

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293107

研究課題名(和文) RNAセンサーを起点とした抗ウイルス自然免疫応答制御メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis on molecular mechanisms of antiviral innate immune regulation via RNA sensors

研究代表者

河合 太郎 (Kawai, Taro)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：50456935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスが感染すると生体は自然免疫受容体を介して察知し排除する。この察知の中心的な役割を果たすのがウイルスRNA認識受容体であるRIG-I-like receptors (RLRs)である。本研究では、RLRsの活性化を負に制御する因子としてArl5bを同定するとともに、正に制御する脂質リン酸化酵素PIKfyveを同定した。また、RLRのシグナルを正に制御する新たな因子としてRNA結合蛋白質HuRを同定した。本研究では、HuRの標的遺伝子としてリン酸化酵素PLK2 mRNAを同定し、PLK2がRLRを介するI型インターフェロン産生を制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Virus infection is usually sensed by innate immune receptors for foreign RNAs such as RIG-I-like receptors (RLRs). In this research, we have identified Arl5b as a negative regulator for RLRs signaling. Moreover, we have discovered a lipid kinase PIKfyve as a positive regulator for RLRs. Moreover, we have identified RNA-binding protein HuR as a positive regulator for RLR signaling. We found that HuR binds to mRNA encoding the kinase Plk2 and it plays a critical roles in induction of type I interferon during RLR signaling. These findings demonstrate that HuR-mediated stabilization of Plk2 mRNA regulates antiviral innate immunity.

研究分野：自然免疫

キーワード：自然免疫 ウイルス感染 シグナル伝達 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

ウイルスの宿主への侵入が宿主自然免疫系により察知されると、生体は抗ウイルス作用をもつ I 型インターフェロンや炎症性サイトカインが分泌される。これらサイトカインはウイルス増殖の抑制や炎症反応を誘導するとともに、T 細胞や B 細胞によるウイルス特異的な獲得免疫の成立においても重要な役割を果たす。ウイルスの複製産物としての RNA やゲノム RNA が宿主細胞質内へと遊離すると、宿主細胞は RIG-I-like receptor (RLR) ファミリーと呼ばれる分子群を介して RNA を認識し自然免疫応答を誘導する。RLR は、RIG-I と MDA5 から形成される RNA ヘリカーゼファミリーであり、それぞれ異なる RNA 型ウイルスを認識する。RLR はウイルス RNA の認識とその後の自然免疫応答惹起において中心的な役割を果たしているが、RIG-I による RNA 認識の細胞内での場や、その活性化機構については不明な点が多い。我々はこれまで I 型インターフェロン発現誘導制御に関与する分子の発現スクリーニング系を構築し、いくつかの陽性クローンを得てきた。それらの中に、ウイルス感染に伴い細胞質から細胞質内顆粒状の構造体へと移行する因子として HuR (別名 ELAV1) と呼ばれる分子を見出した。HuR は RNA 結合タンパク質であり、標的 mRNA の安定化を誘導することが知られている。また、我々は、RLRs を介するシグナル伝達を負に制御する調節因子として RLR ファミリーメンバーの一つ MDA5 を負に制御する因子として低分子量 G タンパク質の一つ Arf15B (Arf-like GTPase 5b) を同定した。本研究では、我々が新たに見いだした RLR を介する抗ウイルス自然免疫応答の制御因子を中心に解析を行った。

2. 研究の目的

RLR を介する外来 RNA の認識は I 型インターフェロンや炎症性サイトカインといった自然免疫応答に加え、抗原特異的な獲得免疫の成立においても中心的な役割を果たす。本研究では、我々が独自に同定した HuR や Arf15B を中心に解析することで、RLR を介した抗ウイルス応答誘導機構の仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

まず、Cas9/CRISPR システムによるゲノム編集技術を用いて HuR を欠損するマウスマクロファージ RAW264.7 細胞を 2 ライン樹立した。この細胞を用いて、合成二本鎖 RNA Poly (I:C) やウイルスに対するサイトカイン産生や遺伝子発現について野生型と比較し検討した。また、HuR と結合する mRNA の同定も行い、この標的因子が抗ウイルス応答に関与するか検討を行った。

また、Arf15B に関しては、結合タンパク質の同定、遺伝子欠損マウスの樹立を通して、RLR を介するシグナル伝達経路における役割

を中心に解析を行った。

4. 研究成果

樹立した HuR 欠損細胞では合成二重鎖 RNA である Poly (I:C) 刺激後のインターフェロン遺伝子の発現が野生型細胞と比べ低下していた (図 1)。

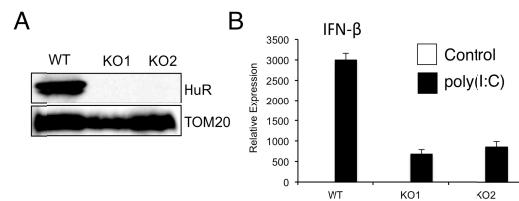
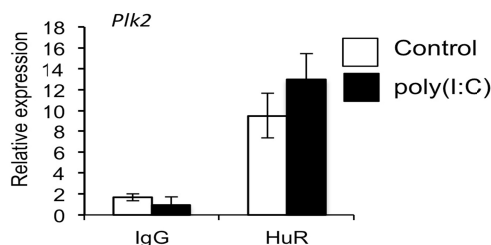


図 1 HuR の発現 (A) と poly (I:C) に対する IFN 遺伝子発現

そこで野生型と HuR 欠損細胞間でマイクロアレイにより網羅的に遺伝子発現解析を行ったところ、ケモカインやシグナル伝達分子を始めとする遺伝子群の発現に差が認められた。それらの中の一つ、Polo-Like Kinase 2 (PLK2) はインターフェロン 遺伝子の転写を調節する IRF3 の活性化に関与していることが示唆されている。そこで、PLK の阻害剤である BI2536 を用いたところ、Poly (I:C) 刺激によるインターフェロン 遺伝子の発現を抑制することを見いだした。HuR が mRNA の安定性に関与していることから、HuR と PLK2 mRNA の結合を検討したところ、RAW264.7 細胞において Poly (I:C) 刺激後抗 HuR 抗体免



疫沈降物中に PLK2 mRNA が検出された (図 2)。図 2 IgG 抗体及び抗 HuR 抗体で HuR と共沈する PLK2 mRNA の比較

これらのことから、HuR は PLK2 mRNA の安定化を誘導することで IFN の産生に関与する可能性が示唆された。さらに、PLK2 は IRF3 の核内移行を制御することが示されていることから、IRF3 の局在を検討したところ、HuR 欠損株では、Poly (I:C) 刺激後の IRF3 核移行が阻害されていた。これらのことから、HuR は PLK2 mRNA の発現を制御することで RLR を介する自然免疫応答を正に制御する因子であることが示唆された。

これと平行して我々は、Arf1 ファミリー分子群に対する発現ベクターを構築し MDA5 とともに培養細胞へ強制発現させインターフェロン 遺伝子プロモーター活性化を指標に発現スクリーニングを行い、Arf15B が MDA5 によるインターフェロン プロモーターの活

性を減少させることを見いだした。さらに、MDA5 と Ar15B が複合体を形成すること、またこの抑制効果は Ar15B の GTP/GDP 結合活性に依存しないことを明らかにした。そこで、Ar15B を欠損するマウスを作成したが、胎生致死であったため胎児から線維芽細胞を樹立した。この細胞を用いて解析を行った結果、Ar15B 欠損細胞においては Poly (I:C) や脳心筋炎ウイルスに対するインターフェロンや炎症性サイトカイン遺伝子の発現や IRF3 や NF- κ B の活性化が野生型と比して上昇していた。以上の結果から、Ar15B は MDA5 を介する自然免疫応答を負に制御する機能を持つことが示唆された。

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 11 件)

1 Kawasaki T, Ito K, Miyata H, Akira S, Kawai T. Deletion of PIKfyve alters alveolar macrophage populations and exacerbates allergic inflammation in mice. *EMBO J*. 査読有 . 印刷中 doi: 10.15252/embj.201695528.

2 Ori D, Murase M, Kawai T. Cytosolic nucleic acid sensors and innate immune regulation. *Int Rev Immunol*. 2017 Mar 4;36(2):74-88. 査読有 . doi: 10.1080/08830185.2017.1298749.

3 Kozaki T, Komano J, Kanbayashi D, Takahama M, Misawa T, Satoh T, Takeuchi O, Kawai T, Shimizu S, Matsuura Y, Akira S, Saitoh T. Mitochondrial damage elicits a TCDD-inducible poly (ADP-ribose) polymerase-mediated antiviral response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Mar 7;114(10):2681-2686. 査読有 . doi: 10.1073/pnas.1621508114.

4 Kitai Y, Kawasaki T, Sueyoshi T, Kobiyama K, Ishii KJ, Zou J, Akira S, Matsuda T, Kawai T. DNA-containing exosomes derived from cancer cells treated with Topotecan activate a STING-dependent pathway and reinforce antitumor immunity. *J Immunol*. 2017 Feb 15;198(4):1649-1659. 査読有 . doi: 10.4049/jimmunol.1601694.

5 Kumar S, Ingle H, Mishra S, Mahla RS, Kumar A, Kawai T, Akira S, Takaoka A, Raut AA, Kumar H. IPS-1 differentially induces TRAIL, BCL2, BIRC3 and PRKCE in type I interferon-dependent and -independent anticancer activity. *Cell Death Dis*. 2015 May 7;6:e1758. 査読有 . doi: 10.1038/cddis.2015.122.

6 Matsuda T, Murao N, Katano Y, Juliandi B, Kohyama J, Akira S, Kawai T, Nakashima K. TLR9 signalling in microglia attenuates seizure-induced

aberrant neurogenesis in the adult hippocampus. *Nat Commun*. 2015 Mar 9;6:6514. 査読有 . doi: 10.1038/ncomms7514.

7 Pandey S, Kawai T, Akira S. Microbial sensing by toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015 Jan;5(1):a016246. 査読有 . doi: 10.1101/cshperspect.a016246.

8 Kitai Y, Takeuchi O, Kawasaki T, Ori D, Sueyoshi T, Murase M, Akira S, Kawai T. Negative regulation of melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)-dependent antiviral innate immune responses by Arf-like protein 5B. *J Biol Chem*. 2015 Jan 9;290(2):1269-80. 査読有 . doi: 10.1074/jbc.M114.611053.

9 Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014 Sep 25;5:461. 査読有 . doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.

10 Imanishi T, Ishihara C, Badr Mel S, Hashimoto-Tane A, Kimura Y, Kawai T, Takeuchi O, Ishii KJ, Taniguchi S, Noda T, Hirano H, Brombacher F, Barber GN, Akira S, Saito T. Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation. *Nat Commun*. 2014 Apr 10;5:3566. 査読有 . doi: 10.1038/ncomms4566.

11 Kuniyoshi K, Takeuchi O, Pandey S, Satoh T, Iwasaki H, Akira S, Kawai T. Pivotal role of RNA-binding E3 ubiquitin ligase MEX3C in RIG-I-mediated antiviral innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 15;111(15):5646-51. 査読有 . doi: 10.1073/pnas.1401674111.

[学会発表](計 23 件)

1 Kawai T. Recognition of PAMPs and DAMPs by mammalian innate immunity. 第 58 回日本植物生理学会年会. 2017 年 3 月 17 日. 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市). シンポジウム

2 Murase M, Hakozaiki R, Kawasaki T, Kawai T. Role of endosomal acidification in TLR-mediated inflammatory responses. 第 45 回日本免疫学会学術集会. 2016 年 12 月 7 日. 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 口頭・ポスター発表

3 Putri DD, Kawasaki T, Kawai T. Functional elucidation of lipid phosphatases, myotubularin related protein (MTMR) 3 and 4, in modulating antiviral innate immune response. 第 45 回日本免疫学会学術集会. 2016 年 12 月 6 日. 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) ポスター発表

4 Kawasaki T, Kawai T. PIKfyve regulates development and function of alveolar macrophage. 第 45 回日本免疫学会学術集会.

2016年12月6日・沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 口頭・ポスター発表
5 Sueyoshi T, Kawasaki T, Kawai T.
Regulation of antiviral innate immunity by an RNA-binding protein HuR. 第45回日本免疫学会学術集会. 2016年12月5日. 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 口頭・ポスター発表
6 村瀬本弥, 箱崎理花, 川崎拓実, 河合太郎. Toll-Like Receptor (TLR)を介した自然免疫応答におけるV型ATPaseの役割. 第39回日本分子生物学会年会. 2016年12月3日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)ポスター発表
7 Zobaer H, Monwan W. Kawai T. An Endoplasmic reticulum stress transducer CREB3 regulates innate immunity upon viral infection. 第39回日本分子生物学会年会. 2016年12月2日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)ポスター発表
8 佐竹茉以, 川崎拓実, 河合太郎. 肥満誘導に関連した炎症誘導性マクロファージにおけるPIKfyveの役割. 第39回日本分子生物学会年会. 2016年12月2日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)ポスター発表
9 Sueyoshi T, Kawasaki T, Kawai T. The role of RNA binding protein Hu antigen R (HuR) in antiviral innate immune responses. 第39回日本分子生物学会年会. 2016年12月2日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)ポスター発表
10 Nagayama M, Kawasaki T, Kawai T. Molecular mechanism of IL-33 production. 第39回日本分子生物学会年会. 2016年12月2日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)ポスター発表
11 鍛代悠一, 河合太郎. 自然免疫による癌細胞DNAの認識と抗腫瘍免疫発動機構の解析. 第25回日本Cell Death学会. 2016年9月10日. 品川区立総合区民会館(東京都品川区)口頭発表
12 Sueyoshi T, Kawasaki T, Kawai T. Identification of HuR as a molecule that mediates antiviral innate immune responses. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Gene Expression & Signaling in the Immune System. 2016年4月27日. Cold Spring Harbor 研究所(アメリカ合衆国ニューヨーク州)ポスター発表
13 河合太郎. ウイルスRNAに対する自然免疫応答におけるユビキチンリガーゼMex3cの役割. 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会合同大会. 2015年12月3日. 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)ワークショップ.
14 村瀬元弥, 川崎拓実, 河合太郎. ELMO domain-containing protein 2 (ELMOD2)による抗ウイルス自然免疫制御機構の解析. 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会合同大会. 2015年12月3日. 神戸ポ-

ートアイランド(兵庫県神戸市)ポスター発表
15 Kawasaki T, Kawai T. Role of the lipid kinase PIKfyve in alveolar macrophage. 第44回日本免疫学会学術集会. 第44回日本免疫学会学術集会. 2015年11月18日. 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)口頭・ポスター発表
16 Sueyoshi T, Kawasaki T, Kawai T. Identification of HuR as a molecule that mediates antiviral innate immune responses. 第44回日本免疫学会学術集会. 2015年11月18日. 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)ポスター発表
17 Sueyoshi T, Murase M, Murata R, Kawasaki T, Kawai T. Identification of HuR as a molecule that mediates antiviral innate immune responses. 第43回日本免疫学会学術集会. 2014年12月12日. 国立京都国際会館(京都府京都市)ポスター発表
18 Kawasaki T, Tanaka R, Ito K, Akira S, Kawai T. Physiological role of the lipid kinase PIKfyve in innate immune responses. 第43回日本免疫学会学術集会. 2014年12月12日. 国立京都国際会館(京都府京都市)口頭・ポスター発表
19 Kitai Y, Ori D, Sueyoshi T, Murase M, Kawasaki T, Kawai T. Negative regulation of Mda5-mediated antiviral response by Arl5B. 第43回日本免疫学会学術集会. 2014年12月11日. 国立京都国際会館(京都府京都市)口頭・ポスター発表
20 鍛代悠一, 織大祐, 末吉拓也, 村瀬本弥, 川崎拓実, 竹内理, 審良静男, 河合太郎. Arl5BによるMDA5依存的な自然免疫シグナルの抑制機構の解明. 第37回日本分子生物学会年会. 2014年11月26日(神奈川県横浜市)ポスター発表
21 鍛代悠一, 織大祐, 末吉拓也, 村瀬本弥, 川崎拓実, 竹内理, 審良静男, 河合太郎. Arl5B-mediated negative regulation of MDA5-dependent innate immune signaling. 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 2014年9月25日. 奈良県新公会堂(奈良県奈良市)ポスター発表
22 鍛代悠一, 織大祐, 末吉拓也, 村瀬本弥, 川崎拓実, 竹内理, 審良静男, 河合太郎. Arl5BによるMDA5を介した自然免疫シグナルの抑制機構の解明. 第66回日本細胞生物学会大会. 2014年6月13日. 奈良県新公会堂(奈良)ポスター発表
23 川崎拓実, 武村直紀, ダロンスタンドリ, 審良静男, 河合太郎. 免疫応答におけるホスファチジルイノシトール5リン酸の役割. 第66回日本細胞生物学会大会. 2014年6月11日. 奈良県新公会堂(奈良県奈良市)ポスター発表

[図書](計2件)

1 村瀬本弥, 末吉拓也, 河合太郎. ダメージ関連分子(DAMPs)と慢性炎症. 最新醫學 71

卷 11 月増刊号(通巻 917 号)28-36 頁、2016
年 11 月

2 末吉拓也、村瀬本弥、河合太郎．TRIM 分子による核酸に対するパターン認識レセプターの制御反応．科学評論社 臨床免疫・アレルギー科 62(1) 120-126 頁．2014 年 7 月

〔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
<http://bsw3.naist.jp/kawai/>

6．研究組織

(1)研究代表者 河合 太郎
(Taro Kawai)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・教授
研究者番号：5 0 4 5 6 9 3 5

(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
()