

RIG-I シグナル調節因子 ZAPS の ウイルス感染防御における生体内の役割

学位論文内容の要旨

【背景と目的】我々の体内には、自然免疫系と適応免疫系という二つの免疫システムが存在する。自然免疫系は、マクロファージや樹状細胞などによって担われ、微生物の侵入初期における免疫応答に重要である。体内への微生物の侵入は、自然免疫系に属する認識受容体が微生物由来の様々な構成分子の構造、すなわち糖や脂質、タンパク質、核酸からなる分子パターン（病原体関連分子パターン:PAMPs, pathogen-associated molecular patterns）を認識していることが示されており、「パターン認識受容体 (PRRs; pathogen-associated molecular receptors)」と総称される。ヒトにおける PARP ファミリー分子は現在 17 種類が知られ、DNA 修復、中心体複製、テロメアの維持、細胞死誘導および遺伝子発現調節などの生理的機能を担い、PARP 活性には依存的/非依存的に炎症や変性疾患の発生過程に関わる。我々は、PARP-13/ZAP (Zincfinger antiviral protein; ZAP) の isoform である ZAP short form (ZAPS) が、ヒトの細胞において細胞質型 PRRs である RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I; RIG-I) と結合し RIG-I の機能を活性化することで、I 型インターフェロン (I 型 IFNs) 遺伝子や炎症性サイトカイン遺伝子の発現を増強し、RIG-I によって認識される Newcastle disease virus (NDV) や、インフルエンザウイルスなどの一本鎖 RNA (-) ウイルスに対する抗ウイルス作用をもたらすことを、ヒト由来の細胞を用いて明らかにした (Nature immunology, published online 21 November 2010)。しかし、*in vivo* における ZAPS のウイルス感染防御における役割については、これまで明らかにされていなかった。

【材料と方法】マウス ZAPS の cDNA を組み込んだベクターを胚に注入し、誕生したマウスの尾でタイピングを行った。その結果、#A6、#B10 の 2 系統の HA-ZAPS トランスジェニックマウスを作製した。mouse embryonic fibroblasts (MEFs) に対し、RIG-I のリガンドである、5'末端に 3 リン酸構造を持つ一重鎖 RNA (RNA carrying 5'-triphosphate modification; 3pRNA) の細胞質内投与や、NDV 感染を行った。3pRNA 刺激後、NDV 感染後の細胞から total RNA を回収し quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 法を用いて I 型 IFNs および炎症性サイトカイン遺伝子の mRNA 発現を検討した。NDV 感染では、感染後の培養上清中の IFN- β を ELISA 法で測定した。続いて *in vivo* において、経鼻的にインフルエンザウイルス (strains A/X31 (H3N2)) 感染を行い、感染 36 時間後の肺より total RNA を抽出し、qRT-PCR 法にて IFN- β の mRNA を測定した。

【結果】 マウス尾より抽出した DNA を用いて HA-ZAPS の遺伝子タイピングを行った。その結果、#A6、#B10 の 2 系統の HA-ZAPS トランスジェニックマウスを樹立した。尾の HA-ZAPS のコピー数は、#A6 マウスと比較し、#B10 マウスにおいて高い傾向を示した。続いて、各マウスより MEFs を作製した (ZAPS #A6 MEFs, ZAPS #B10 MEFs)。MEFs より total RNA を抽出し、ZAP/ZAPS の相同配列部位に設計したプライマーペアで qRT-PCR 法を行った。C57BL/6J マウス由来の MEFs (C57BL/6J MEFs; WT MEFs) と比較し、ZAPS #A6 MEFs, ZAPS #B10 MEFs の双方で、ZAP/ZAPS の mRNA 発現が ZAPS #A6 MEFs で 2.8 倍、ZAPS #B10 MEFs で 5.8 倍に上昇した。ZAPS #B10 マウスの臓器 (脳、胸腺、肺、心臓、胃、肝臓、脾臓、腎臓、大腸、卵巣) においてトランスジーン由来の HA-ZAPS mRNA の発現を確認した。続いて、MEFs の cell lysate を用いて、抗 HA 抗体で免疫沈降法を行った。Western-Blot 法で ZAPS #A6 MEFs, ZAPS #B10 MEFs の双方における HA-ZAPS の発現をタンパク質レベルで確認した。さらに、ZAPS #A6 MEFs, ZAPS #B10 MEFs に対し 3pRNA の細胞質内投与を行った。その結果、刺激後 6 時間における IFN- β の mRNA 発現が、WT MEFs と比較し ZAPS #A6 MEFs では 2 倍、ZAPS #B10 MEFs では 13.3 倍に、炎症性サイトカイン遺伝子 TNF- α の mRNA 発現が、刺激後 6 時間で ZAPS #A6 MEFs では 9 倍、ZAPS #B10 MEFs では 5.3 倍に増強された。ZAPS #B10 MEFs に対し NDV 感染を行った結果、ZAPS #B10 MEFs における I 型 IFNs や炎症性サイトカイン遺伝子の mRNA 発現が顕著に増強され、ZAPS による RIG-I シグナルの増強効果が示された。また、NDV 感染 24 時間後の培養上清を用いた IFN- β の ELISA 法では、ZAPS #B10 MEFs において IFN- β の産生量が増加した。続いて、マウス個体に対し経鼻的にインフルエンザウイルス (strains A/X31(H3N2)) 感染を行い、感染 36 時間後の肺より total RNA を抽出し、qRT-PCR 法にて IFN- β の mRNA を測定した。その結果、C57BL/6J マウスと比較し、ZAPS #B10 マウスにおいて、IFN- β の mRNA が有意に上昇した。

【考察】 HA-ZAPS トランスジェニックマウスより作製した MEFs に対する 3pRNA の細胞質内投与と、NDV 感染において、I 型 IFNs 遺伝子や炎症性サイトカイン遺伝子の mRNA 発現が顕著に増強した。この結果は、我々がヒト由来の細胞を用いて見出した、ZAPS が RIG-I シグナルの調節因子であるという結果を再現した。in vivo における x-31 インフルエンザウイルス感染においても IFN- β の mRNA 発現誘導は HA-ZAPS トランスジェニックマウスにおいて顕著に増強されたことから、今後は in vivo における RNA ウイルス感染実験を進め、ZAPS の RIG-I シグナル調節機構の解明を行う予定である。

【結論】

- 1) 2 系統の HA-ZAPS トランスジェニックマウスを樹立し、各臓器でのトランスジーン の発現を確認した。
- 2) 2 系統の HA-ZAPS トランスジェニック MEFs に対し 3pRNA の細胞質内投与を行った結果、WT MEFs と比較し、IFN- β や TNF- α の mRNA 発現が顕著に増強された。
- 4) ZAPS #B10 MEFs では NDV 感染において、I 型 IFNs 遺伝子や炎症性サイトカイン遺伝子の mRNA 発現が増強され、タンパク質レベルで IFN- β の産生量が有意に増強された。
- 5) in vivo における肺へのインフルエンザウイルス感染において、感染 36 時間後の肺における IFN- β の mRNA が ZAPS #B10 マウスにおいて有意に上昇した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	瀬谷	司
副査	教授	志田	壽利
副査	教授	有川	二郎
副査	教授	浅香	正博
副査	教授	佐邊	壽孝

学位論文題名

RIG-I シグナル調節因子 ZAPS の ウイルス感染防御における生体内の役割

自然免疫系において、パターン認識受容体は病原体由来の分子パターンを認識し、下流のシグナル伝達を誘導する重要な分子であるが、そのなかでも RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I; RIG-I) は、細胞内に侵入したウイルス由来の RNA を認識する。本研究では、PARP-13/ZAP (Zincfinger antiviral protein; ZAP) のアイソフォームである ZAP short form (ZAPS) が、RIG-I と結合し、RIG-I の機能を活性化することで、I 型インターフェロン (I 型 IFNs) 遺伝子や炎症性サイトカイン遺伝子の発現を増強し、Newcastle disease virus (NDV) や、インフルエンザウイルスなどの一本鎖 RNA (-) ウイルスに対する抗ウイルス作用をもたらすことを、ヒト由来の細胞を用いて示した。続いて、ZAPS トランスジェニックマウスを作製し、mouse embryonic fibroblasts (MEFs) や、マウス個体を用いて RNA ウイルス感染を中心とした実験を行った。ZAPS トランスジェニックマウスにおける ZAPS トランスジーン mRNA およびタンパク質での発現を確認した後、MEFs に対し、RNA carrying 5'-triphosphate modification (3pRNA) の細胞質内投与や NDV 感染を行った。定量リアルタイム PCR 法を用いた検討の結果、ZAPS トランスジェニックマウス由来の MEFs における I 型 IFNs や炎症性サイトカイン遺伝子の mRNA 発現が顕著に増強された。マウス個体に対するウイルス感染では、x-31 (H3N2) インフルエンザウイルス感染 36 時間後の肺で、ZAPS トランスジェニックマウスにおける IFN- α の mRNA 発現が有意に増強された。致死的なウイルスである PR8 (H1N1) インフルエンザウイルス感染では、ZAPS トランスジェニックマウス群のみにおける生存例がみられた。

審査会では、学位論文の発表後、各教授より質問がなされた。最初に、副査志田壽利教授から実験に MEFs を用いた理由についての質問があった。申請者は、MEFs は RNA ウイルス感染における I 型 IFNs や炎症性サイトカインの mRNA およびタンパク質レベルでの誘導を検討しやすい細胞であり、論文報告も多数あると回答した。つづいて、PARP ファミリー分子に着目した理由についての質問があった。PARP ファミリー分子のうち、PARP1 は核内のみならずミトコンドリアに局在すること、また、自然免疫系の重要なアダプター分子はミトコンドリアに局在するものが知られており、自然免疫系における PARP

ファミリー分子の役割を解析するきっかけとなったと回答した。副査有川二郎教授から、インフルエンザウイルス感染に、x-31(H3N1)ウイルスと PR8(H1N1)ウイルスを用いた理由についての質問があった。申請者は、x-31(H3N1)ウイルスは感染組織における I 型 IFNs や各種炎症性サイトカイン遺伝子の mRNA 誘導がされ易い型である事から使用したこと、PR8(H1N1)はマウスに対し致命的なウイルスであり、生存期間の検討を行うのに適したウイルスであること、また、論文報告も多数あることを説明した。有川教授からは、マウスのウイルス感染の際、衰弱したマウスは動物愛護の観点から安楽死させるべきとの意見が挙げられた。副査佐邊壽孝教授から、トランスジーンされた ZAPS が、RIG-I の機能を増強することで抗ウイルス効果をもたらしている直接的な証拠を示すべきとの意見が挙げられた。また、スライドの総括において、次の実験計画を明確に示すべきであるとの指摘が出た。申請者は、これらの意見に理解を示した。副査浅香正博教授から、C 型肝炎ウイルス(HCV)感染における ZAPS のかかわりと、創薬に関するアイデアについての質問があった。申請者は、内在性の ZAPS の発現を増強し RIG-I の機能を活性化することで、I 型 IFNs の産生が増強され、HCV の排除につながる創薬が期待できるのではないかと回答した。

この論文は、ZAPS が RIG-I の機能を増強することで、生体内における RNA ウイルス感染に対する抗ウイルス効果をもたらすことを示し、今後、この研究成果をもとに臨床的な応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を取得するのに十分な資格を有するものと判断した。