

学位論文題名

核酸認識性 DEAD box 型ヘリケースの自然免疫活性化機構

学位論文内容の要旨

「背景」

哺乳類の免疫系は自然免疫と獲得免疫の二つに大きく分けられる。自然免疫はパターン認識レセプター (PRR) が病原微生物の特徴的な構造を捉えることで炎症性サイトカインやⅠ型インターフェロンを産生して感染初期の免疫が発動する。自然免疫によって獲得免疫系が活性化するため、このシステムは生体防御に非常に重要である。

ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の Toll が発見されたことをきっかけにヒトでも 10 種類の Toll 様受容体 (Toll-Like Receptor: TLR) が発見された。細胞質内のウイルス RNA を認識する受容体としては LGP2、RIG-I、MDA5 (RIG-I-like receptor: RLR) が発見された。RLR は細胞質で増殖したウイルスの複製中間体やゲノムを認識し、ミトコンドリア上の IPS-1 にシグナルを伝えてⅠ型インターフェロンの発現誘導が起こる。自然免疫に関与する PRR は非常に注目されて研究が進んでいる。

しかし、このようなインターフェロン産生系は主に脊椎動物に特異的に発達した生体防御機構であり、大多数の無脊椎動物種はインターフェロンを持たず、獲得免疫系も存在しない。それにもかかわらずウイルス感染に対して効率的な抑制手段を備えている。例えば、*C.elegans* の RNAi 機構は、長い二重鎖 RNA を切断し、20bp 程の短い RNA 断片を作る Dicer 分子がウイルス由来の二重鎖 RNA を分解し、ウイルスの抑制に働く。また、出芽酵母では RNA エキソヌクレアーゼ複合体のエキソソームがウイルスの RNA を分解することでウイルスの増殖が抑えられる。興味深いことに、このようなモデル生物の生体防御系として明らかになった分子の多くはヒトにも保存されている。しかし、その機能については明らかになっていないものが多い。

我々の研究室ではこれまでウイルスに対する自然免疫応答の研究を進めてきた。その中で、麻疹ウイルス感染時に発現誘導される遺伝子群をマイクロアレイによりパネル化したところ、DDX60 遺伝子が発現誘導されていた。DDX60 は RLR と同じく DEAD box 型ヘリケースであるがその機能は全くの未知である。相同性検索からは興味深いことにエキソソームの構成因子の Ski2 と弱いながらも相同性を示した。そこで、本研究ではこの機能未知の DDX60 の分子機能を明らかにし、自然免疫における DDX60 の役割を解析することを目指した。哺乳類 DDX60 の自然免疫応答はほとんど報告がなく、成果は自然免疫の新たなメカニズムの解明につながる事が期待される。

「結果」

DDX60 の発現誘導を実験的に確認するため RT-PCR を行ったところ、細胞への牛水疱性口内炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus: VSV) 感染、ポリオウイルス感染、polyI:C 刺激、IFN- β 刺激で発現誘導されることが明らかになった。これらのことは DDX60 が刺激前から発現し、VSV やポリオウイルス感染で発現が上昇すること、さらに IFN 誘導性遺伝子であることを示している。

DDX60 と配列類似性の高い分子として Ski2 に着目した。この分子は出芽酵母のウイルスに対する生体防御に非常に重要で、エキソヌクレアーゼ複合体エキソソームと相互作用してウイルス RNA を分解することが知られている。そこで DDX60 とヒトのエキソソ

ムの構成因子との結合を調べたところ、DDX60 とエキソソームは結合し、出芽酵母の Ski2 と同様に DDX60 はヒトのエキソソームの重要な補助因子であることが予想された。

DDX60 の過剰発現やノックダウンの実験から、DDX60 が VSV やポリオウイルスの増殖を抑制することが明らかになった。DDX60 の VSV に対する増殖抑制効果はエキソソーム構成因子をノックダウンしてその機能を阻害しても見られたのに対し、RLR のアダプター分子である IPS-1 をノックダウンした場合ではその効果は減弱したため、DDX60 による VSV の抑制は IPS-1 を介する経路と関連していることが考えられた。

そこで DDX60 の RLR との関連について詳細に検討した。DDX60 は細胞質に局在し、細胞質でウイルス RNA を認識する RLR と共局在した。ウイルス感染後には DDX60 と内在性の RIG-I が結合し、また、MDA5 や LGP2 とも結合したが IPS-1 や IKKε といった RLR 経路の下流の分子とは結合しなかった。DDX60 がウイルス由来の核酸の認識に関与していることを確認するために DDX60 のヘリケースドメインのタンパク質を精製して検討したところ、DDX60 はウイルス RNA や DNA と結合することが明らかになった。さらに、DDX60 を過剰発現させることにより、RIG-I の dsRNA に対する結合量が増加した。DDX60 のノックダウンの解析から、DDX60 はウイルス感染時に RIG-I や MDA5 依存的に誘導される I 型インターフェロンやインターフェロン誘導性遺伝子の発現に必要な因子であることが示唆された。また、DDX60 の I 型インターフェロン誘導にはヘリケース活性が必要であった。

「考察」

本研究では、麻疹ウイルス感染時に樹状細胞で発現誘導される遺伝子のマイクロアレイの結果を基に、RNA ウイルスの VSV やポリオウイルスを抑制するヒト自然免疫系の因子として新たに DDX60 を発見し、RLR 以外の RNA ヘリケース分子が RLR 依存的なシグナル経路およびウイルス抑制経路に重要な働きをすることを明らかにした。DDX60 はウイルス感染時に発現が上昇し、ウイルス由来の核酸と直接相互作用する。DDX60 と RLR が結合するとこれらに結合するウイルス RNA 量も増加し、I 型インターフェロンの誘導が促進され、結果としてウイルスの増殖が抑制されると考えられる。

RIG-I の機能を調節する分子は多く見つかっているが、ウイルス感染で発現誘導され、RLR と相互作用してウイルスの増殖を抑制する DEAD box 型ヘリケースは今回発見した DDX60 が初めてである。DEAD box 型ヘリケース分子は一般的に転写や分解など核酸の代謝に関わる重要な分子群であり、その代謝反応には複数の DEAD box 型ヘリケースやその他の補助因子を必要とする場合がある。DDX60 はウイルス感染時の自然免疫系で RLR 以外にウイルスを直接つかむ因子であり、下流のアダプター分子と結合できる RLR と複合体を形成することで効果的にウイルス RNA を認識することが可能になる。

RLR/DDX60 によって認識されたウイルス RNA はその後どうなるのか。DDX60 と出芽酵母エキソソームの補助因子 Ski2 のアミノ酸配列は弱いながら相同性を示し、実際に免疫沈降の実験から DDX60 とヒトのエキソソームが結合することが明らかになった。エキソソームは細胞内 RNA の 5'CAP 構造や 3'poly(A)の維持に関与しているため、宿主の細胞種やウイルス種によっては細胞内で生じたウイルス由来の核酸が RLR/DDX60 に認識された後 DDX60 によってエキソソーム依存的に除去されている可能性が考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 一 馬

副 査 教 授 瀬 谷 司(医学研究科)

副 査 教 授 綾 部 時 芳

学位論文題名

核酸認識性 DEAD box 型ヘリケースの自然免疫活性化機構

インフルエンザや C 型肝炎ウイルス、麻疹ウイルスなど、ウイルス感染症は現在においても大きな社会問題となっている。ヒトの免疫系は樹状細胞やマクロファージ、上皮細胞などからなる自然免疫と T 細胞、B 細胞を中心とした獲得免疫から構成されている。

自然免疫系による生体内に侵入した病原微生物の認識とサイトカイン産生や抗原提示がその後の獲得免疫系の活性化に非常に重要であることが明らかになって以来、近年ではウイルス感染時の自然免疫活性化の分子メカニズムの解明に関する研究が盛んに行われている。

しかし自然免疫シグナルに重要な因子の一端が明らかになってきている一方で、ヒトに感染する多数のウイルスを抑制し、それを排除する機構は詳細にはまだ明らかにされていない。ウイルス感染の前後では機能の既知、未知に関わらず宿主の多数の遺伝子の発現量が変動し、これらの変動因子がウイルス感染に対する生体防御に重要な機能を持つことが指摘されている。したがって、未だ多数あるとされている機能未知の宿主の生体防御因子を明らかにすることがヒトの自然免疫を理解することに非常に重要である。

本論文は、RNA ウイルスの感染を抑制する新規分子を明らかにし、それにより新しい感染症制御メカニズムを提唱することを目的として研究を行った。アプローチとしては、ヒトの自然免疫系で重要な役割を持つ樹状細胞に麻疹ウイルスが感染したときに発現誘導される遺伝子をマイクロアレイにより解析した既存のデータを用いた。そこから明らかになった機能未知の遺伝子群に対して、データベースによる機能ドメインの検索、遺伝子組み替えと発現、免疫系の各種アッセイ、核酸や蛋白質の精製など免疫生化学、細胞生物学的手法を用いて各遺伝子の機能解析を行った。その結果、RNA ウイルスの感染で強く発現誘導され、ウイルスの細胞内増殖を強く抑制する因子として DEAD box RNA ヘリケース DDX60 を同定した。DDX60 は細胞質内のウイルス RNA センサー RIG-I-like receptors とウイルス感染後に強く結合する。各種のヒト細胞において DDX60 の発現を抑制または欠損させると、RNA による刺激や VSV やポリオウイルス、HSV-1 などのウイルスの感染により引き起こされる I 型インターフェンや、そのほかの炎症性サイトカインの産生が強く抑制された。今回の研究から、DDX60 は RIG-I を介する自然免疫シグナル経路において重要な調節因子であることが示され、感染症の治療の新しいターゲットタンパク質ともなりうる可能性が示唆された。

これを要約するに、著者は自然免疫系でこれまで明らかにされていなかった新規因子 DDX60 を同定することにより、ウイルス感染を検知するメカニズムの新知見を得たものであり、自然免疫システムの理解に対して貢献するところ大なるものがある。DDX60 は多くの研究において病原微生物の感染でその発現が増大し、免疫系への関与が指摘されていた分子であったが、実際にこの分子に焦点を当てて詳細な機能解析を行い、ヒトの生体防御に貢献することを明らかにしたのは本研究が初めてであり高く評価できる。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。