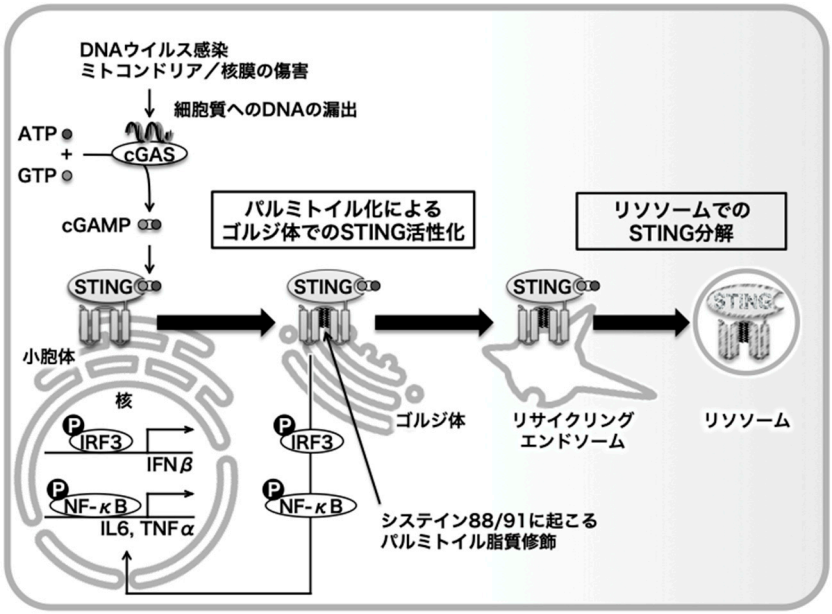
41　cGAS/STING自然免疫シグナル経路の収束分子機構	田口　友彦

【目的】自然免疫は先天的に備わっている異物に対する応答機構であり、感染初期の生体防御において重要な役割を果たしている。近年、この自然免疫応答の研究において、DNA ウイルス感染時に細胞質に露出した DNA を異物として感知するセンサータンパク質 cGAS、及びアダプタータンパク質 STING が同定され、cGAS-STING 経路のウイルス感染応答における重要性が明らかとなった。さらに最近では、ウイルス感染時だけでなく、老化や腫瘍免疫においても、細胞質にゲノム・ミトコンドリア DNA が漏出することで cGAS-STING 経路が活性化し、炎症応答やⅠ型インターフェロン応答を引き起こしていることが示され、注目を浴びている。STING の活性化／不活性化の分子機構を明らかにすることは、人類の健康を増進していく上で重要な課題であると考えられる。本研究では、cGAS-STING 経路の不活性化プロセスに着目し、その分子機構を細胞生物学的なアプローチで解明することを目的とする。

【方法】小胞体に局在する STING は、細胞質 DNA 刺激によって小胞体を脱出し、ゴルジ体で下流の自然免疫シグナルを活性化することが知られている。本研究では、ゴルジ体で活性化した STING がその後どのような運命を辿るのか、ライブセルイメージングによって観察を行い、cGAS-STING 経路の不活性化に必要なプロセスの素過程を明らかにした。観察には、多色の超高解像度蛍光ライブイメージングシステム（Zeiss 880 AiryScan）を用いた。その結果、STING がリソソームで分解されて cGAS-STING 経路の不活性化が起きることが明らかになった。この分解のプロセスを制御する遺伝子について、さらにセルソーターを用いたアッセイシステムを構築して同定を行った。

【結果】超解像度ライブセルイメージングにより STING の輸送過程を観察したところ、DNA 刺激後 3 時間後に STING を含むエンドソーム小胞がリソソームに包み込まれて最終的に分解されていく瞬間を多数捉えることができた。すなわち、STING は小胞体→ゴルジ体→エンドソーム→リソソームという新規細胞内物質輸送経路によりリソソームへ運搬され分解を受けることが明らかになった。リソソーム機能阻害剤の添加によって、cGAS-STING の下流シグナルが持続することから、このリソソームでの分解過程が cGAS-STING 経路の収束に必要であることが示唆された。さらに、リソソーム分解のプロセスを制御する遺伝子についてセルソーターを用いたアッセイシステムを構築して検討を行ったところ、種々の神経変性疾患の原因となる遺伝子が同定された。

cGAS-STING 自然免疫シグナルは細胞内物流によりその活性化・不活性化が制御されている



41. cGAS/STING 自然免疫シグナル経路の収束分子機構

田口　友彦

東北大学 大学院生命科学研究科

Key words：細胞内物流，オルガネラ，自然免疫，オートファジー

緒　言

自然免疫は先天的に備わっている異物に対する応答機構であり、感染初期の生体防御において重要な役割を果たしている［1］。近年、この自然免疫応答の研究において、DNA ウイルス感染時に細胞質に露出した DNA を異物として感知するセンサータンパク質 cGAS［2］、及びアダプタータンパク質 STING［3］が同定され、cGAS-STING 経路のウイルス感染応答における重要性が明らかとなった。さらに最近では、ウイルス感染時だけでなく、老化や腫瘍免疫においても、細胞質にゲノム・ミトコンドリア DNA が漏出することで cGAS-STING 経路が活性化し、炎症応答や I 型インターフェロン応答を引き起こしていることが示され、注目を浴びている［4］。STING の活性化／不活性化の分子機構を明らかにし且つ制御できるようにすることは、人類の健康を増進していく上で重要な課題であると考えられる。本研究では、ほとんど未解明である cGAS-STING 経路の不活性化プロセスに着目し、その分子機構を細胞生物学的なアプローチで解明することを目指した。

方法および結果

1. STING のリソソーム分解

細胞質 DNA 刺激後の STING の動態を、超高解像度蛍光ライブイメージングシステム（Zeiss 880 AiryScan)を用いて観察した。DNA 刺激後 3 時間が経過すると STING のタンパク質量が減少し始めるが［5］、その時間帯の観察によって、STING が部分的にリソソーム内に取り込まれている像を多数得た（図 1)。

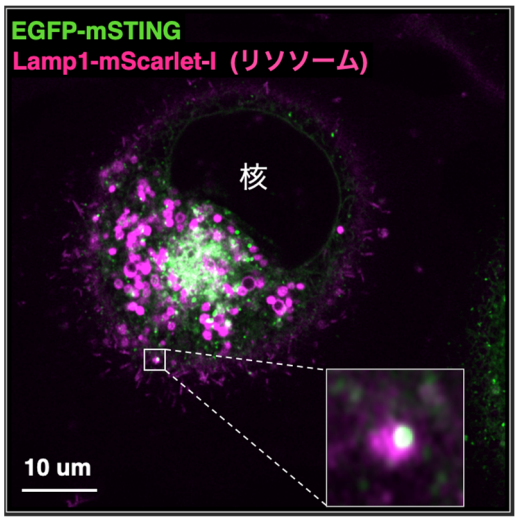


図 1. DNA 刺激 3 時間後の STING のライブセルイメージング
STING には EGFP（緑色）を、リソソーム局在性タンパク質 Lamp1 には mScarlet-I（赤色）を付与したものを用いた。

この結果は、STING は DNA 刺激後にリソソームに運搬されて、タンパク質分解を受けることを示唆している。興味深いことに、STING がリソソームの限界膜と共局在するようなイメージは一切得られなかった。このことは、膜タンパク質 STING が局在するオルガネラ・輸送小胞とリソソームの限界膜が融合することで、STING がリソソームに運搬されている訳ではないことを示唆している。

2. リソソーム加水分解酵素阻害剤存在下でのライブセルイメージング

リソソームでの分解が示唆されたことで、次にリソソームに含有される加水分解酵素の阻害剤（E64d と pepstatin A）を細胞に添加してライブイメージングを行った（図 2）。STING のリソソームでの分解が抑制されることで、STING のリソソームでの蓄積の様子を可視化しやすくする意図である。

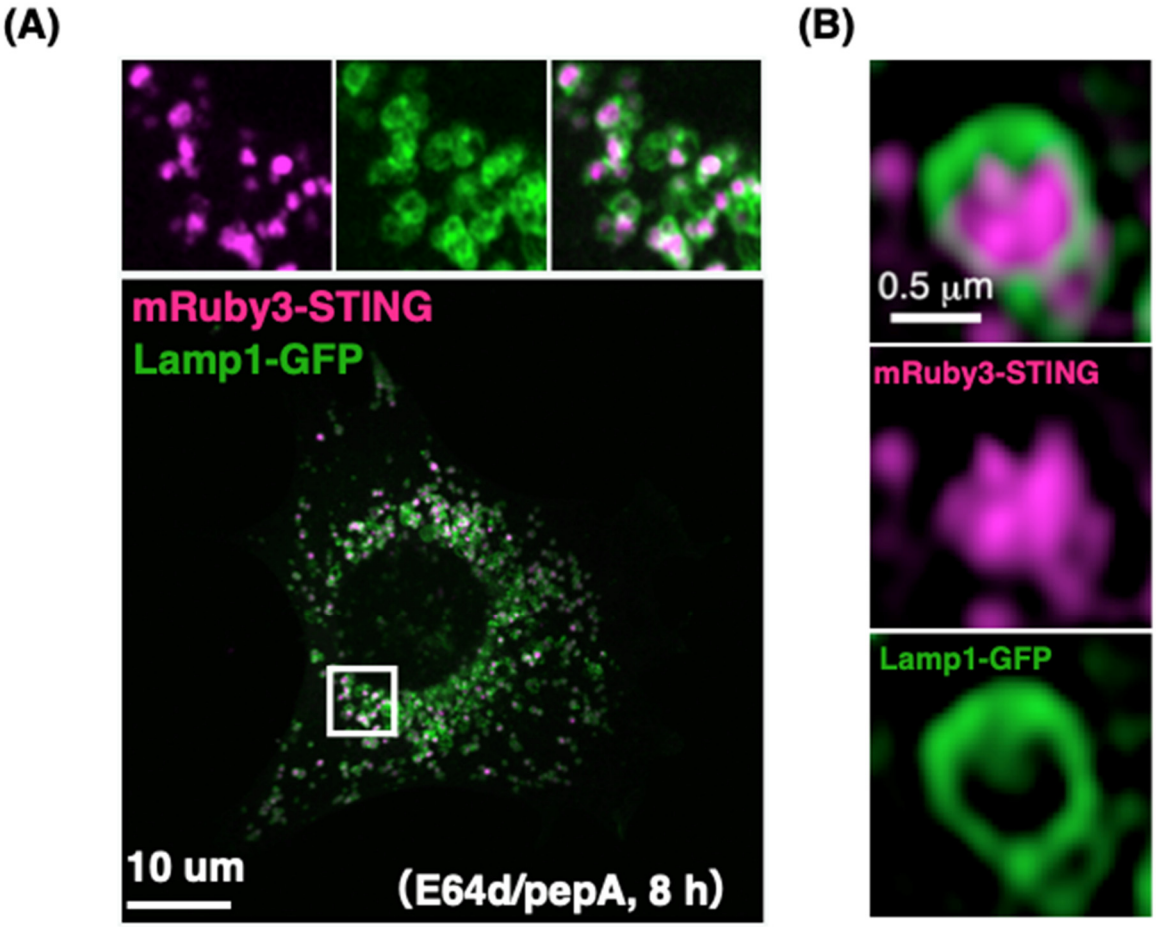


図 2. リソソーム加水分解酵素阻害剤下での STING のライブセルイメージング
STING には mRuby（赤色）を、リソソーム局在性タンパク質 Lamp1 には GFP（緑色）を付与したものを用いた。DNA 刺激 8 時間後のイメージング。
A）低倍率での撮影結果。1 つの細胞全体が入るように撮影している。
B）高倍率での撮影結果。1 つのリソソームを撮影している。

図 2A、B ともに DNA 刺激後 8 時間での結果であるが、この時間ではほとんど全ての STING（赤色）がリソソーム（緑色）の内腔に蓄積している様子が観察できた。この時間帯では、リソソーム加水分解酵素阻害剤を細胞に添加しておかないと STING がほとんど分解されてしまう結果［5］と良く対応している。図 1 の観察結果と同様に、STING がリソソームの限界膜と共局在するようなイメージは得られなかった。

3. STING のリソソーム内腔への運搬経路

上述した結果は、STING は最終的にリソソーム内腔に運搬されて分解されることを示唆している。さらに、STING がリソソームの限界膜に認められないことから、STING は初期エンドソームと融合し、初期エンドソームから multi-vesicular body が形成される際に、オルガネラ内腔に取り込まれる可能性が考えられた。そこで、STING、Lamp1（リソソーム）、Rab5（初期エンドソーム）の 3 色のライブセルイメージングを行った（図 3）。図 1 と同様に、DNA 刺激 3 時間後にリソソームの内腔には STING が蓄積し始めていることが見てとれるが、その一方、Rab5 で示される初期エンドソーム（青色）は STING と共局在しなかった。これらの結果から、STING のリソソームへの輸送は、初期エンドソームを介するものではないことが示唆された。

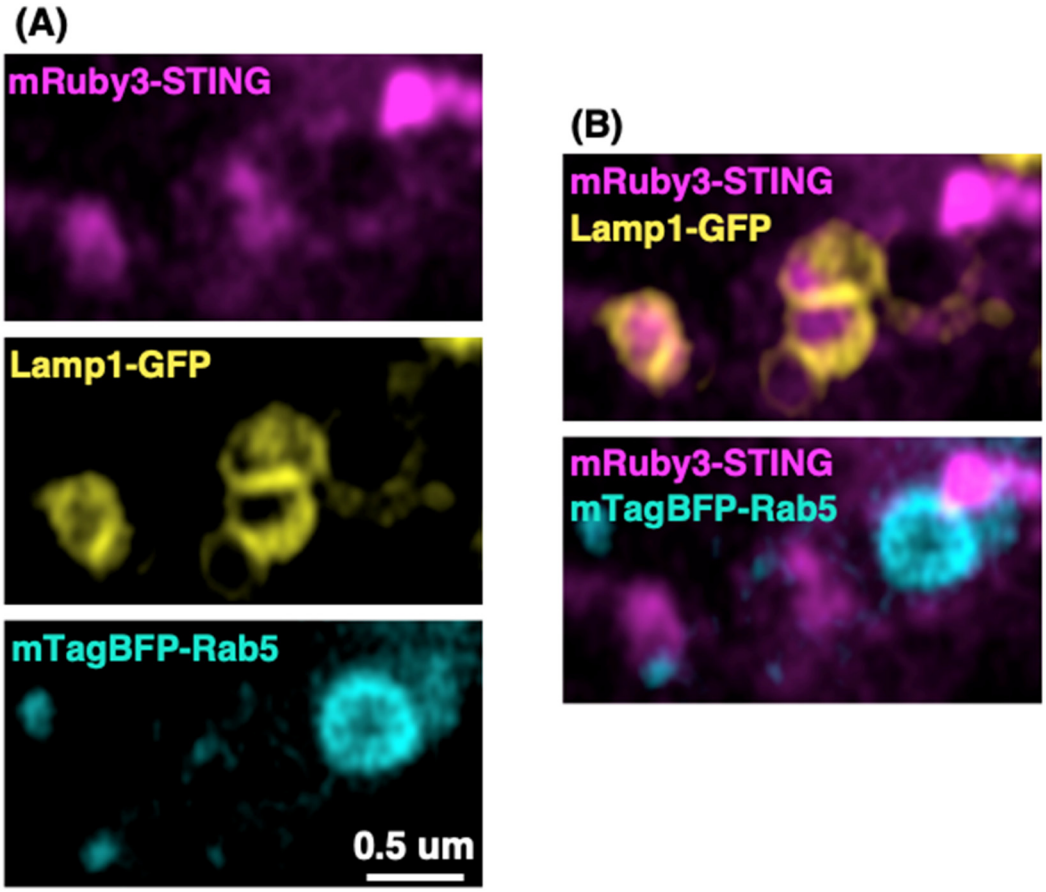


図 3. 初期エンドソーム、リソソーム、STING の 3 色ライブセルイメージング
DNA 刺激 3 時間後に 3 色のライブセルイメージングを行った。
A）STING（赤色）、Lamp1（黄色）、Rab5（青色）で擬似的に表示
B）蛍光画像をブレンドした結果

4. リソソームによる STING の直接的な取り込み

図 3 の結果から、STING は直接リソソームに運搬されている可能性が示唆された。そこで、DNA 刺激 3 時間後、STING のリソソーム分解がはじまるタイミングで、毎秒 1 枚のスピードでライブセルイメージングを行った。まさに STING を内在化させようとしているリソソームを探し出し、撮影を行っている。その結果を図 4 に示す。

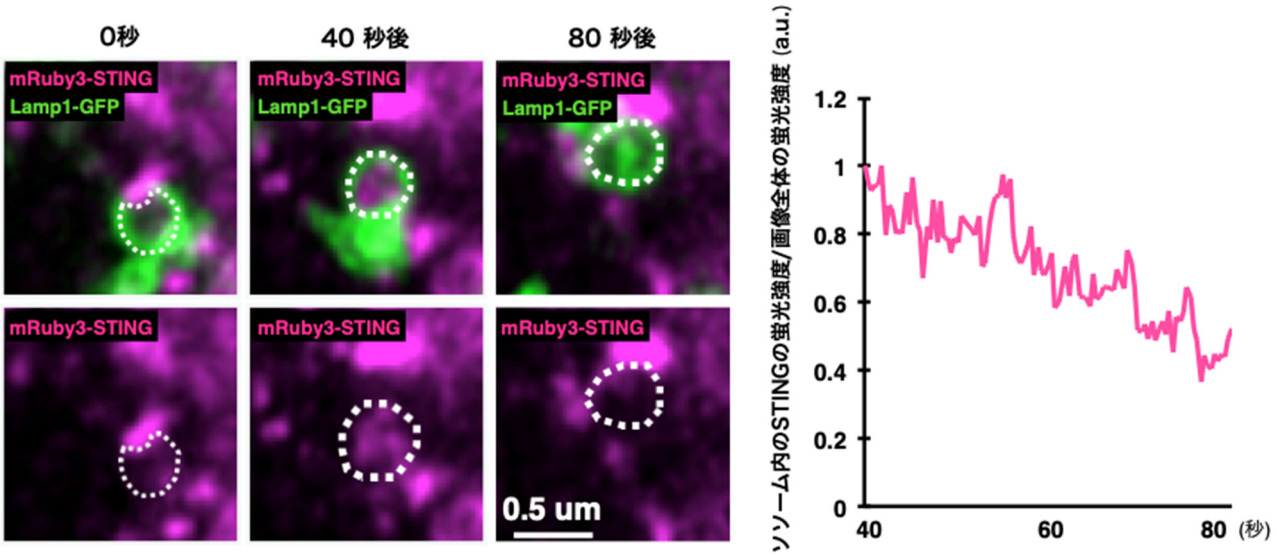


図 4. リソソームによる STING の取り込み・分解のイメージング
STING には mRuby（赤色）を、リソソーム局在性タンパク質 Lamp1 には GFP（緑色）を付与したものを用いた。DNA 刺激 3 時間後にイメージングを行った。

t＝0 秒の瞬間では右下のリソソーム（点線）の内腔には STING を観察することができないが、 t＝40 秒において、STING がそのリソソームの内腔に出現していることがわかる。この STING の蛍光は、t = 80 秒までに顕著に減衰した。リソソーム内の mRuby-STING の蛍光量を定量したものが図 4 右のグラフである。取得画像全体の蛍光強度量で補正することで、レーザー照射による蛍光退色の影響を排除している。この結果から、リソソームに取り込まれた STING は速やかに分解を受けていくことが示された。また、t＝0 秒でリソソーム上部に接近して存在している STING が t = 40 秒までの間に、丸ごとリソソーム内部に直接取り込まれているように見える。図 1 および図 2 の観察結果と同様に、STING がリソソームの限界膜と共局在するようなイメージは、t＝0 秒から t＝80 秒までの間で認めることができなかった。これらの結果は、STING はリソソームによって直接飲み込まれるようにしてリソソーム内腔へ運搬されることが示唆された。

5. STING 分解を制御する遺伝子の探索

STING の分解を制御する遺伝子を探索したところ、種々の神経変性疾患の遺伝子のノックダウンによって、STING のリソソームへの取り込み・分解が抑制される結果を得た。現在、ノックダウン耐性遺伝子によるレスキュー実験、病気型アレルの発現実験を行い、疾患との関連を検討している。

考　察

本研究により、細胞質 DNA 刺激に応答して小胞体を脱出した STING は最終的にリソソームへ直接運搬されて分解を受けることが明らかになった。また、本研究により［小胞体→ゴルジ体→エンドソーム→リソソーム］という新規細胞内物質輸送経路が哺乳細胞に存在することが示された。リソソームへの運搬メカニズムであるが、リソソーム膜と STING 輸送小胞／オルガネラの膜融合で起こるものではなく、リソソームが直接 STING を包み込んで内在化しているようである。この点については、電子顕微鏡による検討を行うことなどによって明らかにしていきたい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東北大学大学院生命科学研究科細胞小器官疾患学研究室の向井康治朗助教である。

文　献

1) Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell. 2010 Mar 19;140(6):805-20. PMID: 20303872 DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.022

2) 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

3) Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. Nature. 2008 Oct 2;455(7213):674-8. PMID:18724357 DOI:10.1038/nature07317

4) Barber GN. STING: infection, inflammation and cancer. Nat Rev Immunol. 2015 Dec;15(12):760-70. PMID:26603901 DOI:10.1038/nri3921

5) Mukai K, Konno H, Akiba T, Uemura T, Waguri S4 Kobayashi T, Barber GN, Arai H, Taguchi T. Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi. Nat Commun. 2016 Jun 21;7:11932. PMID:27324217 DOI:10.1038/ncomms11932