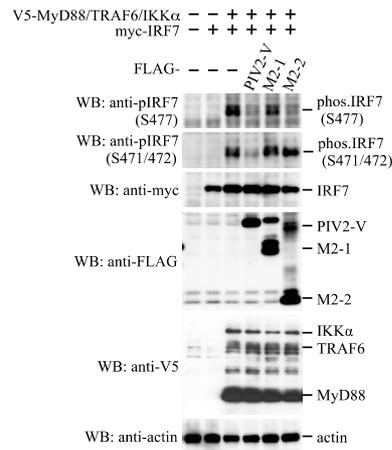


図6 パラミクソウイルスタンパク質によるIRF7のリン酸化阻害
PIV2のVタンパク質は、TLR7/9経路依存性のIRF7のS471/472位とS477位のリン酸化を共に阻害した。一方、HMPVのM2-2タンパク質はS477位のリン酸化のみを阻害したが、S471/472位は抑制しなかった。

経路においてもIRF7の同セリン残基のリン酸化が観察されたが、M2-2蛋白質による阻害は認められなかった(data not shown)。

以上の結果から、M2-2蛋白質はTLR7/9経路依存性のIRF7のS477位のリン酸化を特異的に抑制し、その後誘導されるIRF7の二量体化を阻害する可能性が示唆された。

(5) HPIV2 V蛋白質のTLR7/9経路阻害機構

HMPVが属するパラミクソウイルス科には異なるアクセサリー蛋白質にTLR7/9経路を阻害する能力を備えるウイルスも存在する。これまでに私たちは、ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(PIV2)のV蛋白質がTLR7/9経路を阻害する活性を備えることを明らかにしていた。そこで、PIV2のV蛋白質のTLR7/9経路阻害機構を解析し、M2-2蛋白質のそれと比較した。その結果、V蛋白質はIRF7の二量体形成を阻害し(図4A)、さらにIRF7のS471/472お

よびS477の両セリン残基のリン酸化を阻害することが示された(図6)。さらに、活性化IRF7の核移行についても調べた結果、V蛋白質はTLR7/9経路に依存したIRF7の核移行をブロックしたのに対し、M2-2蛋白質はIRF7の核移行を阻害しなかった(data not shown)。

以上の結果から、HMPVのM2-2蛋白質とPIV2のV蛋白質は、共にTLR7/9依存性IFN γ 産生シグナル経路を抑制するが、その阻害機構は異なることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- (1) Schock SN, Chandra NV, Sun Y, Irie T, Kitagawa Y, Gotoh B, Coscoy L, Winoto A. 2017. Induction of necroptotic cell death by viral activation of the RIG-I or STING pathway. *Cell Death Differ.* 査読あり 24:615–625. DOI: 10.1038/cdd.2016.153
- (2) Satoh Y, Yonemori S, Hirose M, Shogaki H, Wakimoto H, Kitagawa Y, Gotoh B, Shirai T, Takahashi K-I, Itoh M. 2016. A residue located at the junction of the head and stalk regions of measles virus fusion protein regulates membrane fusion by controlling conformational stability. *Journal of General Virology.* 査読あり 98:143–154. DOI: 10.1099/jgv.0.000670
- (3) Satoh Y, Hirose M, Shogaki H, Wakimoto H, Kitagawa Y, Gotoh B, Takahashi K-I, Itoh M. 2014. Intramolecular complementation of measles virus fusion protein stability confers cell-cell fusion activity at 37°C. *FEBS Letters.* 査読あり 589:152–158. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.11.040

〔学会発表〕(計9件)

- (1) Kitagawa Y. Effect of human meta-

IRF7 homodimerization critical for alpha Interferon gene activation. 日本ウイルス学会 2016年10月23日-25日 北海道札幌市
(2) Kitagawa Y. NSs protein of SFTS virus targets STAT2 for preventing type I Interferon signaling. 日本ウイルス学会 2015年11月22日-24日 福岡県福岡市
(3) 北川 善紀. センダイウイルス C 蛋白質による JAK-STAT 経路阻害機構の再考. 日本ウイルス学会 2014年11月10日-12日 神奈川県横浜市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqmicro/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

北川 善紀 (KITAGAWA, Yoshinori)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00444448

(2)連携研究者

後藤 敏 (Gotoh, Bin)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00211920