

論文の内容の要旨

論文題目 抗ウイルス生体防御を司るシグナル伝達の解析

氏名 岡崎 朋彦

I. 緒言

高等哺乳動物は、ウイルスの感染の初期においては自然免疫系を用い、後期においては獲得免疫系を用いてウイルスに対抗する。自然免疫応答の中でも特に中心的な役割を担うのが、液性因子 I 型インターフェロン (IFN) を介した応答である。IFN は細胞にウイルス複製を制限する活性を与え、“抗ウイルス状態”へと導く。この IFN 応答は抗ウイルスの生体防御に必須であることが示されているものの、その制御機構にはまだ未解明な点が多く残されている。また、抗ウイルスの生体防御には、IFN 産生とは別に感染細胞が細胞死を誘導する機構が知られている。これは、感染細胞を取り除くことで感染拡大を抑制できるからであると考えられている。しかしながら、ウイルス感染がいかなるメカニズムで細胞死を誘導するのかは分かっていない。本研究では、ウイルス感染によって IFN- β が産生される機構 (II 章) と細胞死が誘導される機構 (III, IV 章) について解析を行い、新たなシグナル伝達経路を明らかにした。更に、この二つのストラテジーの使い分け機構を見出した (III, IV 章)。

II. ウイルス感染による IFN- β 産生機構

非免疫系の細胞における IFN 応答においては、IFN- β が主に発現誘導される。MAPK の p38/JNK 経路の活性化が IFN- β 産生に必須であることがこれまで示されているにも関わらず、ウイルス感染、dsRNA 刺激時にいかにして p38/JNK 経路が活性化するかについては分かっていなかった。そこで本研究では、ウイルス感染、dsRNA による MAPK 経路の活性化メカニズムの解明を目的とし、それを通じて IFN- β の発現制御機構の解明を試みた。

細胞内に侵入したウイルス由来の RNA や dsRNA を認識する RNA センサーとしては RIG-I 様受容体 (RLR) の RIG-I、MDA5 が知られている。RNA 干渉法 (RNAi) を用いて、まず dsRNA による p38/JNK 経路の活性化において、RLR とその下流のアダプター分子：IPS-1 が関与しているかを検討し、その関与を見出した。MAPK が活性化する際には、MAPKKK、MAPKK によるキナーゼカスケードを介することが広く知られている。そこで、IPS-1 の下流で働く MAPKKK の候補として、ASK1 という分子に注目した。すると、dsRNA 刺激やウイルス感染、IPS-1 の過剰発現によって ASK1 活性化の指標である Thr838 (ヒト) のリン酸化が上昇することが分かり、dsRNA 刺激、ウイルス感染時に ASK1 が活性化する可能性が示唆された。次に、IFN- β 産生に対する ASK1 の必要性を検討した。ASK1 のノックダウンにより、ウイルス感染、dsRNA 刺激による IFN- β の転写量が顕著に減少し、p38/JNK 経路の活性化が抑制されることが分かった。更に、ASK1 がウイルス感染の拡大を防ぐのに必要かどうかを検討するため、ウ

ウイルス感染の拡大をモニターする系として GFP をコードしたセンドライウイルス:SeV-GFP を用いた。SeV-GFP を感染させ 48 時間後に観察すると、野性型由来の MEF に比べ ASK1 KO 由来の MEF では GFP 陽性細胞が著しく増加していた。このことは、ASK1 がウイルス感染の拡大を防いでいることを示している。以上の結果より、ASK1 は RLR 経路の新たな構成因子であり、IFN- β の産生を介してウイルス複製を制限する必須の分子であることが示唆された。

本研究によって、ウイルス感染及び dsRNA 刺激における MAPK の活性化経路が明らかになり、IFN- β の転写制御機構の重要なメカニズムの一端が明らかになった。更に、MAPKKK である ASK1 の IFN 産生における関与を新たに見出した。

III. ウイルス感染による細胞死の誘導機構(その 1)

近年の研究によって、RLR がウイルス感染による細胞死にも必要であることが明らかになっている。しかしながら、その下流でどのように細胞死が誘導されるかは分かっていない。本研究によってウイルス感染によって ASK1 が活性化することが明らかになったことと、ASK1 が様々なストレスによる細胞死を仲介するという先行研究より、ウイルス感染による細胞死においても ASK1 が重要なのではないかと考え、その必要性について検討した。

すると、ASK1 の RNAi によって dsRNA 刺激による細胞死が抑制されることがわかった。次に、細胞が ASK1 を介した IFN 産生と細胞死をどのように使い分けているのかを検討することにした。そのメカニズムを考える上で、ASK ファミリーの ASK2 に注目した。ASK2 は近年同定された ASK ファミリーであり、ASK1 とヘテロオリゴマーを形成することで ASK1 を介した応答を制御することが報告されている。そこで、RNAi によって ASK2 が IFN- β の産生と細胞死誘導に関与するか検討した。すると、dsRNA 刺激による IFN- β の誘導は、ASK2 の RNAi によってわずかながら上昇し、一方で細胞死は抑制されることが分かった。以上より、ASK1/ASK2 ヘテロオリゴマーは、dsRNA 刺激による細胞死の誘導に選択的に寄与することが示唆された。また、ASK2 を過剰発現した細胞においては、dsRNA 刺激によるカスパーゼの活性化が強く亢進している一方で、IFN- β の転写誘導に関しては亢進がみられなかった。これらの結果は、ASK2 の発現量が感染細胞の死を誘導するかどうかを決める要因であることを示している。

本研究により、ウイルス感染、dsRNA 刺激によって誘導される細胞死の誘導において、ASK ファミリーの ASK1 と ASK2 が必須の役割を果たしており、更に ASK2 が IFN 産生と細胞死の使い分けに寄与していることが明らかになった。組織においてユビキタスに発現する ASK1 とは異なり、ASK2 は上皮組織に選択的に発現していることが知られている。従って、ターンオーバーの早い上皮組織においては IFN 産生に加え ASK2 を介した細胞死の誘導が、一方の心臓や脳といったターンオーバーの遅い非上皮組織においては主に IFN 産生によってウイルス感染に対抗しているのではないかと考えている。

IV. ウイルス感染による細胞死の誘導機構(その 2)

IPS-1 は IFN 産生、そして細胞死の誘導といった多彩な機能を介して抗ウイルス応答に貢献するが、IPS-1 の活性がどのように制御されているのかは分かっていない。本研究では、IPS-1 の翻訳後修飾に注目し、IPS-1 の新規翻訳後修飾： γ -カルボキシル化を見出した。そして、その翻訳後修飾が IPS-1 の機能制御に関わる可能性について検討した。

蛋白質の γ -カルボキシル化は、唯一の修飾酵素である γ -カルボキシラーゼ(GGCX)によって触媒される翻訳後修飾の一つである。IPS-1 が GGCX による γ -カルボキシル化を受けるのであれば、細胞内において両者の結合が観察されると考え、293T 細胞を用いて免疫沈降実験を行った。すると、過剰発現した IPS-1 と GGCX が共沈されることが分かった。次に、LC-MS/MS で検出された IPS-1 の γ -カルボキシル化がウエスタンブロッティングでも観察されるかを、汎 Gla 化抗体を用いて検討した。すると、293T 細胞に過剰発現した IPS-1 が汎 Gla 化抗体によって認識されることが分かった。従って、細胞内で IPS-1 が GGCX によって γ -カルボキシル化を受けている可能性が強く示唆された。

続いて、 γ -カルボキシル化サイトにアラニン変異を導入した変異体 IPS-1 4A の機能を検討した。IPS-1 の過剰発現によって IFN- β 産生に必要な転写因子:IRF-3 や p38/JNK のリン酸化が上昇することが、我々や他の研究によって明らかになっている。しかしながら、変異体 IPS-1 4A の過剰発現は IRF-3 や p38/JNK のリン酸化には全く影響がないが、カスパーゼの活性化を著しく亢進させることが分かった。次に、 γ -カルボキシル化が dsRNA 刺激による細胞死に対し何らかの役割を果たすのかを調べるため、GGCX のノックダウンを行った。すると、ヌックダウンした HeLa S3 細胞においては、dsRNA 刺激によるカスパーゼの活性化が亢進することがわかった。また、293T 細胞において、IPS-1 の過剰発現によるカスパーゼの活性化は、GGCX の共発現によって抑制されることがわかった。一方で、IPS-1 4A の過剰発現によるカスパーゼの活性化は GGCX の共発現ではほとんど抑制されなかった。以上の結果より、GGCX による γ -カルボキシル化を介した細胞死の抑制効果は、IPS-1 の γ -カルボキシル化を介している可能性が強く示唆された。

本研究により、抗ウイルス応答において重要な働きを担う IPS-1 において、翻訳後修飾を介した機能の切り替えが行われている可能性が示唆された。IPS-1 はウイルス感染による IFN の産生と細胞死の両方を制御する必須の分子であることが知られていたが、その活性化制御はこれまでほとんど分かっていなかった。従って、今回 IPS-1 の翻訳後修飾を介した活性制御機構を見出したことは、新しくかつ重要であると思われる。

V. 結言

本研究によって、自然免疫において重要な役割を担う IFN 産生と細胞死誘導の新たなメカニズムが明らかになった。更に、その二つの抗ウイルスストラテジーの使い分けの分子的詳細を明らかにした。これらの知見は、自然免疫系の理解と生物の恒常性維持のメカニズム解明に対する貢献のみならず、抗ウイルス治療法の開発に対する新たな基盤となるのではないかと期待している。