

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860766

研究課題名(和文) 抗ウイルス因子の遺伝学的背景に基づいた感染リスク評価へ向けた研究

研究課題名(英文) Study on the risk evaluation of viral infection based on single nucleotide polymorphism (SNP) of mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS)

研究代表者

Xing Fei (Xing, Fei)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70711985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：データベース上から抽出したMAVS-SNPのうち、アミノ酸置換を伴うものSNPを再抽出した。その結果、データベース上から12個のMAVS-SNPが抽出された。つぎに、これらのSNPを反映したMAVS遺伝子を12種類複製し、さらに、発現ベクターへと遺伝子を組換えたのち、MAVS-SNPの機能解析をおこなった。その結果、いくつかのSNPは自然免疫応答へ影響を与えることが判明した。次に、検診で得られた検体(約1000例)を用いて自然免疫応答へ影響を与えるSNP解析を行ったところ、申請者が着目したSNPは検出されなかった。これらのことから、このようなSNPは重篤な疾患と関連があることが予想された。

研究成果の概要(英文)： We tested effects of twelve of non-synonymous MAVS SNPs in the coding region with amino acid substitution from NCBI database. We found five of these SNPs exhibited functional alteration that four of them resulted in the inhibitory immune response and one led to the contrary effect. One thousand and thirty-two human genomic samples obtained from a mass examination were genotyped at these five SNPs, however, no one variation, neither homozygous nor heterozygous, was detected. We considered that these five SNPs do not reside in Japanese population and such variations of MAVS may result in serious immune diseases, especially infections.

研究分野：自然免疫学

キーワード：MAVS SNP

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内ウイルスセンサーは、ウイルス核酸を認識後、ミトコンドリア外膜上に局在しているアダプター分子である mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) (別名 IPS-1) に結合する。認識シグナルを受け取った MAVS は、下流の抗ウイルスシグナルを活性化し、その結果、抗ウイルス因子として最も重要な I 型インターフェロン (IFN) が誘導される。すなわち、MAVS は抗ウイルスシグナル関連因子のなかで最も重要な分子の一つと考えられていた。

(2) ある種のウイルスは細胞内へ侵入後に MAVS を分解することで、抗ウイルス作用から免れている。このことは、MAVS の量的な変動が抗ウイルス作用と連動していることを強く示唆している。一方で、ウイルス感染による MAVS 遺伝子への影響は不明であった。申請者はウイルス核酸や外因性の RNA が MAVS の遺伝子発現に与える影響を検討し、細胞種によって差はあるものの、2 本鎖 RNA が MAVS 遺伝子の発現を抑制する事を明らかにした。また、この発現抑制はウイルス種に依存した (Xing et al. PLoS One 2012)。

(3) 申請者らを含むこれまでの研究から、MAVS の発現量と抗ウイルス作用には正の相関があることが分かったが、MAVS の質と抗ウイルス作用に関する報告はなかった。また、MAVS の一塩基多型 (SNP) に関する報告も限定的であり、疾患との関連も不明であった。

2. 研究の目的

自然免疫系分子の異常は感染症の重症化と関連する。例えば NF- κ B essential modulator (NEMO; 別名 IKK) の異常が細胞内寄生菌に対して易感染性となることが明らかとなっている。そこで、本課題では MAVS の質に関する、以下の解明を研究目的とした。

- 1) SNP に基づいた MAVS の抗ウイルス作用への影響
- 2) MAVS の SNP 情報とウイルス感染リスクの関係

3. 研究の方法

(1) はじめに、オープンデータベースである、国際 Hapmap プロジェクトや米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI) がインターネットを通じて提供しているものを利用して MAVS の SNP 部位を検索する。今回は SNP の出現頻度の下限を一般的な 5% とする。この際、日本人のデータベースのみでは例数が少なく、MAVS-SNP 部位の頻度が検出されないことが考えられるので、中国人 (モンゴロイド) のデータベースも同時に検索した。

(2) 得られた SNP の内、今回の検討では、MAVS の機能に影響を与え得る、アミノ酸置換を伴う SNP に焦点を当て、SNP をデータ内より再抽出した。

(3) データベース解析によって得られた MAVS-SNP が野生型 MAVS と比較して抗ウイルス作用に与える影響を検討するために、SNP 配列をもつ MAVS の cDNA を作製した。野生型 MAVS 発現ベクターを鋳型として、SNP 配列を含むプライマーを用いて site-mutagenesis 法により cDNA の点変異を行い、塩基配列を確認した後に、遺伝子発現ベクターへの乗せ換えを行った。

(4) 各 MAVS-SNP 発現ベクターを用い、野生型 MAVS と比較した場合の抗ウイルスシグナルへの影響を検討した。

(5) 抗ウイルスシグナルへの影響が確認された MAVS-SNP を再抽出した後、本学社会医学講座が主体として実施中の、地域住民の健康増進のための「岩木健康増進プロジェクト」で得られたヒトゲノム DNA (約 1000 例) を検体として、SNP 解析を行った。

4. 研究成果

(1) オンラインデータベース上から、日本人、中国人で SNP が予想された MAVS-SNP のうち、アミノ酸置換を伴うものが 12 個抽出された。

(2) 以前に作製された野生型 MAVS 全長遺伝子を含むベクターを利用して、MAVS-SNP 遺伝子を 12 種類作製した。

(3) それらを哺乳類発現ベクターへ組換えした後、HeLa 細胞へ遺伝子導入し、野生型 MAVS とミトコンドリアとの局在を比較したところ、MAVS の細胞外への局在変化や、ミトコンドリアの形態変化をもたらす MAVS-SNP が認められた。

(4) 同様に、細胞内へ MAVS-SNP を遺伝子導入後、抗ウイルスシグナル活性化への影響を、IFN- γ の発現誘導を指標として検討した。その結果、2 本鎖 RNA により誘導される IFN- γ の発現を抑制する MAVS-SNP や、逆に発現を亢進する MAVS-SNP を確認した。

(5) MAVS の細胞内局在や IFN- γ の発現に影響を与える SNP を再抽出し、それらを検診で得られた約 1000 例のゲノム DNA を用いて、SNP 解析を行った。SNP 解析は定量 PCR を用いて行った。その結果、いずれの MAVS-SNP も検出されなかった。そこでサンプルの質の問題を確認する目的で、日本人で一定頻度 SNP が検出されることが知られているアルコール脱水素酵素 (ALDH) の SNP を行ったところ、報告通りの頻度で ALDH-SNP が検出され

たことから、MAVS-SNPの結果も問題ないことが確認された。

(6)以上のことから、データベース上で検出された、MAVS-SNPは日本人ではrare variationである可能性が示唆された。しかしながら、これらのMAVS-SNPは抗ウイルスシグナルへ影響を及ぼすことから、重篤な疾患、特に感染症と関連することが予想された。

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 6件)

以下の論文は全て査読有

1. Xing F, Matsumiya T, Hayakari R, Yoshida H, Kawaguchi S, Takahashi I, Nakaji S, Imaizumi T. Alteration of Antiviral Signalling by Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of Mitochondrial Antiviral Signalling Protein (MAVS). PLoS One. 2016 Mar 8;11(3):e0151173. doi: 10.1371/journal.pone.0151173.
2. Chiba Y, Matsumiya T, Satoh T, Hayakari R, Furudate K, Xing F, Yoshida H, Tanji K, Mizukami H, Imaizumi T, Ito E. Retinoic acid-inducible gene-1-like receptor (RLR)-mediated antiviral innate immune responses in the lower respiratory tract: Roles of TRAF3 and TRAF5. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Nov 13;467(2):191-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.010.
3. Imaizumi T, Sakashita N, Mushiga Y, Yoshida H, Hayakari R, Xing F, Wang L, Matsumiya T, Tanji K, Chiba Y, Furudate K, Kawaguchi S, Murakami M, Tanaka H. Desferrioxamine, an iron chelator, inhibits CXCL10 expression induced by polyinosinic-polycytidylic acid in U373MG human astrocytoma cells. Neurosci Res. 2015 May;94:10-6. doi: 10.1016/j.neures.2015.01.001.
4. Imaizumi T, Numata A, Yano C, Yoshida H, Meng P, Hayakari R, Xing F, Wang L, Matsumiya T, Tanji K, Tatsuta T, Murakami M, Tanaka H. ISG54 and ISG56 are induced by TLR3 signaling in U373MG human astrocytoma cells: possible involvement in CXCL10 expression. Neurosci Res. 2014 Jul;84:34-42. doi: 10.1016/j.neures.2014.03.001.
5. Imaizumi T, Aizawa T, Hayakari R, Xing F, Meng P, Tsuruga K, Matsumiya T, Yoshida H, Wang L, Tatsuta T, Tanaka H. Tumor necrosis factor-synergistically enhances polyinosinic-polycytidylic acid-induced toll-like receptor 3 signaling in cultured normal human mesangial cells: possible involvement in the pathogenesis of lupus nephritis. Clin Exp Nephrol. 2015 Feb;19(1):75-81. doi: 10.1007/s10157-014-0956-3.
6. Meng P, Yoshida H, Tanji K, Matsumiya T, Xing F, Hayakari R, Wang L, Tsuruga K, Tanaka H, Mimura J, Kosaka K, Itoh K, Takahashi I, Kawaguchi S, Imaizumi T. Carnosic acid attenuates apoptosis induced by amyloid-1-42 or 1-43 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Neurosci Res. 2015 May;94:1-9. doi: 10.1016/j.neures.2014.12.003.

[学会発表](計 4件)

1. Xing F, Matsumiya T, Hayakari R, Yoshida H, Takahashi I, Nakaji S, Imaizumi T. Single nucleotide polymorphism (SNP) of mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS). 第88回日本生化学会大会 2015年11月30日~12月4日, 神戸市ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
2. Xing F, 松宮朋穂, 早狩亮, 吉田秀見, 今泉忠淳. I型インターフェロン非依存的なSTAT1リン酸化におけるIKKの役割の検討 第98回弘前医学会例会 2014年6月8日, 八戸グランドホテル(青森県・八戸市)
3. Xing F, Matsumiya T, Hayakari R, Yoshida H, Imaizumi T. Involvement of IKK in type I interferon-independent phosphorylation of STAT1 in response to double-stranded RNA. 第87回日本生化学会大会 2014年10月15日~10月19日, 国立京都国際会館(京都府・京都市)
4. Xing F, Matsumiya T, Hayakari R, Yoshida H, Imaizumi T. Double-stranded RNA induces the expression of type I interferon-stimulated genes 54 and 56 in human astrocyte cell line. 12th International Congress of Neuroimmunology. 2014年11月8日~11月15日(Mainz, Germany)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

Xing Fei(Xing Fei)

弘前大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：70711985