HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	細胞質内ウイルスDNAへの細胞特異的な自然免疫応答とウイルスによるその抑制
Author(s)	鈴木, 孝幸
Description	配架番号：2154
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11672号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11672
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59036
Type	doctoral thesis
File Information	Takayuki_Suzuki.pdf



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

細胞質内ウイルス DNA への細胞特異的な自然免疫応答とウイルスによるその抑制

(Cell type-specific innate immune response to cytoplasmic viral DNA and its suppression by viral proteins)

2015 年　3 月

北　海　道　大　学

鈴　木　孝　幸

学位論文

細胞質内ウイルス DNA への細胞特異的な自然免疫応答とウイルスによるその抑制

(Cell type-specific innate immune response to cytoplasmic viral DNA and its suppression by viral proteins)

2015 年　3 月

北　海　道　大　学

鈴　木　孝　幸

目次

発表論文目録および発表学会目録 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1

緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2

略語表 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5

第一章

緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・8

実験材料と方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10

結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17

考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・34

第二章

緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・35

実験材料と方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・37

結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・44

考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・52

総括および結論 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・54

謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・56

引用文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・57

発表論文目録および発表学会目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Takayuki Suzuki, Hiroyuki Oshiumi, Moeko Miyashita, Hussein Hassan Aly, Misako Matsumoto, and Tsukasa Seya
   Cell Type-Specific Subcellular Localization of Phospho-TBK1 in Response to Cytoplasmic Viral DNA
   PLoS ONE, (12): e83639, (2013)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Takayuki Suzuki, Hiroyuki Oshiumi, Moeko Miyashita, Misako Matsumoto, and Tsukasa Seya
   Mitochondrial Localization of Phospho-TBK1 in Response to Cytoplasmic viral DNA
   第 36 回日本分子生物学会, 2012 年 12 月 6, 神戸

2. 鈴木 孝幸, 押海 裕之, 宮下 萌子, 松本 美佐子, 瀬谷 司
   細胞質内 DNA 刺激によるリン酸化 TBK1 のミトコンドリアへの局在
   第７９回日本インターフェロン・ サイトカイン学会学術集会, 2014 年 6 月 19 日, 北海道

緒言

ヒトの免疫系は自然免疫と獲得免疫からなる。獲得免疫は抗原特異的な攻撃を行う生体防御反応であり、B 細胞や T 細胞が担う。その始動には自然免疫が関わっている。自然免疫はマクロファージや樹状細胞が関与し、感染初期に発動する免疫系である。獲得免疫が抗原を認識するのに対し、自然免疫は微生物の構成成分 (Pathogen associated molecular patterns: PAMPs)を認識する。これらは、パターン認識受容体 (Pattern Recognition Receptors: PRRs)により認識される[1]。なかでも、Toll 様受容体 (Toll-like receptors: TLRs)や RIG-I 様受容体 (RIG-I-like receptors: RLRs)、NOD 様受容体 (NOD-like receptors: NLRs)が重要である[2]。PRRs は PAMPs を認識すると I 型インターフェロン (Interferon: IFN)や炎症性サイトカインの産生を誘導し、一方で、樹状細胞の成熟化等を介して T 細胞等を活性化する[3,4]。

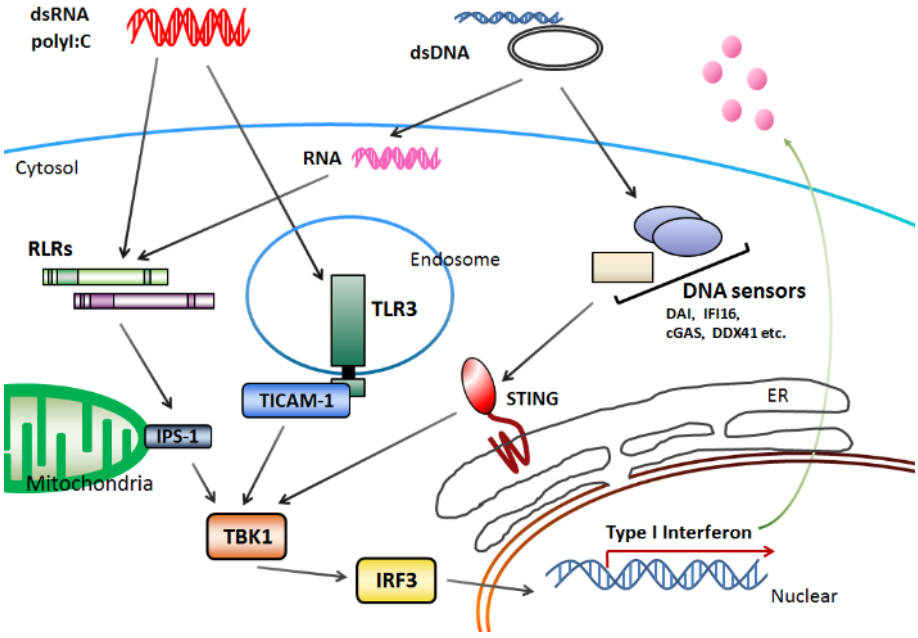
RNA をゲノムにもつウイルスの認識には、細胞質内 RNA ヘリケースである Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)や Melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)等の RLRs が重要である[5]。これらの RLRs は樹状細胞やマクロファージだけなく、上皮細胞や線維芽細胞など様々な細胞で発現する[6]。RLRs は細胞質内に侵入したウイルス由来の二重鎖 RNA (double-stranded RNA: dsRNA)を認識すると I 型インターフェロンや Interleukin-6 (IL-6)等の炎症性サイトカイン産生を誘導する[7]。ノックアウトマウスの解析などから、RLRs をノックアウトしたマウスは水泡性口炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus: VSV)等のウイルス感染に非常に弱くなりウイルス感染後の死亡率が著しく上昇することから、生体内における自然免疫応答に非常に重要であることが知られている[6]。

RLRs は細胞質内でウイルス RNA や dsRNA 合成アナログである polyinosinic: polycytidylic acid (polyI:C)等を認識する。RLRs の一つである RIG-I はこれらの核酸と結合すると、リジン 63 鎖結合型のポリユビキチン修飾を受ける。このポリユビキチン修飾は Tripartite motif-containing protein 25 (TRIM25)と RING finger protein leading to RIG-I activation (Riplet)の二つのユビキチンリガーゼによる[8,9]。これらのユビキチンリガーゼによる RIG-I のポリユビキチン化が RIG-I の活性化に必須であることが報告されている。一方で、RLRs の MDA5 のポリユビキチン修飾については十分に解明されていない。活性化した RLRs は、RNA を含む翻訳の開始前駆複合体であるストレス顆粒 (Stress Granule: SG)へと局在する[10]。これらの核酸の認識により RLRs が活性化をすると、アダプター分子である Interferon-β promoter stimulator-1 (IPS-1) (Mitochondrial antiviral signaling protein: MAVS/ Virus-induced signaling adaptor: VISA/ CARD adaptor inducing IFN-β: Cardif)を活性化する[7,11,12]。IPS-1 は

ミトコンドリアの外膜に主に局在し、一部、ペルオキシゾームにも局在することが報告されている[13]。更に最近の研究で、一部の IPS-1 が小胞体（Endoplasmic reticulum: ER)とミトコンドリアが接している領域である Mitochondria associated membranes (MAM)に局在していることが報告された[14]。RLRs により活性化した IPS-1 は、プリオン様集積を引き起こす[15]。このプリオン様集積の調整には、Mitofusin-1 (MFN-1)や MFN-2 と言ったミトコンドリアの調節因子が関与する[16,17]。

ウイルスの dsRNA や polyI:C は初期エンドソームや細胞表面に局在する TLR3 によっても認識される[18]。TLR3 は、TIR domain-containing adapter molecule-1 (TICAM-1) (TIR domain containing adapter inducing IFN-β: TRIF))分子をアダプター分子とする[19,20]。

細胞質に存在するウイルス等の DNA は、細胞質に存在する DNA センサー分子により認識される。これまでに、DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors (DAI)[21] や Gamma-interferon-inducible protein 16 (IFI16)[22]、DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 41 (DDX41)[23]、Cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)[24]、Meiotic Recombination 11 (Mre11)[25]、DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit (DNA-PKcs)[26] 等が DNA センサーとして報告されている。これらは、Stimulator of interferon genes (STING)をアダプター分子とし I 型 IFN の誘導を引き起こす[27,28]。STING は主に ER に存在し、一部 MAM にも存在する[27]。



これら DNA センサーの中で、cGAS 分子については、そのノックアウトマウスの解析結果が報告され、cGAS ノックアウトマウスでは DNA ウイルスである Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)感染時の I 型 IFN や IL-6 等の炎症性サイトカインの産生が樹状細胞やマクロファージで消失し、個体への感染実験でもこれらのサイトカインの産生が消失することが報告された[29]。

cGAS は細胞質内の DNA を認識すると cyclic-GMP-AMP (cGAMP)を合成し、これが STING により認識され、STING が活性化する[30]。STING のノックアウトマウスも cGAS ノックアウトマウスと同様に HSV-1 感染時の I 型 IFN 産生や炎症性サイトカインの産生が消失することが報告されている[24]。

これらノックアウトマウスの解析から、DNA に対する自然免疫応答には cGAS-STING 経路が重要であると考えられているが、ヒトの細胞を用いた解析からは、上記の RLRs が DNA に対する自然免疫応答に関与することが報告されている。HEK293 細胞では、細胞質内の dsDNA は RNA ポリメラーゼ III により転写され、その RNA が RIG-I により認識されると報告されている[31]。一方で、RLRs が直接 dsDNA に結合し活性化するとの報告も存在する[32]。RLRs は dsDNA により活性化した場合もミトコンドリア上に存在する IPS-1 分子を介して I 型 IFN 産生を誘導する。つまり、DNA に対する自然免疫応答において、cGAS-STING 経路と RIG-I 経路の役割が、ヒトとマウスで異なるのか、あるいは細胞の種類により異なるのかについてはまだ明確になっていないという問題点が存在する。

ミトコンドリア上の IPS-1 や ER 上の STING は、活性化すると共に、TANK-binding kinase 1 (TBK1)と呼ばれるリン酸化酵素を活性化する。TBK1 は活性化すると自己リン酸化するとともに、転写因子の IFN regulatory factor-3 (IRF-3)をリン酸化し、リン酸化した IRF-3 は二量体を形成し核へと移行し、I 型 IFN の一つ、IFN-β 遺伝子のプロモーター領域に結合し転写を誘導する[33]。一章では、このリン酸化した TBK1 の細胞内局在を指標に、DNA に対する自然免疫応答の細胞特異性について検討した。

自然免疫応答はウイルスの抑制に重要である一方で、ウイルスは自然免疫応答を抑制することで感染を成立させる。ヒトの肝癌の約 7 割の原因となる C 型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus: HCV)は、その Nonstructural protein 3-4A (NS3-4A)プロテアーゼにより、RIG-I のアダプター分子の IPS-1 や、RIG-I のユビキチンリガーゼの Riplet 分子を切断させ I 型 IFN 産生を抑制することが知られている[34]。一方で、HCV のコアタンパク質は DDX3 ヘリケースと IPS-1 分子との結合を阻害する[35]。DNA をゲノムにもつ B 型肝炎ウイルス(Hepatitis B virus: HBV)も、ヒトの肝癌の主要な原因の一つである。本研究の一章で、HBV 感染時には RLRs 経路が働くことが示唆されたことから、二章においては、HBV が RLRs 経路をどのように抑制するのかについて検討した。

略語表

AMP	Adenosine monophosphate
BPB	Bromophenol blue
BSA	Bovine serum albumin
CARD	Caspase activation and recruitment domain
Cardif	CARD adaptor inducing IFN-β
cccDNA	covalently closed circular DNA
cGAMP	cyclic GMP-AMP
cGAS	cyclic GMP-AMP synthase
CPE	Cytopathic effect
dsRNA	double stranded RNA
DAI	DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors
DDX	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Endoplasmic reticulum
FBS	Fetal bovine serum
G3BP	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1
GMP	Guanosine monophosphate
GTP	Guanosine triphosphate
HA	Hemagglutinin
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HEK	Human Embryonic Kidney
HSV-1	Herpes simplex virus type 1
IFN	Interferon
IFI16	Gamma-interferon-inducible protein 16
IKK	Ikappa-B kinase
IL-6	Interleukin-6
IPS-1	Interferon-β promoter stimulator-1

IRF-3	Interferon regulatory factor-3
MAM	Mitochondria associated membranes
MAVS	Mitochondrial antiviral signaling protein
MDA5	Melanoma differentiation-associated gene 5
ME	Mercaptoethanol
MFN	Mitofusin
MOI	Multiplicity of infection
Mre11	Meiotic Recombination 11
mRNA	messenger RNA
MxA	Myxovirus resistance A
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NAK	NF-κB-Activating Kinas
NEAA	Non essential amino acids
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NLRs	Nucleotide binding oligomerization domain-like receptors
NP-40	Nonidet P-40
NS3-4A	Nonstructural protein 3-4A
NTCP	Sodium taurocholate cotransporting polypeptide
PAGE	Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
polyI:C	polyinosinic: polycytidylic acid
PP2A	Protein phosphatase 2
PRRs	Pattern Recognition Receptors
PSEN	Plesenilin
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene-I
RING	Really Interesting New Gene
Riplet	RING finger protein leading to RIG-I activation
RLRs	RIG-I-like receptors
RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse transcription
SDS	Sodium dodecyl sulfate

SG	Stress Granule
STAT	Signal Transducers and Activator of Transcription
STING	Stimulator of interferon genes
TANK	TRAF family member-associated NF-kappa-B activator
TBK1	TANK-binding kinase 1
TICAM-1	TIR domain-containing adapter molecule-1
TIR	Toll/interleukin-1 receptor
TRAF	Tumor necrosis factor receptor-associated factor
TLRs	Toll-like receptors
TMEM173	transmembrane protein 173
TRIF	TIR domain containing adapter inducing IFN-β
TRIM25	Tripartite motif-containing protein 25
VISA	Virus-induced signaling adaptor
VSV	Vesicular stomatitis virus
WCL	Whole-cell lysate

第一章　細胞質内 DNA 認識における p-TBK1 の局在

緒言

DNA は通常核に存在することから、細胞質に存在する DNA はウイルス DNA だけでなく、細菌や脊椎動物由来の DNA であっても自然免疫応答を誘導する [36,37]。この細胞質内の DNA に対する自然免疫応答では、TBK1 分子が非常に重要な働きをすることが知られている。TBK1 は活性化すると自己リン酸化し、さらに転写因子の IRF-3 をリン酸化する。リン酸化した IRF-3 は二量体を形成し、核へと移行し、IFN-β遺伝子の転写を活性化する [33]。

細胞質内の DNA はノックアウトマウスを用いた解析から cGAS 分子により主に認識されると考えられている [29]。cGAS は DNA に結合すると、セカンドメッセンジャーとして cGAMP と呼ばれる小分子を生成し、これがミトコンドリア上に存在する STING 分子を活性化する [30]。活性化した STING は TBK1 を介して I 型 IFN 産生を誘導する [38]。

一方で、ヒトの培養細胞を用いた研究から RIG-I が細胞質内の DNA 認識に関与することが報告されている。ヒトの肝細胞由来の細胞株である HuH7.5 細胞株ではゲノム上の RIG-I 遺伝子に変異が有る。その為、RIG-I 異存的な自然免疫応答に欠損を有する。これまでの報告から、ウイルス DNA による自然免疫応答は HuH7.5 細胞では大きく低下しており、野生型の RIG-I 遺伝子を形質導入することで、この欠損を相補できることが報告されている [39]。また、HEK293 細胞株においては、細胞質内の DNA は RNA ポリメラーゼ III により転写され、転写された RNA が RIG-I を介して自然免疫応答を誘導する [31]。さらに、東京大学の谷口維紹教授らのグループは、RIG-I が直接 DNA に結合し、自然免疫応答を誘導することを報告している [32]。このように、DNA に対する自然免疫応答には一見すると矛盾する報告が存在することから、詳細なメカニズムについては十分には解明されていない。

自然免疫に関与する分子は細胞の特定の部位に局在することが知られている。RIG-I は活性化すると SG と呼ばれる領域に局在する [10]。RIG-I のアダプター分子である IPS-1 は主に、ミトコンドリア上に局在する。一方で、cGAS のアダプター分子である STING は ER 上に局在することが知られている。当研究室では、リン酸化した TBK1 に対する市販の抗体を用いることで、RIG-I 活性化時には、p-TBK1 は主にミトコンドリア上に局在することを発見した [34]。RIG-I はミトコンドリア上に存在する IPS-1 を活性化することから、これは、ミトコンドリア上で TBK1 がリン酸化した

ものと推測される。このように、自然免疫応答時の p-TBK1 の細胞内局在は特定のオルガネラに存在することから、DNA に対する自然免疫応答においても、p-TBK1 が特定のオルガネラに存在することが期待された。そこで本研究では、まず、DNA 刺激時の p-TBK1 の細胞内局在を観察した。結果、興味深いことに、HeLa 細胞や HepG2 や THP-1 細胞など、ヒト由来の細胞株では、DNA 刺激時には主にミトコンドリア上に局在したのに対し、RAW264.7 細胞、L929 細胞、マウス肝細胞株では主に STING 上に局在した。これは細胞の種類により DNA に対する自然免疫応答の分子機構が異なることを示唆しており、ヒトとマウスでは、この分子機構が異なっている可能性が考えられる。

実験材料と方法

1. 実験材料

1-1. 細胞

溶液および緩衝液の組成

PBS(-)	137 mM NaCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, 2.68 mM KCl, 1.49 mM KH_2PO_4
$NaHCO_3$ 水溶液	10% $NaHCO_3$
トリプシン液	0.25% Trypsin-0.02% EDTA-PBS(-)

試薬

以下の試薬を各メーカーより購入した。

FBS	BioSource Intl., Inc.
Eagle's MEM "Nissui" ① Nissui, Japan	Nissui, Japan
DMEM (1.0 g/l Low Glucose)	GIBCO-Invitrogen
DMEM (4.5 g/l High Glucose)	GIBCO-Invitrogen
RPMI1640	GIBCO-Invitrogen
100 mU/ml PenicillinG, 100 µg/ml Streptomycin	GIBCO-Invitrogen
L-Glutamine	GIBCO-Invitrogen
NEAA	GIBCO-Invitrogen
Sodium Pyruvate	GIBCO-Invitrogen
HEPES	GIBCO-Invitrogen
Insulin solution from Bovin Pancreas	SIGMA
EGF	Wako
Dexamethasone	
Opti-MEM	Invitrogen

各細胞の培養条件・継代条件

1-1-1. HeLa 細胞

ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞は京都大学ウイルス研究所の藤田尚志教授より供与された。あらかじめ 56℃で 30 分加熱し非働化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、1%(v/v) L-Glutamine、$NaHCO_3$ を適量添加した Eagle's MEM 培地を用いて 37℃、5% CO_2 の条件下で培養した。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

1-1-2. HEK293FT 細胞

ヒト胎児腎細胞株 HEK293FT 細胞はレンチウイルス発現システム(Invitrogen)に付属していたものを用いた。あらかじめ 56℃で 30 分加熱し非働化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 μg/ml Streptomycin、0.1 mM NEAA、1 mM Sodium Pyruvate を添加した DMEM (4.5 g/l High Glucose) を用いて 37℃、5%CO_2 の条件下で培養した。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

1-1-3. HepG2 細胞

ヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞は慶応義塾大学医学部の吉村昭彦教授より供与された。あらかじめ 56℃で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 μg/ml Streptomycin を添加した DMEM (1.0 g/l Low Glucose)を用いて 37℃、5%CO_2 の条件下で培養した。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 2 ~3 日おきに行った。

1-1-4. THP-1 細胞

ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 細胞は広島大学医学部の櫨木修教授より供与された。あらかじめ 56℃で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 μg/ml Streptomycin を添加した RPMI1640 を用いて 37℃、5%CO_2 の条件下で培養した。細胞は浮遊細胞であり、細胞の継代は 2 ~3 日おきに行った。

1-1-5. RAW264.7 細胞

マウスマクロファージ由来細胞株 RAW264.7 細胞は Japanese Cancer Reserch Resources Bank より購入した。あらかじめ 56℃で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 μg/ml Streptomycin を添加した RPMI1640 を用いて 37℃、5%CO_2 の条件下で培養した。細胞はスクレイパーを用いて回収した。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

1-1-6. L929 細胞

マウス線維芽細胞由来細胞株 L929 細胞は RIKEN BRC Cell Bank より購入した。あらかじめ 56℃で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 μg/ml Streptomycin を添加した RPMI1640 を用いて 37℃、5%CO_2 の条件下で培養した。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

1-1-7. マウス由来肝細胞株

マウス肝臓細胞由来細胞株は Dr. Hussein Hassan Aly により樹立された [40]。あらかじめ 56℃で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 μg/ml Streptomycin、 0.1 mM NEAA、20 mM HEPES、0.5 μg/ml Insulin solution from Bovin Pancreas、44 mM 炭酸水素ナトリウム、0.2 mM L-アスコルビン酸-2-リン酸エステル、10 mM ニコチンアミド、10 ng/ml EGF、30 μg/ml L-プロリン、100 pM Dexamethasone を添加した DMEM (4.5 g/l High Glucose)を用いて 37℃、5%CO_2 の条件下で培養した。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

1-1-8. T-23 細胞

ツパイ上皮細胞由来細胞株 T-23 細胞 (clone 8)は東京都医学総合研究所の小原道法プロジェクトリーダーより供与された。あらかじめ 56℃で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 μg/ml Streptomycin を添加した DMEM (1.0 g/l Low Glucose)を用いて 37℃、5%CO_2 の条件下で培養した。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

1-1-9. Vero 細胞

アフリカミドリザル腎臓上皮細胞由来細胞株 Vero 細胞は RIKEN BRC Cell Bank より購入した。あらかじめ 56℃で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 μg/ml Streptomycin を添加した DMEM (1.0 g/l Low Glucose)を用いて 37℃、5%CO_2 の条件下で培養した。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

1-2. プラスミド

使用したプラスミドは以下の通りである。

empty/pEF-BOS （京都大学 長田重一教授より供与)[41]
pEF-BOS/hRIG-I CARD N 末 FLAG （京都大学 藤田尚志教授より供与)[42]
pTRE2hyg/ x1.4 HBV （広島大学 茶山一彰教授より供与)[43]
pEF-BOS/hSTING-C 末 FLAG
pEF-BOS/hIPS-1-C 末 HA
pEF-BOS/hTICAM-1 C 末 HA
} 当研究室で作成

2. 方法

2-1. 細胞からの RNA 抽出

細胞の総 RNA の回収には TRIzol Reagent (Invitrogen)を用いた。24 ウェルプレートに撒いた細胞を 500 μl の TRIzol に懸濁しピペッティングをした後、室温で 15 分間インキュベートした。その後 100 μl のクロロホルムを加えてボルテックスをし、室温で 2 分間インキュベートをした後、12,000 g、15 分間遠心をして水層とクロロホルム層を分離した。水層のみ回収し、同量のイソプロパノールを加えて転倒混合をし、室温で 20 分間インキュベートした。その後 15,000 g、20 分間遠心をし上清を破棄したのち 70% エタノールを 500 μl 加え、15,000 g、10 分遠心をした。上清を破棄したのち、風乾によりペレットを乾かした。

ペレットは適量の Nucrease-free Water (Ambion)に溶解し、Nano-View (GE Healthcare)を用いた吸光度測定により濃度測定した。

2-2. 免疫染色

細胞を Micro Cover glass sheets (Matshnami)を入れた 24 ウェルプレートに撒き、翌日にプラスミドをトランスフェクションした。刺激または HSV-1 感染を行う場合には、その 24 時間後に行った。ミトコンドリアの染色を行う場合、培養上清を 500 nM MitoTracker Red CM-H2XRos （Invitrogen)を含む培地に置換し、37℃、5%

CO_2 で 45 分間インキュベートした。続いて上清を MitoTracker を含まない培地に置換し、更に 37℃、5% CO_2 で 45 分間インキュベートを行った。

細胞は PBS で 2 回洗浄した後、3% ホルムアルデヒド-PBS を用いて室温で 30 分間固定処理を行った。続いて 0.2% Triton-X100-PBS を用いて室温で 15 分間の透過処理を行った。固定した細胞を 1% BSA-PBS を用い室温で 30 分間ブロッキングし、1 次抗体を室温で 60 分間反応させた。1% BSA-PBS で 4 回洗浄した後、暗所にて 2 次抗体を室温、30 分間反応させた。1% BSA-PBS で 4 回洗浄した後 Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen)で封入した。

細胞の観察には共焦点レーザースキャン顕微鏡 (LSM510 Meta microscope、Zeiss)を用いて対物レンズ倍率 x63oil で観察し、同ソフトにて Colocalization coefficient の計算を行った。

実験に用いた抗体と希釈倍率を以下に示す。

FLAG mAb M2(SIGMA)	1:1000
FLAG pAb (SIGMA)	1:1000
HA mAb (COVANCE)	1:1000
HA pAb (SIGMA)	1:1000
Phospho-TBK1/NAK (Ser172) (D52C2) XP® Rabbit mAb (Cell Signaling Technology)	1:100
Anti-NAK antibody [EP611Y] Rabbit mAb (Abcam)	1:500
Anti-Mitofusin 1 Antibody mouse mAb (Abcam)	1:400
Anti-Presenilin 1 antibody [APS 11] mouse mAb (Abcam)	1:200
Anti-G3BP antibody mouse mAb (Abcam)	1:300
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody (Life Technology)	1:400
Alexa Fluor® 594Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody (Life Technology)	1:400
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody (Life Technology)	1:400
Alexa Fluor® 569 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody (Life Technology)	1:400
Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody (Life Technology)	1:400

2-3. RT-PCR、定量 PCR

TRIzol により回収した総 RNA から 100-1000 ng の RNA を用いて定量 PCR を行った。RNA は 37℃、30 分間 DNaseI (Promega)処理を行い、DNA を除去した。その後 DNaseI は 2.5 mM EDTA を加え 80℃、2 分間インキュベートする事で不活化した。続いて High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems)を用いて RT-PCR を行った。RT-PCR の条件は、25℃ 10 分、37℃ 120 分、85℃ 5 分、4℃ ∞で行った。

RT-PCR により得た cDNA をテンプレートに定量 PCR を行った。定量 PCR は Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用い、StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)により Ct 値を測定し、mRNA 量を ΔΔCt 法により算出した。内部標準にはβ-actin を用いた。

使用したプライマーの配列は以下に示す。

hβ-actin F	CCTGGCACCCAGCACAAT
hβ-actin R	GCCGATCCACACGGAGTACT
hIPS-1 F	GGTACCCGAGTCTCGTTTCCT
hIPS-1 R	TTGTCTTCAGCAAACGGCATT
hSTING F	GAGAGCCACCAGAGCACAC
hSTING R	CGCACAGTCCTCCAGTAGC
hIFN-β F	CAACTTGCTTGGATTCCTACAAAG
hIFN-β R	TATTCAAGCCTCCCATTCAATTG
mβ-actin F	TTTGCAGCTCCTTCGTTGC
mβ-actin R	TCGTCATCCATGGCGAACT
mIPS-1 F	AGCCCTCCAGAGAGCATCAA
mIPS-1 R	GAGGCAACATTTGCTGCGT
mSTING F	CCTAGCCTCGCACGAACTGG
mSTING R	CGCACAGCCTTCCAGTAGC
mIFN-β F	CCCTATGGAGATGACGGAGA
mIFN-β-R	TCCCACGTCAATCTTTCCTC

2-4. HSV-1 ウイルスの培養、感染実験

HSV-1 (K strain) (東京慈恵医科大学 近藤一博教授より供与)は Vero 細胞に MOI=0.1 で感染させて培養した。24-48 時間後に CPE を確認した後、その上清を回収し-80℃で凍結保存した。

2-5. SDS-PAGE、ウェスタンブロット

10%アクリルアミドゲル電気泳動によりサンプルを分離した。泳動バッファーには 25 mM Tris、0.19 M glycine、0.1% SDS を含む溶液を用いた。続いてメタノールで親水処理を行い、Blotting Buffer (25 mM Tris-HCl、40 mM glycine、20% methanol (pH 9.4))で平衡化をした PVDF 膜 (MILLIPORE)へ転写した。転写は、Blotting Buffer へ浸したろ紙各 3 枚で PVDF 膜およびゲルを挟み、100 mA、90 分間の通電により行った。転写後、PVDF 膜を Blocking Buffer (5% Skimmilk、0.5 M NaCl、20 mM Tris-HCl (pH7.4))中で 60 分間振盪した。その後 Wash Buffer (0.1%(v/v) Tween20, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4))で 5 分間 3 回振盪し PVDF 膜を洗浄した。各実験に適した一次抗体を Wash Buffer に希釈し、室温で 60 分間反応した。更に Wash Buffer 中で 5 分間 3 回の洗浄をした後、一次抗体の検出に適した二次抗体を加えた Wash Buffer 中にて室温で 60 分反応した。PVDF 膜を Wash Buffer 中で 5 分 3 回の振盪の後、検出を行った。検出には ECL または ECL prime (GE Healthcare)を用いた。

2-6. RNA 干渉

細胞を各実験に適したプレートに撒き、翌日に siRNA のトランスフェクションを行った。実験に応じて 3-10 μM の siRNA を lipofectamine iMAX を用いてトランスフェクションした。細胞は 48 時間後に回収し、ルシフェラーゼアッセイ、定量 PCR、ウェスタンブロットを行った。

siRNA negative control (AM4635)および si humanTMEM173 (s50645)、si human IPS-1 (s33178)、si mouseTMEM173 (s91057)、si mouseIPS-1 (s72976)は ambion-Applied Biosystems より購入した。

結果

1.1 HeLa 細胞における p-TBK1 の細胞内局在

RIG-I タンパク質の CARD 領域を pEF-BOS ベクターを用いて、細胞内で一過的に過剰発現させると、RIG-I 下流のシグナルが活性化することが知らている。そこで、RIG-I CARD を HeLa 細胞に過剰発現したところ、RIG-I 下流の TBK1 がリン酸化する事がウェスタンブロットにより観察された (Fig.1-1 A)。次に、TICAM-1、STING、IPS-1 の過剰発現に於いても、それぞれの下流のシグナルが活性化する事が知られていることから、TICAM-1、STING、IPS-1 を過剰発現させることでも、TBK1 がリン酸化されることをウェスタンブロットにより確認した (Fig.1-1 A)。

次に、これらの分子を過剰発現した際の p-TBK1 や TBK1 が HeLa 細胞内のどこに局在しているのかを、p-TBK1 と TBK1 に特異的な抗体を用いて共焦点顕微鏡により観察した。すると、RIG-I CARD や IPS-1 を過剰発現した場合には、p-TBK1 はミトコンドリアに局在した (Fig.1-1 B)。また STING を過剰発現した細胞においても、p-TBK1 のミトコンドリアへの局在が観察された (Fig.1-1 B)。統計的な解析を行ったところ、RIG-I CARD、IPS-1、STING の過剰発現により誘導された p-TBK1 の 70%以上がミトコンドリアに局在し、共局在していると判断できる (Fig.1-1 C)。一方で TICAM-1 を過剰発現させた細胞では p-TBK1 はミトコンドリアには局在せず、細胞質内にドット上に分布した (Fig.1-1 B)。また、いずれの場合においても総 TBK1 は細胞質全体に強く発現していた。

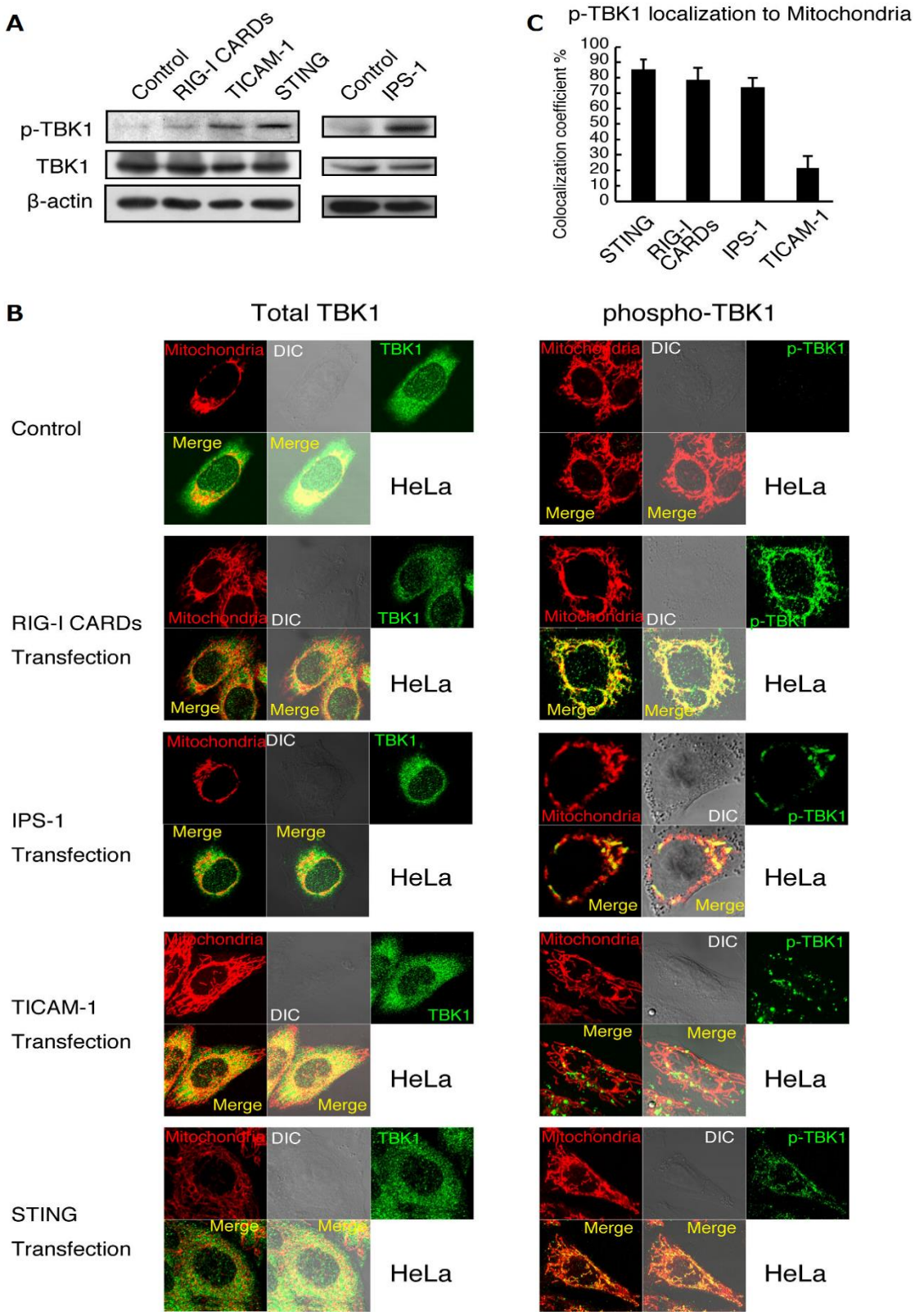


Figure.1-1　HeLa 細胞における p-TBK1 の発現と局在の観察

(A) 6 ウェルプレートに HeLa 細胞を撒き、翌日に空ベクターまたは RIG-I CARD、TICAM-1、STING、IPS-1 の発現プラスミドを 1.2 μg トランスフェクションした。24 時間後に細胞のライセートを回収し、SDS-PAGE で分離した。各タンパク質の発現は抗 p-TBK1 抗体、抗 TBK1 抗体、抗β-actin 抗体を用い、ウェスタンブロットにより行った。(B と C) 24 ウェルプレートに HeLa 細胞を撒き、翌日に空ベクターまたは RIG-I CARD、TICAM-1、STING、IPS-1 の発現プラスミドを 0.3 μg トランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後、Mitotracker Red を用いてミトコンドリアを染色後に細胞を固定し、p-TBK1 または TBK1 抗体にて細胞を染色した。p-TBK1 の Colocalization coefficients は n=3、平均値±標準偏差により求めた。(B)に示す写真は 3 回の異なる実験のうち、代表的なものを載せた。

1-2. HeLa 細胞での細胞質内核酸刺激による p-TBK1 の細胞内局在

次に polyI:C や脊椎動物由来の dsDNA で刺激した場合の p-TBK1 の局在を観察した。まず p-TBK1 は polyI:C や dsDNA の刺激により誘導される事をウェスタンブロットにより確認した (Fig.1-2 A)。

polyI:C や dsDNA 刺激により現れる p-TBK1 の細胞内局在を共焦点顕微鏡により観察したところ、polyI:C や dsDNA をトランスフェクションし刺激した細胞では、p-TBK1 がミトコンドリア上に局在していた (Fig.1-2 B)。どの程度ミトコンドリア上に局在するかを評価するために、Colocalization Coefficient の値を求めたところ、p-TBK1 の 80%以上がミトコンドリアへ局在していることが明らかとなった (Fig.1-2 C)。これはミトコンドリアと共局在していると表現しても差し支えない値である。一方で細胞上清中に polyI:C を添加し、TLR3 を刺激した細胞では、TICAM-1 を過剰発現した細胞と同様に、p-TBK1 はミトコンドリア上には局在しなかった (Fig.1-2 B)。

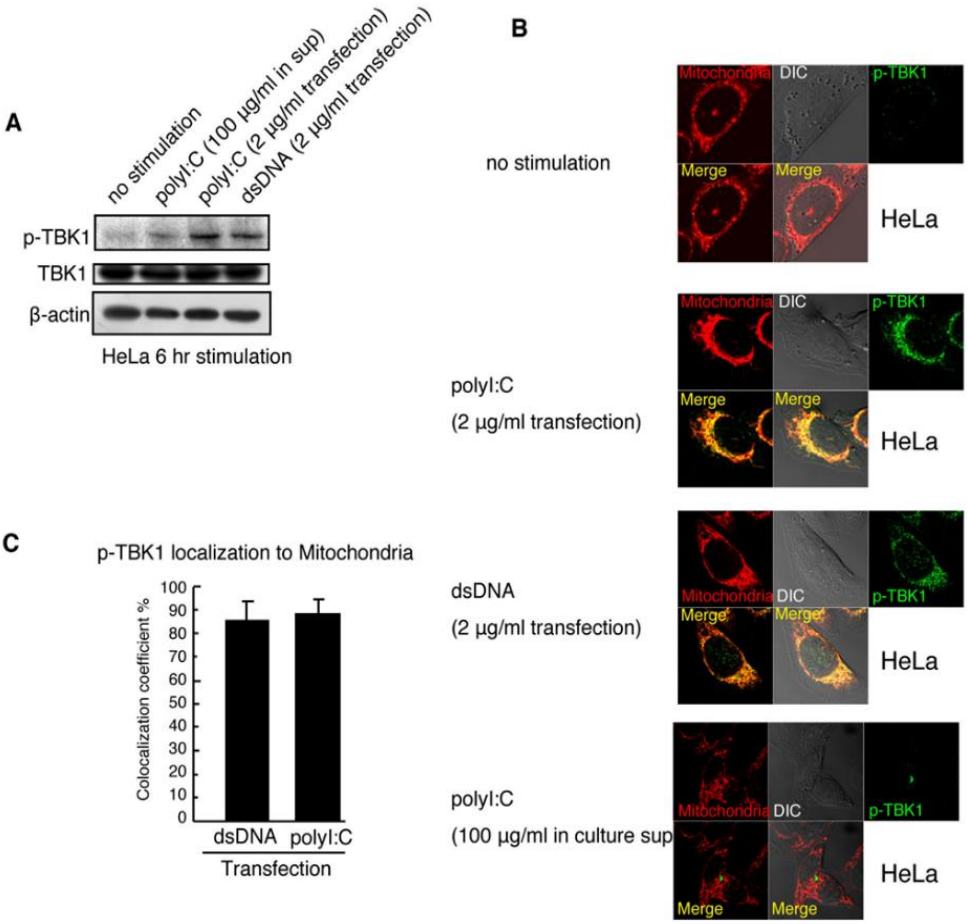


Figure.1-2　HeLa 細胞での細胞質内核酸刺激における p-TBK1 の発現と局在の観察
(A) 6 ウェルプレートに HeLa 細胞を撒き、翌日に 100 μg/ml の polyI:C (情勢に加える)または 2 μg/ml の polyI:C (トランスフェクション)、2 μg/ml の鮭精子由来 dsDNA (トランスフェクション)により細胞を刺激した。6 時間刺激をした後、細胞のライセートを回収し、SDS-PAGE で分離した。各タンパク質の発現は抗 p-TBK1 抗体、抗 TBK1 抗体、抗β-actin 抗体を用い、ウェスタンブロットにより行った。(B と C) 24 ウェルプレートに HeLa 細胞を撒き、翌日に 100 μg/ml の polyI:C (上清に加える)または 2 μg/ml の polyI:C (トランスフェクション)、2 μg/ml の鮭精子由来 dsDNA (トランスフェクション)により細胞を刺激した。6 時間刺激をした後 MitoTracker Red を用いてミトコンドリアを染色後に細胞を固定し、p-TBK1 または TBK1 抗体にて細胞を染色した。p-TBK1 の Colocalization coefficients は n=3、平均値±標準偏差により求めた。(B)に示す写真は 3 回の異なる実験のうち、代表的なものを載せた。

1-3. HeLa 細胞における p-TBK1 と細胞内タンパク質の共局在

次に、リン酸化した TBK1 がどのようなタンパク質と共局在しているのかを観察した。polyI:C を細胞質内にトランスフェクションして刺激をした HeLa 細胞ではトコンドリア外膜に局在する MFN-1 と p-TBK1 が共局在した (Fig.1-3 A)。SG のマーカーである GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1 (G3BP)は p-TBK1 と僅かに共局在した (Fig.1-3 A)。

HA タグの付いた IPS-1 や FLAG タグの付いた STING を HeLa 細胞に過剰発現させ p-TBK1 の局在を比較したところ、polyI:C トランスフェクション刺激により現れる p-TBK1 は主に IPS-1 と共局在し、STING とはほとんど共局在しなかった (Fig.1-3 A,B)。

DNA トランスフェクション刺激においても同様に、p-TBK1 は IPS-1 や MFN-1 と共局在した (Fig.1-3 C, E)。またこの時、MAM のマーカー分子である Presenilin-1 (PSEN-1)[44] や STING とも一部共局在した (Fig.1-3 D, F)。統計的な解析を行ったところ、p-TBK1 と HA タグの付いた IPS-1 や MFN-1 の共局在の程度を示す Colocalization coefficient の値は、60%以上であったのに対し、FLAG タグの付いた STING とは 10%以下の値であった。一方で、PSEN-1 とでは、およそ 30%程度であった (Fig.1-3 G)。

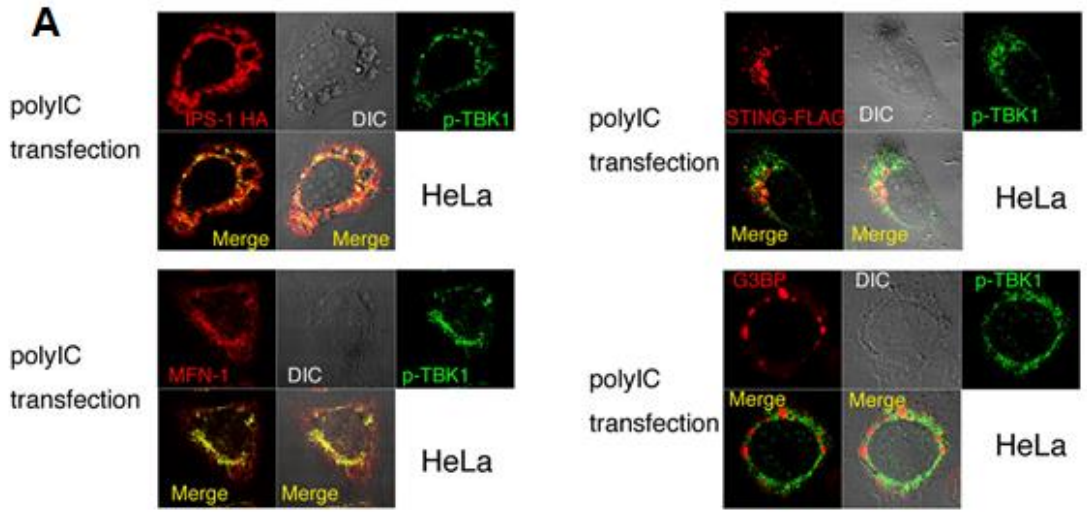
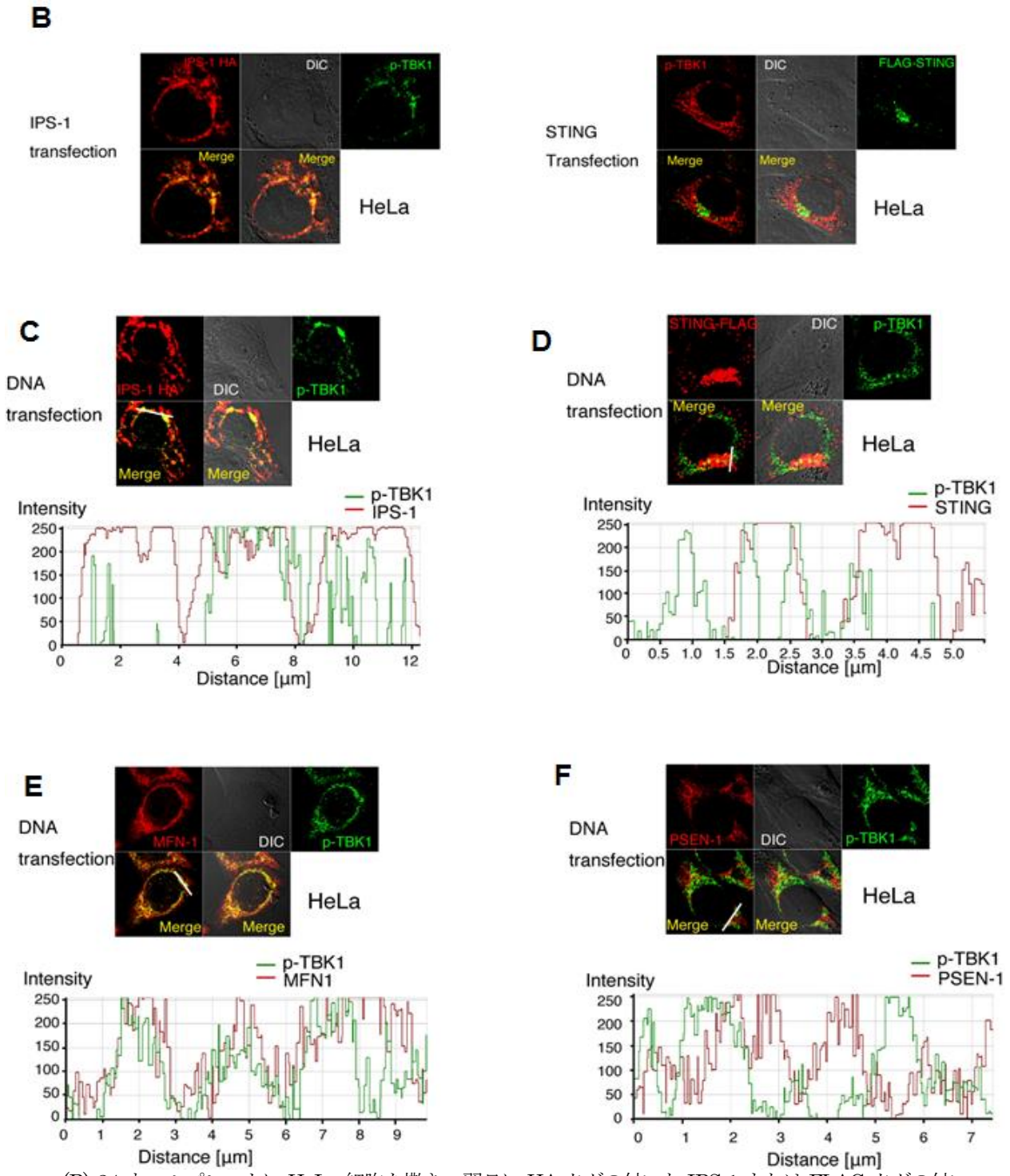
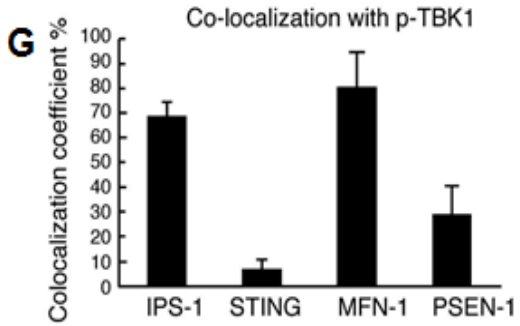


Figure.1-3　HeLa 細胞での様々な分子や細胞小器官と p-TBK1 の共局在の観察
(A) 24 ウェルプレートに HeLa 細胞を撒き、翌日に 2 μg/ml の polyI:C でトランスフェクションにより刺激をした。刺激から 6 時間後に細胞を固定し、抗 TBK1 抗体と抗 FLAG 抗体または抗 HA 抗体、抗 MFN-1 抗体、抗 G3BP 抗体により細胞を染色した。IPS-1 または STING の局在を観察する場合は、HeLa 細胞を撒いた翌日に HA タグの付いた IPS-1 または FLAG タグの付いた STING の発現プラスミドをトランスフェクションし、その 24 時間後に刺激を行った。



(B) 24 ウェルプレートに HeLa 細胞を撒き、翌日に HA タグの付いた IPS-1 または FLAG タグの付いた STING の発現プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に細胞を固定し、抗 TBK1 抗体と抗 FLAG 抗体または抗 HA 抗体を用いて細胞を染色した。(C と D) 24 ウェルプレートに HeLa 細胞を撒き、その翌日に 0.3 μg の HA タグの付いた IPS-1 (C)または、FLAG タグの付いた STING (D)発現ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後、1 μg の鮭精子由来 dsDNA をトランスフェクションし、細胞を 6 時間刺激した。その後細胞を固定し、抗 p-TBK1 抗体と抗 HA 抗体または抗 FLAG 抗体にて細胞を染色した。ヒストグラムは、Marge 写真の白い線上の蛍光強度を示す。(E と F) 24 ウェルプレートに HeLa 細胞を撒き、翌日に 1 μg の鮭精子由来 dsDNA をトランスフェクションし、細胞を 6 時間刺激した。その後細胞を固定し、抗 p-TBK1 抗体と抗 MFN-1 抗体または抗 PSEN-1 抗体により細胞を染色した。ヒストグラムは、Marge 写真の白い線上の蛍光強度を示す。



(G) (C-F)の写真における p-TBK1 の Colocalization coefficients を示す。値は n=3、平均値±標準偏差により求めた。(A-F)に示す写真は 3 回の異なる実験のうち、代表的なものを載せた。

1-4. 様々な細胞株での細胞質内 DNA 刺激による p-TBK1 の細胞内局在

次に HeLa 細胞以外の細胞株において細胞質内 DNA 刺激による p-TBK1 がミトコンドリアへ局在するかどうかを、ミトコンドリアを染色する Mitotracker 試薬を用いて観察した。ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞では、HeLa 細胞と同様に、p-TBK1 はミトコンドリアに局在した (Fig.1-4 A)。一方で、マウス由来細胞株の RAW264.7 細胞や L929 細胞、マウス肝臓由来細胞株、更にツパイ由来細胞株の T-23 細胞株では、p-TBK1 はミトコンドリアに局在しなかった (Fig.1-4 B-E)。ミトコンドリアへ局在している p-TBK1 の割合を示す Colocalization coefficient の値は、RAW264.7 細胞や 929 細胞、マウス肝臓由来細胞株、T-23 細胞では 20%未満であり、共局在しているとは判断できない (Fig.1-4 F)。

またこの時、RAW264.7 細胞や L929 細胞、マウス肝臓由来細胞株、T-23 細胞では p-TBK1 は過剰発現した STING と共局在した (Fig.1-4 G-L)。

以上より、細胞質内 DNA 刺激による p-TBK1 の局在は、HeLa 細胞と HepG2 細胞ではミトコンドリアに局在し、RAW264.7 細胞や L929 細胞、マウス肝臓由来細胞株、T-23 細胞ではミトコンドリアへはほとんど局在せず、STING と局在した。これは p-TBK1 の局在の細胞特異性を示している。

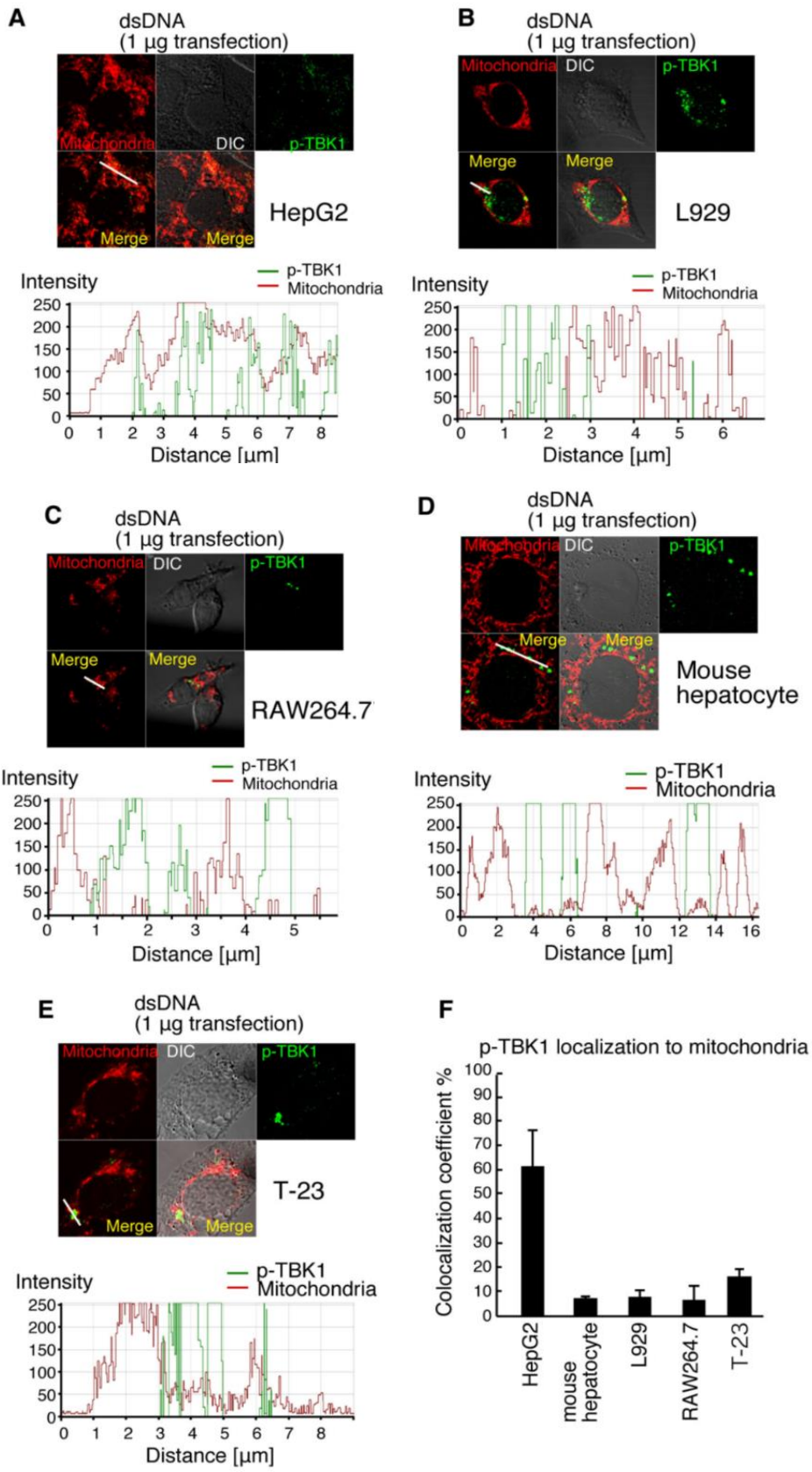
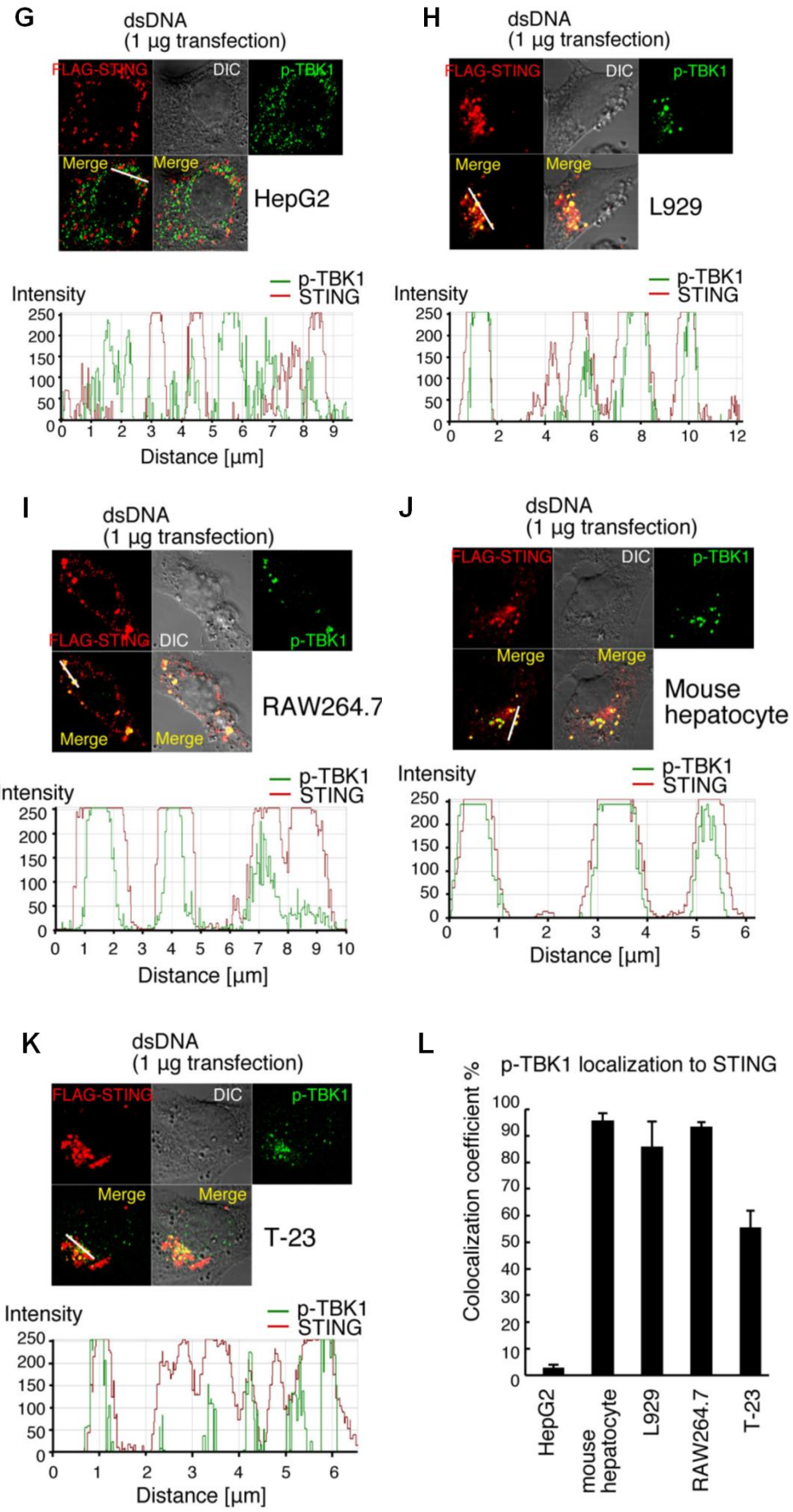


Figure.1-4　細胞質内 DNA 刺激による p-TBK1 のミトコンドリアへの局在は細胞特異的である

(A-E) 24 ウェルプレートに HepG2 細胞 (A)と L929 細胞 (B)、RAW264.7 細胞 (C)、マウス肝細胞由来細胞株 (D)、T-23 細胞 (E)を撒き、翌日に 1 µg の鮭精子由来 dsDNA をトランスフェクションし、細胞を 6 時間刺激した。その後 Mitotracker Red を用いてミトコンドリアを染色後に細胞を固定し、抗 p-TBK1 抗体にて染色を行った。ヒストグラムは、Marge 写真の白い線上の蛍光強度を示す。(F) (A-E)の写真における p-TBK1 とミトコンドリアの Colocalization coefficients を示す。値は n=3、平均値±標準偏差により求めた。(A-E)に示す写真は3回の異なる実験のうち、代表的なものを載せた。図は全て p-TBK1 (緑) と STING-FLAG (赤) の共局在を観察している。



(G-L) 24 ウェルプレートに HepG2 細胞 (G) と L929 細胞 (H)、RAW264.7 細胞 (I)、マウス肝細胞由来細胞株 (J)、T-23 細胞 (K)を撒き、翌日に 0.3 μg の FLAG タグの付いた STING 発現ベクターをトランスフェクションし、その 24 時間後に 1 μg の鮭精子由来 dsDNA で細胞を 6 時間刺激した。その後細胞を固定し、抗 p-TBK1 抗体と抗 FLAG 抗体にて染色を行った。ヒストグラムは、Marge 写真の白い線上の蛍光強度を示す。(L) (G-L) の写真における p-TBK1 と STING の Colocalization coefficients を示す。値は n=3、平均値±標準偏差により求めた。(G-L)に示す写真は 3 回の異なる実験のうち、代表的なものを載せた。図は全て p-TBK1（緑）と STING-FLAG（赤）の共局在を観察している。

1-5. ヒト由来細胞株における細胞質内ウイルス DNA への応答

これまでの刺激では鮭由来のゲノム DNA を用いて刺激したが、ウイルス由来 DNA でも同様のことが観察されるかどうかについて次に検討をおこなった。完全長の HBV ゲノムをコードするプラスミドを HepG2 にトランスフェクションするとウイルスが作られるため、I 型 IFN はほとんど産生されない[45-48]。そこで HBV タンパク質により自然免疫応答が抑制されるのを避けるため、HBV ゲノム DNA の一部の断片を用いてトランスフェクションし刺激した。HBV のゲノムを 4 つに分け (F1 – F4)、断片を作成した (Fig.1-5 A)。それぞれの断片を用いて RAW264.7 細胞を刺激すると IFN-βの mRNA を産生した (Fig.1-5 B)。断片による IFN-β産生量に大きな差がなかったため、以降はゲノム断片の F1 を用いて実験を行った。

HBV のゲノム断片の F1 を用いて HepG2 細胞を刺激すると、p-TBK1 はミトコンドリアへ局在し (Fig.1-5 C)、過剰発現した IPS-1 と共局在し、STING とはほとんど共局在しなかった (Fig.1-5 C, D)。一方で RAW264.7 細胞やマウス肝臓由細胞株、T-23 細胞に HBV のゲノム断片 F1 をトランスフェクションすると、p-TBK1 はミトコンドリアへは局在せず、そのほとんどが STING へ局在した (Fig.1-5 E-J)。

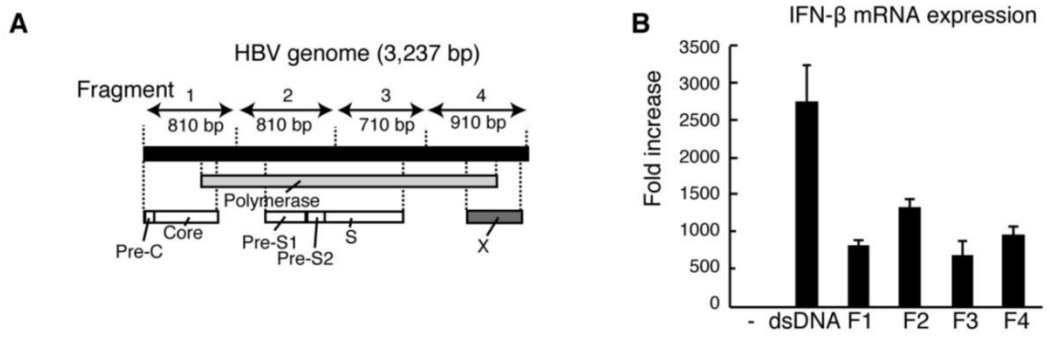
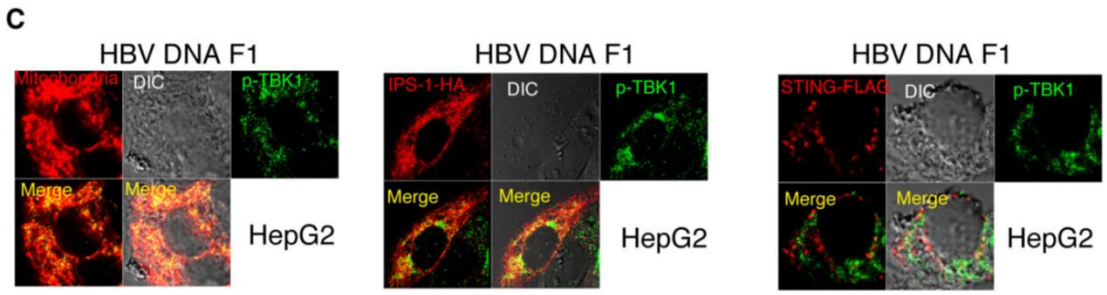
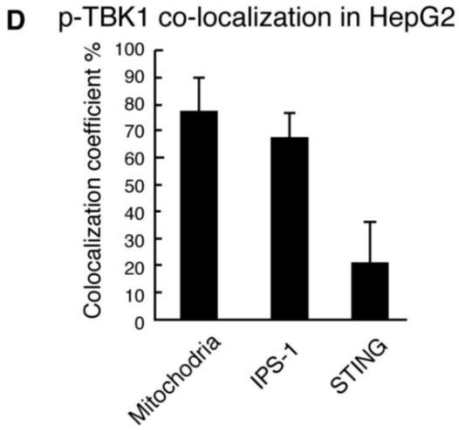
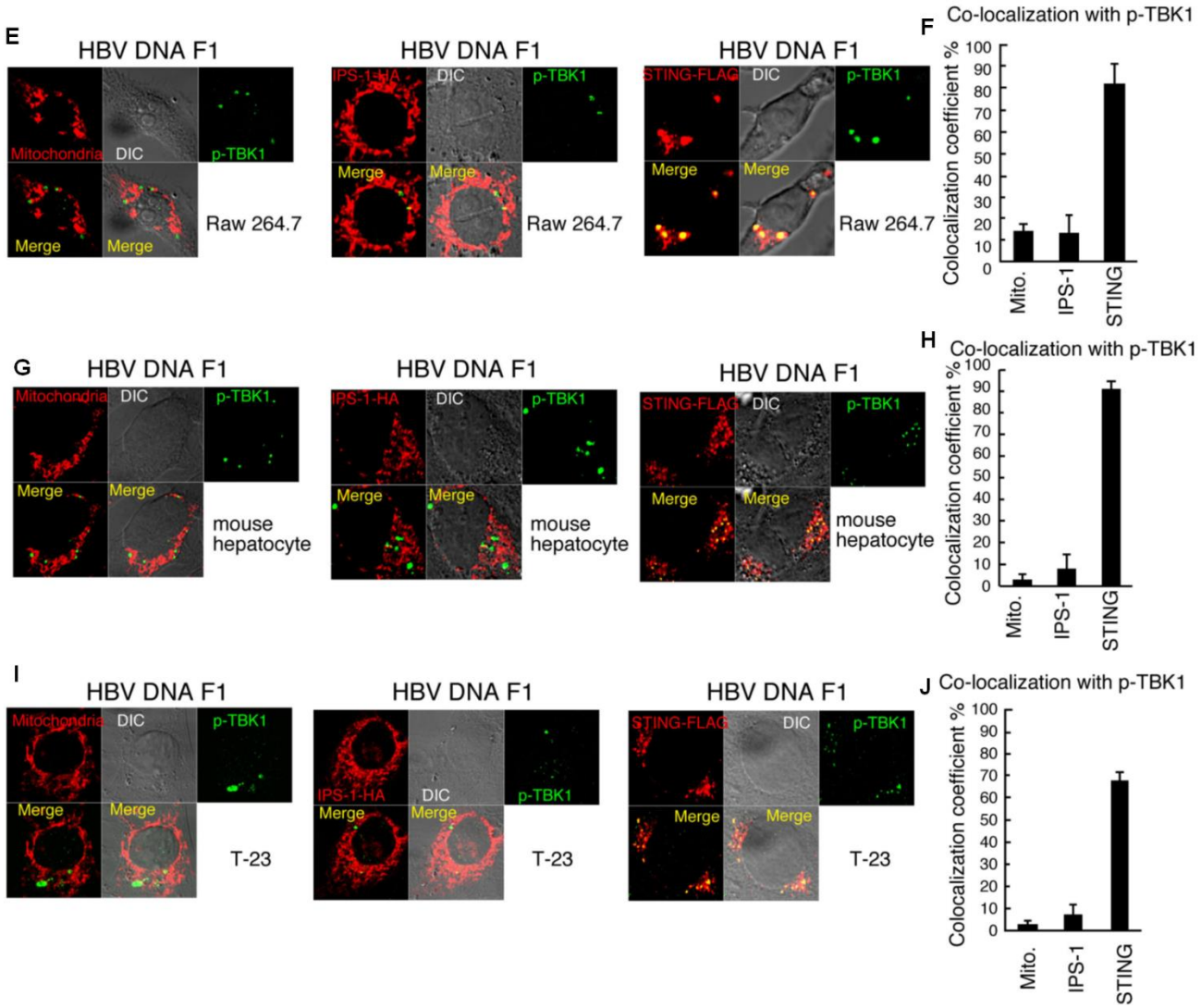


Figure.1-5　HBV ゲノム DNA 刺激により出現する p-TBK1 の局在
(A) (B-J)で用いた HBV ゲノム断片の概要図。(B) RAW264.7 細胞を鮭精子由来 dsDNA または HBV ゲノム断片 F1、F2、F3、F4 をトランスフェクションにより刺激した。刺激をしてから 6 時間後に未刺激の細胞と共に回収し、定量 PCR により IFN-βの mRNA の発現を調べた。





(C と D) 24 ウェルプレートに HepG2 細胞を撒き、翌日に 0.3 μg の空ベクターまたは HA タグの付いた IPS-1、FLAG タグの付いた STING の発現ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に 1 μg の HBV ゲノム断片をトランスフェクションし、6 時間刺激をした。その後細胞を固定し、抗 p-TBK1 抗体と抗 HA 抗体または抗 FLAG 抗体を用いて細胞を染色した。、ミトコンドリアを染色する場合は固定前に MitoTracker Red にて染色を行った。図は左から、p-TBK1 (緑)とミトコンドリア(赤)、p-TBK1 (緑)と IPS-1-HA (赤)、p-TBK1 (赤)と STING-FLAG (緑)の共局在を観察している。(D)に p-TBK1 とミトコンドリアまたは IPS-1、STING との Colocalization coefficients を示す。値は n=3、平均値±標準偏差により求めた。(C)に示す写真は 3 回の異なる実験のうち、代表的なものを載せた。



(E-J) 24 ウェルプレートに RAW264.7 細胞 (E と F)、マウス細胞由来細胞株 (G と H)、T-23 細胞 (I と J)を撒き、翌日に 0.3 μg の空ベクターまたは HA タグの付いた IPS-1、FLAG タグの付いた STING の発現ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に 1 μg の HBV ゲノム断片をトランスフェクションし、6 時間刺激をした。その後細胞を固定し、抗 p-TBK1 抗体と抗 HA 抗体または抗 FLAG 抗体を用いて細胞を染色した。、ミトコンドリアを染色する場合は固定前に MitoTracker Red にて染色を行った。(F、H、J) に p-TBK1 とミトコンドリア (mito.)または IPS-1、STING との Colocalization coefficients を示す。値は n=3、平均値±標準偏差により求めた。(E、G、I) に示す写真は 3 回の異なる実験のうち、代表的なものを載せた。

1-6. HSV-1 感染による p-TBK1 の細胞内局在

次にDNAウイルスである単純ヘルペスウイルス1(HSV-1)感染によるp-TBK1の局在を観察した。HeLa 細胞や HepG2 細胞では p-TBK1 はミトコンドリアへ局在したが、マウス肝臓由来細胞株や T-23 細胞では p-TBK1 は STING と共局在した(Fig.1-6 A-D)。統計解析においても、ミトコンドリアへ局在する p-TBK1 の割合は HeLa 細胞と HepG2 細胞で高く、マウス肝臓由来細胞株や T-23 細胞では 20%未満であった (Fig.1-6 E)。

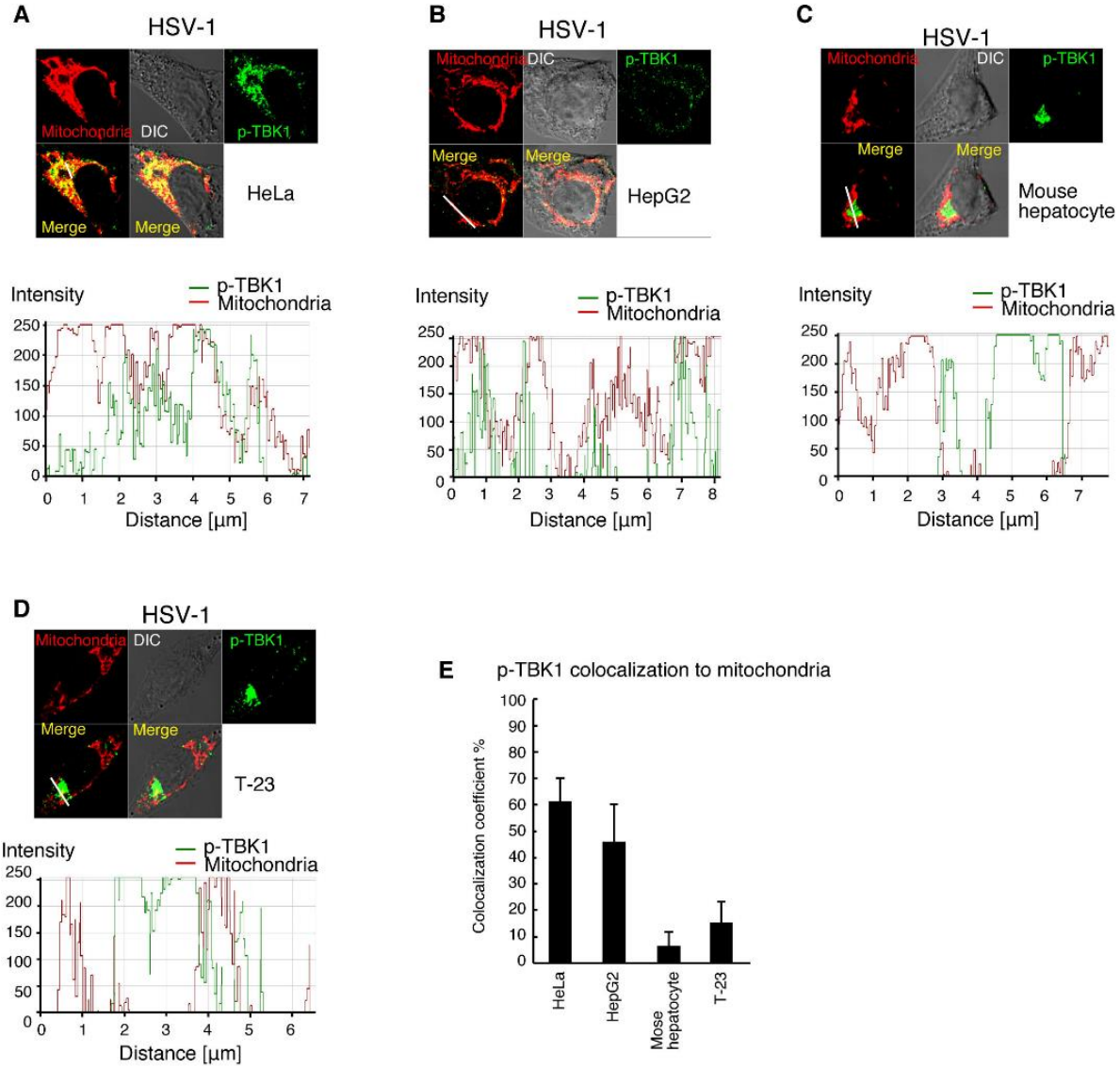


Figure.1-6　HSV-1 感染応答における p-TBK1 の細胞内局在
(A-D) 24 ウェルプレートに HeLa (A)、HepG2 (B)、マウス肝臓由来細胞株 (C)、T-23 細胞 (D)を撒き、翌日に HSV-1 に感染させた。感染から 24 後に MitoTracker Red を用いてミトコンドリアを染色後に細胞を固定し、抗 p-TBK1 抗体にて染色を行った。ヒストグラムは、Marge 写真の白い線上の蛍光強度を示す。(E) (A-D)の写真における p-TBK1 とミトコンドリアの Colocalization coefficients を示す。値は n=3、平均値±標準偏差により求めた。(A-D)に示す写真は 3 回の異なる実験のうち、代表的なものを載せた。

1-7. 細胞質内 DNA 刺激における IPS-1 細胞特異的な役割

これまでの観察で、HeLa 細胞を dsDNA のトランスフェクションにより刺激すると、p-TBK1 は IPS-1 と共局在していた。このことから、HeLa 細胞では細胞質内 DNA 刺激による応答において IPS-1 が必要であるか否かを siRNA を用いて検討した。

HeLa 細胞にネガティブコントロールもしくは IPS-1 の siRNA をトランスフェクションした。その 48 時間後に脊椎動物由来 dsDNA もしくは HBV ゲノム断片 F1 をトランスフェクションして 6 時間刺激をした。IPS-1 の siRNA は未刺激または dsDNA 刺激をした細胞で IPS-1 の mRNA を減少することを定量 PCR により確認した (Fig.1-7 A)。HeLa 細胞では、IPS-1 をノックダウンすると、細胞質内 DNA 刺激によりミトコンドリアへ局在する p-TBK1 の量が減少した (Fig.1-7 B)。

細胞質内 DNA 応答に必須と言われている STING についても同様の実験を行った。すると、siRNA で STING をノックダウンさせた場合もミトコンドリアへ局在する p-TBK1 が減少した (Fig.1-7 B)。次にウェスタンブロットにより p-TBK1 の量を観察したところ、DNA 刺激をした細胞では IPS-1 をノックダウンすると p-TBK1 の量が減少した (Fig.1-7 C)。STING をノックダウンした場合にも同様に p-TBK1 の量が減少した (Fig.1-7 E)。更に、IPS-1 または STING をノックダウンし、脊椎動物由来 dsDNA または HBV ゲノム断片 F1 で刺激した場合での IFN-βの mRNA の発現量の変化を定量 PCR により観察した。HeLa 細胞では IPS-1 または STING をノックダウンすると、IFN-βの mRNA の発現量が減少した (Fig.1-7 D)。

続いて dsDNA 刺激時に p-TBK1 が STING に局在していた L929 細胞で同様の実験を行った。L929 細胞での IPS-1 または STING のノックダウンの効率は定量 PCR で確認し、どちらの siRNA もそれぞれの mRNA を減少していることを確認した。L929 細胞の IPS-1 または STING をノックダウンし、脊椎動物由来 dsDNA もしくは HBV ゲノム断片 F1 で刺激をすると、STING をノックダウンした場合にのみ IFN-βの mRNA が減少した (Fig.1-7 F)。

以上より、HeLa 細胞では細胞質内 dsDNA 応答による IFN-β産生に IPS-1 と STING のどちらの分子も重要であるということ、L929 細胞は STING のみが重要であることが明らかとなった。

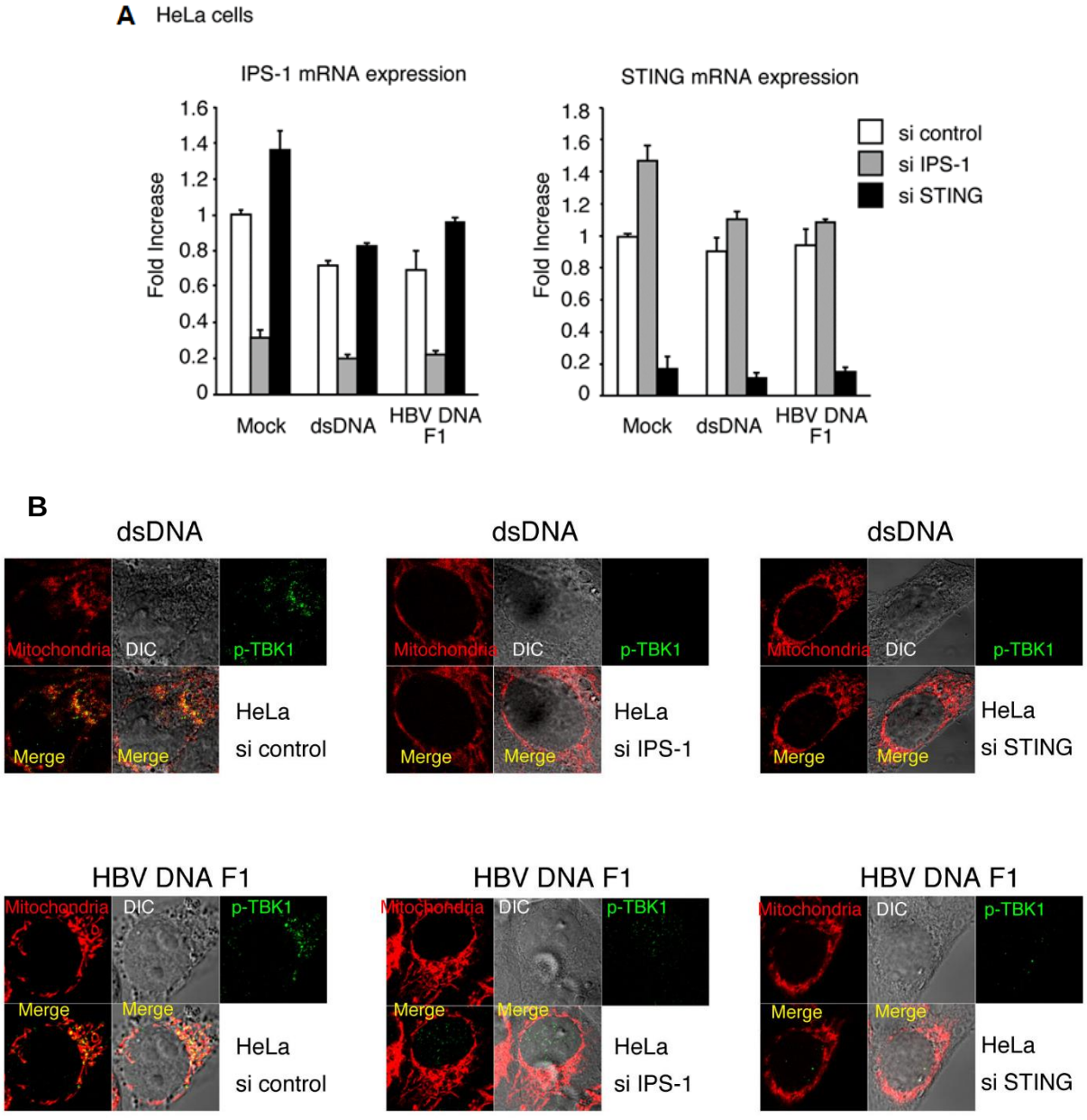
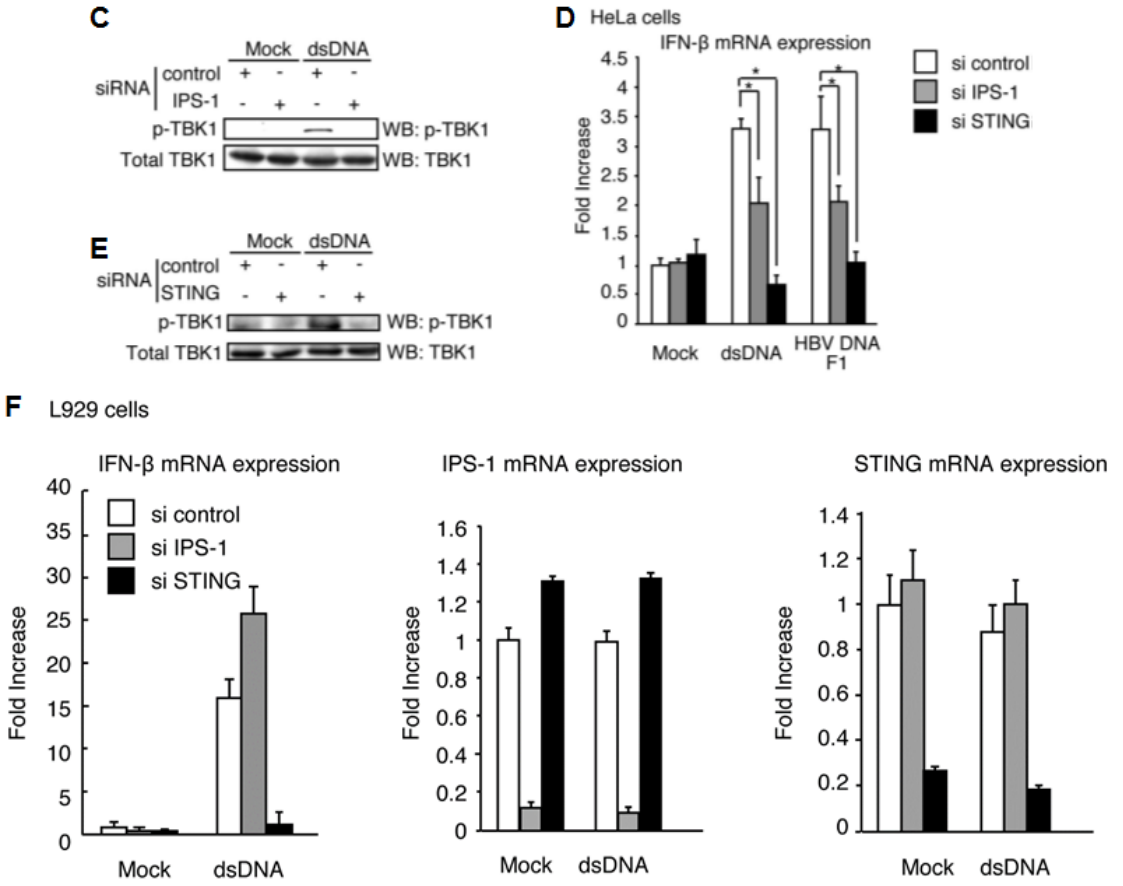


Figure.1-7　IPS-1 または STING をノックダウンした細胞での p-TBK1 の発現量
(A) 24 ウェルプレートに HeLa 細胞を撒き、その翌日に 6 pmol の control、IPS-1、STING の siRNA をトランスフェクションした。その 48 時間後に 1 μg の鮭精子由来 dsDNA または HBV ゲノム断片 F1 をトランスフェクションし、6 時間刺激をした。その後 TRIzol を用いて総 RNA を回収し、定量 PCR により IPS-1、STING、β-actin の mRNA 発現量を測定した。数値は"Mock si control"のサンプルの値に対する割合で示した。(B-D) HeLa 細胞を撒いた翌日に 6 pmol の control、IPS-1、STING の siRNA をトランスフェクションした。その 48 時間後に 1 μg の HBV ゲノム断片をトランスフェクションし、6 時間刺激をした。24 ウェルプレートに細胞を撒き、刺激後に Mitotracker Red を用いてミトコンドリアを染色した後細胞を固定し、抗 p-TBK1 抗体にて染色を行った (B)、もしくは 6 ウェルプレートに細胞を撒き、刺激の後に細胞のライセートを回収し、SDS-PAGE とウェスタンブロットにより発現量を調べた



(C と D)。(E) 24 ウェルプレートに HeLa 細胞を撒き、その翌日に 6 pmol の control、IPS-1、STING の siRNA をトランスフェクションした。その 48 時間後に 1 μg の鮭精子由来 dsDNA または HBV ゲノム断片 F1 をトランスフェクションし、6 時間刺激をした。その後 TRIzol を用いて総 RNA を回収し、定量 PCR により IFN-β、β-actin の mRNA 発現量を測定した。数値は"Mock si control"のサンプルの値に対する割合で示した。(F) 24 ウェルプレートに L929 細胞を撒き、その翌日に 6 pmol の control、IPS-1、STING の siRNA をトランスフェクションした。その 48 時間後に 1 μg の鮭精子由来 dsDNA または HBV ゲノム断片 F1 をトランスフェクションし、6 時間刺激をした。その後 TRIzol を用いて総 RNA を回収し、定量 PCR により IFN-β、IPS-1、STING、β-actin の mRNA 発現量を測定した。数値は"Mock si control"のサンプルの値に対する割合で示した。

1-8. THP-1 細胞での細胞質内 DNA 刺激による p-TBK1 の局在

L929 細胞や RAW264.7 細胞は、HeLa 細胞に比べると、細胞質内 DNA 刺激による IFN-βの mRNA の発現量が多い (Fig.1-8 A)。L929 細胞や RAW264.7 細胞の様に DNA に対して強い応答を示す細胞では p-TBK1 が STING に局在し、HeLa 細胞の様に DNA に対して弱い応答を示す細胞ではミトコンドリアに局在する可能性が考えられた。この考察を検討するため、L929 細胞と同程度の IFN-βの mRNA 発現量を示した (Fig.1-8 B)、単球様の細胞である THP-1 細胞を用いて実験を行った。

結果、HeLa 細胞と同様に、dsDNA 刺激による p-TBK1 はミトコンドリアへ局在した。

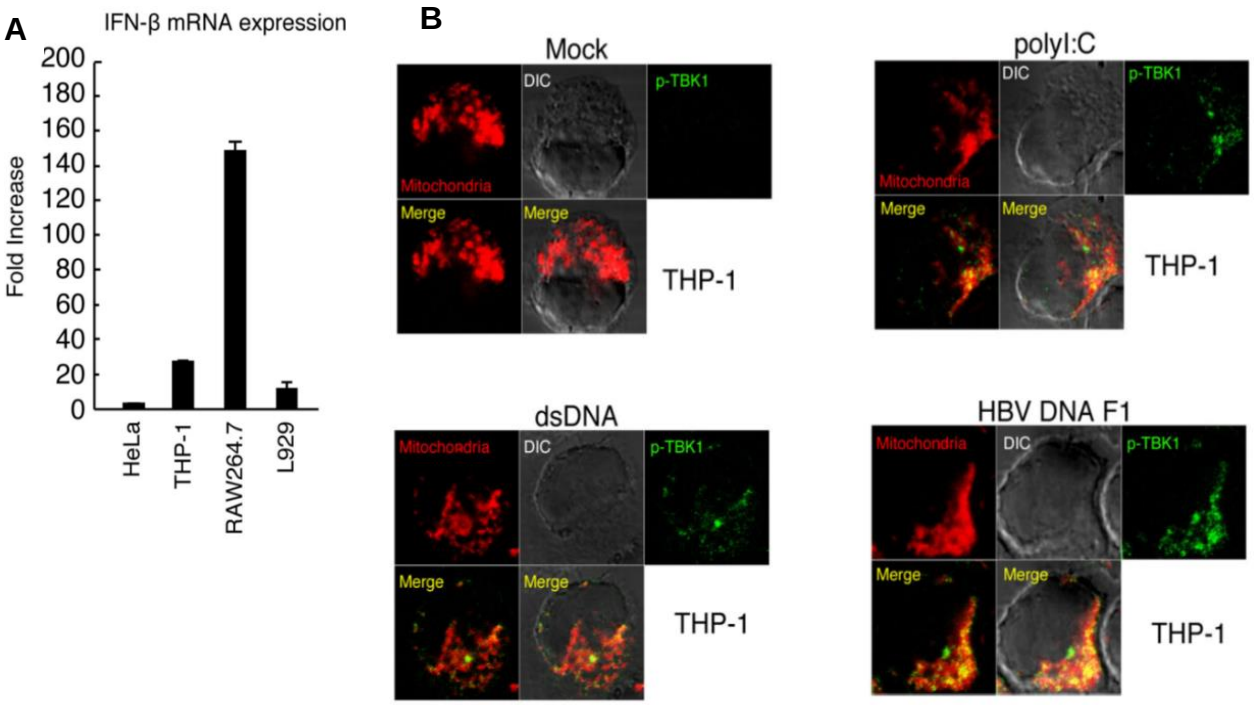


Figure.1-9　THP-1 細胞での polyI:C または dsDNA 細胞質内刺激による p-TBK1 の細胞内局在
(A) HeLa 細胞または、THP-1 細胞、RAW264.7 細胞、L929 細胞に 2 μg/mL の鮭精子由来 dsDNA をトランスフェクションした。6 時間刺激の後 TRIzol を用いて総 RNA を回収し、定量 PCR により IFN-β、β-actin の mRNA 発現量を測定した。数値は HeLa 細胞のサンプルの値に対する割合で示した。(B) 24 ウェルプレートに THP-1 細胞を撒き、翌日 2 μg/ml の polyI:C または鮭精子由来 dsDNA 、HBV ゲノム断片 F1 をトランスフェクションした。細胞を 6 時間刺激した後 Mitotracker Red を用いてミトコンドリアを染色後に細胞を固定し、抗 p-TBK1 抗体にて染色を行った。

考察

TBK1 分子は細胞質内の DNA に対する自然免疫応答において非常に重要な役割を果たす。本研究では、このリン酸化した TBK1 の細胞内局在を様々な細胞株を用いて観察したところ、ヒト由来の HeLa 細胞、HepG2 細胞、THP-1 細胞では、ウイルス由来の DNA に応答し、主にミトコンドリア上に局在するの対し、マウス由来の細胞株である RAW264.7 細胞、L929 細胞、肝細胞や、ツパイ由来の T-23 細胞では、ウイルス由来の DNA に応答し、主にミトコンドリア以外の場所に局在し、STING 分子と共局在することが明らかとなった。これは、DNA 刺激時の p-TBK1 の局在は、細胞特異的であることを示している。

これまでのノックアウトマウスを用いた研究からは、様々な DNA センサーの中でも cGAS 分子が非常に重要な役割を果たし、cGAS をノックアウトすることで、DNA に対する自然免疫応答としてのⅠ型 IFN 産生が消失することが報告されている[29]。しかし、本研究では、p-TBK1 の局在を指標とすることで、ヒトの細胞とマウスの細胞では p-TBK1 の細胞内局在が異なり、異なる経路が活性化していることを示唆した。これは、これまでの研究とは異なる新たな知見である。

ヒトの RIG-I がヒト細胞においては、DNA 認識に関与することは複数報告されている[31,32]。一方で、IPS-1 ノックアウトマウスの解析から、IPS-1 をノックアウトしたマウス由来の細胞でも DNA 刺激による I 型 IFN 産生はほとんど欠損がないことなどから、DNA に対する自然免疫応答における RIG-I の役割についてはこれまであまり重要視されてこなかった[49]。本研究から、p-TBK1 は IPS-1 が存在するミトコンドリア上に主に局在することが明らかとなったことから、ヒトの細胞においては、DNA 刺激時には主に RIG-I-IPS-1 の経路が働いていると推測される。実際にヒトの細胞で IPS-1 をノックダウンすることで、DNA 刺激によるⅠ型 IFN 産生が大きく減少したことは、我々のモデルを補強する結果である。しかしながら、ヒトの細胞株を用いた場合においても STING をノックダウンすると IPS-1 ノックダウンの時と同様に I 型 IFN 産生が減少した。このことから、ヒト細胞においては、まだ解明されていない未知の分子機構により、DNA に対する I 型 IFN 産生誘導が生じていると考えられる。

一章で行った実験から、マウスなどのヒト以外の哺乳類細胞とは異なり、ヒト細胞では RIG-I-IPS-1 経路が DNA に対する自然免疫応答で重要であることが示唆された。二章では、DNA ウイルスである HBV がどのように RIG-I-IPS-1 経路を抑制するのかについて検討した。

第二章　HBV 感染による I 型 IFN 産生抑制機構の解明

緒言

B 型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus: HBV)は B 型肝炎の原因ウイルスであり[50]、ヘパドナウイルス科オルソヘパドナウイルス属に属する[51]。不完全な環状二本鎖 DNA をゲノムに持ち[52]、ウイルスゲノムにはコアタンパク質、ポリメラーゼタンパク質、S タンパク質、X タンパク質の 4 つのタンパク質がコードされている[34]。

HBV は Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)をエントリーレセプターとしてヒトの肝細胞内に侵入する[53]。その後細胞質内へ移行する際にエンベロープを捨て、核へ移行する際に脱殻する[54]。ウイルスゲノムは核内で完全な環状二重鎖 DNA (covalently closed circular DNA: cccDNA)となる[55]。その後、宿主のタンパク質を用い、cccDNA を鋳型にして異なる長さのウイルス RNA を転写する[39]。転写された RNA のうち、完全長より短いものは mRNA として機能し、宿主の翻訳機構によりウイルスを構成するタンパク質が作られる。完全長の RNA はプレゲノム RNA と呼ばれ、コアタンパク質に包まれたのちにウイルス由来のポリメラーゼタンパク質により DNA へ逆転写されウイルスのゲノムとなる[56]。これらのウイルス複製の工程から、感染した肝細胞内には HBV 由来の DNA と RNA の両方が存在している事が分かる。

I 型 IFN は強い抗ウイルス作用をもち、HBV に対しても、その複製を抑制する[57]。一方で、HBV に感染しても I 型 IFN が検出されないことが知られている[45-48]。つまり、HBV は宿主の自然免疫応答を抑制していると考えられる。これまで、ウイルス由来のタンパク質による宿主細胞内の免疫系の抑制がいくつか報告されている。感染細胞内でコアタンパク質が発現すると、IFN-βの転写活性抑制[58]や Myxovirus resistance A (MxA)遺伝子の発現抑制[59]が起きる。ポリメラーゼタンパク質が発現すると、Signal Transducers and Activator of Transcription (STAT1)の核内移行の抑制[60]や、RIG-I/TLR3 経路での IRF-3 の活性化抑制[61]が報告されている。また S タンパク質と X タンパク質により Protein phosphatase 2A (PP2A)の発現上昇による IFN 応答の抑制が報告され[62]、更に X タンパク質は単体で脱ユビキチン化酵素として働き、その機能は I 型 IFN 産生に関わる多くの分子を標的としていることも報告されている[63]。

一章での研究結果から、ヒト細胞においては DNA に対する自然免疫応答には RIG-I 経路が重要であることが示唆された。これまで、HBV に対する自然免疫応答に

ついては十分には解明されていない。HBV 感染時にはそのゲノム DNA が認識される可能性と、HBV ゲノムより転写された RNA が認識される可能性の両方が考えられる。我々は予備実験から、HBV のポリメラーゼタンパク質が、RIG-I に対して作用し、RIG-I 依存的な自然免疫応答を抑制することを発見した。このメカニズムはこれまで報告されていない。そこで、二章では、HBV のポリメラーゼにより RIG-I 分子への作用機序の詳細について検討した。その結果、HBV のポリメラーゼの C 末端領域が RIG-I の活性化に必要なユビキチン化を阻害している可能性を示唆する結果を得た。

実験材料と方法

1. 実験材料

1-1. 細胞

溶液および緩衝液の組成

PBS(-)	137 mM NaCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, 2.68 mM KCl, 1.49 mM KH_2PO_4
$NaHCO_3$ 水溶液	10% $NaHCO_3$
トリプシン液	0.25% Trypsin-0.02% EDTA-PBS(-)

試薬

以下の試薬を各メーカーより購入した。

FBS	BioSource Intl., Inc.
DMEM (1.0 g/l Low Glucose)	GIBCO-Invitrogen
DMEM (4.5 g/l High Glucose)	GIBCO-Invitrogen
100 mU/ml PenicillinG, 100 μg/ml Streptomycin	GIBCO-Invitrogen
L-Glutamine	GIBCO-Invitrogen
NEAA	GIBCO-Invitrogen
Sodium Pyruvate	GIBCO-Invitrogen
Opti-MEM	GIBCO-Invitrogen

各細胞の培養条件・継代条件

1-1-1. HEK293 細胞

ヒト胎児腎細胞株 HEK293 細胞は住友製薬より供与された。あらかじめ 56℃で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 μg/ml Streptomycin を添加した DMEM (1.0 g/l Low Glucose)を用いて 37℃、5%CO_2 の条件下で培養した。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

1-1-2. HEK293FT 細胞

ヒト胎児腎細胞株 HEK293FT 細胞はレンチウイルス発現システム(Invitrogen)に付属していたものを用いた。あらかじめ 56℃で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 μg/ml Streptomycin、0.1 mM NEAA、1 mM Sodium Pyruvate を添加した DMEM (4.5 g/l High Glucose)を用いて 37℃、5%CO_2 の条件下で培養した。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

1-1-3. Huh7 細胞

ヒト肝癌細胞株 Huh7 細胞は Scripps Research Institute の Dr. Francis V Chisari より供与された。あらかじめ 56℃で 30 分加熱し非動化した 10%(v/v) 牛胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 μg/ml Streptomycin、1%(v/v) L-Glutamine を添加した DMEM (4.5 g/l High Glucose)を用いて 37℃、5%CO_2 の条件下で培養した。細胞の回収にはトリプシン液を用いた。細胞の継代は 100% confluent になり次第行った。

1-2. プラスミド

1-2-1. プラスミド

使用したプラスミドは以下のとおりである。

empty/pEF-BOS （京都大学 長田重一教授より供与)[41]
pEF-BOS/RIG-I N 末 FLAG （京都大学 藤田尚志教授より供与)[42]
pEF-BOS/hRIG-I CARDs N 末 FLAG （京都大学 藤田尚志教授より供与)
pFF-BOS/hTBK1 C 末 Myc （名古屋市立大学 中西真教授より供与)[64]
pTRE2hyg/ x1.4 HBV （広島大学 茶山一彰教授より供与)[43]
pEF-BOS/hIPS-1 C 末 HA
pEF-BOS/hSTING C 末 FLAG
pEF-BOS/hIKKε C 末 FLAG
pEF-BOS/hMyD88
pEF-BOS/hTRIM25 C 末 HA
pEF-BOS/hRiplet C 末 HA
} 当研究室で作成

1-2-2. HBV タンパク質発現プラスミドのクローニング

pEF-BOS/HBVcore C 末 HA、pEF-BOS/HBVpolymerase C 末 HA、pEF-BOS/HBVs C 末 HA、pEF-BOS/HBVx C 末 HA のそれぞれのプラスミドは次に示す方法によりクローニングした。pTRE2hyg/ x1.4 HBV を鋳型にし、以下に示すそれぞれのプライマーを用い、ポリメラーゼには KOD+ (TOYOBO)を用いた。増幅した断片は Solution I (TAKARA)を用いて pCR®-Blunt (Invitrogen)とライゲーションをした。配列解析の後 SalI/KpnI で制限酵素処理をし、アガロースゲル電気泳動によりゲル抽出後ライゲーションに用いた。同様に XhoI/KpnI で処理した後ゲル抽出した pEF-BOS/hIPS-1 C 末 HA へ Solution I を用いてライゲーションした。

HBV コアタンパク質のクローニングに用いたプライマー

HBVcore F	GTCGACGCCACCATGCAACTTTTTCACCTCTG
HBVcore R	GGTACCGATATCGATGTTCGAAGCTTACATTGAGATTCCCGAG

HBV ポリメラーゼタンパク質のクローニングに用いたプライマー

HBVpolymerase F	GTCGACGCCACCATGCCCCTATCCTATCAACA
HBVpolymerase R	GGTACCGATATCGATGTTCGAAGTCTCGGTGGTTTCCATGCGA

HBV S タンパク質のクローニングに用いたプライマー

HBVs F	GTCGACGCCACCATGGGAGGTTGGTCTTCCAA
HBVs R	GGTACCGATATCGATGTTCGAAGTTTAATGTATACCCAAAGAC

HBV X タンパク質のクローニングに用いたプライマー

HBVx F	GTCGACGCCACCATGGCTGCTAGGGTGTGCTG
HBVx R	GGTACCGATATCGATGTTCGAAGTTTGGCAGAGGTGAAAAAGT

1-2-3. HBV ポリメラーゼタンパク質の欠損体のクローニング

pEF-BOS/ HBVpolymerase C 末 HA を鋳型とし、以下に示すそれぞれのプライマーとポリメラーゼタンパク質のクローニングに用いたプライマーを用い、ポリメラーゼには KOD+ (TOYOBO)を用いた。増幅した断片は Solution I (TAKARA)を用いて pCR®-Blunt (Invitrogen)とライゲーションをした。配列解析の後 SalI/KpnI で制限酵素処理をし、アガロースゲル電気泳動によりゲル抽出後ライゲーションに用いた。同様に XhoI/KpnI で処理した後ゲル抽出した pEF-BOS/hIPS-1 C 末 HA へ Solution I を用いてライゲーションした。

HBV ポリメラーゼ欠損体クローニング用プライマー

HBVpol-cut1-1R	GGTACCGATATCGATGTTCGAAGAGCAGCAGGATGAAGAGGAA
HBVpol-cut1-2F	GTCGACGCCACCATGCCTCATCTTCTTGTTGG
HBVpol-cut2-1R	GGTACCGATATCGATGTTCGAAGCAAGGCAGGATAGCCACATT
HBVpol-cut2-2F	GTCGACGCCACCATGCCTTTATATACATGTAT
HBVpol-cut2-3F	GTCGACGCCACCATGTGTTTGGCTTTCAGTTATAT
HBVpol-cut2-3R	GGTACCGATATCGATGTTCGAAGTTTTGCTCCAGACCGGCTGC

2. 方法

2-1. ルシフェラーゼレポータージーンアッセイ

細胞を 24 ウェルプレートに撒き、翌日に FuGENE HD (Roche)または Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いてトランスフェクションを行った。発現プラスミドの量は各実験条件に従い、総プラスミド量は empty/pEF-BOS により調整した。レポータージーンには IFN-βプロモータの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ p125-luc (東京大学 谷口維紹教授より供与)[65] を用い、内部コントロールには Rennila luciferase (promega)を用いた。また刺激を行う場合はトランスフェクションより 24 時間後に行い、刺激に用いた核酸の総量と刺激時間は各実験条件に従った。核酸を用いた刺激は Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションにより行った。細胞

は Passive Lysis Buffer (Promega)で可溶化し、Dual-luciferase assay kit (Promega)のプロトコルに従い解析を行った。

各実験は一条件 2 ウェルで行い、更に 3 回の実験を行った上でその代表例を示した。

2-2. 細胞からの RNA 抽出

細胞の総 RNA の回収には TRIzol Reagent (Invitrogen)を用いた。24 ウェルプレートに撒いた細胞を 500 μl の TRIzol に懸濁しピペッティングをした後、室温で 15 分間インキュベートした。その後 100 μl のクロロホルムを加えてボルテックスをし、室温で 2 分間インキュベートをした後、12,000 g、15 分間遠心をして水層とクロロホルム層を分離した。水層のみ回収し、同量のイソプロパノールを加えて転倒混合をし、室温で 20 分間インキュベートした。その後 15,000 g、20 分間遠心をし上清を破棄したのち 70% エタノールを 500 μl 加え、15,000 g、10 分遠心をした。上清を破棄したのち、風乾によりペレットを乾かした。

ペレットは適量の Nucrease-free Water (Ambion)に溶解し、Nano-View (GE Healthcare)を用いた吸光度測定により濃度測定した。

2-3. 免疫染色

細胞を Micro Cover glass sheets (Matshnami)を入れた 24 ウェルプレートに撒き、翌日にプラスミドをトランスフェクションした。ミトコンドリアの染色を行う場合、培養上清を 500 nM MitoTracker Red CM-H2XRos (Invitrogen)を含む培地に置換し、37℃、5% CO_2 で 45 分間インキュベートした。続いて上清を MitoTracker を含まない培地に置換し、更に 37℃、5% CO_2 で 45 分間インキュベートを行った。

細胞は PBS で 2 回洗浄した後、3% ホルムアルデヒド-PBS を用いて室温で 30 分間固定処理を行った。続いて 0.2% Triton-X100-PBS を用いて室温で 15 分間の透過処理を行った。固定した細胞を 1% BSA-PBS を用い室温で 30 分間ブロッキングし、1 次抗体を室温で 60 分間反応させた。1% BSA-PBS で 4 回洗浄した後、暗所にて 2 次抗体を室温、30 分間反応させた。1% BSA-PBS で 4 回洗浄した後 Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen)で封入した。

細胞の観察には共焦点レーザースキャン顕微鏡 (LSM510 Meta microscope、Zeiss)を用いて対物レンズ倍率 x63oil で観察し、同ソフトにて Colocalization coefficient の計算を行った。

実験に用いた抗体と希釈倍率を以下に示す。

FLAG mAb M2 (SIGMA)	1:1000
FLAG pAb (SIGMA)	1:1000
HA mAb (COVANCE)	1:1000
HA pAb (SIGMA)	1:1000
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody (Life Technology)	1:400
Alexa Fluor® 594Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody (Life Technology)	1:400
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody (Life Technology)	1:400
Alexa Fluor® 569 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody (Life Technology)	1:400

2-4. 免疫沈降

細胞を 6 ウェルプレートに撒き、その翌日にプラスミドをトランスフェクションした。24 時間後に細胞を回収し、PBS で 2 回洗浄した。細胞は 150 μl の Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、125 mM NaCl、1 mM EDTA、10% glycerol、1% NP-40、30 mM NaF、5 mM Na_3VO_4、20 mM Iodoacetamide、2 mM PMSF)に懸濁し、氷上で 30 分間インキュベートした。その後 15,000 rpm、4℃、20 分遠心をし、上清を回収した。上清に Protein G sepharose (GE Healthcare)を加えて 4℃で 60 分間プレクリアを行った。その後 5,000 rpm、4℃、1 分遠心をし上清を回収した。回収した上清に各実験に適した抗体を過剰量添加し、4℃で 120 分反応させた。その後 Protein G sepharose を加え、4℃で一晩の間抗体を吸着した。Protein G sepharose は Lysis Buffer で 4 回洗浄し、2x SDS Sample Buffer (0.2 M Tris-HCl (pH 6.8)、40%(v/v) glycerol、8%(w/v) SDS、BPB、12%(v/v) 2-ME)を加えてボルテックスをし、98℃、5 分間ボイルした。上清を回収した後 SDS-PAGE、ウェスタンブロットに用いた。

2-7. SDS-PAGE、ウェスタンブロット

10%アクリルアミドゲル電気泳動によりサンプルを分離した。泳動バッファーには 25 mM Tris、0.19 M glycine、0.1% SDS を含む溶液を用いた。続いてメタノールで親水処理を行い、Blotting Buffer (25 mM Tris-HCl、40 mM glycine、20% methanol (pH 9.4))で平衡化をした PVDF 膜 (MILLIPORE)へ転写した。転写は、Blotting Buffer へ浸したろ紙各 3 枚で PVDF 膜およびゲルを挟み、100 mA、90 分間の通電により行った。転写後、PVDF 膜を Blocking Buffer (5% Skimmilk、0.5 M NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.4))中で 60 分間振盪した。その後 Wash Buffer (0.1%(v/v) Tween20, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4))で 5 分間 3 回振盪し PVDF 膜を洗浄した。各実験に適した一次抗体を Wash Buffer に希釈し、室温で 60 分間反応した。更に Wash Buffer 中で 5 分間 3 回の洗浄をした後、一次抗体の検出に適した二次抗体を加えた Wash Buffer 中にて室温で 60 分反応した。PVDF 膜を Wash Buffer 中で 5 分 3 回の振盪の後、検出を行った。検出には ECL または ECL prime (GE Healthcare)を用いた。

結果

2-1. 細胞質内 RNA または DNA 応答において IFN-β産生抑制を行う HBV 由来タンパク質の探索

HBV ゲノムは、コア、ポリメラーゼ、S、X の 4 つのタンパク質をコードする。これらのタンパク質が核酸認識による自然免疫応答を抑制するか否かについて調べた。HEK293 細胞に IFN-βのレポータープラスミド (p125-luc)と、コア、ポリメラーゼ、S、X のそれぞれを発現するベクターをトランスフェクションした。続いて polyI:C または dsDNA をトランスフェクションして刺激した後の IFN-βプロモーター活性を調べたところ、HBV のどのタンパク質を発現させた場合にもレポーター活性は減少したが、ポリメラーゼが最も強く抑制した (Fig.2-1 A, B)。

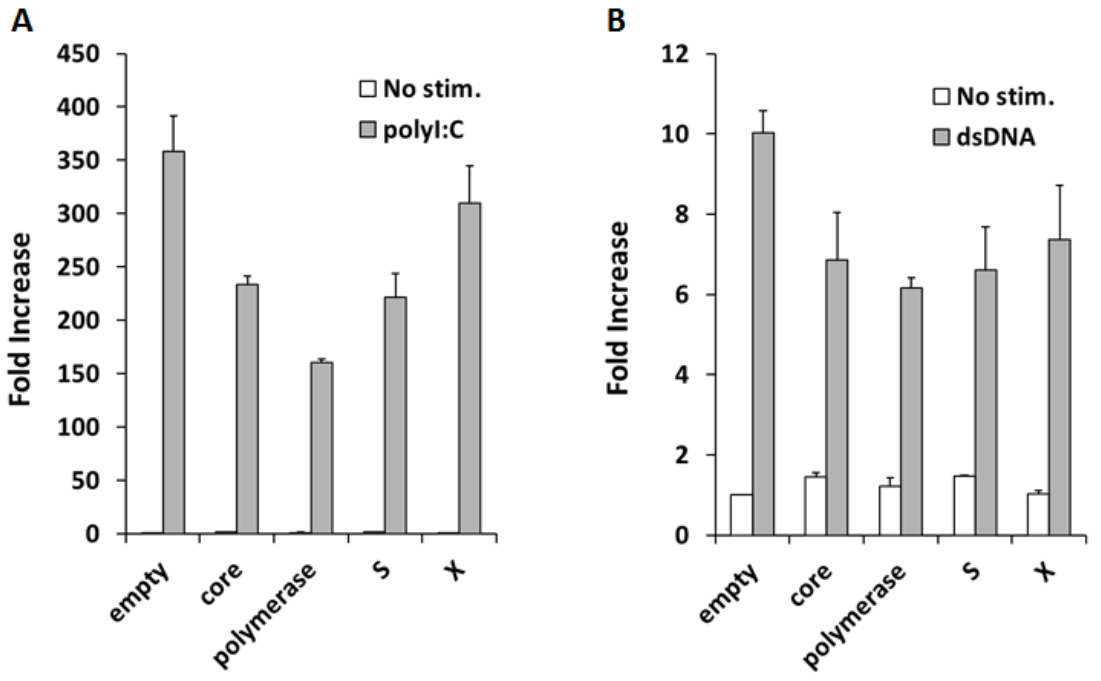


Figure.2-1　HEK293 細胞での HBV タンパク質発現による IFN-βプロモーター活性の抑制
(A 、B) 24 ウェルプレートに HEK293 細胞を撒き、翌日にレポータープラスミドの p125-luc とコントロールプラスミドと共に、0.4 μg の各 HBV 構成タンパク質発現ベクターもしくは空ベクターと 0.3 μg の polyI:C もしくは鮭精子由来 dsDNA をトランスフェクションし，24 時間後にルシフェラーゼの活性を測定した。値は空ベクターをトランスフェクションし未刺激のものに対する割合で示す。

2-2. 核酸認識経路での HBV 由来タンパク質により抑制される分子の探索

次に、細胞質内 polyI:C または dsDNA による刺激によるレポーター活性が、シグナル経路のどの分子を標的としているかを調べた。細胞に RIG-I CARD または IPS-1、STING、Myeloid differentiation factor 88 (MyD88)、TBK1、Iκ-B kinase ε (IKKε)を過剰発現するとシグナルが誘導される(Fig.2-2 A)。HEK293 細胞にそれらのタンパク質と各 HBV タンパク質を過剰発現させ、レポーター活性を観察した。MyD88、TBK1、IKKεを過剰発現させた場合は、ルシフェラーゼ活性は抑制されなかった (Fig.2-2 C)。一方で RIG-I CARD と IPS-1、STING の過剰発現によるレポーター活性は、ポリメラーゼにより最も抑制された (Fig.2-2 B)。特に RIG-I CARD の過剰発現によるレポーター活性が大きく抑制された (Fig.2-2 B)。

続いて、ヒト肝癌細胞由来細胞株である Huh7 細胞により同様の実験を行った。すると、HEK293 細胞と同様に、RIG-I CARD の過剰発現によるレポーター活性をポリメラーゼが最も抑制した(Fig.2-2 D)。一方で STING や TBK1 を発現させてもレポーター活性は増加しなかった (Fig.2-2 D, E)。

以上より、HEK293 細胞や Huh7 細胞において、ポリメラーゼは RIG-I CARD もしくは IPS-1 の過剰発現によるレポーター活性を抑制し、特に RIG-I CARD によるものを強く抑制した。

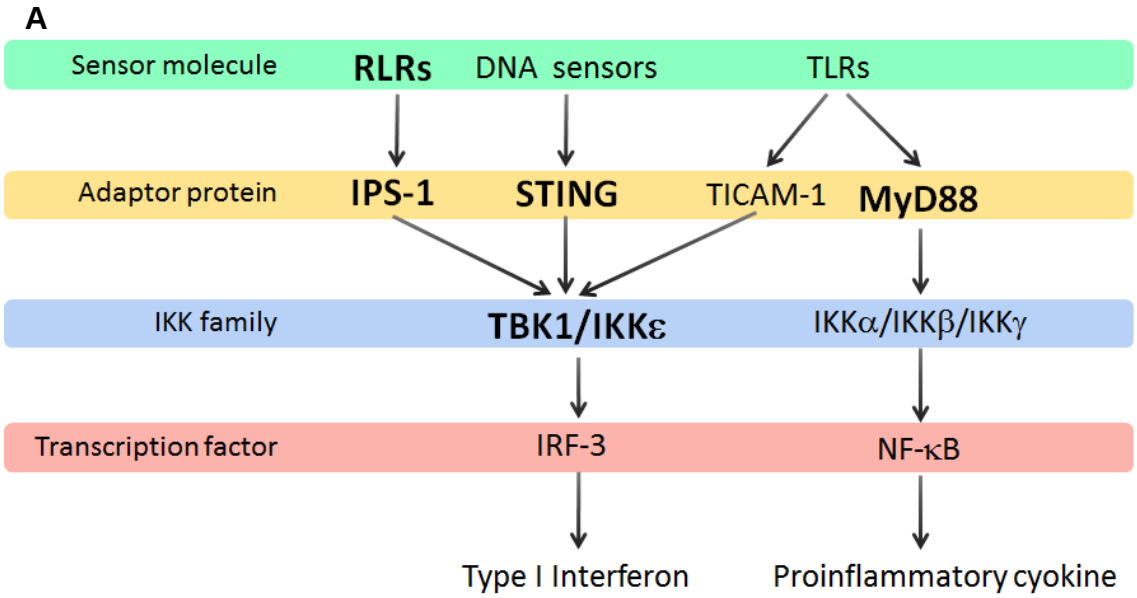
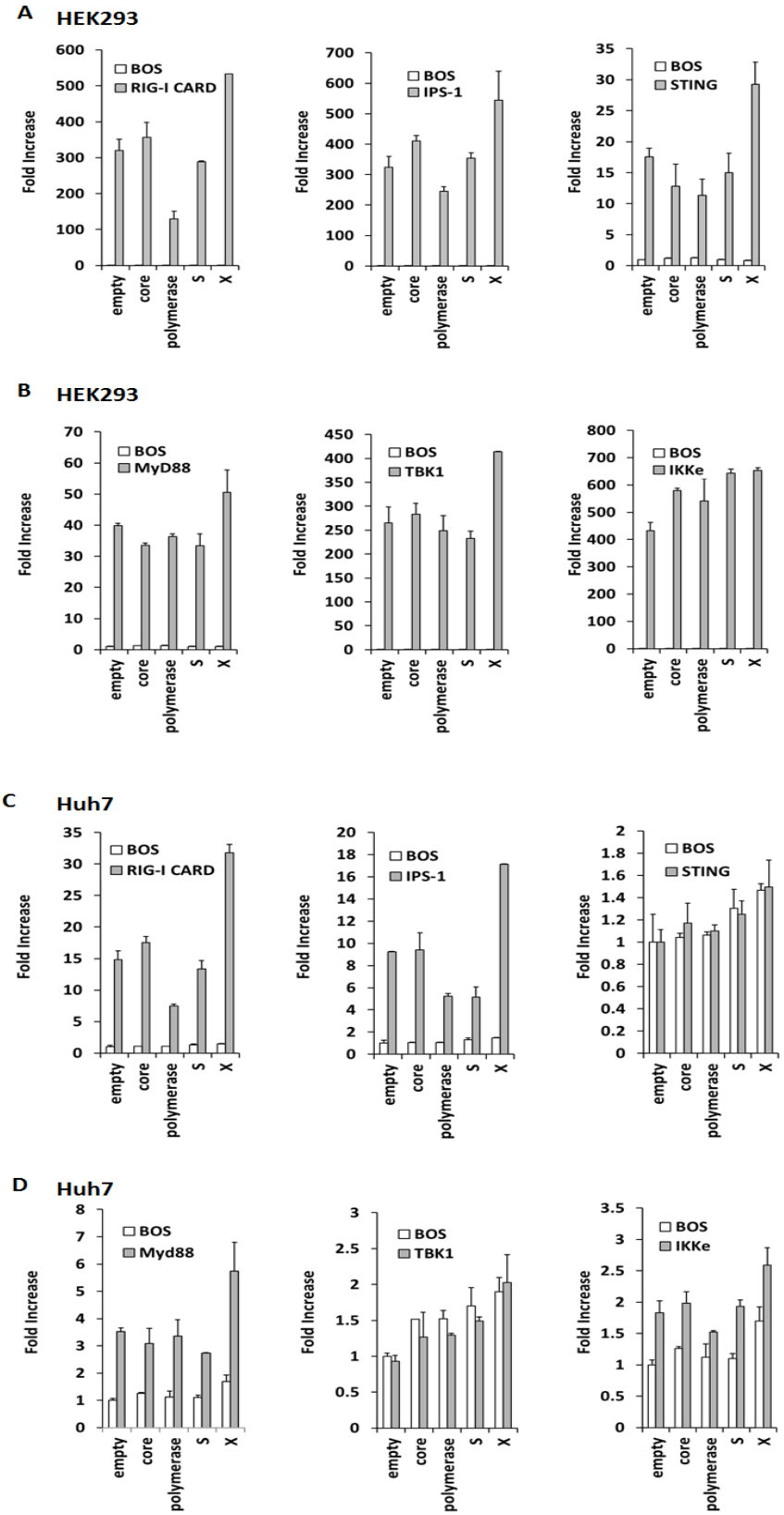


Fig.2-2 **過剰発現系での HBV タンパク質発現による IFN-βプロモーター活性の抑制**
(A) 本実験で過剰発現したタンパク質と、自然免疫経路の関係概略図。



(B-E) HEK293 細胞または Huh7 細胞を 24 ウェルプレートに撒き，翌日にレポータープラスミドの p125-luc とコントロールプラスミドと共に、0.4 μg の各 HBV 構成タンパク質発現ベクターもしくは空ベクターと 0.3 μg の RIG-I CARD または IPS-1、STING、MyD88、TBK1、IKKε発現ベクターをトランスフェクションした。24 時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼの活性を測定した。値は空ベクターをトランスフェクションし未刺激のものに対する割合で示す。

2-3. RIG-I CARD とポリメラーゼタンパク質の結合評価

RIG-I CARD の過剰発現によるシグナルは、HBV のポリメラーゼに抑制された。次に、抑制の過程で RIG-I CARD とポリメラーゼが相互作用をしていると考え、IP により相互作用を調べた。FLAG タグの付いた RIG-I CARD で免疫沈降を行い、ポリメラーゼに付いた HA タグをウェスタンブロットで検出したところ、RIG-I CARD とポリメラーゼを共発現した試料でバンドが検出された (Fig.2-3)。

以上より、ポリメラーゼは RIG-I CARD に直接結合する事で I 型 IFN の産生抑制を行っている可能性が示唆された。

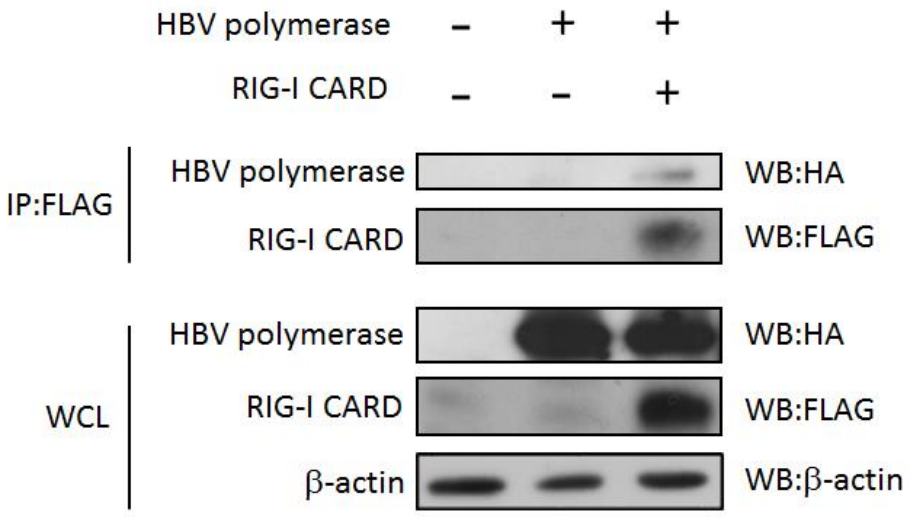


Fig.2-3 RIG-I CARD と HBV ポリメラーゼの相互作用
6 ウェルプレートに HEK293FT 細胞を撒き、翌日に 0.6 μg の RIG-I CARD、1.2 μg の HBV ポリメラーゼ発現ベクターをトランスフェクションし、プラスミドの総量は空ベクターで合わせた。24 時間後に細胞のライセートを回収し、抗 FLAG 抗体を用いて一晩の間タンパク質と抗体を結合した。サンプルは翌日に SDS-PAGE により解析した。

2-4. RIG-I のユビキチン化とポリメラーゼによる抑制の相関の探索

HBV ポリメラーゼは RIG-I CARD によるシグナルを抑制し、更に RIG-I CARD に直接相互作用している可能性が示唆された。そこで RIG-I のユビキチン化の抑制に焦点を当て、実験を行った。

RIG-I は dsRNA を結合すると、N 末端側を TRIM25 に、C 末端側を Riplet により K63 鎖ユビキチン化され（Fig.2-4 A)、この修飾は RIG-I のシグナル応答に重要である[8,9]。そこで、ポリメラーゼと共に RIG-I CARD と TRIM25 または全長の RIG-I と Riplet を過剰発現し、IFN-βのプロモーター活性を調べた。

HEK293 細胞では、Riplet と全長の RIG-I によるレポーター活性は、ポリメラーゼにより抑制された（Fig.2-4 B)。一方で TRIM25 と RIG-I CARD によるレポーター活性は抑制されなかった（Fig.2-4 B)。同様の実験を Huh7 細胞でも行ったところ、HEK293 細胞とは異なり、両方のレポーター活性が抑制された（Fig.2-4 C)。

以上より HBV ポリメラーゼは、HEK293 細胞では Riplet による作用を、Huh7 細胞では TRIM25 と Riplet による両方の作用を抑制している。

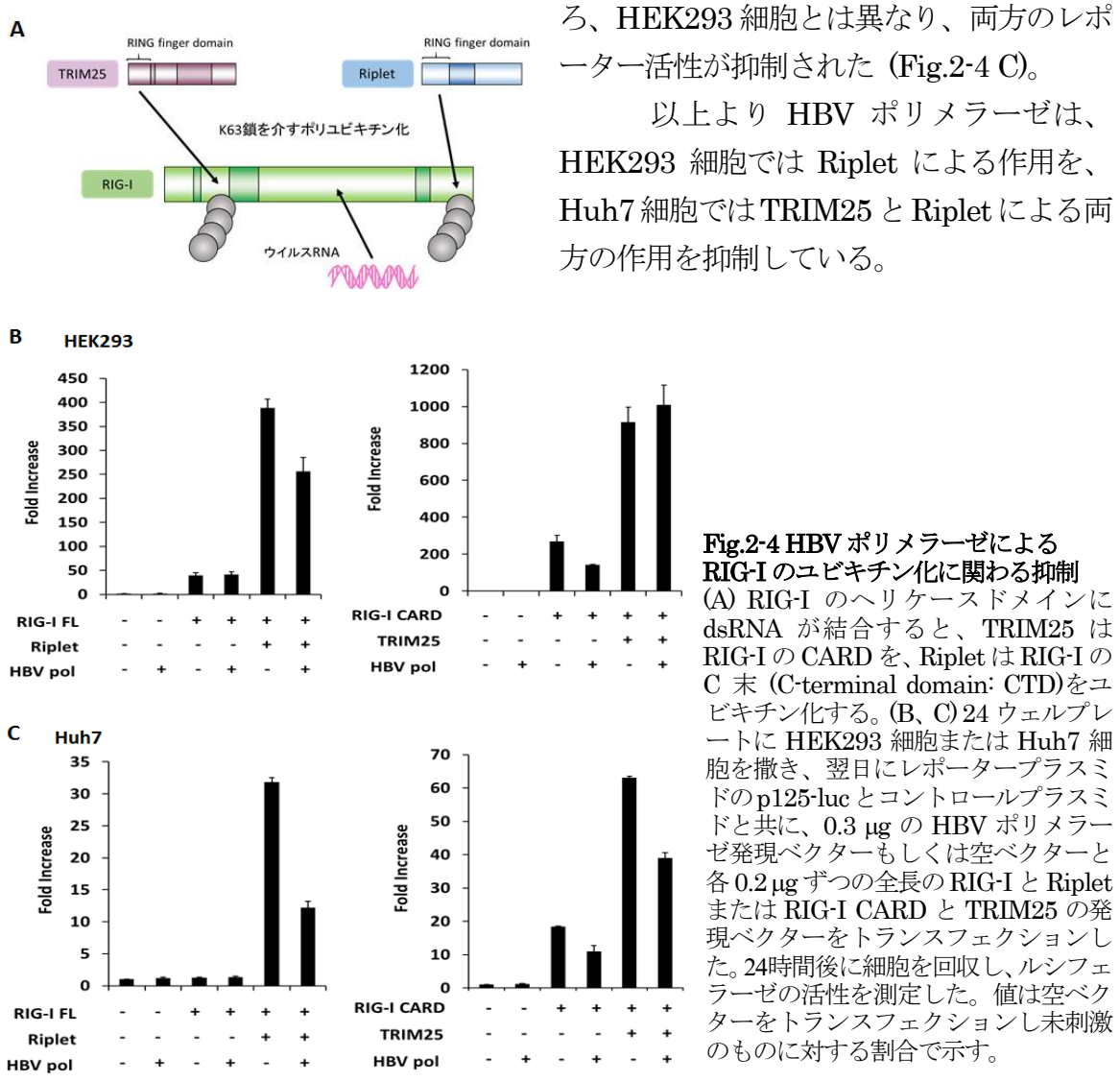


Fig.2-4 HBV ポリメラーゼによる RIG-I のユビキチン化に関わる抑制
(A) RIG-I のヘリケースドメインに dsRNA が結合すると、TRIM25 は RIG-I の CARD を、Riplet は RIG-I の C 末 (C-terminal domain: CTD)をユビキチン化する。(B、C) 24 ウェルプレートに HEK293 細胞または Huh7 細胞を撒き、翌日にレポータープラスミドの p125-luc とコントロールプラスミドと共に、0.3 μg の HBV ポリメラーゼ発現ベクターもしくは空ベクターと各 0.2 μg ずつの全長の RIG-I と Riplet または RIG-I CARD と TRIM25 の発現ベクターをトランスフェクションした。24時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼの活性を測定した。値は空ベクターをトランスフェクションし未刺激のものに対する割合で示す。

2-5. ポリメラーゼタンパク質の抑制作用部位の特定

HBV ポリメラーゼが Riplet もしくは TRIM25 による RIG-I のユビキチン化を抑制する事で I 型 IFN 産生誘導を抑制している可能性が示唆された。

次に、全長 844 アミノ酸のポリメラーゼにおける I 型 IFN 抑制活性の中心を決定するため、ポリメラーゼを分割し、抑制作用を持つ領域を調べた。この実験は HBV が感染する肝細胞由来の Huh7 細胞で行った。

まずはポリメラーゼを中央で二分し、N 末端側と C 末端側のそれぞれのポリメラーゼと全長のポリメラーゼタンパク質を用いた (Fig.2-5 A)。評価の際は Riplet と全長の RIG-I または TRIM25 と RIG-I CARD をそれぞれ発現させた。すると、TRIM25 を発現した細胞で、ポリメラーゼの C 末端側が全長のポリメラーゼ以上にレポーター活性を抑制した (Fig.2-5 B)。

次に C 末端側を 3 つの領域 (F1、F2、F3)に分割した (Fig.2-5 A)。実験は、全長以上の抑制が観察された TRIM25 の系にのみ施行した。すると、F3 の断片を発現した系でレポーター活性が一番抑制された (Fig.2-5 C)。更に、全長から F3 の部位を除いた欠損体のポリメラーゼの発現ベクターを作成した (Fig.2-5 A)。これを用いて実験を行うと、欠損体の発現いよりレポーター活性は回復した (Fig.2-5 D)。

以上より、ポリメラーゼの C 末端側が TRIM25 による作用を抑制する事で、IFN-β産生を抑制している事が示唆された。

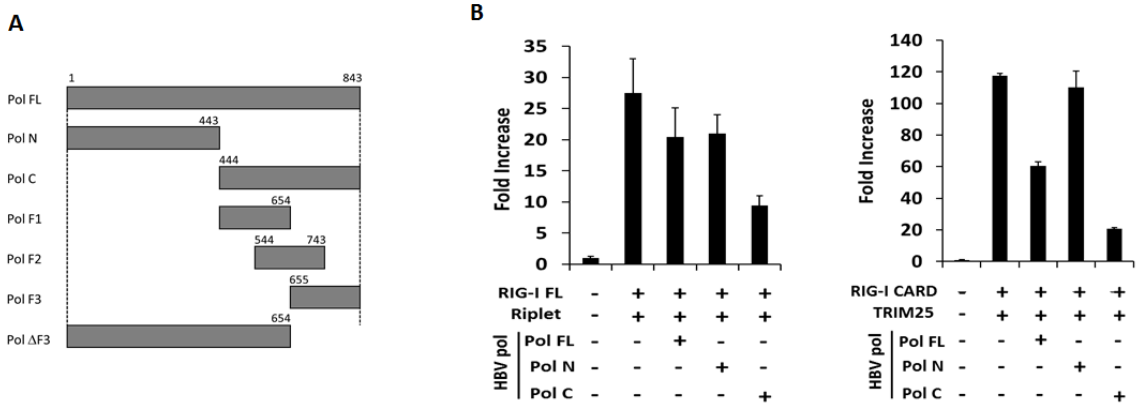
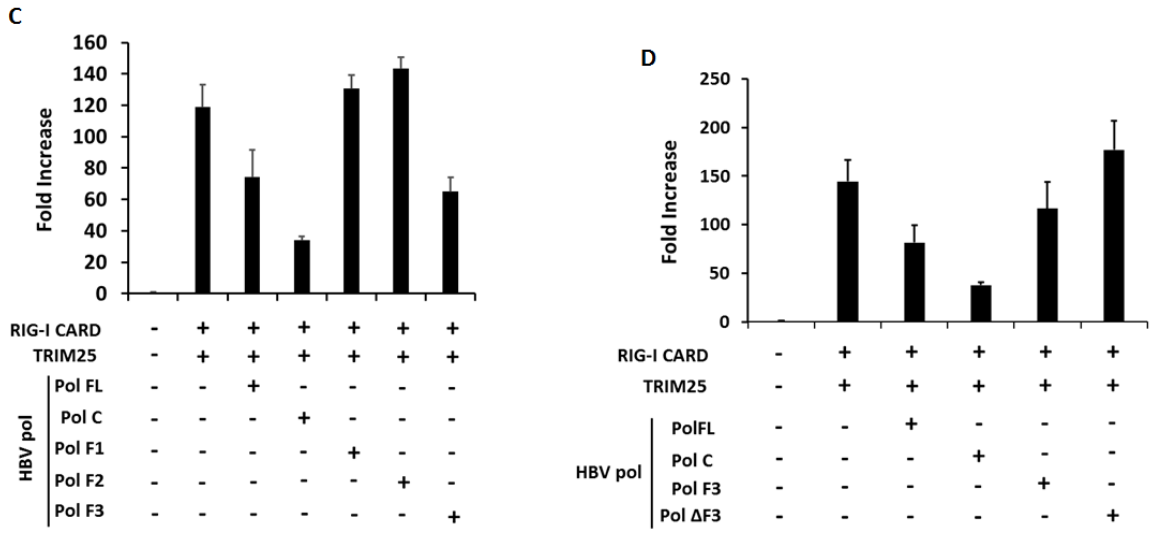


Fig.2-5 HBV ポリメラーゼ欠損体による IFN-βプロモーター活性の抑制
(A) (B-D)で用いた欠損体の概要図。(B) 24 ウェルプレートに Huh7 細胞を撒き、翌日にレポータープラスミドの p125-luc とコントロールプラスミドと共に、0.3 μg の Pol FL、Pol N、Pol C 発現ベクターもしくは空ベクターと各 0.2 μg ずつの全長の RIG-I と Riplet または RIG-I CARD と TRIM25 の発現ベクターをトランスフェクションした。24時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼの活性を測定した。値は空ベクターをトランスフェクションし未刺激のものに対する割合で示す。



(C、D) 24 ウェルプレートに HEK293 細胞または Huh7 細胞を撒き、翌日にレポータープラスミドの p125-luc とコントロールプラスミドと共に、0.3 μg の Pol FL、Pol C、Pol F1、Pol F2、Pol F3、Pol ΔF3 の発現ベクターもしくは空ベクターと各 0.2 μg ずつの RIG-I CARD と TRIM25 の発現ベクターをトランスフェクションした。24時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼの活性を測定した。値は空ベクターをトランスフェクションし未刺激のものに対する割合で示す。

2-6. ポリメラーゼの細胞内局在

これまでの実験よりポリメラーゼは、RIG-I CARD と TRIM25 の発現による IFN-βプロモーター活性を抑制し、更に RIG-I CARD と相互作用した。次に、細胞内において RIG-I CARD とポリメラーゼの局在を観察した。Huh7 細胞に FLAG タグの付いた RIG-I CARD と HA タグの付いた全長のポリメラーゼを過剰発現し、共焦点顕微鏡によりそれぞれの局在を観察した。すると、RIG-I CARD とポリメラーゼはほとんど共局在しなかった (Fig.2-6)。更にそれぞれのタンパク質は共発現よる局在位置の変化は観察されなかった (Fig.2-6)。

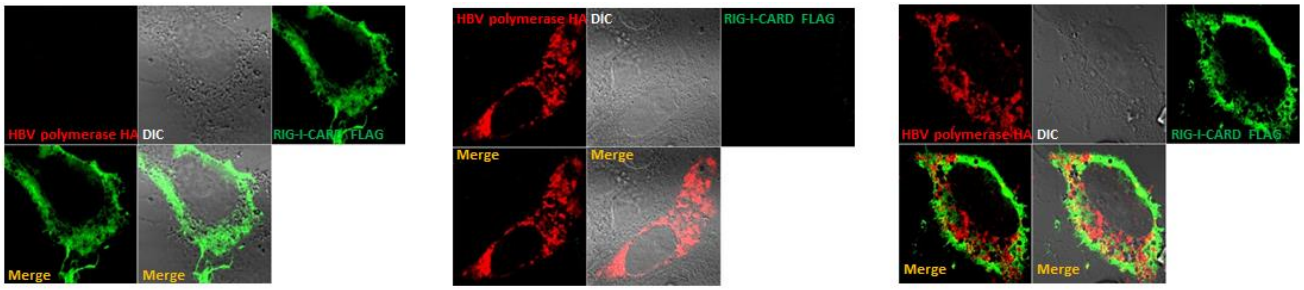


Fig.2-6 Huh7 細胞における HBV ポリメラーゼと RIG-I CARD の細胞内局在
24 ウェルプレートに Huh7 細胞を撒き、翌日に 0.3 μg/ml の HBV ポリメラーゼ、RIG-I CARD の発現プラスミドをトランスフェクションした。24 時間後に細胞を固定し、抗 HA 抗体と抗 FLAG 抗体により染色を行った。図は全て RIG-I CARD (緑)と HBV のポリメラーゼ (赤)の共局在を観察している。

考察

HBV は生体内において、ヒトの肝細胞に数十年持続感染する。その為、長期間にわたり、ヒトの自然免疫を抑制する能力を有している。これまで、HBV による自然免疫抑制機構については複数の報告が存在する[58-63]。本研究では、HBV のポリメラーゼが RIG-I に直接作用することを発見し、RIG-I のポリユビキチン修飾を阻害している可能性が示唆された。これは、これまで報告されていない新しいメカニズムである。

RIG-I は、N 末端に CARD 領域を有し、非活性化状態では RIG-I の C 末端領域がこの CARD 領域を抑制している[66]。RIG-I の C 末端が RNA に結合するとこの抑制が解除され、RIG-I の CARD 領域が活性化状態となり、アダプター分子の IPS-1 と結合する[66]。この時、RIG-I の活性化には二つのユビキチンリガーゼが必要であることが報告されている[8,9]。当研究室では、RIG-I が ウイルス RNA と結合すると、Riplet ユビキチンリガーゼが RIG-I の C 末端をリジン 63 結合型のポリユビキチン修飾を行うことを報告した[9]。さらに、この C 末端のリジン 63 結合型のポリユビキチン修飾が、RIG-I の N 末端の CARD 領域の TRIM25 ユビキチンリガーゼによるリジン 63 結合型ポリユビキチン修飾を促すことを報告した[34]。この TRIM25 によるポリユビキチン鎖は RIG-I の CARD 領域と IPS-1 との結合に必要であることが報告されている[8]。

本研究では、HBV のポリメラーゼが Riplet による RIG-I の活性化を抑制するだけでなく、TRIM25 による RIG-I CARD の活性化を抑制することを発見した。一方で、IPS-1 過剰発現によるシグナルの活性化は HBV のポリメラーゼではほとんど抑制されなかったことから、HBV のポリメラーゼは主に TRIM25 による RIG-I CARD のポリユビキチン修飾を阻害していると考えられる。このモデルは、RIG-I CARD と HBV のポリメラーゼ分子が免疫沈降の実験により共沈したことからも支持される。

RIG-I CARD の TRIM25 によるポリユビキチン修飾は、Gack, M.U.らにより報告されているが[8]、今回実験した結果からはそのポリユビキチン修飾は観察できなかった。これが技術的な理由によるものか別の理由によるものかは不明であるが、今後、さらに検証が必要である。また、免疫沈降では HBV のポリメラーゼと RIG-I CARD の結合が示唆されたものの、共焦点顕微鏡を用いた解析からは、RIG-I CARD と HBV ポリメラーゼとの共局在はほとんど観察されなかった。これらの結果は本研究のモデルを支持しないが、今後、さらなる検証が必要であると考えられる。

二章においては、HBV のポリメラーゼが RIG-I 分子に直接作用し、その活性化を阻害するという新たな知見を得ることができたが、その分子機構についてはまだ

十分に解明されていない。また、HBV による自然免疫抑制については、これまでにも複数の報告があることから、どの抑制メカニズムが生体内において重要であるのかについても今後検証を行う必要があると考えられる。

総括および結論

本研究において、以下の知見が得られた。

1. 細胞質内 DNA 刺激によりリン酸化された TBK1 は、ヒト由来の細胞株ではミトコンドリアに局在し、マウスやツパイ由来の細胞株ではミトコンドリア以外に局在し、その多くは STING に局在する。

2. 細胞質内 DNA 刺激の経路において、ヒト由来の細胞株では IPS-1 と STING の両方が重要であり、マウス由来の細胞株では STING のみが必要である。

3. HBV 感染による自然免疫応答の抑制は、HBV のポリメラーゼが RIG-I に直接作用し、TRIM25 による RIG-I のポリユビキチン修飾を阻害している可能性が示唆された。

以上の所見から、細胞質内 DNA 刺激時の p-TBK1 の局在の違いにより、ヒトとヒト以外の哺乳類におけるウイルス DNA に対する I 型 IFN 産生機構の違いが示唆され、特にヒトでは RIG-I-IPS-1 経路が重要である事が示唆された。一方で HBV はポリメラーゼタンパク質により RIG-I のポリユビキチン化を阻害する事で I 型 IFN 産生を抑制している可能性が示唆された。

ヒト以外の細胞を DNA で刺激した場合も、ヒト以外の細胞にヒトの IPS-1 または STING を過剰発現させた場合も、どちらにおいても p-TBK1 はミトコンドリアには局在せず、STING に局在した。つまり、細胞種特異的な p-TBK1 の局在の違いは、ヒトとヒト以外の哺乳類の間にある、IPS-1 または STING のアミノ酸配列の違いによるものではないと考えられる。この事から、細胞特異的な p-TBK1 の局在の違いは、ヒトとマウスの間の TBK1 のアミノ酸配列の違いや、それに伴うヒト細胞における未発見の分子機構の存在により起きているものと考えられる。

また、本研究で用いた HBV ポリメラーゼ発現ベクターは、その中に S タンパク質の全長と、X タンパク質の N 末端の遺伝子配列を含む。本実験において、ポリメラーゼタンパク質の C 末端が RIG-I 依存の I 型 IFN 産生抑制に重要であることが示唆されたが、ポリメラーゼの C 末端の遺伝子配列には、X タンパク質の N 末端が重

複してコードされている。この事から、抑制に関わっているタンパク質が X タンパク質の N 末端である可能性も考えられる。その可能性を検討するため、今後、ポリメラーゼの C 末端欠損体と X タンパク質の N 末端が同時に発現するベクターを用いて、更なる検証を行っていきたい。また、ポリメラーゼ C 末端欠損体を発現する変異ウイルスを用い、I 型 IFN の産生が誘導されるかどうかを検討していきたい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始適切な御指導、御討論を賜りました北海道大学医学部医学研究科 微生物学講座 免疫学分野 瀬谷司教授ならびに松本美佐子准教授に心から感謝いたします。

本研究は北海道大学大学院医学研究科 微生物学講座 免疫学分野 押海裕之講師の御指導なしには成し得ませんでした。終始適切な御指導、御討論、そして本論文作成にあたって惜しみないご助力をいただきました押海裕之講師には感謝の念に堪えません。

本論文を審査して下さいました、北海道大学大学院医学研究科小児科学分野 有賀正教授、北海道大学大学院医学研究科血液内科学分野 豊嶋崇徳教授、北海道大学大学院医学研究科北海道大学保健センター 橋野聡教授、北海道大学大学院医学研究科内科学講座第二内科 渥美達也教授、北海道大学大学院医学研究科生化学講座医化学分野 畠山鎮次教授に深く感謝いたします。

筆者の北海道大学大学院医学研究科での研究を可能にして下さいました北海道大学大学院医学研究科の諸先生方、事務職員の方々に深く感謝いたします。

研究生活及びのあらゆる面でお力添えいただいた、北海道大学医学部医学研究科 微生物学講座免疫学分野の皆様に深く感謝いたします。

最後に、長い学生生活を見守り、支え続けてくれた両親に深く感謝します。

引用文献

1 Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).

2 Kawai, T. & Akira, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol* **21**, 317-337 (2009).

3 Montoya, M. *et al.* Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* **99**, 3263-3271 (2002).

4 Ni, K. & O'Neill, H. C. The role of dendritic cells in T cell activation. *Immunol. Cell Biol.* **75**, 223-230 (1997).

5 Loo, Y. M. & Gale, M., Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* **34**, 680-692 (2011).

6 Kato, H. *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101-105 (2006).

7 Kawai, T. *et al.* IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* **6**, 981-988 (2005).

8 Gack, M. U. *et al.* TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* **446**, 916-920 (2007).

9 Oshiumi, H., Matsumoto, M., Hatakeyama, S. & Seya, T. Riplet/RNF135, a RING Finger Protein, Ubiquitinates RIG-I to Promote Interferon-β Induction during the Early Phase of Viral Infection. *JBC* **284**, 807-817 (2009).

10 Onomoto, K. *et al.* Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity. *PLoS One* **7**, e43031 (2012).

11 Xu, L. G. *et al.* VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol. Cell* **19**, 727-740 (2005).

12 Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K. & Chen, Z. J. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**, 669-682 (2005).

13 Dixit, E. *et al.* Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell* **141**, 668-681 (2010).

14 Horner, S. M., Liu, H. M., Park, H. S., Briley, J. & Gale, M., Jr. Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form

innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **108**, 14590-14595 (2011).

15 Hou, F. *et al.* MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* **146**, 448-461 (2011).

16 Yasukawa, K. *et al.* Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Sci. Signal* **2**, ra47 (2009).

17 Onoguchi, K. *et al.* Virus-infection or 5'ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1. *PLoS Pathog.* **6**, e1001012 (2010).

18 Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738 (2001).

19 Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. & Seya, T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat. Immunol.* **4**, 161-167 (2003).

20 Matsumoto, M. *et al.* Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* **171**, 3154-3162 (2003).

21 Rothenburg, S., Schwartz, T., Koch-Nolte, F. & Haag, F. Complex regulation of the human gene for the Z-DNA binding protein DLM-1. *Nucleic Acids Res.* **30**, 993-1000 (2002).

22 Unterholzner, L. *et al.* IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat. Immunol.* **11**, 997-1004 (2010).

23 Zhang, Z. *et al.* The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat. Immunol.* **12**, 959-965 (2011).

24 Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. & Chen, Z. J. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* **339**, 786-791 (2013).

25 Kondo, T. *et al.* DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **110**, 2969-2974 (2013).

26 Ferguson, B. J., Mansur, D. S., Peters, N. E., Ren, H. & Smith, G. L. DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. *Elife* **1**, e00047 (2012).

27 Ishikawa, H. & Barber, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674-678 (2008).

28 Ishikawa, H., Ma, Z. & Barber, G. N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* **461**, 788-792 (2009).

29 Li, X. D. *et al.* Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science* **341**, 1390-1394 (2013).

30 Wu, J. *et al.* Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* **339**, 826-830 (2013).

31 Chiu, Y. H., Macmillan, J. B. & Chen, Z. J. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* **138**, 576-591 (2009).

32 Negishi, H. *et al.* Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nat. Immunol.* **13**, 659-666 (2012).

33 Ishii, K. J. *et al.* TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* **451**, 725-729 (2008).

34 Oshiumi, H., Miyashita, M., Matsumoto, M. & Seya, T. A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. *PLoS Pathog.* **9**, e1003533 (2013).

35 Angus, A. G. *et al.* Requirement of cellular DDX3 for hepatitis C virus replication is unrelated to its interaction with the viral core protein. *J. Gen. Virol.* **91**, 122-132 (2010).

36 Ishii, K. J. *et al.* A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat. Immunol.* **7**, 40-48 (2006).

37 Stetson, D. B. & Medzhitov, R. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* **24**, 93-103 (2006).

38 Tanaka, Y. & Chen, Z. J. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci. Signal* **5**, ra20 (2012).

39 Cheng, G., Zhong, J., Chung, J. & Chisari, F. V. Double-stranded DNA and double-stranded RNA induce a common antiviral signaling pathway in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **104**, 9035-9040 (2007).

40 Aly, H. H. *et al.* Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). *PLoS One* **6**, e21284 (2011).

41 Mizushima, S. & Nagata, S. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.* **18**, 5322 (1990).

42 Yoneyama, M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* **5**, 730-737 (2004).

43 Tsuge, M. *et al.* Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology* **42**, 1046-1054 (2005).

44 Area-Gomez, E. *et al.* Presenilins are enriched in endoplasmic reticulum membranes associated with mitochondria. *Am. J. Pathol.* **175**, 1810-1816 (2009).

45 Hill, D. A., Walsh, J. H. & Purcell, R. H. Failure to demonstrate circulating interferon during incubation period and acute stage of transfusion-associated hepatitis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **136**, 853-856 (1971).

46 Kinoshita, R., Miura, K., Suzuki, S. & Uchino, H. Lack of correlation between interferon production of mononuclear cells and virus replication in chronic hepatitis B virus infection. *J. Clin. Microbiol.* **10**, 923-925 (1979).

47 Taylor, P. E. & Zuckerman, A. J. Non-production of interfering substances by serum from patients with infectious hepatitis. *J. Med. Microbiol.* **1**, 217-219 (1968).

48 Tolentino, P., Dianzani, F., Zucca, M. & Giacchino, R. Decreased interferon response by lymphocytes from children with chronic hepatitis. *J. Infect. Dis.* **132**, 459-461 (1975).

49 Kumar, H. *et al.* Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J. Exp. Med.* **203**, 1795-1803 (2006).

50 Hassan, M. M. *et al.* Association between hepatitis B virus and pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 4557-4562 (2008).

51 Bouchard, M. J. & Navas-Martin, S. Hepatitis B and C virus hepatocarcinogenesis: lessons learned and future challenges. *Cancer Lett.* **305**, 123-143 (2011).

52 Kay, A. & Zoulim, F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res.* **127**, 164-176 (2007).

53 Yan, H. *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* **1**, e00049 (2012).

54 Qiao, M., Scougall, C. A., Duszynski, A. & Burrell, C. J. Kinetics of early molecular events in duck hepatitis B virus replication in primary duck hepatocytes. *J. Gen. Virol.* **80 (Pt 8)**, 2127-2135 (1999).

55 Kock, J. & Schlicht, H. J. Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J. Virol.* **67**, 4867-4874 (1993).

56 Enders, G. H., Ganem, D. & Varmus, H. E. 5'-terminal sequences influence the segregation of ground squirrel hepatitis virus RNAs into polyribosomes and viral core particles. *J. Virol.* **61**, 35-41 (1987).

57 Wieland, S. F., Guidotti, L. G. & Chisari, F. V. Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J. Virol.* **74**, 4165-4173 (2000).

58 Whitten, T. M., Quets, A. T. & Schloemer, R. H. Identification of the hepatitis B virus factor that inhibits expression of the beta interferon gene. *J. Virol.* **65**, 4699-4704 (1991).

59 Fernandez, M., Quiroga, J. A. & Carreno, V. Hepatitis B virus downregulates the human interferon-inducible MxA promoter through direct interaction of precore/core proteins. *J. Gen. Virol.* **84**, 2073-2082 (2003).

60 Wu, M. *et al.* Hepatitis B virus polymerase inhibits the interferon-inducible MyD88 promoter by blocking nuclear translocation of Stat1. *J. Gen. Virol.* **88**, 3260-3269 (2007).

61 Yu, S. *et al.* Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKKepsilon and DDX3. *J. Gen. Virol.* **91**, 2080-2090 (2010).

62 Christen, V. *et al.* Inhibition of alpha interferon signaling by hepatitis B virus. *J. Virol.* **81**, 159-165 (2007).

63 Jiang, J. & Tang, H. Mechanism of inhibiting type I interferon induction by hepatitis B virus X protein. *Protein Cell* **1**, 1106-1117 (2010).

64 Tojima, Y. *et al.* NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature* **404**, 778-782 (2000).

65 Fujita, T. *et al.* Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN-beta gene regulatory elements. *Embo J.* **7**, 3397-3405 (1988).

66 Cui, S. *et al.* The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Mol. Cell* **29**, 169-179 (2008).