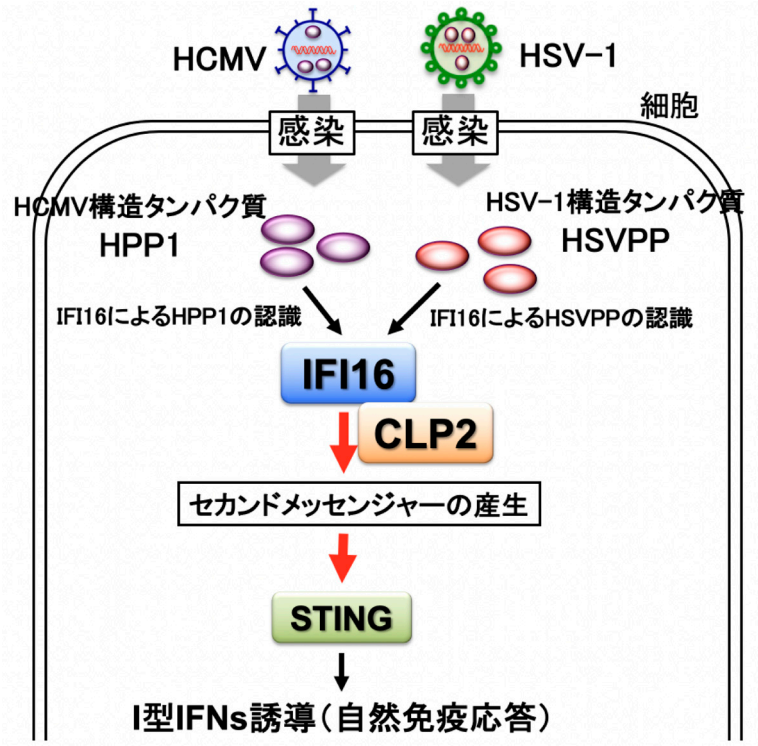
183　抗ウイルス応答における新規自然免疫モジュールの同定	山田　大翔

【目的】ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）は、健常人に広く潜伏感染しながら、とくに免疫不全の患者で致死的な感染症を引き起こすヘルペスウイルス科に属する DNA ウイルスであり、実際に重篤な肺炎や網膜炎、肝炎などの原因となる、臨床的に注意すべき日和見病原体として知られているが、その自然免疫認識機構についてはまだ充分に明らかにされていない。そのような背景の中、我々は HCMV 感染時に、cGAS が核酸（HCMV ゲノム DNA）を認識する一方、IFI16 のターゲットは核酸ではなく、HCMV 粒子中に存在する構造タンパク質 HPP1（HCMV particle containing protein 1）であることが示唆される結果を得た。そこで本研究では、IFI16 による HPP1 認識経路に関わる分子機構を検討した。

【方法】IFI16 の STING へのシグナル伝達機構は、cGAS 経路と類似した機構ではないかと仮説を立て、cGAS が属する Mab21 ファミリーの中から、ヒト肺胎児線維芽細胞（human embryonic lung fibroblasts：HELF）で発現が高い因子を定量的 RT-PCR 法で測定し、その候補因子を探索した。さらに、siRNA を用いて、その候補因子をノックダウンさせ、HPP1 認識経路による IFN-β誘導への影響を検討した。また、その他のウイルスタンパク質 HSVPP 認識による自然免疫活性化においても同様に検討した。また、HPP1 を過剰発現させた HELF から低分子化合物が産生されるかを Digitonin 処理による透過処理などを行う実験系を構築し、検討を行った。

【結果】IFI16 による HPP1 認識経路に関与するタンパク質 CLP2 を同定した。さらに、この CLP2 は HSV-1 構造タンパク質 HSVPP による IFI16 経路においても重要であり、外来タンパク質を認識するシグナル経路に関与する、ユニバーサルな因子であることが示された。また、CLP2 は、その IFI16 と STING を結ぶ低分子化合物（セカンドメッセンジャー）を産生し、抗ウイルス応答を誘導することが示唆された。

ウイルス由来タンパク質認識を認識する IFI16 経路の自然免疫シグナル伝達機構



183. 抗ウイルス応答における新規自然免疫モジュールの同定

山田　大翔

北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子生体防御分野

Key words：自然免疫，ヒトサイトメガロウイルス，インターフェロン

緒　言

ウイルスが感染した際に、最前線において微生物を認識する機構は感染防御応答を惹起する上で最も初めの重要なプロセスである。DNA ウイルスが感染した際には、ウイルス由来の核酸（ゲノム DNA）が宿主のセンサー分子によって認識され、下流にシグナルが伝達されることで、I 型インターフェロン（IFNs）や各種サイトカインの遺伝子発現が誘導し抗ウイルス効果が発揮される［1］。この認識に細胞内で関わる DNA センサーとして、cGAS、IFI16、DDX41 などが報告されており、下流の共通アダプター分子である STING の活性化を介して、抗ウイルス応答が誘導される［1］。このうち cGAS は DNA を認識すると、自身の酵素活性依存的にセカンドメッセンジャーである低分子化合物 cGAMP を産生し、STING と結合することで活性化させることが知られているが、その他の DNA センサーがどのように STING を活性化させるかについては詳細に知られていない。

一方、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）は、健常人に広く潜伏感染しながら、とくに免疫不全の患者で致死的な感染症を引き起こすヘルペスウイルス科に属する DNA ウイルスであり、実際に重篤な肺炎や網膜炎、肝炎などの原因となる、臨床的に注意すべき日和見病原体として知られている。現在、HCMV 感染症の治療には、長期にわたる抗 HCMV 薬の投与が必要であるが、一方で白血球・好中球の減少などの副作用や薬物耐性株の出現が問題視されており［2］、HCMV 感染症の克服には免疫学的なアプローチも重要であると考えられるが、しかしながら、その自然免疫認識機構についてはまだ充分に明らかにされていない。特にこれまで、HCMV 感染時には、そのゲノム DNA が、宿主 DNA センサー分子である cGAS や IFI16 によって認識され、STING の活性化を介した抗ウイルス応答が誘導されることが示唆されている［3，4］。我々はそのような背景の中、cGAS は核酸（HCMV ゲノム DNA）を認識することが確認されたが、一方で興味深いことに、IFI16 のターゲットは核酸ではなく、HCMV 粒子中に存在する構造タンパク質 HPP1（HCMV particle containing protein 1）であることが示唆される結果が得られた。さらに詳細に解析したところ、少なくとも cGAS 経路（DNA 認識）と IFI16 経路（HPP1 認識）は、それぞれ独立して自然免疫応答の活性化に寄与しているものと考えられた。細胞質において自然免疫応答を活性化させる微生物由来の因子としては、核酸や糖が知られてきたが［5，6］、HCMV の構造タンパク質 HPP1 のように、細胞内において外来タンパク質が宿主センサー分子に認識されることはこれまで報告されていない。重要なことに、我々が新たに見出した、IFI16 による HPP1 認識機構を詳細に検討することは、これまで知られてこなかった、細胞内において外来由来のタンパク質を認識するという自然免疫系における新たな局面を見出すことにつながる。

そこで本研究では、IFI16 による HPP1 認識経路に関わる分子機構を明らかにし、IFI16 によるシグナルの伝達機構の詳細を明らかにすることを目的とした。その結果、HPP1 によって活性化される IFI16 経路において、IFI16 と STING を結ぶ新規シグナル因子として、CLP2（cGAS-like protein 2）を同定した。

方法および結果

1. CLP2 は HPP1 によって活性化される自然免疫応答における正の制御因子である

我々はこれまでの研究で、HPP1 と IFI16 は、主に核内で共局在していることを確認してきた。さらに、DNA 存在下では IFI16 が STING と結合する報告があるが［7］、少なくとも我々が見出してきた HPP1 認識経路においては、IFI16 と STING の会合性は認められていない。このような背景から、HPP1 を認識した IFI16 が、どのようにして細胞質（小胞体）に局在する STING へシグナルを伝達するかについては不明である。DNA センサーである cGAS は DNA を認識するとセカンドメッセンジャーとして低分子化合物 cGAMP を産生し、STING の活性化を誘導する［1, 8］。そこで、IFI16 経路もまた、cGAS 経路と類似した機構をもつのではないかと仮説を立てた（図 1A）。cGAS は Nucleotidyltransferase 活性をもつ Mab21 ファミリーに属し、その Mab21 ドメインが cGAMP の産生に重要であるため、まずは、Mab21 ファミリーに属する因子の中から、HPP1 認識 IFI16 経路に関与する因子の同定を試みた。我々は HPP1 認識 IFI16 がヒト胎児肺線維芽細胞（human embryonic lung fibroblasts：HELF）で存在するのに対し、ヒト包皮線維芽細胞（human foreskin fibroblasts：HFF）では存在しないことを確認したことから（図 1B）、HFF と比較し HELF で発現が高い因子を定量的 RT-PCR 法で測定し、その候補因子を探索した。その結果、10 種類の Mab21 ファミリーのうち、CLP2 の発現が HELF で約 80 倍高いことを見出した（図 1C）。そこで次に、この CLP2 が HPP1 認識 IFI16 経路に関与する因子であるかを検討するため、siRNA（small interfering RNA）を用いたノックダウンの実験により検討を行った。CLP2 mRNA のそれぞれ異なる部位を標的とする siRNA を 3 種類用い、HELF に siRNA を導入後、HPP1 過剰発現による IFNB1 mRNA 発現誘導を定量的 RT-PCR 法で測定すると、いずれの siRNA を導入した HELF でもその IFNB1 mRNA 発現誘導が有意に減少した（図 1D、E）。このことから CLP2 は、HPP1 認識 IFI16 経路を正に制御する因子であることが示唆された。実際の HCMV 感染時の IFN-β産生応答へ関与するかについても検討した。その結果、CLP2 に対する siRNA を導入した HELF では、その IFN-β産生が有意に減少した（図 1F）。次に、この CLP2 のシグナル特異性について検討するため、HCMV ゲノム DNA を認識する cGAS 経路への関与や、別のシグナル経路として細胞内 RNA 認識経路である RIG-I を介したシグナル伝達経路への関与について検討した。CLP2 のノックダウンした HELF でも、HCMV ゲノム DNA 刺激、または RIG-I リガンドである 3pRNA 刺激を行った際に産生される IFN-β産生に変化が認められなかった（図 1G）。これらの結果から、CLP2 は、核酸を介した自然免疫応答ではなく、HPP1 によって誘導される応答に特異的に関与する正に制御する因子であることが明らかとなった。

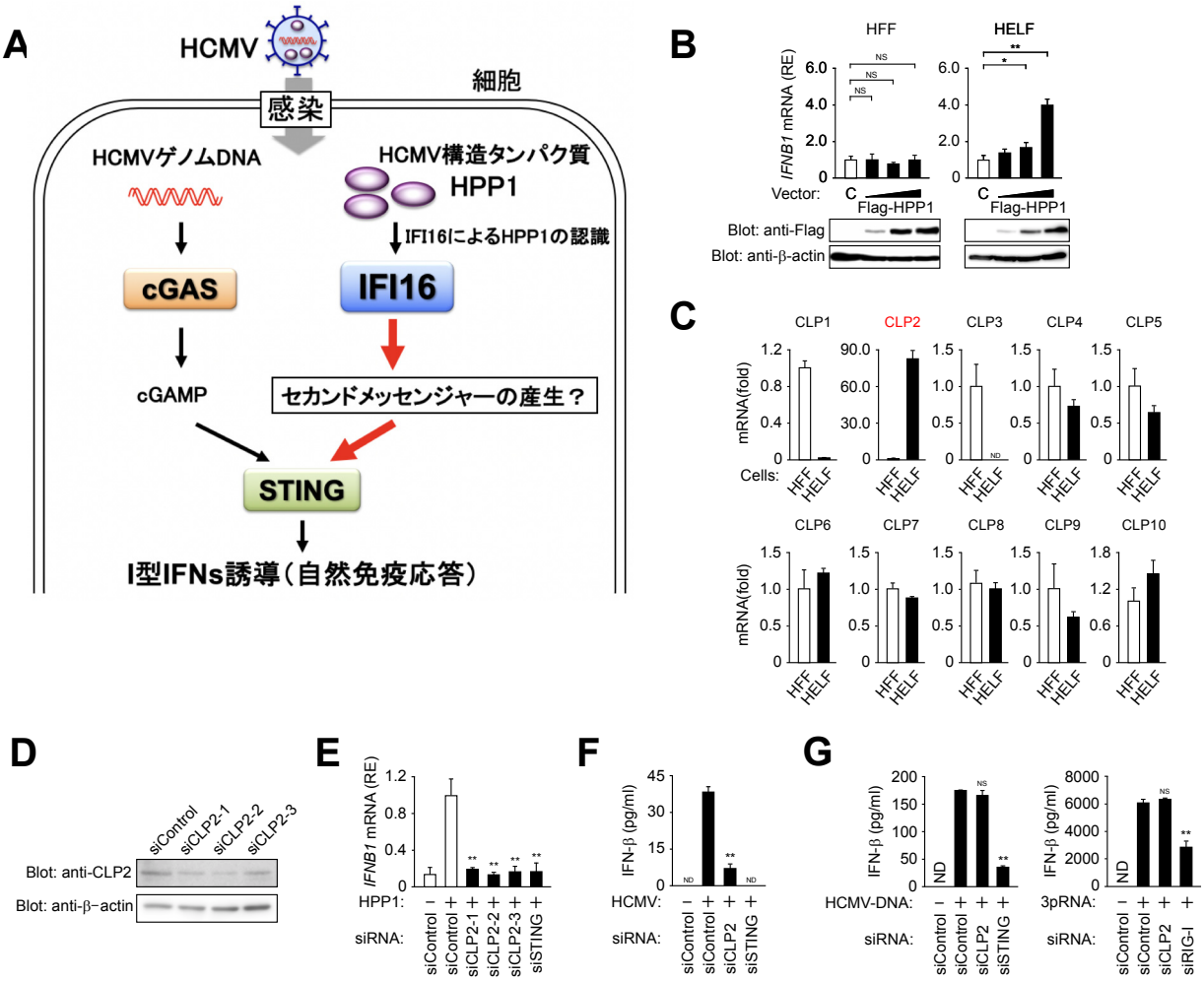


図 1. CLP2 は HPP1 によって活性化される自然免疫応答を正に制御する

(A) 本研究における仮説。

(B) HFF または HELF に Flag-HPP1 を過剰発現させ、48 時間後の IFNB1 mRNA を qRT-PCR で測定した。Flag-HPP1 タンパク質発現量をウエスタンブロットで確認した。

(C) HFF または HELF における定常状態での CLPs の mRNA 発現量を qRT-PCR で測定した。

(D) 3 種類の CLP2 に対する siRNA をそれぞれ HELF に導入し、48 時間後の CLP2 タンパク質発現量をウエスタンブロットで確認した。内部標準として β-Actin を使用した。

(E) HELF に HPP1 と 3 種類の CLP2 に対する siRNA をそれぞれ導入し、48 時間後の IFNB1 mRNA を qRT-PCR で測定した。STING に対する siRNA はポジティブコントロールとして用いた。

(F) HELF に CLP2 に対する siRNA を導入し、その 48 時間後に HCMV を MOI. 3 で感染させ、48 時間後の培養上清に含まれる IFN-β タンパク質を ELISA で測定した。STING に対する siRNA はポジティブコントロールとして用いた。

(G) HELF に CLP2 に対する siRNA を導入し、その 48 時間後に HCMV-DNA または 3pRNA をそれぞれ 1 μg/ml の濃度で導入し、24 時間後の培養上清に含まれる IFN-β タンパク質を ELISA で測定した。STING、RIG-I に対する siRNA はポジティブコントロールとして用いた。ND; not detected。NS; not significant、*P < 0.05、**P < 0.01 (Student t-test)。

2. CLP2 はウイルス由来タンパク質によって活性化される自然免疫応答における正の制御因子である

これまで我々は、HCMV 以外のヘルペスウイルスにおいても、自然免疫の標的となるウイルス由来タンパク質が標的となることかを検討したところ、ヒト単純ヘルペスウイルス I 型（HSV-1）のウイルス粒子中に含まれる HSVPP（HSV-1 particle containing protein）もまた、IFI16 依存的に IFN 応答を誘導することを独自に見出している。そこで CLP2 が、HSVPP によって誘導される IFN 応答においても関与するかを検討した。その結果、CLP2 をノックダウンした HELF では、HSVPP によって誘導される IFNB1 mRNA 発現が有意に減少した（図 2A）。このことから CLP2 は、HPP1 のみならず、外来タンパク質を認識するシグナル経路に関与する、ユニバーサルな因子であることが示唆された。そこで、様々なウイルスに対する CLP2 の作用について検討した。それぞれ HSV-1、アデノウイルス 3 型（HAdV-3）、インフルエンザウイルス（FluV）、水疱性口内炎ウイルス（VSV）を感染させた時の IFN-β 産生応答への CLP2 の関与を検討したところ、HSV-1 に対する応答への関与が認められたが、その他のウイルスには関与が見られなかった（図 2B）。これらの結果より、CLP2 はある種のウイルス（おそらくヘルペスウイルス科）にコードされているウイルス由来タンパク質を認識する IFI16 経路を正に制御する因子であることが示唆された。

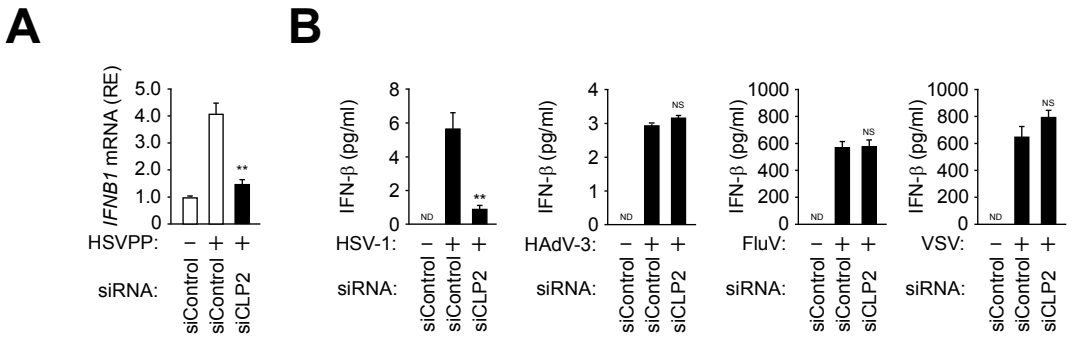


図 2. CLP2 は HSV-1 由来 HSVPP によって活性化される自然免疫応答を正に制御する

(A) HELF に HSVPP と CLP2 に対する siRNA を導入し、48 時間後の IFNB1 mRNA を qRT-PCR で測定した。

(B) HELF に CLP2 に対する siRNA を導入し、その 48 時間後に HSV-1、HAdV-3、FluV、VSV をそれぞれ MOI. 3 で感染させ、24 時間後の培養上清に含まれる IFN-β タンパク質を ELISA で測定した。

ND：not detected。NS：not significant、**P < 0.01、(Student t-test)。

3. CLP2 は IFI16-STING 間を結ぶセカンドメッセンジャーを産生する

次に、この CLP2 がどのように IFI16 によるタンパク質認識経路を活性化するかを検討した。上述したように、CLP2 は cGAS の Nucleotidyltransferase 活性部位と類似したモチーフを持つため、cGAS 経路と類似したセカンドメッセンジャーを利用したシグナル機構をもつのではないかと考えた。まず、図 3A に実験の大まかなストラテジーを示す。簡潔に記述すると、HPP1 を過剰発現した HELF から低分子化合物を抽出し、その抽出した低分子化合物を HFF の細胞内に導入する方法である。HFF は CLP2 の発現が低く、抽出した低分子化合物への CLP2 の関与を抑えるために使用した。この実験の結果、IFN 誘導能をもつ低分子化合物が、HPP1 を過剰発現した HELF で産生されていることが示唆された（図 3B）。そこで、この低分子化合物の産生に CLP2 と IFI16 が関与しているかを検討した。すると、CLP2、IFI16 をノックダウンした HELF ではともに、低分子化合物の産生が減少することが示された（図 3B）。さらに、この低分子が STING シグナルを活性化させるかを検討した。STING をノックダウンした細胞にこの低分子化合物を処理すると、IFNB1 mRNA 発現誘導が有意に減少した（図 3C）これらの結果より、CLP2 は、HPP1 認識における IFI16 経路において、IFI16-STING 間を結ぶセカンドメッセンジャーを産生することでシグナルを伝達するという新たな自然免疫モジュールに重要な因子であることが示唆された。

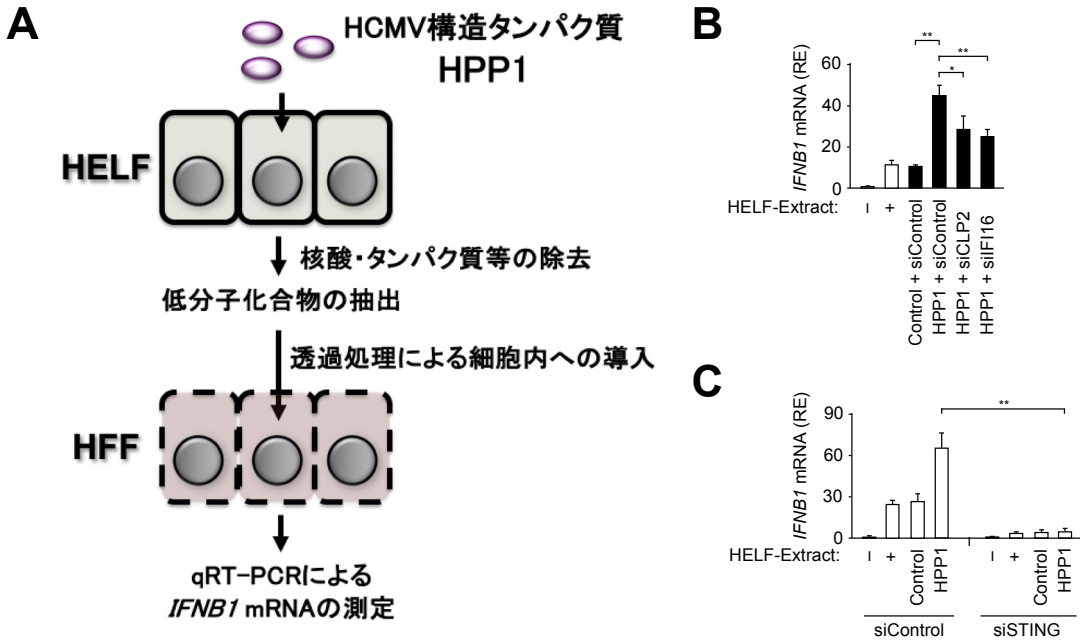


図 3. HPP1 を導入した HELF において、CLP2 は STING を活性化しうる低分子化合物を産生する

(A) 図 3 で行う実験の概略。HPP1 を過剰発現した HELF から Benzonase、熱処理により核酸・タンパク質を除去し低分子化合物を抽出した。その抽出した低分子化合物を、Digitonin 処理により透過処理した HFF に対し添加することで細胞内に導入する。その 8 時間後に IFNB1 mRNA を qRT-PCR で測定した。

(B) HELF に HPP1 と CLP2 に対する siRNA を導入し、48 時間後に低分子化合物を抽出した。その抽出した低分子化合物を HFF に導入 8 時間後の IFNB1 mRNA を qRT-PCR で測定した。IFI16 に対する siRNA はポジティブコントロールとして用いた。

(C) HELF に HPP1 を導入し、48 時間後に低分子化合物を抽出した。STING に対する siRNA を導入して 48 時間後の HFF に、その抽出した低分子化合物を導入し 8 時間後の IFNB1 mRNA を qRT-PCR で測定した。

$*P < 0.05$、$**P < 0.01$、(Student t-test)。

考　察

本研究により、自然免疫シグナル伝達において、IFI16 と STING を結ぶセカンドメッセンジャーを産生することでシグナルを伝達するという新たな自然免疫モジュールを見出し、その重要な因子として CLP2 を同定した（図 4）。すなわち、細胞内においてウイルス由来タンパク質を認識するという自然免疫系における新たな局面を見出し、その一部を明らかにしたといえる。最も重要な課題は、今回その存在が見出された低分子化合物が、実際にどのような分子なのかを明らかにすることである。我々は、この低分子化合物が cGAMP ではないことを確認するため Cas9-CRISPR システムによる cGAS 欠損 HELF の作製を試みたが、HELF をクローン化すると細胞の増殖が止まってしまうという細胞の性質上、その樹立を行うことができなかった。そのため、この低分子化合物が cGAMP か否かを現在まで確認できておらず、今後のさらなる検討が必要である。今回その存在を見出した低分子化合物を新たに同定することで、自然免疫応答の新たな知見を得ることに加え、新たなアジュバントとしての可能性の提示につなげたい。

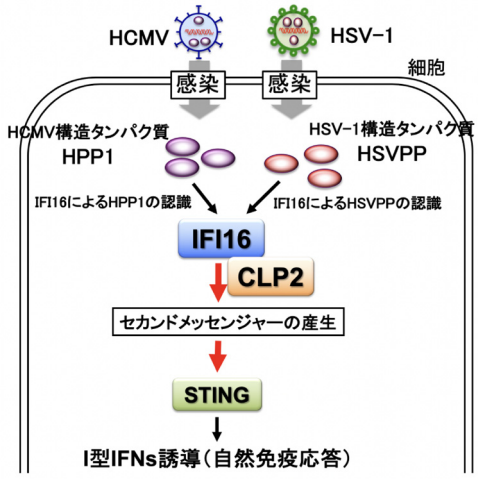


図4. 本研究により見出された、新たな自然免疫モジュールの予想図
HPP1やHSVPPなどのウイルス由来タンパク質認識を認識するIFI16経路において、CLP2は、そのIFI16とSTINGを結ぶ低分子化合物（セカンドメッセンジャー）を産生し、抗ウイルス応答を誘導する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は北海道大学遺伝子病制御研究所分子生体防御分野の高岡晃教教授とその研究室メンバーである。研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文　献

1) Takaoka A, Yamada T. Regulation of signaling mediated by nucleic acid sensors for innate interferon-mediated responses during viral infection. Int Immunol. 2019 Apr 15. pii: dxz034. PMID: 30985969 DOI: 10.1093/intimm/dxz034
2) Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. Clin Microbiol Rev. 2010 Oct;23(4):689-712. PMID: 20930070 DOI: 10.1128/CMR.00009-10
3) Gray EE, Einship D, Snyder JM, Child SJ, Geballe AP, Stetson DB. The AIN2-like Receptors Are Dispensable for the Interferon Response to Intracellular DNA. Immunity. 2016 Aug 16;45(2):255-66. PMID: 27496731 DOI: 10.1016/j.immuni.2016.06.015
4) Li T, Chen J, Cristea IM. Human cytomegalovirus tegument protein pUL83 inhibits IFI16-mediated DNA sensing for immune evasion. Cell Host Microbe. 2013 Nov 13;14(5):591-9. PMID: 24237704 DOI: 10.1016/j.chom.2013.10.007
5) Wu J. Chen ZJ. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. Annu. Rev. Immunol. 2014;32:461-88. PMID: 24655297 DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120156
6) Yang J. Zhao Y, Shao F. Non-canonical activation of inflammatory caspases by cytosolic LPS in innate immunity. Curr. Opin. Immunol. 2015 Feb;32:78-83. PMID: 25621708 DOI: 10.1016/j.coi.2015.01.007
7) Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, Sirois CM, Jin T, Latz E, Xiao TS, Fitzgerald KA, Paludan SR, Bowie AG. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. Nat Immunol. 2010 Nov;11(11):997-1004. PMID: 20890285 DOI: 10.1038/ni.1932
8) Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. Science. 2013 Feb 15;339(6121):786-91. PMID: 23258413 DOI: 10.1126/science.1232458