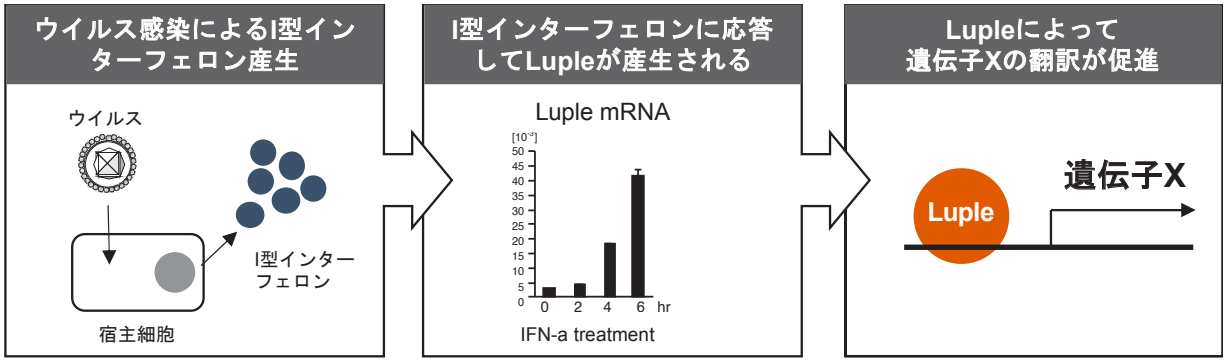
141　感染とヒトの疾患をつなぐ新規因子Lupleの解明	幸脇　貴久

【目的】新型コロナウイルスの世界的流行やジカ熱の流行など、ウイルス感染症は未だ解決されていない。ウイルス感染初期には自然免疫応答としてⅠ型インターフェロンなどのサイトカインが産生され、これが、ウイルスの排除に非常に重要な役割を果たす。一方で、この自然免疫の過剰な活性化は、自己免疫疾患の原因となることも知られている。そのため、ウイルスに対する自然免疫応答の分子メカニズムを解明することは、新たな抗ウイルス薬の開発や、自然免疫が原因となる自己免疫疾患の治療法の開発や創薬につながると期待される。筆者は、ウイルス感染時に発現が上昇する分子について網羅的に調べ、機能未知の分子を見つけ、Luple と名付けた。本研究ではこの新規分子 Luple に焦点を当て、その分子機構と、生体内での重要性を解明することを目的とした。

【方法】当該研究で筆者が発見した新規分子 Luple の機能を同定するために、Luple の発現制御機構を定量 PCR 法や共焦点顕微鏡を用いて検討した。また、生体内での機能を解明するために *Luple* ノックアウトマウスを作製し、ウイルス感染に対する遺伝子発現を網羅的に解析した。

【結果】培養細胞を用いた検討によって、Luple 分子は、インターフェロン刺激やウイルス感染によって発現量が上昇する分子であることが分かった。さらに、Luple 分子は核内に存在することがわかった。次に筆者は *Luple* 遺伝子ノックアウトマウスを作製した。*Luple* ノックアウトマウス由来の Mouse Embryonic Fibroblast（MEF）にウイルス感染後、マイクロアレイ解析を行った結果、ケモカインである遺伝子 X 発現が低下していた。さらに、Luple は DNA 結合ドメインを有していることから、ChiP アッセイを行いプロモーター領域との結合の有無について検討を行ったところ、遺伝子 X の上流に結合することを示唆するデータを得ることができた。

Luple はインターフェロンによって発現誘導され、遺伝子 X 産生を促進する



141. 感染とヒトの疾患をつなぐ新規因子 Luple の解明

幸脇　貴久

熊本大学 大学院生命科学研究部 免疫学講座

Key words：自然免疫，感染症，Luple

緒　言

新興・再興感染症の流行は、21 世紀に生きる人類にとって最大の脅威となることは今回の新型コロナウイルスの世界的大流行によって証明されている。ウイルス感染症は人類の生命を奪い、社会的、経済的な混乱を引き起こし停滞させることから、その解決は急務である。ウイルス感染時の免疫応答を解明することは、ワクチンや新たな治療薬を開発するための重要な基礎データとなる。筆者はこれまでウイルス感染時の自然免疫応答の研究をしており、このウイルス感染初期の自然免疫の分子機構について研究を進めてきた［1，2］。

ウイルス感染後、細胞質内のウイルス RNA は RIG-I 分子により認識され、ミトコンドリア外膜に存在する MAVS 分子を介して、TBK1 などのリン酸化酵素や TRAF などのユビキチンリガーゼなどを活性化させる。これにより、IRF3 や NFκB などの転写因子を活性化させることで、I 型インターフェロンや IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を誘導する（図 1）。

ウイルス感染に対する自然免疫では、このような分子機構が明らかとなっているが、既知の分子だけでは自然免疫応答は説明できず、未知の分子やメカニズムが存在すると考えられる。

そこで本研究では、麻疹ウイルスを樹状細胞に感染させ、遺伝子の発現を網羅的に解析した。その結果、機能未知の分子を発見し、Luple と名付けた。本研究では Luple 分子に焦点を当て、その分子機構と、生体内での重要性を解明することを目的とする。

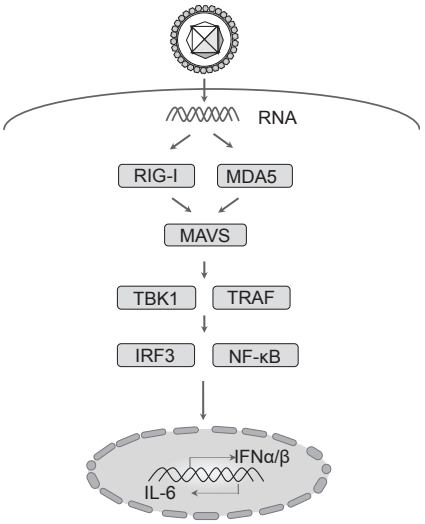


図 1. RIG-I 様受容体による自然免疫応答の模式図

方　法

本研究課題では、ウイルス感染時の自然免疫応答における Luple 分子の役割を明らかにするために以下の方法で実験を行った。

1.　ウイルス感染時の自然免疫におけるサイトカイン産生制御の新たなメカニズムの解明

・インターフェロン刺激による Luple の発現制御の解析

・*Luple* 遺伝子の siRNA によるノックダウンでサイトカイン産生能の解析

・サイトカイン産生のどの経路に関与するのかの解明

・Luple の細胞内局在の解析

2.　生体内における、Luple 分子を介した自然免疫応答の役割と重要性の解明

・*Luple* ノックアウトマウスの作製

・*Luple* ノックアウト MEF にセンダイウイルスを感染させ、遺伝子発現をマイクロアレイで解析

結　果

1.　Luple はウイルス感染に対するインターフェロン産生に応答して発現誘導される

ウイルス感染に対する Luple の発現誘導の有無を調べるために、HEK293 細胞をインターフェロンαで刺激した。その結果、Luple はインターフェロンによって発現誘導されることがわかった（図 2）。

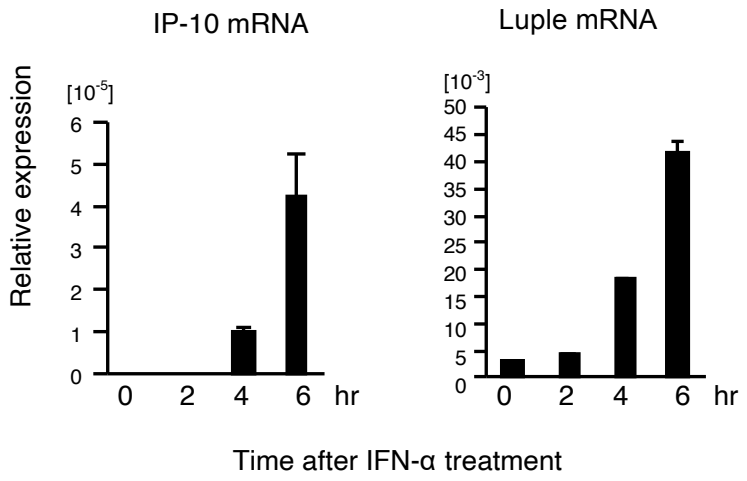


図 2.　インターフェロン刺激に対するサイトカインと Luple の発現誘導

左）インターフェロンα刺激に対する IP–10 の発現誘導を定量 PCR 法で定量した。

右）インターフェロンα刺激に対する Luple の発現誘導を定量 PCR 法で定量した。

次に、*Luple* 遺伝子の siRNA によるノックダウンを行い、RIG-I リガンドの poly（I:C）で刺激した。その結果、Luple がサイトカイン産生を促進していることが判明した（図 3）。

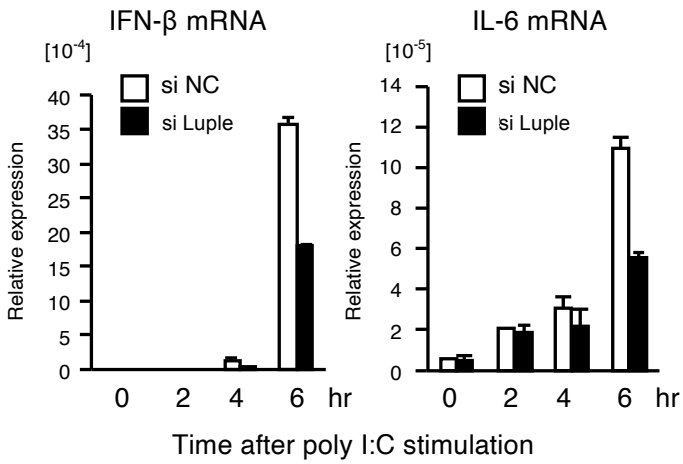


図 3. *Luple* ノックダウンによるインターフェロンおよび IL-6 の発現制御

左) Lupleの遺伝子ノックダウン条件下でpoly（I:C） 刺激に対するIFN-βの応答性の変化を定量した。

右) Lupleの遺伝子ノックダウン条件下でpoly（I:C） 刺激に対するLupleの応答性の変化を定量した。

ウイルスの核酸を認識する RIG-I 様受容体のアダプター分子 MAVS、それと TLR9（Toll-like receptor 9）のアダプター分子 MyD88 および TLR3 のアダプター分子 TICAM-1 は、ウイルスを認識した後のシグナル伝達に必須のタンパク質として知られている。*Luple* の siRNA によるノックダウンを行い、MAVS、MyD88 および TICAM-1 を過剰発現させインターフェロンβ遺伝子のレポーター法でインターフェロン誘導能を調べた。その結果、Luple は、MAVS、MyD88、TICAM-1 の下流で働くことを確認した（図 4）。

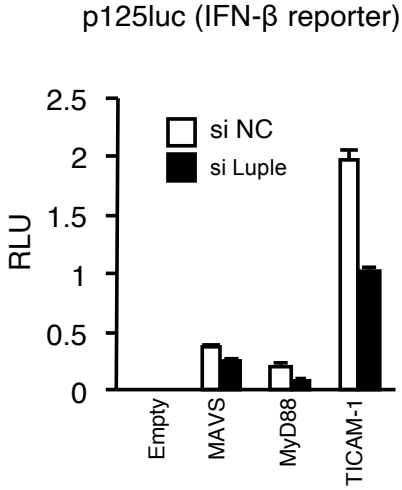


図 4. 自然免疫シグナル経路と Luple との関わりの検討

Luple の siRNA によるノックダウン条件下で MAVS、MyD88、TICAM-1 による *IFN-β*遺伝子のレポーター法を行った。

さらに、Luple は細胞核にも局在することをウエスタンブロッティングで確認した（図 5）。

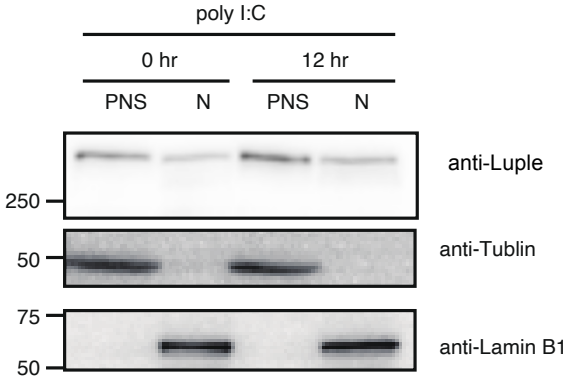


図 5. Luple の細胞内局在の検討

Luple タンパク質の細胞内局在を調べるために、細胞質と細胞核を分子後ウエスタンブロッティングで Luple タンパク質を検出した。

2. Luple は遺伝子 X の産生に関与している

生体内での Luple の機能を明らかにするために *Luple* ノックアウトマウスを作製した。*Luple* ノックアウトマウスから作製した Mouse Embryonic Fibroblast（MEF）にウイルスを感染させマイクロアレイ法を用いて遺伝子発現を網羅的に解析した結果、遺伝子 X の発現が低下していた（図 6）。

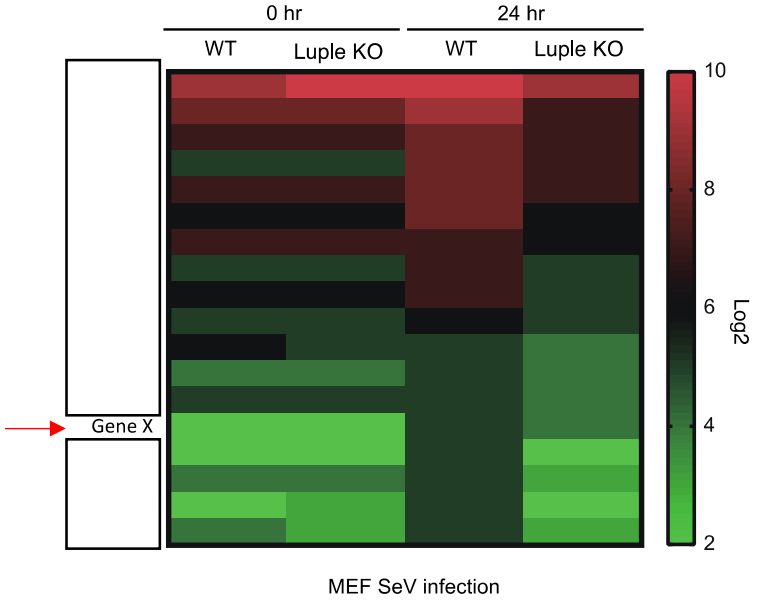


図 6. *Luple* ノックアウト MEF の遺伝子発現解析

WT MEF と *Luple* KO MEF にセンダイウイルスを感染させ、感染後 24 時間での遺伝子発現をマイクロアレイ法で解析した。遺伝子名は未発表のため伏せている。

次に我々は、Luple が遺伝子 X のプロモーター領域に直接結合するかどうかを ChiP 法で確認した。その結果、Luple は自然免疫応答に反応して 遺伝子 X のプロモーター領域に結合していることを明らかとした（図 7）。

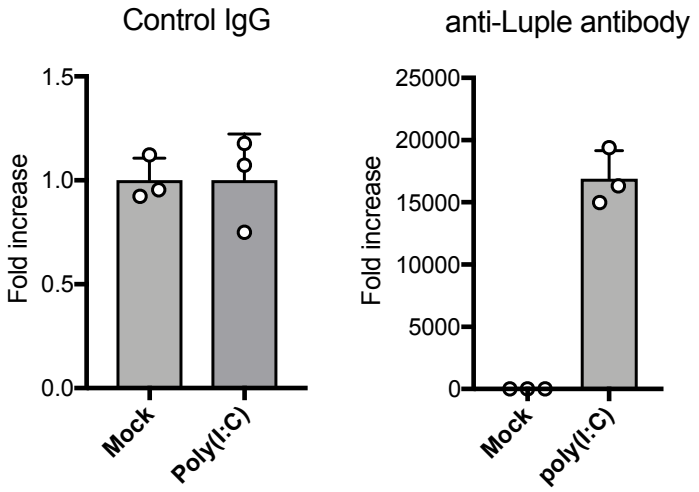


図 7. Luple の遺伝子 X プロモーター領域への結合の検討

左) RIG-I のリガンドで細胞を刺激後、コントロール抗体を用いて ChiP を行い遺伝子 X の上流のプロモーター領域に対する定量 PCR を行った。

右) RIG-I のリガンドで細胞を刺激後、Luple 抗体を用いて ChiP を行い遺伝子 X の上流のプロモーター領域に対する定量 PCR を行った。

考　察

当該研究では、ウイルスに対する自然免疫応答において、サイトカイン遺伝子のプロモーター領域に Luple 分子が結合することによりサイトカイン遺伝子の転写が活性化するという自然免疫の新たな分子メカニズムの解明につながる成果を挙げることができた。ウイルスは宿主の自然免疫関連分子を抑制することで、宿主免疫応答から逃れることが知られている。ウイルスによる Luple 分子の抑制機構の有無については、今後の検討課題として取り組む。Luple 分子の過剰な発現は、ウイルスに対する防御に働くと期待される。そのため、Luple の発現を誘導する化合物のスクリーニングをすることで、新たな抗ウイルス薬の開発につながると期待される。

共同研究者・謝辞

当該研究は、熊本大学大学院生命科学研究部免疫学講座の押海裕之教授のご指導のもと行われた。この場を借りて御礼申し上げます。

文　献

1) Wang G, Kouwaki T, Okamoto M, Oshiumi H. Attenuation of the innate immune response against viral infection due to ZNF598-promoted binding of FAT10 to RIG-I. Cell Reports 2019 Aug 20;28 (8):1961-1970.e4. PMID: 31433974 DOI:10.1016/j.celrep.2019.07.081

2) Kouwaki T, Okamoto M, Tsukamoto H, Fukushima Y, Matsumoto M, Seya T, Oshiumi H. Zyxin stabilizes RIG-I and MAVS interactions and promotes type I interferon response. Scientific reports 2017 Sep 19;7(1):11905 PMID: 28928438 DOI: 10.1038/s41598-017-12224-7