

様式 Z - 7

平成27年度科学研究費助成事業 実績報告書(研究実績報告書)

1. 機関番号	1 4 6 0 3	2. 研究機関名	奈良先端科学技術大学院大学																								
3. 研究種目名	基礎研究(B)(一般)																										
4. 研究期間	平成26年度～平成28年度																										
5. 課題番号	2 6 2 9 3 1 0 7																										
6. 研究課題名	RNAセンサーを起点とした抗ウイルス自然免疫応答制御メカニズムの解析																										
7. 研究代表者	<table border="1"> <tr> <th>研究者番号</th> <th>研究代表者名</th> <th>所属部局名</th> <th>職名</th> </tr> <tr> <td>5 0 4 5 6 9 3 5</td> <td>カワイ タロウ 河合 太郎</td> <td>バイオサイエンス研究科</td> <td>准教授</td> </tr> </table>			研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名	5 0 4 5 6 9 3 5	カワイ タロウ 河合 太郎	バイオサイエンス研究科	准教授																
研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名																								
5 0 4 5 6 9 3 5	カワイ タロウ 河合 太郎	バイオサイエンス研究科	准教授																								
8. 研究分担者	<table border="1"> <tr> <th>研究者番号</th> <th>研究分担者名</th> <th>所属研究機関名・部局名</th> <th>職名</th> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名																				
研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名																								
9. 研究実績の概要	<p>ウイルスが感染すると生体はI型インターフェロンや炎症性サイトカイン等を産生することでウイルス増殖を抑制するとともに、ウイルスに対する獲得免疫系を成立させ感染防御を行う。ウイルスRNAを認識する自然免疫センサーとしてRIG-I-like receptors (RLRs)が知られている。我々はこれまで、抗ウイルス免疫応答を制御する分子としてRBIF-1 (Mex3c) の同定を行い、Mex3cがRLRの一つRIG-Iと相互作用しRIG-IのK63型ユビキチン化修飾を施すユビキチンリガーゼとして機能することを見いだした。この修飾は、下流シグナル伝達経路活性化に必須であった。細胞内において、Mex3cはストレス顆粒と呼ばれる細胞質内顆粒にウイルス感染後凝集し、この顆粒内においてウイルスRNAと結合すること、さらにRIG-Iも同顆粒に凝集していた。今年度、ストレス顆粒に局在し抗ウイルス免疫応答を誘導する新たな自然免疫制御因子としてRNA結合タンパク質HURを同定し解析を行った。ゲノム編集技術を用いてHUR欠損マクロファージ細胞株を樹立し解析したところ、ウイルスRNA刺激やRNA型ウイルス感染後のI型インターフェロンや炎症性サイトカインの産生が欠損細胞で減少していた。このことから、HURは抗ウイルス応答誘導に関わる新たな制御因子であることが示唆された。また、RLRファミリーのMDA5を介する抗ウイルス自然免疫応答を制御する因子として低分子量Gタンパク質Ar15Bの同定を行った。Ar15BがMDA5と複合体を形成すること、これによりMDA5とウイルスRNAの結合が阻害されることを見いだした。また、Ar15B欠損マウスを樹立し、このマウス由来の細胞ではウイルスに対するサイトカイン産生が上昇していることが分かった。これらのことからAr15BがMDA5の機能を負に制御していることが示唆された。</p>																										
10. キーワード	<p>(1) 自然免疫 (2) ウイルス感染 (3) シグナル伝達 (4) サイトカイン</p> <p>(5) (6) (7) (8)</p>																										

11. 現在までの進捗状況

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

Mex3c欠損細胞を用いて、ウイルスに対する自然免疫応答に対する役割を明らかにすることができた。また、ウイルス感染察知の場としてのストレス顆粒の役割に着目し、HuRがストレス顆粒から誘導されるI型インターフェロン産生誘導に関与していることを示唆する結果を得ることができた。現在、ゲノム編集技術により、HuRを欠損するマクロファージ細胞株や纖維芽細胞株等の樹立に成功しており、今後これらを用いてさらに解析可能な状況にある。また、HuRはRNA結合タンパク質でありmRNAの安定性制御に関与していることから、HuR欠損細胞と発現細胞におけるmRNAの発現の差をマイクロアレイにより解析し、HuRの標的となるmRNAの候補の抽出を行った。抽出した候補分子に関しては、ノックダウンや欠損細胞株の樹立を行っており、HuRを介する抗ウイルス応答におけるこれら標的分子の役割について解析を開始している。また、MDA5の活性を負に制御する因子としてAr15Bの同定を行い、生体レベルでも実際にMDA5を介する自然免疫応答を負に制御していることを示すことができた。さらに、抗ウイルス応答制御に関与する分子として以前同定を行ったPIKfyveに関しても、マクロファージやT細胞特異的に欠損するマウスの樹立に成功しており、既に解析を開始している。以上のことから、おおむね順調に研究が進展しているといえる。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

ストレス顆粒の役割に着目し、RIG-IとMex3cの細胞内での挙動を可視化技術により明らかにする。また、新たに見いだしたHuRに関しては既に樹立しているHuR欠損細胞を用いてウイルス感染後のサイトカイン産生やシグナル伝達分子の活性化等について詳しく調べる。また、HuR欠損細胞と発現細胞間で遺伝子発現プロファイルを比較し、HuR欠損細胞で減少している遺伝子の抽出を行った。それら候補遺伝子をノックダウンした細胞あるいは欠損株を複数既に樹立しており、今年度はこれら細胞における抗ウイルス応答について検討を行う。また、これら候補mRNAとHuRが結合するかin vitroで確認するとともにHuRとの結合領域の同定を目指す。これらを通して、ウイルスに対する自然免疫制御におけるHuRの役割を明らかにしていく。また、樹立に成功している組織特異的PIKfyve欠損マウスに関しては、ウイルスに対するサイトカイン産生やT細胞応答等を調べることでウイルスに対する生体防御における役割を生体レベルで明らかにしていく。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

27年度に、PIKfyve遺伝子欠損マウスを用いてウイルスに対する免疫応答の解析を行う予定であったが、マウス同士の掛け合わせの結果想定した数より少ないマウスが得られたため実験が遅延した。したがって、未使用額は解析に必要な試薬やキットの購入に充てることとしたい。

(使用計画)

野生型およびPIKfyve欠損マウスよりマクロファージと樹状細胞を調整し、ウイルス感染を模倣する人工核酸（RNA、DNA）で刺激を行い、その後のサイトカイン産生を定量PCRとELISA法で解析を行う。

(課題番号： 26293107)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(2/5)

13.研究発表(平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(2)件 / うち査読付論文 計(2)件 / うち国際共著論文 計(1)件 / うちオープンアクセス 計(2)件

著者名	論文標題				
Kumar S, Ingle H, Mishra S, Mahla RS, Kumar A, Kawai T, Akira S, Takaoka A, Raut AA, Kumar H.	IPS-1 differentially induces TRAIL, BCL2, BIRC3 and PRKCE in type I interferons-dependent and -independent anticancer activity.				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Cell Death Dis.	有	6	2 0 1 5	e1758	該当する
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1038/cddis.2015.122.					
オープンアクセス					
オープンアクセスとしている(また、その予定である)					

著者名	論文標題				
Matsuda T, Murao N, Katano Y, Juliandi B, Kohyama J, Akira S, Kawai T, Nakashima K.	TLR9 signalling in microglia attenuates seizure-induced aberrant neurogenesis in the adult hippocampus.				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Nat Commun.	有	6	2 0 1 5	6514	-
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1038/ncomms7514.					
オープンアクセス					
オープンアクセスとしている(また、その予定である)					

(学会発表) 計(4)件 / うち招待講演 計(1)件 / うち国際学会 計(0)件

発表者名	発表標題	
村瀬 本弥、川崎 拓実、河合 太郎	ELMO domain-containing protein 2 (ELMOD2)による抗ウイルス自然免疫制御機構の解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会合同大会	2015年12月03日	兵庫県神戸市

(課題番号: 26293107)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(3/5)

発表者名	発表標題	
河合 太郎、國吉 佳奈子、竹内 理、審良 静男	ウイルスRNAに対する自然免疫応答におけるユピキチンリガーゼMex3cの役割	
学会等名	発表年月日	発表場所
第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会合同大会(招待講演)	2015年12月03日	兵庫県神戸市

発表者名	発表標題	
Takumi Kawasaki, Taro Kawai	Role of the lipid kinase PIKfyve in alveolar macrophage	
学会等名	発表年月日	発表場所
第44回日本免疫学会学術集会	2015年11月18日	北海道札幌市

発表者名	発表標題	
Takuya Sueyoshi, Takumi Kawasaki, Taro Kawai	Identification of HuR as a molecule that mediates antiviral innate immune responses	
学会等名	発表年月日	発表場所
第44回日本免疫学会学術集会	2015年11月19日	北海道札幌市

(図書) 計(0)件

著者名	出版社	
書名	発行年	総ページ数

(課題番号: 26293107)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(4/5)

14.研究成果による産業財産権の出願・取得状況

(出願) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

(取得) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別

15.科研費を使用して開催した国際研究集会

(国際研究集会) 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16.本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1)国際共同研究: -

17.備考

--