



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ウイルス感染・腫瘍に対する自然免疫応答の制御機構 [全文の要約]
Author(s)	高島, 謙
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2300 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12559号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66064
Type	doctoral thesis
File Information	Ken_Takashima_summary.pdf



学位論文（要約）

ウイルス感染・腫瘍に対する自然免疫応答の制御機構

(Regulatory mechanisms of the innate immune response to virus
infection and tumor)

2017 年 3 月

北海道大学

高島 謙

Ken TAKASHIMA

学位論文（要約）

ウイルス感染・腫瘍に対する自然免疫応答の制御機構
(Regulatory mechanisms of the innate immune response to virus
infection and tumor)

2017 年 3 月

北海道大学

高島 謙

Ken TAKASHIMA

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
略語表	3
序章	6
第一章 MDA5 の新規制御因子の同定とその制御機構の解明	
緒言	12
第一節 MDA5 の新規結合因子の同定及び単離	
材料と方法	14
実験結果	17
1-1-1. MDA5 C 末端領域に結合する因子の同定及び単離	
考察	18
第二節 リン酸化酵素 RIOK3 による MDA5 の活性制御機構	
材料と方法	19
実験結果	34
1-2-1. MDA5 は定常状態においてリン酸化を受けている	
1-2-2. MDA5 と RIOK3 との哺乳類細胞内での相互作用	
1-2-3. 各種細胞における RIOK3 の発現	
1-2-4. RIOK3 の細胞内局在	
1-2-5. RIOK3 の MDA5 のリン酸化への関与	
1-2-6. MDA5 を介したシグナル伝達経路に対する RIOK3 の作用	
1-2-7. RIOK3 ノックダウン及びノックアウト細胞における dsRNA 刺激への応答	
1-2-8. MDA5 C 末端領域におけるリン酸化部位 Ser-828 の同定	
1-2-9. RIOK3 の MDA5 Ser-828 リン酸化への関与	
1-2-10. リン酸化による MDA5 多量体形成への影響	
1-2-11. RIOK3 による MDA5 多量体形成への影響	
考察	60

第三節 DNAJB1-HSP70 複合体による MDA5 の活性制御機構

材料と方法	62
実験結果	67
1-3-1. MDA5 と DNAJB1 との哺乳類細胞内での相互作用	
1-3-2. dsRNA 刺激による DNAJB1 の発現・細胞内局在の変化	
1-3-3. IFN- β 産生シグナル伝達経路に対する DNAJB1 の作用	
1-3-4. DNAJB1 ノックダウン及びノックアウト細胞における dsRNA 刺激への応答	
1-3-5. DNAJB1 による MDA5 シグナル活性抑制のメカニズム	
1-3-6. dsRNA 刺激による HSP70 の発現と局在の変化	
1-3-7. HSP70 による MDA5 由来のシグナル伝達経路の制御	
考察	81

第二章 腫瘍微小環境における STING 経路の役割

緒言	83
材料と方法	85
実験結果	92
2-1. STING 欠損マウスの樹立	
2-2. STING KO マウスではNK 細胞依存的な B16D8 の増殖制御機構が破綻する	
2-3. STING KO マウスでは腫瘍浸潤 NK 細胞の割合が低下する	
2-4. STING KO マウスでは B16D8 腫瘍内において 1 型免疫応答が減弱する	
2-5. STING KO マウスにおける B16D8 腫瘍内においての NK 細胞誘導因子の発現	
2-6. STING 欠損 B16D8 細胞の樹立	
2-7. 腫瘍細胞自体の STING 経路も抗腫瘍免疫応答に対し正に働く	
2-8. 腫瘍細胞の STING 経路も NK 細胞の腫瘍内への誘引に寄与し、I 型免疫応答を誘導する	
2-9. STING KO-B16D8 腫瘍内においての NK 細胞誘導因子の発現	
考察	106

総括および結論	109
謝辞	113
引用文献	114

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Takashima K, Oshiumi H, Takaki H, Matsumoto M & Seya T.
RIOK3-mediated phosphorylation of MDA5 interferes with its assembly and attenuates the innate immune response.
Cell Reports, 11(2):192-200. (2015)
2. Takashima K, Takeda Y, Oshiumi H, Shime H, Masaru Okabe, Masahito Ikawa, Matsumoto M & Seya T.
STING in tumor and host cells cooperatively work for NK cell-mediated tumor growth retardation.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 478(4):1764-1771. (2016)

本研究の一部は以下の論文として投稿中である。

Takashima K, Oshiumi H, Matsumoto M & Seya T.
DNAJB1/HSP40 inhibits MDA5-MAVS signaling in conjunction with HSP70
Scientific Reports

関連論文

Takashima K, Oshiumi H & Seya T.
RIOK3 keeps MDA5 inactive.
Oncotarget, 13;6(31):30423-4 (2015)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Takashima K, Oshiumi H, Takaki H, Matsumoto M, Seya T
RIOK3-mediated phosphorylation of MDA5 interferes with its assembly and attenuates the innate immune response. “
第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月18日-21日、札幌
2. 高島 謙、高木 宏美、松本 美佐子、瀬谷 司、押海 裕之
”リン酸化酵素 RIOK3 によるウイルス RNA センサーMDA5 の活性制御機構”
第81回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、
2016年5月13日-14日、長崎

略語表

AIM2	Absent in melanoma 2
AP-1	Activator protein 1
BMDC	Bone marrow derived dendritic cell
BPB	Bromphenol blue
CARD	Caspase recruitment domain
Cardif	CARD adaptor inducing IFN- β
CCL	C-C motif chemokine Ligand
CD	Cluster of differentiation
CDN	Cyclic-di-nucleotide
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase
cGAMP	Cyclic-GMP-AMP
CIAP	Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal
CPE	Cytopathic effect
CTD	C-terminal domain
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
DAI	DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC	Dendritic cell
DDX	DEAD box polypeptide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMXAA	5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid
DNAJB1	DnaJ Hsp40 homolog, subfamily B, member 1
dsRNA	Double-stranded ribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMCV	Encephalomyocarditis virus
ER	Endoplasmic Reticulum
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
ERIS	Endoplasmic reticulum IFN stimulator
FBS	Fetal bovine serum

G3BP	Ras-GAP SH3 domain binding protein
HA	Hemagglutinin
HEK	Human embryonic kidney
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HRP	Horseradish peroxylase
HSP	Heat shock protein
HSV	Herpes simplex virus
IFI16	Gamma-interferon-inducible protein 16
IFN	Interferon
IKK	I κ B kinase
IL	Interleukin
IP-10	Interferon- γ inducible protein 10
IPS-1	Interferon- β promoter stimulator-1
IRF	Interferon-regulatory factor
LGP2	Laboratory of Genetics and Physiology 2
LPS	Lipopolysaccharide
MAVS	Mitochondrial antiviral signaling protein
MDA5	Melanoma differentiation associated gene 5
2-ME	2-mercaptoethanol
MEM	Minimal essential medium
MHC	Major Histocompatibility Complex
MITA	Mediator of IRF3 activation
Mre11	Meiotic Recombination 11
MV	Measles virus
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
MYPS	Plasma membrane tetraspanner
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NK	Natural killer
NP-40	Nonidet P-40
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns

PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pDC	Plasmacytoid dendritic cell
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
polyI:C	Polyinosinic:polycytidylic acid
PRR	Pattern-recognition receptor
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene 1
Riplet	RING finger protein leading to RIG-I activation
RLR	RIG-I-like receptor
rpm	Revolutions per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SeV	Sendai virus
SLE	Systemic lupus erythematosus
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
STING	Stimulator of interferon genes
TANK	TRAF family member-associated NF- κ B activator
TBK1	TANK-binding kinase-1
TGN	Trans-Golgi network
TICAM	TIR-containing adapter molecule
TIR	Toll-IL-1 receptor homology
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRIM	Tripartite motif-containing protein
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
VISA	Virus-induced signaling adaptor
VSV	Vesicular stomatitis virus
v/v	Volume per volume
WT	Wild type

序章

生体は細菌やウイルスの感染に対する生体防御機構として、自然免疫と獲得免疫の2つのメカニズムを保持する。獲得免疫はリンパ球（T細胞、B細胞）の遺伝子再構成により多様な抗原に対し高度な特異性をもって応答するが、その成立には数日を要する。一方で自然免疫は Toll-like-receptor（TLR）に代表されるパターン認識受容体（Pattern-recognition receptor: PRR）が、細胞表面、エンドソーム内、そして細胞質などにおいて、病原微生物に共通する構造（Pathogen-associated molecular patterns: PAMPs）を認識し、下流のシグナル分子を介し迅速な免疫応答を引き起こす¹。無脊椎動物は自然免疫が主な生体防御機構だが、ヒトを含む脊椎動物では自然免疫の賦活化により樹状細胞（Dendritic cell: DC）などの抗原提示細胞の活性化が生じ、獲得免疫が誘導される²。ヒトの自然免疫応答は免疫応答の起点であり、その詳細な分子基盤の解明は非常に重要である。

多くの微生物において、それらの生存に必須であるゲノム複製や伝播を担う要素はRNAやDNAといった核酸であり、我々の生体には、この核酸を認識することにより病原微生物の侵入を検知するシステムが備わっている³。

まずゲノムとしてRNAを持つウイルスの認識には、細胞質内に存在するRNAヘリケースである Retinoic acid-inducible gene-I（RIG-I）、Melanoma differentiation-associated gene5（MDA5）または Laboratory of Genetics and Physiology 2（LGP2）といった RIG-I-like receptors（RLRs）が重要な働きを担う³。RLRsは細胞質内へと侵入したウイルス由来の複製産物である二重鎖RNA（double-stranded RNA: dsRNA）を認識すると、下流のアダプター分子を介したシグナル伝達により、I型インターフェロンや Interleukin-6（IL-6）、tumor necrosis factor- α （TNF- α ）などの炎症性サイトカイン産生を誘導する。

RIG-IとMDA5はそのN末端領域に2つの Caspase recruitment domains（CARDs）、中央に DExD/H Box 型の RNAヘリケースドメイン、そしてC末端に C-terminal domain（CTD）を持ち、3種のドメイン構造によって構成される⁴。そのうちCTDにおいてウイルスRNAとの結合が生じている^{5,6}。RIG-Iにおいては非感染時にはこのCTDが抑制性ドメインとして機能するが、MDA5にはそのような機能は認められず、両者の制御機構が異なるとされている⁵。N末端のCARDドメインは、アダプター分子である Mitochondrial antiviral signaling protein（MAVS）（別名 Interferon- β -promoter stimulator-1: IPS-1, Virus-induced signaling adaptor: VISA, CARD adaptor inducing IFN- β : Cardif）⁷⁻¹⁰との結合および活性化に必須である。一方でLGP2はRIG-IやMDA5と同様にRNAヘリケースドメイン及びウイルスRNAと結合するCTDを保持するが、N末CARDドメインは欠いた構造となっている⁴。

RIG-Iは5'末端に3つ及び2つのリン酸基を保持した比較的短いdsRNAを認識し¹¹⁻¹³、一方でMDA5は1kb以上の長いdsRNAを認識することが知られている¹⁴。またウイルスについては、RIG-Iはインフルエンザウイルス、水泡性口炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus: VSV)、センダイウイルス (Sendai virus: SeV)、C型肝炎ウイルスなどの多数のウイルスRNAを認識するのに対し、MDA5はポリオウイルス (Polio virus)、脳心筋炎ウイルス (Encephalomyocarditis virus: EMCV) などのピコルナウイルス属のウイルスRNAを認識する³。またdsRNA合成アナログであるPolyinosinic:polycytidylic acid (polyI:C) もRLRによって認識されることが知られている^{15,16}。

RIG-I はユビキチンリガーゼ Tripartite motif-containing protein 25 (TRIM25)¹⁷ 及び RING finger protein leading to RIG-I activation (Riplet)^{18,19} によってリジン 63 鎖結合型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RIG-Iの活性化に必須であり、翻訳後修飾によるRIG-Iの活性制御機構が明らかにされてきた。一方で、MDA5もポリユビキチン鎖による活性制御が報告されているが²⁰、これまでMDA5の活性制御機構の大部分は明らかにされていなかった。

RIG-I 及びMDA5 は dsRNA と結合すると多量体を形成し、そのN末端CARDドメインのシス多量体形成が下流のMAVSへのシグナル伝達に必要とされている²¹⁻²⁵。LGP2については当初 in vitro の解析からRIG-IやMDA5の抑制因子であると考えられていたが^{4,26}、ノックアウトマウスの解析よりLGP2はRIG-IやMDA5のシグナル伝達を亢進させる因子であることが示唆された²⁷。さらに最近、LGP2がMDA5-dsRNA間の相互作用を支持することで効率の良いMDA5の多量体形成を促進し、MDA5依存的なシグナル伝達の補助因子として働くことが報告されている²⁸。

MAVSはミトコンドリア外膜に局在する分子であり、RLRsにより活性化されたMAVSはプリオン様の凝集を引き起こし^{29,30}、TANK-binding kinase-1 (TBK1)を活性化する。活性化TBK1により転写因子Interferon-regulatory factor 3 (IRF3)はリン酸化を受け、活性化する。リン酸化されたIRF3は二量体を形成し、核に移行してI型インターフェロンの転写を促進する²⁹。また一方で、MAVSのプリオン様の凝集体はTNF receptor-associated factor 2 (TRAF2)やTRAF6といった下流分子の足場として機能することで、I κ B kinase (IKK) 複合体を介した転写因子Nuclear factor-kappa B (NF- κ B)の活性化にも寄与し、各種炎症性サイトカインの産生にも寄与している^{29,31}。

一方、エンドソーム上に局在するTLR3もdsRNAを認識することが知られている^{32,33}。TLR3はそのアダプター分子としてTIR-containing adapter molecule-1 (TICAM-1)を利用し、転写因子NF- κ B、IRF-3、Activator protein 1 (AP-1)を介したI型インターフェロンおよび炎症性サイトカインの産生に重要な役割を果たす³⁴。RLRsは全身にユビキタスに発現しているのに対し、TLR3は樹状細胞やマクロファージなどの抗原提

示細胞に強く発現している³⁵。感染細胞で RLRs がウイルス複製産物の dsRNA を細胞質内で認識し、防御応答が誘導される。感染細胞から放出される dsRNA を抗原提示細胞がエンドサイトーシスによって取り込むことにより、TLR3 由来の免疫応答が引き起こされるものと考えられている。

RNA の認識経路は主にウイルス感染の制御に重要である一方で、近年になって RLRs-MAVS 経路の異常な活性化による過剰な I 型インターフェロン産生が自己免疫疾患の引き金となることが示唆されている。古くよりピコルナウイルスなどのウイルス感染に付随して 1 型糖尿病などの自己免疫疾患をきたす例が数多く報告されており³⁶、近年になって自己免疫疾患の患者において RLRs における一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms: SNPs) が認められることが明らかになった³⁷。特に近年になって MDA5 をコードする遺伝子 *Ihhl1* にみられる SNPs と、1 型糖尿病^{38,39} 及び全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus: SLE)⁴⁰ との関連が指摘され、また以前より抗 MDA5 抗体陽性である筋症状を伴わない皮膚筋炎患者において高率に急速進行性間質性肺炎をきたすことが知られており⁴¹、複数の知見から MDA5 と自己免疫応答との関連が示唆されている⁴²。しかし前述の通り、RIG-I に比べ MDA5 の活性制御機構は不明の点が多く残されていた。

本研究の第一章ではこの MDA5 の活性制御機構に焦点を当て、新規制御因子の同定及びその活性制御機構について検討した。

RNA の認識経路は前述のように研究が進んでいた一方で、DNA の認識機構の理解は遅れており、DNA センサー分子に関してはエンドソームに局在する TLR9 のみが知られている状況が続いていた。TLR9 は樹状細胞、形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells: pDC) やマクロファージなどの免疫担当細胞のエンドソーム内に局在し、DNA をエンドサイトーシスによって取り込むことによって Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) 依存的に I 型インターフェロン産生を担うことが知られている⁴³。しかし、以前より TLR9 非依存的な細胞質内 DNA 認識による I 型インターフェロン産生経路の存在が示唆されおり^{44,45}、また 2008 年に細胞質内 DNA 認識による I 型インターフェロン産生に必須の分子として Stimulator of interferon genes (STING) (別名 Plasma membrane tetraspanner: MYPS, Mediator of IRF3 activation: MITA, Endoplasmic reticulum IFN stimulator: ERIS) が同定されたことにより⁴⁶⁻⁵⁰、細胞質内 DNA センサーの同定が近年になって急速に加速した。最近の研究において DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors (DAI)⁵¹、Absent in melanoma 2 (AIM2)⁵²、Gamma-interferon-inducible protein 16 (IFI16)⁵³、DEAD box polypeptide 41 (DDX41)⁵⁴、Ku70⁵⁵、Meiotic Recombination 11 (Mre11)⁵⁶、そして Cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)⁵⁷ など数多くの細胞質内 DNA センサーが同定されてきた。AIM2 はインフラマゾームの活性化を介して IL-1 β

および IL-18 の活性化をきたし⁵²、また Ku70 は IRF1 及び 7 の活性化を介してⅢ型インターフェロン産生に寄与する⁵⁵。それ以外のセンサー分子については STING をアダプター分子とし、I 型インターフェロンの産生を誘導することが知られている⁵⁸。また RNA センサーとして知られている RIG-I も、RNA ポリメラーゼⅢにより細胞質内 DNA が RNA に転写されることによって、その認識に関わることが報告されている⁵⁹。最近になってノックアウトマウスの解析結果を受けて、上記 DNA センサーの中でも cGAS の重要性が注目を浴びている。cGAS ノックアウトマウスは DNA ウイルスである Herpes simplex virus 1 (HSV-1) 感染時において I 型インターフェロンの産生が著明に減少し、感染後の死亡率の増加が認められた⁶⁰。

cGASは細胞質内においてDNAと結合することによって構造変化が生じ活性型となり^{61 62}、ATPとGTPからcyclic GMP-AMP (cGAMP) を合成する。cGAMPはセカンドメッセンジャーとして作用し、小胞体 (Endoplasmic reticulum: ER) 上に存在するSTINGに結合し、STINGの活性化を導く⁶³。STINGは活性化すると二量体を形成し⁵⁰、ERからER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) 及びGolgiへと移行する⁶⁴。STINGはGolgi上でパルミトイル化され、trans-Golgi network (TGN) 上でTBK1を活性化させ⁶⁵、IRF3のリン酸化を介してI型インターフェロンの産生に寄与する⁶⁶。

cGAS-cGAMP-STING 経路はウイルス感染に対して非常に重要な役割を果たしている⁶⁷。前述の HSV-1 の他にも、サイトメガロウイルス^{68 69}、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス⁷⁰、アデノウイルス⁷¹などの DNA ウイルスの感染、または注目すべきこととして Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) 及び HIV-2 といったレトロウイルスの感染に対しても認識及び免疫応答を引き起こすことが知られている⁷²。またウイルス感染のみならず、DNA をゲノムとして含む多くの細菌の認識にも関わっており、この経路は感染に対する自然免疫応答に非常に重要である⁷³。

また一方で近年、抗腫瘍免疫応答におけるcGAS-STING経路の重要性が非常に注目を浴びている^{67,73}。腫瘍に対する免疫監視機構においてI型インターフェロンは非常に重要な働きを担うことが知られており、直接的な腫瘍への細胞障害のみならず、DCの成熟及び抗原提示能の増強を誘導する⁷⁴。最近、STINGノックアウトマウスにおいて腫瘍増殖が促進されることが報告され、STING経路が抗原特異的T細胞(Cytotoxic T-lymphocyte: CTL)を介した腫瘍の制御機構に重要であることが示唆された^{75,76}。この報告では腫瘍微小環境のDCなどが死んだ腫瘍細胞由来のDNAを取り込むこと、そしてcGAS-STING経路を介したI型インターフェロン産生を誘導し、内因性の抗腫瘍免疫応答を引き起こすことが示唆された⁷⁵。放射線療法による抗腫瘍効果もSTING経路を必要とすることが知られており、こちらも放射線の影響によって死んだ腫瘍細胞由来のDNAがSTING経路を刺激するモデルが示されているが⁷⁶、腫瘍細胞の死から実際の

抗原提示細胞による取り込み、そして抗原提示細胞の細胞質へDNAが移行してゆく過程の詳細なメカニズムについては未だ不明である。

一方でSTINGのリガンドであるcGAMPの投与により、効率よく抗原特異的T細胞を誘導できることが示されている⁶⁰。そのためcGAMP及びcGAMP誘導體、STINGアゴニストとして知られる5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA)などを免疫アジュバントとして投与することにより、抗腫瘍免疫応答を効率よく引き起こす試みもすでに進行している⁷⁷⁻⁷⁹。

このように腫瘍に対する内在性の免疫監視機構としてSTING経路の重要性が示唆されており、特にDCにおける効率的なCTL誘導の作用が注目を浴びていた。腫瘍免疫には抗原特異的CTLのみならずNatural killer (NK) 細胞等の細胞がエフェクター細胞として働くが、それらを介した腫瘍抑制機構に関するSTING経路の役割は不明である。また腫瘍内でどの細胞のSTING経路が抗腫瘍に関与するかについても十分に解明されていない。そこで本研究の第二章では、Natural killer (NK) 細胞依存的な抗腫瘍免疫応答に対し生体（宿主）側と腫瘍細胞そのもののSTING経路がどのような影響を及ぼすか検討を行った。

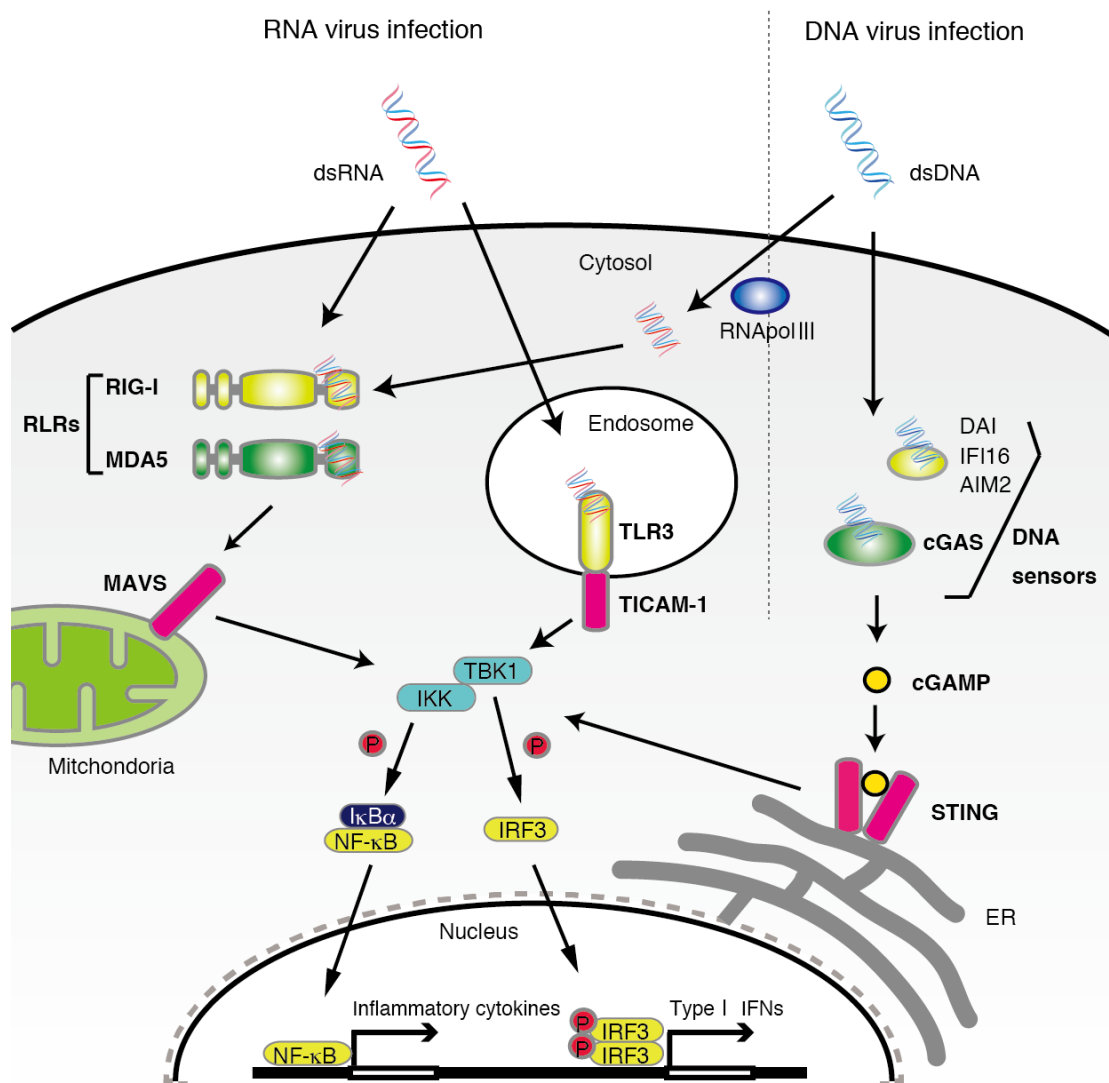


図1：核酸に対する自然免疫応答

第一章

MDA5 の新規制御因子の同定とその制御機構の解明

緒言

MDA5 は RLR の一つであり、麻疹ウイルスやポリオウイルス、または脳心筋炎ウイルス(EMCV)などに由来する長い dsRNA (>1kb) を認識する^{14,80-81}。一方で別の RLR の分子である RIG-I は短い dsRNA を認識することが知られている。MDA5 は N 末端領域に存在する 2 つの caspase recruitment domains(CARDs)、RNA ヘリケース domain、そして C-terminal domain (CTD) の 3 種のドメイン構造によって構成される。MDA5 はその C 末端領域でウイルス dsRNA を挟み込む形で認識すると、その dsRNA に沿って繊維状の多量体を形成し、その際に MDA5 の N 末端 CARDs 同士も多量体を形成する²³⁻²⁵。その N 末端 CARDs の多量体がミトコンドリア外膜上に存在するアダプター分子 MAVS と結合することで MAVS の活性化を促し、I 型インターフェロンや炎症性サイトカインの産生などの抗ウイルス自然免疫応答を誘導する²⁹⁻³¹。

このように MDA5 の適切な活性化はウイルス感染に対する生体防御に働くが、一方で MDA5 の過剰な活性化が自己免疫疾患 (1 型糖尿病、SLE 等) を引き起こすことが近年示唆されており⁴²、MDA5 の詳細な活性制御機構の解明が求められていた。

今回我々は MDA5 の新規制御因子の同定およびその制御機構の解明を目的とし、解析を行った。本章では当解析より得られた知見について、三つの節に渡って報告する。

まず第一節では酵母 two-hybrid 法による MDA5 新規結合因子のスクリーニング結果について述べる。細胞内局在などからリン酸化酵素 RIO Kinase 3 (RIOK3) と熱ショックタンパク質 DnaJ Hsp40 homolog, subfamily B, member 1 (DNAJB1) の 2 つの分子について着目し、次節以降においてその機能について詳細な解析を行なった。

第二節では RIOK3 による MDA5 の活性制御機構について述べる。セリン・スレオニンリン酸化酵素である RIOK3 は細胞質内において MDA5 と結合し、MDA5 C 末端領域の Ser-828 をリン酸化する。この RIOK3 による MDA5 Ser-828 のリン酸化は、MDA5 の活性化に必須である多量体形成を阻害し、MDA5 由来のシグナル伝達を抑制していることが明らかになった。

さらに第三節では DNAJB1/ HSP70 複合体による MDA5 の活性制御機構について述べる。＜第一章第三節に関する事項は論文掲載の関係より省略させていただきます。(2017 年 3 月 16 日現在)＞

第一節 MDA5 の新規結合因子の同定及び単離

材料と方法

1.実験材料

1-1. 細胞

培地の組成

YPAD 培地	1% Yeast Extract (BD) , 2% Bacto Peptone (BD) , 2% Dextrose (SIGMA) , 0,004% Adenin Sulfate, 1.5% Agar (Wako)
SD 培地 (1L volume)	Yeast Nitrogen Base 6.7 g/l (BD) , 2% Dextrose , A.A. mix stock 0.46 g/l, 1.5%Agar
SD-W SD-WL SD-WLH SD-WLHA 培地	上記 SD 培地作成において A.A mix stock を以下の A.A.-W、A.A.-WL、A.A.-WLH、A.A.-WLHA に変更したもの
A.A. mix stock	Adenin 0.2 g, Arginine 0.2 g, Histidine 0.2 g, Leucine 0.3 g, Lysine 0.3 g, Methione 0.2 g, Phenylalanine 0.5 g, Threonine 2.0 g, Thriptophan 0.2 g, Throsine 0.3 g, Uracil 0.2 g (各 Wako)
A.A.-W	A.A. mix stock より Tryptophan を抜いたもの
A.A.-WL	A.A. mix stock より Tryptophan 及び Leucine を抜いたもの
A.A.-WLH	A.A. mix stock より Tryptophan、Leucine 及び Histidine を抜いたもの
A.A.-WLHA	A.A. mix stock より Tryptophan、Leucine、Histidine 及び Adenine を抜いたもの

AH109 株

酵母 AH109 株は Clontech より購入した。培養には YPAD 培地を用い、栄養選択を行う際には SD、SD-W、SD-WL、SD-WLH、SD-WLHA 培地を用いた。

1-2. プラスミド

以下のプラスミド及びライブラリーは Clontech より購入した。

pGADT7、pGBKT7、Human Lung library

pGBKT7-MDA5-C (731-1025 a.a.) は当研究室において構築された。

2.実験方法

2-1. Yeast two-hybrid 法

溶液の組成

PEG mix	40% PEG4000, 0.1 M LiAc, 1 × 10 TE
10 × 10 TE	100 mM Tris-Hcl (pH 7.5) , 10 mM EDTA

酵母は AH109 株を使用した。Prey vector としては pGADT7 を、Bait Vector としては pGBKT7 を使用した。まず AH109 株を YPAD 培地中で前培養し、Bait ベクターである pGBKT7-MDA5-C 発現プラスミドを AH109 株に導入して形質転換を行い、SD-W 寒天培地に播種した。3 日後に得られたコロニーを SD-W 液体培地中で培養し、さらに YPAD 培地中で前培養のあと、Prey ベクターである pGADT7-Human Lung library 発現プラスミドを導入して 2 段階目の形質転換を行い、SD-WLH 寒天培地に播種した。一週間後、得られたコロニーを SD-WLHA 寒天培地へとレプリカしてさらに栄養選択を行い、その 2 日後に得られたコロニーよりプラスミドを回収した。得られたプラスミドを大腸菌に導入して形質転換を行い、アンピシリン選択によりライブラリー由来のプラスミド (pGADT7) であることを確認し、さらにシーケンスを確認して候補分子を得た。

その後、得られた候補分子が偽陽性である可能性を排除するため、Re-test を行った。AH109 に pGBKT7/Empty と pGADT7/候補遺伝子、または pGBKT7/MDA5-C と pGADT7/候補遺伝子という 2 つの組み合わせで発現ベクターを導入して形質転換を行い、それぞれ SD-WL 寒天培地に播種した。3-4 日後に得られたコロニーを SD-WLHA 寒天培地にさらに播種し、前者の組み合わせではコロニーが生えず、かつ後者の組み合わせでコロニーが得られた候補遺伝子を陽性とした。

酵母形質転換（酢酸リチウム法）

2 ml の YPAD 培地中で AH109 株を 30°C で一晩培養した。翌日、2 ml の培養液を 50 ml の YPAD 培地へ添加し、さらに 30°C で 3 時間培養した。3,000 rpm で 2 分間遠心して集菌したのち、滅菌水で一度洗浄した。さらに 3,000 rpm で 2 分間遠心して沈殿した細胞について 500 μ l の 0.1M LiAc に懸濁し、6,000 rpm で 15 秒間遠心した。さらに沈殿した細胞について次は 250 μ l の 0.1 M LiAc に懸濁し、6,000 rpm で 15 秒間遠心した。そして沈殿した細胞を 125 μ l の 0.1 M LiAc に懸濁し、PEG mix（PEG4000 と酢酸リチウム、TE の混和物）とキャリア DNA 及び導入するプラスミドを加え、十分に攪拌した。30°C で 30 分間震盪培養し、42°C で 15 分間熱処理を行った。6,000 rpm で 15 秒間遠心して集菌し、100 μ l の滅菌水に懸濁して寒天培地に塗布した。3 日後にコロニーを得た。キャリア DNA はサケ精子由来のものを使用した（Clontech）。

酵母からのプラスミドの回収

選択によって得られたシングルコロニーを培地と同じ種類の液体培地にて 30°C で 1 日から 2 日ほど培養した。3,000 rpm で 2 分間遠心して集菌し、1 ml の 50%エタノールを加え懸濁した。その後 6,000 rpm で 15 秒間遠心し、沈殿した細胞に 500 μ l のソルビトール溶液を加え懸濁し、2-Mercapthoethanol（2-ME: GIBCO-Invitrogen）を 1 μ l、そして 10 mg/ml の Zymolyase 溶液（ナカライテスク）を 3 μ l 加え穏やかに混和した後、37°C で 1 時間震盪培養した。3,000 rpm で 2 分間遠心し、上清を捨てた後、500 μ l の 50:20 Tris-EDTA 溶液を加えて懸濁し、さらに 50 μ l の 10%SDS を加えて十分に混和した。ここに 10 μ l の 10 mg/ml ProK 溶液を加えてよく混和し、65°C で 20 分間培養した。200 μ l の 5 M KAc 溶液を加えて十分に攪拌し、氷上で 1 時間反応させた。その後 15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。得られた上清についてエタノール沈殿処理を行い、プラスミドを精製した。

実験結果

1-1-1. MDA5 C 末端領域に結合する因子の同定及び単離

MDA5 は C 末端領域での活性制御機構が RIG-I とは異なることが示唆されていたため、Yeast two-hybrid 法により MDA5 C 末端領域 (MDA5-C; 731-1,025 アミノ酸) と結合する新規制御因子の同定を試みた。ヒト肺由来 cDNA ライブラリーを用いて、約 27 万 3300 クローンに対してスクリーニングを行なった。SD 培地から Trp, Leu, His, Ade を欠損させた培地を選択培地とした際に、38 個のクローンを得た。これらのクローンに含まれている遺伝子をそれぞれ同定したところ、15 種類の遺伝子が明らかとなった。再度 MDA5-C との結合を確認した結果、15 種類の遺伝子のうち 7 種類において再結合を確認することができた。このうち局在などを考慮した上で MDA5 を介したシグナル伝達に関与する可能性が高いものとして細胞質内に存在する RIO kinase 3 (RIOK3) 及び DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1 (DNAJB1) の 2 つに注目した。

A

No.		# of clone	Retest
1	Surfactant protein B (SFTPB)	6	+
2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1 (DNAJB1)	4	+
3	RING1 and YY1 binding protein (RYBP)	3	+
4	dedicator of cytokinesis 11 (DOCK11)	2	+
5	RIO kinase 3 (RIOK3)	1	+
6	HCLS1 associated protein X-1 (HAX1)	1	+
7	heat shock 60kDa protein 1 (HSPD1)	1	+
8	Metallothionein 2A (MT2A)	8	-
9	A kinase (PRKA) interacting protein 1 (AKIP1)	4	-
10	alpha-2-macroglobulin (A2M)	3	-
11	folliculin-like 3 (secreted glycoprotein) (FSTL3)	1	-
12	Actin beta (ACTB)	1	-
13	macrophage receptor with collagenous structure (MARCO)	1	-
14	chromosome 14 genomic contig, alternate assembly	1	-
15	nuclear transcription factor Y, gamma (NFYC)	1	-

B

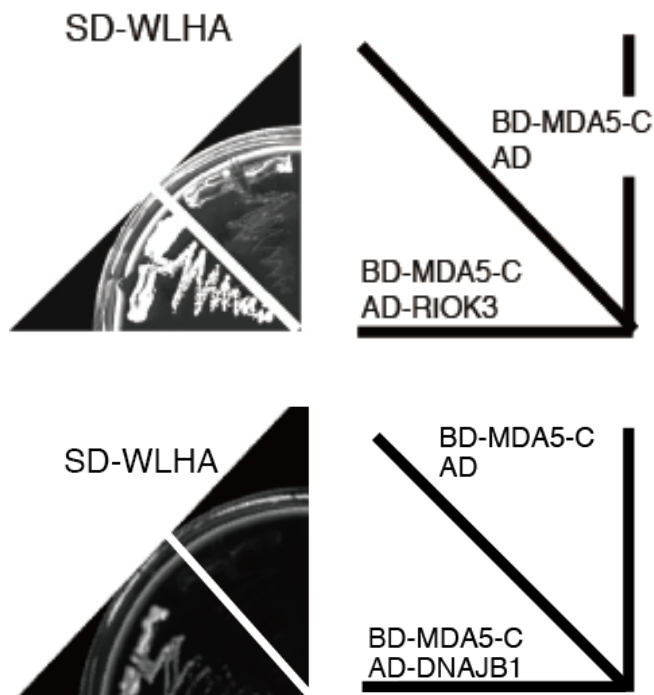


Figure. 1-1-1 MDA5 C 末端領域と結合する因子のスクリーニング結果

(A) 得られたクローンの遺伝子名及び個数

(B) MDA5-C と RIOK3 (上段) 及び DNAJB1 (下段) の再結合の確認。Yeast A109 株に各発現プラスミドを導入し、SD 培地より Trp、Leu、His、Ade を抜いた培地 (SD-WLHA) で生育させた。

考察

MDA5 C 末端領域に結合する分子について Yeast two-hybrid 法を用いたスクリーニングを行なったところ、7 種類の分子が結合しうることが明らかとなった。このうち Surfactant protein B は細胞外タンパク質であり偽陽性である可能性が高い。また RYBP 及び DOCK11 は主に核に発現するタンパク質であり、また HAX1 及び HSPD1 はミトコンドリア内膜上に発現するタンパク質であるため、これらは細胞質内に存在する MDA5 とは局在が異なり偽陽性の可能性が考えられる。一方で RIOK3 及び DNAJB1 は細胞質内に存在するタンパク質であり、以降の節においてはこの 2 つの分子に注目し詳細な解析を行なった。

第二節

リン酸化酵素 **RIOK3** による **MDA5** の活性制御機構

材料と方法

1.実験材料

1-1. 細胞

溶液及び緩衝液の組成

PBS(-)	137 mM NaCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.68 mM KCl, 1.49 mM KH ₂ PO ₄
NaHCO ₃ 水溶液	10% NaHCO ₃
Trypsin 液	0.25% Trypsin-0.02% EDTA-PBS(-)

以下の試薬を各メーカーより購入した。

DMEM (1.0 g/l Low Glucose)	GIBCO-Invitrogen
DMEM (4.5 g/l Low Glucose)	GIBCO-Invitrogen
Eagle's MEM" Nissui"①	Nissui, Japan
FBS	BioSource Intl., Inc
L-Glutamine	GIBCO-Invitrogen
RPMI1640	GIBCO-Invitrogen
Opti-MEM	Invitrogen
100 mU/ml PenicillinG, 100 mg/ml Streptomycin	GIBCO-Invitrogen

HEK293 細胞 / RIOK3 KO-HEK293 細胞 / BJ 細胞 / Vero 細胞 / Vero-SLAM 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。RIOK3 KO-及び DNAJB1 KO-HEK293 細胞は CRISPR/Cas9 システムを用いて当研究室において樹立された。樹立方法に関しては下記実験方法において記載する。ヒト繊維芽細胞株 BJ 細胞は STEMAGENT 社の Stemgent® BJ Human Fibroblasts (early passage, P6) を購入した。サル腎由来細胞株 Vero 細胞は RIKEN BRC Cell Bank より購入した。当研究室にて Vero 細胞に SLAM (huCD150) /pCXN を遺伝子導入し、SLAM (huCD150) を安定的に発現させた細胞株である Vero-SLAM 細胞を樹立した。あらかじめ 56°C で 30 分加熱し非働化した 10% (v/v) ウシ胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 µg/ml Streptomycin を添加した DMEM (1.0 g/l Low Glucose) を用い、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。細胞の継代は confluent になり次第行い、細胞の回収はトリプシン液を用いた。

HEK293FT 細胞

ヒト胎児腎細胞株 HEK293FT 細胞は Invitrogen 社のレンチウイルス発現システムに付属されていたものである。あらかじめ 56°C で 30 分加熱し非働化した 10% (v/v) ウシ胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 µg/ml Streptomycin、1 mM Sodium pyruvate、1% NEAA を添加した DMEM (4.5 g/l Low Glucose) を用い、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。細胞の継代は confluent になり次第行い、細胞の回収はトリプシン液を用いた。

THP-1 細胞

ヒト急性白血病単球細胞株 THP-1 細胞は広島大学医学部の櫛木修教授より供与された。あらかじめ 56°C で 30 分加熱し非働化した 10% (v/v) ウシ胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 µg/ml Streptomycin、55 µM 2-ME を添加した RPMI1640 を用い、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。細胞の継代は 1×10^6 cells/ml になり次第を行った。

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°C で 30 分加熱し非働化した 10% (v/v) ウシ胎児血清 FBS、1% (v/v) L-Glutamine、NaHCO₃ 水溶液を適量添加した Eagle's MEM 培地を用い、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。細胞は PBS(-) で洗浄した後にトリプシン液を用いて回収した。細胞の継代は confluent になり次第行った。

1-2. ウイルス

MV

MV Nagahata 株は 100 mm dish に播種した Vero-SLAM 細胞に対し $Moi=0.1$ で感染させて培養した。72 時間後に細胞変性効果 (Cytopathic effect: CPE) を確認した後、dish ごと -80°C で凍結した。3 回の凍結融解処理と 1 分間の超音波破碎を行った後、3,000 rpm、 4°C で 20 分間遠心し、その上清をウイルス液として -80°C で凍結保存した。ウイルスの力価は Vero-SLAM 細胞を用いたプラークアッセイにより決定した。

SeV

SeV (HVJ 株) は 100 mm dish に播種した Vero 細胞に対し $Moi=0.1$ で感染させて培養した。24 時間後に CPE を確認した後、その上清を回収し、 -80°C で凍結保存した。ウイルスの力価は Vero 細胞を用いたプラークアッセイにより決定した。

1-3. プラスミド

pEF-BOS は大阪大学免疫学フロンティア研究センター 長田重一教授より供与された。また pEF-BOS/MDA5-FLAG は京都大学ウイルス研究所 藤田尚志教授より供与された。

pEF-BOS/MDA5-C (731-1025a.a) -FLAG、pEF-BOS/LGP2-FLAG、及び pEF-BOS/MAVS-HA については当研究室で作成された。

以下のプラスミドの作成手順に関しては 2-2. プラスミドの構築にて言及する。

pEF-BOS/RIOK3-HA

pEF-BOS/RIOK3 Δ -HA

pEF-BOS/MDA5-S828A-FLAG

pEF-BOS/MDA5-S828D-FLAG

pEF-BOS/MDA5-T829A-FLAG

pEF-BOS/MDA5-T829D-FLAG

pEF-BOS/MDA5-S911A-FLAG

pEF-BOS/MDA5-S916A-FLAG

pEF-BOS/MDA5-T932A-FLAG

pEF-BOS/MDA5-T970A-FLAG

pEF-BOS/MDA5-S995A/T996A-FLAG

pEF-BOS/MDA5-T1009A-FLAG

pEF-BOS/MDA5-S828A/T829A-FLAG	pEF-BOS/MDA5-S1016A-FLAG
pEF-BOS/MDA5-S828D/T829D-FLAG	pEF-BOS/MDA5-S1022A-FLAG
pEF-BOS/MDA5-S836A/S838A-FLAG	pEF-BOS/MDA5-C-A18-FLAG
pEF-BOS/MDA5-T845A-FLAG	pEF-BOS/MDA5-C-S828-A17-FLAG
pEF-BOS/MDA5-S880A-FLAG	pEF-BOS/MDA5-HA
pEF-BOS/MDA5-T888A-FLAG	pEF-BOS/MDA5 S828A-HA
pEF-BOS/MDA5-S901A-FLAG	pEF-BOS/MDA5 S828D-HA

1-4. リガンド

dsRNA 合成アナログである polyI:C は、Amersham より購入した。
実験目的に合わせて 1 mg/ml, 0.1 mg/ml に調整したものを用いた。

1-5. トランスフェクション試薬

プラスミド及び polyI:C のトランスフェクションを行う際には Lipofectamin 2000 reagent (Invitrogen Life Technology) を、また siRNA のトランスフェクションを行う際には Lipofectamin RNAiMAX (Invitrogen Life Technology) を、それぞれ付属のプロトコールに従い使用した。

2.実験方法

2-1. プラスミドの構築

[pEF-BOS/RIOK3-HA]

HEK293 細胞より得られた cDNA を鋳型とし、下記表 1 のプライマーセット a: RIOK3 F1/RIOK3 R1、b: RIOK3 F2/RIOK3 R2 を使用し、またポリメラーゼに KOD FX（東洋紡）を用いて PCR 反応を行い、前後半 2 つの断片を増幅した。増幅した各断片はアガロース pCR-blunt vector へサブクローニングした。シークエンスを確認後、pCR-blunt vector（Thermo Fishaer）に挿入されたそれぞれの断片について、プライマーセット a、b を用いた PCR 反応により再度増幅を行った。そして得られた 2 つの PCR 産物を鋳型とし、プライマー RIOK3 F1/RIOK3 R2 を用いた PCR 反応により 2 つの断片を連結した。なお RIOK3 F1 プライマーは *Xho* I サイトを、また RIOK3 R2 プライマーは *Bam*H I サイトを含んだ配列に設計しており、得られた PCR 産物には N 末端に *Xho* I サイトが、そして C 末端には *Bam*H I サイトが付加されている。そして得られた連結 PCR 産物を再度 pCR-blunt vector へサブクローニングし、シークエンスを確認した。*Xho* I / *Bam*H I（TAKARA）で制限酵素処理し、同様の制限酵素処理を行った pEF-BOS/MAVS-HA の N 末端部分と入れ替えることにより Hemagglutinin (HA) タグを付加した。シークエンスの確認後、Plasmid Midi Kit（QIAGEN）でプラスミドを精製した。

[pEF-BOS/RIOK3Δ-HA]

全長 RIOK3 のクローニングを行う際にプライマーセット b で PCR 反応を行ったところ、PCR 断片の中に Exon8 の途中から 43bp の塩基欠損がみられるスプライシングバリエーションが存在した。この断片をプライマーセット a で増幅した RIOK3 前半部の断片と PCR 反応で連結した。以降 pEF-BOS/RIOK3-HA 作成時と同様の操作にてクローニングを行った。

表 1: RIOK3 Cloning primer list

		Sequence (5'→3')
a	RIOK3 F1	CTCGAGGCCACCATGGATCTGGTAGGAGTGGC
	RIOK3 R1	CTTTCCTGTACTAATACAGCC
b	RIOK3 F2	GTTGGAGACAATCACTGGCTG
	RIOK3 R2	GCGGCCGCCTATTCATCATATAGTAGTGG

[pEF-BOS/MDA5 各種アミノ酸置換変異体]

pEF-BOS/MDA5 を鋳型とし、それぞれ下記表 2 のプライマーを用い、KOD Plus を使用して PCR 反応を行った。その後 *Dpn* I (NEB) を加えて 37°C で 1 時間反応させ鋳型メチル化 DNA を切断し、DH5 α コンピテントセルに導入した。シーケンスの確認後、Plasmid Midi Kit でプラスミドを精製した。

また pEF-BOS/MDA5-C-A18 については pEF-BOS/MDA5-C-FLAG を鋳型とし、ポリメラーゼには KOD plus (東洋紡) を用いた下記のプライマーによる PCR 反応) により、CTD に存在する 18 個の Ser、Thr 残基について 1 個または 2 個ずつ Ala 残基に置換した。pEF-BOS/MDA5-C-S828-A17 は pEF-BOS/MDA5-C-A18 を鋳型とし、ポリメラーゼには KOD plus を用いた下記のプライマーによる PCR 反応により元の Ser-828 に置換した。これらのプラスミドに関してもシーケンスの確認後、Plasmid Midi Kit でプラスミドを精製した。

表 2: MDA5 site-directed mutagenesis primer list

		Sequence (5'→3')
S828A	F	CGAGCCAGAGCTGATGAGGCCACCTACGTCCTGGTTGCTCAC
	R	GTGAGCAACCAGGACGTAGGTGGCCTCATCAGCTCTGGCTCG
S828D	F	CGAGCCAGAGCTGATGAGGACACCTACGTCCTGGTTGCTCAC
	R	GCTCGGTCTCGACTACTCCTGTGGATGCAGGACCAACGAGTG
S828E	F	CGAGCCAGAGCTGATGAGGAAACCTACGTCCTGGTTGCTCAC
	R	GTGAGCAACCAGGACGTAGGTTTCCTCATCAGCTCTGGCTCG
T829A	F	CGAGCCAGAGCTGATGAGAGCGCCTACGTCCTGGTTGCTCAC
	R	GTGAGCAACCAGGACGTAGGCGCTCTCATCAGCTCTGGCTCG
T829D	F	CGAGCCAGAGCTGATGAGAGCGACTACGTCCTGGTTGCTCAC
	R	GTGAGCAACCAGGACGTAGTCGCTCTCATCAGCTCTGGCTCG
S828/T829A	F	CGAGCCAGAGCTGATGAGGCCCGCCTACGTCCTGGTTGCTCAC
	R	GTGAGCAACCAGGACGTAGGCGGCCTCATCAGCTCTGGCTCG
S828/T829D	F	CGAGCCAGAGCTGATGAGGACGACTACGTCCTGGTTGCTCAC
	R	GTGAGCAACCAGGACGTAGTCGTCCTCATCAGCTCTGGCTCG
S836/S838A	F	TACGTCCTGGTTGCTCACGCTGGTGCAGGAGTTATCGAACATGA
	R	TCATGTTGATAACTCCTGCACCAGCGTGAGCAACCAGGACGTA
T845A	F	CAGGAGTTATCGAACATGAGGCAGTTAATGATTTCCGAGAGAAG
	R	CTTCTCTCGGAAATCATTAAGTGCCTCATGTTGATAACTCCTG
S880A	F	ATTTTGGAATTACAGATGCAAGCTATAATGGAAAAGAAAATG

	R	CATTTTCTTTTCCATTATAGCTTGCATCTGTAATTCCAAAAT
T888A	F	ATAATGGAAAAGAAAATGAAAAGCCAAGAGAAATATTGCCAAGC
	R	GCTTGGCAATATTTCTCTTGGCTTTCATTTTCTTTTCCATTAT
S901A	F	CAAGCATTACAAGAATAACCCAGCACTAATAACTTTCCTTTGCAA
	R	TTGCAAAGGAAAGTTATTAGTGCTGGGTATTCTTGTAATGCTTG
T904A	F	AAGAATAACCCATCACTAATAGCTTTCCTTTGCAAAAAGTGC
	R	GCAGTTTTTGCAAAGGAAAGCTATTAGTGATGGGTATTCTT
S901A/T904A	F	CAAGCATTACAAGAATAACCCAGCACTAATAGCTTTCCTTTGCAA
	R	TTGCAAAGGAAAGCTATTAGTGCTGGGTATTCTTGTAATGCTTG
S911A	F	AACTTTCCTTTGCAAAAAGTGCCTGTGCTAGCCTGTTCTGGGGA
	R	TCCCCAGAACAGGCTAGCACAGCGCAGTTTTTGCAAAGGAAAGTT
S916A	F	AACTGCAGTGTGCTAGCCTGTGCTGGGGAAGATATCCATGTAATT
	R	AATTACATGGATATCTTCCCCAGCACAGGCTAGCACACTGCAGTT
T904A/S911A/T916	F	AGCTTTCCTTTGCAAAAAGTGCCTGTGCTAGCCTGTGCTGGGGA
A(※)	R	TCCCCAGCACAGGCTAGCACAGCGCAGTTTTTGCAAAGGAAAGCT
T932A	F	GAAAATGCATCACGTCAATATGGCCCCAGAATTCAAGGAACTTTA
	R	TAAAGTTCCTTGAATTCTGGGGCCATATTGACGTGATGCATTTTC
T970A	F	CAAATGTGGCCAGGCTTGGGGAGCAATGATGGTGCACAAAGGCTT
	R	AAGCCTTTGTGCACCATCATTGCTCCCCAAGCCTGGCCACATTTG
S995A/T996A	F	AGTGGTTTTCAAAAATAATGCAGCAAAGAAACAATACAAAAGTG
	R	CACTTTTTGTATTGTTTCTTTGCTGCATTATTTTTGAAAACCACT
T1009A	F	AAGTGGGTAGAATTACCTATCGCATTTCCTCAATCTTGACTATTCA
	R	TGAATAGTCAAGATTGGGAAATGCGATAGGTAATTCTACCCACTT
S1016A	F	ACATTTCCCAATCTTGACTATGCAGAATGCTGTTTATTTAGTGAT
	R	ATCACTAAATAAACAGCATTCTGCATAGTCAAGATTGGGAAATGT
S1022A	F	TATTCAGAATGCTGTTTATTTGCTGATGAGGATTAGCACTTGATT
	R	AATCAAGTGCTAATCCTCATCAGCAAATAAACAGCATTCTGAATA
T1009A/S1016A/S1	F	GCATTTCCCAATCTTGACTATGCAGAATGCTGTTTATTTGCTGAT
022A(※)	R	ATCAGCAAATAAACAGCATTCTGCATAGTCAAGATTGGGAAATGC

(※) は pEF-BOS/MDA5-C-A18-FLAG 作成時に使用。

2-2. 免疫沈降法

溶液及び緩衝液の組成

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 ₃ VO ₅ , 20 mM Iodoacetamide, 2 mM PMSF
2× SDS sample buffer	125 mM Tris-HCl (pH 6.8) , 35% (w/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, BPB, 7% (v/v) 2-ME

HEK293FT 細胞を 6well プレートに播種し、翌日 Lipofectamin 2000 を用いて発現ベクターのトランスフェクションを行った。24 時間後に細胞を回収し、PBS(-)で洗浄した。細胞は 150 µl の Lysis buffer に懸濁し、氷上で 30 分間静置した。その後 15,000 rpm、4°C、20 分間遠心を行い、上清を回収した。上清に Protein G sepharose (GE Healthcare) を加えて 4°C において 1 時間緩やかに攪拌し、非特異的な吸着を取り除いた。その後 5,000 rpm、4°C、1 分間遠心を行い、上清を回収した。回収した上清に各実験に適した抗体を 1:100 の希釈倍率で添加し、4°C において 2 時間反応させた。その後 Protein G sepharose を加え、4°C において 1 時間から一晩の間、緩やかに攪拌し免疫複合体を吸着させた。Lysis buffer で 4 回洗浄後、各サンプルにつき Lysis buffer 15 µl と 2×SDS sample buffer 15 µl を加えて十分に攪拌し、98°C、5 分間煮沸し、免疫複合体を溶出した。10,000 rpm、4°C、1 分間遠心を行って、得られたサンプルについて SDS-PAGE で分離し、各抗体を用いてウェスタンブロットによってタンパク質を検出した。

2-3. SDS-PAGE、ウェスタンブロット

溶液および緩衝液の組成

Running buffer	25 mM Tris, 190 mM glycine, 0.1% SDS
Blotting buffer	25 mM Tris, 40 mM glycine, 20 % methanol
Blocking buffer	5 % Skimmilk, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)
Rinse buffer	0.1% (v/v) Tween20, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)

抗体

		希釈倍率
Anti-HA pAb	SIGMA	1/1,000
Anti-FLAG(M2) mAb	SIGMA	1/1,000
Anti-MDA5 pAb	Enzo Life Sciences	1/1,000
Anti-RIG-I mAb	LifeSpan BioSciences	1/1,000
Anti-IRF3 mAb	IBL	1/1,000
Anti-phosphorylated IRF3 mAb	IBL	1/1,000
Anti-RIOK3 pAb	SIGMA	1/1,000
Anti- β -actin mAb	SIGMA	1/500
HRP-conjugated secondary antibodies	Biosource	1/40,000

実験目的に応じたアクリルアミドゲル (5-15%) を用いて、35 mA / 1 枚の定電流の条件で電気泳動を行い、サンプルを分離した。分子量マーカーは Prestained XL-Ladder Broad (アプロサイエンス) を用いた。泳動後、メタノール親水処理し Blotting buffer で平衡化した PVDF 膜 (MILLIPORE) へ転写を行った。転写は、Blotting buffer を浸した濾紙を 3 枚ずつ用いて PVDF 膜及びゲルを上下から挟み、100 mA, 75 分の通電により行った。転写後、PVDF 膜を Blocking buffer 中で 1 時間振とうし、各実験に適した一次抗体と常温において 1 時間、または 4°C において一晩反応させた。反応後 Rinse buffer で 10 分間の洗浄を 3 回を行い、HRP 標識二次抗体と室温において 40 分間反応させた。反応後 Rinse buffer で再び 10 分間の洗浄を 3 回を行い、ECL または ECL prime (GE Healthcare) と反応させて、シグナルを検出した。

2-4. Phos-tag SDS-PAGE

HEK293 FT 細胞を 6 well plate に播種し、翌日それぞれの実験に応じた発現ベクターを Lipofectamin 2000 を用いて導入した。24 時間後に細胞を回収し、2-3. に示した手順に則って免疫沈降を行った。Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIAP) 処理を行う際は、免疫複合体の洗浄を 1× CIAP buffer (TAKARA) で 2 回を行い平衡化した後、サンプル 50 ml につき CIAP を 1 ml 加え、37°C において 1 時間反応させた。その後 2× SDS sample buffer を等量加え、98°C で 5 分間煮沸し、免疫複合体を溶出した。10,000 rpm、4°C、1 分間遠心を行って、その上清をサンプルとした。Phos-tag SDS-PAGE は 50-75 mm

Phos-tag (Wako) 及び 100-150 mM MnCl_2 を含む 5-7.5 % アクリルアミドゲルを用いて行った。電気泳動後、Phos-tag アクリルアミドゲルを 10 mM EDTA-blotting buffer で 10 分間の振盪を三回行って、ゲルに含まれるマンガンイオンの除去を行った。その後、EDTA を含まない Blotting buffer で 10 分間の振盪し、ゲルを洗浄した。以降 2-4. に示した手順でウエスタンブロットを行って目的のタンパク質を検出し、泳動度の違いからリン酸化の程度を評価した。

2-5. Native-PAGE

溶液および緩衝液の組成

Lysis buffer for Native-PAGE	50 mM Tris-Cl (pH 8.0) , 1% NP-40, 150 mM NaCl, cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (SIGMA)
2×sample buffer for Native-PAGE	125 mM Tris-Cl (pH 6.8) , 30 % glycerol, BPB
Running buffer for negative electrode	25 mM Tris-Cl (pH 8.4) , 192 mM glycine, 1% DOC
Running buffer for positive electrode	25 mM Tris-Cl (pH 8.4) , 192 mM glycine

各細胞を 6 well plate に播種し、それぞれの実験に応じた処理を施したのちに回収し、PBS(-)で洗浄後、Lysis buffer for Native-PAGE を加えた。on ice にて 5 分静置し、可溶化を行った。その後 4°C において 15,000 rpm, 10 分間遠心し、その上清をサンプルとして用いた。サンプルを等量の 2× sample buffer for Native-PAGE と混合し、そのうち 2 μl を泳動に用いた。ゲルはミニプロティアン TGX ゲル (BIO-RAD) を使用し、負極側、正極側にはそれぞれ Running buffer for negative electrode 200 ml 及び positive electrode 500 ml を加え、40 mA, 30 分間の前泳動を行なった。前泳動の後、25 mA, 50 分間サンプルの泳動を行った。以降 2-4. に示した手順でウエスタンブロットを行い、目的のタンパク質を検出した。

2-6. 定量 PCR

各細胞を 24 well plate に播種し、それぞれの実験に応じた処理を施したのちに回収し、回収した細胞について TRIZOL (Invitrogen) を用いて溶解した。室温にて 5 分間静置したのち、TRIZOL の 1/5 量のクロロホルムを加え、十分攪拌した。さらに室温にて 3 分間静置したのち、12,000 g, 15 分間遠心して水層とクロロホルム層を分離した。水層のみを分取し、等量のイソプロパノールを加え、再び十分攪拌した。室温において 10 分静置したのち、15,000 rpm, 10 分間遠心した。上清を捨て、沈殿を 70%エタノールで洗浄した。十分に風乾させ、水に溶解させたものを抽出 RNA サンプルとした。各サンプルにつき 400 ng の RNA について DNase I (Takara) 処理を 37°C 25 分間行い、その後 25 mM EDTA を各サンプルにつき 1 μ l 加え、80°C, 3 分間の処理を行い、DNase I を失活させた。その後 High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) を用いて random primer により逆転写反応を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型とし、各実験に応じて Step One Real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて Ct 値を測定し、mRNA 量を $\Delta\Delta$ Ct 法により算出した。内部標準として β -actin を用いた。使用した primer の配列を以下に示す。

表 3: 定量 PCR primer list

Target gene		Sequence (5'→3')
Human β -actin	F	CCTGGCACCCAGCACAAT
	R	GCCGATCCACACGGAGTACT
Human RIOK3	F	GTGGGCAGAAAAAGAAATGC
	R	TAACTGCCGCATCAAATGAA
Human RIOK3 Δ	F	TGCCATCAAGAATGCAGAGA
	R	TAACTGCCGCATCAAATGAA
Human MDA5	F	AGAGTGGCTGTTTACATTGCC
	R	GCTGTTCAACTAGCAGTACCTT
Human IFN- β	F	CAACTTGCTTGGATTCTTACAAAG
	R	TATTCAAGCCTCCCATTC AATTG
Human IP-10	F	TCCACGTGTTGAGATCATTGC
	R	GGCCTTCGATTCTGGATTGAG
Human TNF- α	F	TCTTCTCGAACCCCGAGTGA
	R	AGCTGCCCCTCAGCTTGA

Human IFIT-1	F	GCAGCCAAGTTTTACCGAAG
	R	CACCTCAAATGTGGGCTTTT
MV-P	F	CTGCATCACGCAGTGTAATC
	R	CTGGTGGAACCTGGCAAGATC

2-7. 共焦点顕微鏡

溶液および緩衝液の組成

細胞固定液	3%ホルムアルデヒド-PBS(-)
細胞透過処理液	0.2% Triton X100-PBS(-)
ブロッキング液	1% BSA-PBS(-)

抗体

		希釈倍率
Anti-HA pAb	SIGMA	1/1,000
Anti-HA mAb	COVANCE	1/1,000
Anti-FLAG(M2) mAb	SIGMA	1/1,000
Anti-Calnexin pAb	Enzo Life Sciences	1/200
Anti-G3BP mAb	Abcam	1/200
Anti-RIOK3 pAb	SIGMA	1/200
Alexa Fluor [®] -conjugated secondary antibodies	Invitrogen	1/400

カバーガラスを敷いた 12 well plate に HeLa 細胞を播種し、翌日カバーガラスに細胞が付着したのちに、各実験に応じた発現ベクターの導入や poly(I:C)による刺激などを行った。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°C、5% CO₂ 下で 45 分間インキュベートした。続いて培養上清を MitoTracker を含まない培地に置換し、さらに 37°C、5% CO₂ 下で 45 分間インキュベートした。

細胞は PBS(-) にて 3 回洗浄を行ったのち、細胞固定液で 30 分処理した。さらに細胞透過処理液と交換し 15 分処理を行い、PBS(-) で洗浄後、ブロッキング液を加えて室温において 10 時間のブロッキングを行った。液を取り除いたのち、ブロッキング液

で希釈した 1 次抗体を加えて、4°C において一晩反応させた。反応後、PBS(-)で 3 回洗浄し、蛍光標識二次抗体でさらに 30 分反応させた。その後 PBS(-)で 3 回洗浄し、水分を拭き取ったのち、Prolong Gold (Invitrogen) によりスライドグラスに載せ、マニキュアで辺縁を固定した。各サンプルは、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss) にて 63 倍対物レンズを用いて観察した。

2-8. RNA 干渉

HEK293 細胞及び HEK293FT 細胞を 24 well plate (または 6 well plate) に播種し、6 pmol (または 30 pmol) の siRNA を Lipofectamin RNAi max を用いて導入した。ルシフェラーゼレポーターアッセイを行う際には、siRNA と必要に応じた発現ベクターと共に Lipofectamin 2000 を用いて導入した。siRNA を導入した 48 時間後からそれぞれの実験に応じた刺激を行い、随時サンプルを回収した。ノックダウン効率は、mRNA 発現については定量 PCR によって、そしてタンパク質発現についてはウェスタンブロットにより確認した。

siRNA negative control (AM4635)、si RIOK3 (s16728)、及び si MDA5 (s34499) は ambion-Applied Biosystems より購入した。

2-9. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

HEK293 細胞を 24 well plate に播種し、翌日 Lipofectamin 2000 を用いて発現ベクター、レポータープラスミド (p125Luc)、内在性コントロールプラスミド (Renilla luciferase) のトランスフェクションを行った。総プラスミド量は pEF-BOS/Empty ベクターで調整した。Human IFN- β promoter のレポータープラスミドである p125Luc は東京大学谷口維紹教授より供与された。polyI:C で刺激する場合は、各プラスミドのトランスフェクションの 24 時間後に、Lipofectamin 2000 を使用して polyI:C のトランスフェクションを行い、20 時間後にサンプルを回収した。細胞は Passive Lysis Buffer (Promega) で可溶化し、dual-luciferase assay kit (Promega) を使用してルシフェラーゼと Renilla ルシフェラーゼ活性を測定し、pEF-BOS/Empty ベクターのみをトランスフェクションした未刺激のサンプルに対する相対値で示した。各実験は一条件につき 2 ウェルで行い、その平均値に標準偏差を付けて示した。本文中ではレポーターアッセイと表記する。

2-10. CRISPR/Cas9 システムによるノックアウト細胞の構築

HEK293 細胞において CRISPR/Cas9 システムを利用し、以下の手順で目的遺伝子を欠損させた。導入ベクターとしては大阪府立成人病センターの井上徳光部長より供与された pX330-PGK-Puro-3F ベクターを用い、目的遺伝子に応じた guide RNA (gRNA) 配列をこのベクターに組み込んで使用した。pX330-PGK-Puro-3F ベクターは gRNA、Cas9、または Puromycin 耐性遺伝子をコードしており、遺伝子導入後に Puromycin による一過的な薬剤選抜を行うことが可能である。

gRNA 配列の設計については、まずオンラインツールである CRISPR design tool (<https://www.dna20.com/eCommerce/cas9/input>) を利用し、複数の候補配列を得た。その後それらの候補配列について COSMID (<https://crispr.bme.gatech.edu/>) を利用し、オフターゲット切断の候補部位が少ないものをさらに選抜し、実験に用いた。

HEK293 細胞を 24 well plate に播種し、翌日 Lipofectamin 2000 を使用し、目的遺伝子に応じた gRNA が挿入された pX330-PGK-Puro-3F 0.1 µg を遺伝子導入した。48 時間後、終濃度 3 mg/ml の割合で Puromycin (SIGMA) を添加し、さらに 48 時間後に付着細胞を回収した。得られた細胞集団について限界希釈を行い、1 細胞/1well の割合で 96 well plate に播種した。約 2-3 週間後に得られた各細胞株について標的配列近傍のゲノム配列を確認すると共に抗 R1OK3 抗体を用いたウエスタンブロットを行ってタンパクの欠失を確認することにより、ノックアウト細胞のスクリーニングを行った。標的配列及び標的配列近傍のゲノム配列の増幅に用いたプライマーセットを以下に示す。

表 4 : CRISPR-Cas9 標的配列 (R1OK3)

	Target sequence
R1OK3	GGAGTGGCATCGCCTGAGCC

表 5 : 標的配列近傍のゲノム配列の増幅に用いた Primer list (R1OK3)

	Primer sequence
Forward:	GCATGGAGGATGAAAAGGAA
Reverse:	CTCACTGAGGTCAGCATGGA

2-11. *In vitro* kinase assay

まず T7 promoter 配列を付加した PCR 産生物より *in vitro* の系において転写・翻訳を行い、基質となるタンパク質 (MDA5-C-S828-A17) を合成した。合成の過程としては、まず鋳型に pEFBOS/MDA5-C-S828-A17 を用い PCR 反応により T7 promoter 配列を付加した PCR 断片を増幅した。その後、TNT T7 Quick for PCR DNA (Promega) を用いて、30°C、1 時間反応させ、転写及び翻訳を行った。タンパク発現はウエスタンブロットにより確認した。

次に HEK293 FT 細胞に HA tag が付加された RIOK3 を発現ベクターより過剰発現させ、免疫沈降法を用いて RIOK3 タンパクを得た。手順としては、HEK293 FT 細胞を 6 well plate に播種し、翌日 pEFBOS/RIOK3-HA を 400 ng/well となるよう Lipofectamin 2000 を用いて遺伝子導入した。24 時間後に細胞を回収し、Anti-HA pAb を用い、2-3. で示した手順で免疫沈降を行った。

in vitro 合成した MDA5-C-S828-A17 と免疫沈降により得られた RIOK3 を 10× T4 kinase Buffer (TAKARA) 存在下で 37°C において 1 時間反応させた。この反応産物に 2× SDS sample buffer を等量加え、98°C で 5 分間煮沸した。その後 10,000 rpm、4°C、1 分間遠心を行って、その上清をサンプルとし Phos-tag を用いた SDS-PAGE により分離を行った。その後目的に応じた抗体を用いたウエスタンブロットによりタンパク質を検出し、泳動度の違いからリン酸化の程度を評価した。

実験結果

1-2-1. MDA5 は定常状態においてリン酸化されている

Yeast two-hybrid 法を用いたスクリーニングにより、MDA5 の C 末端領域に結合する分子として RIO kinase 3 (RIOK3) を同定した。RIOK3 はセリン・スレオニンリン酸化酵素であるため、MDA5 は RIOK3 によってリン酸化を受けているという仮説を考えた。はじめに MDA5 はリン酸化による修飾を受ける分子であるか、検討を行なった。MDA5 のリン酸化を検出するため、Phos-tag を用いた SDS-PAGE (Phos-tag SDS PAGE) による分離を試みた⁸⁶。Phos-tag は二価の金属イオンと協働しリン酸基を捕捉する機能分子であり、これを SDS-PAGE の分離ゲルに対し二価の金属イオンと共に添加し電気泳動を行うことにより、リン酸化程度に応じてリン酸化・非リン酸化体を分離することが可能となる。リン酸化の程度が高いほど、Phos-tag 分子は数多く結合することができるため、見かけ上の分子量が大きくなり泳動度は減少する。

まず MDA5 全長について Phos-tag SDS-PAGE によってリン酸化状態の検討を行なった。FLAG-tag を付加した MDA5 を HEK293FT 細胞に過剰発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降により MDA5 タンパク質を濃縮した。この濃縮サンプルについて CIAP 処理による脱リン酸化を行なったものと無処理のものを用意し、それぞれ Phos-tag SDS-PAGE により解析した。その結果、CIAP 処理を施した MDA5 タンパク質は無処理 MDA5 タンパク質に比べ、泳動度が上昇した (Fig.1-2-1 A)。また内在性 MDA5 タンパク質についても検討したところ、CIAP 処理によって内在性 MDA5 タンパク質の泳動度が上昇した (Fig.1-2-1 B)。すなわち、MDA5 は定常状態においてリン酸化を受けていることが明らかとなった。

次に RIOK3 は MDA5 C 末端領域に結合する因子であるため、MDA5 C 末端領域がリン酸化を受けるか検討した。FLAG-tag を付加した MDA5-C を過剰発現させ、免疫沈降の後に CIAP 処理を行なったところ、この場合についても無処理のサンプルに比べて泳動度の上昇を認めた (Fig.1-2-1 C)。これらの結果より MDA5 C 末端領域はリン酸化を受けていることが明らかとなった。

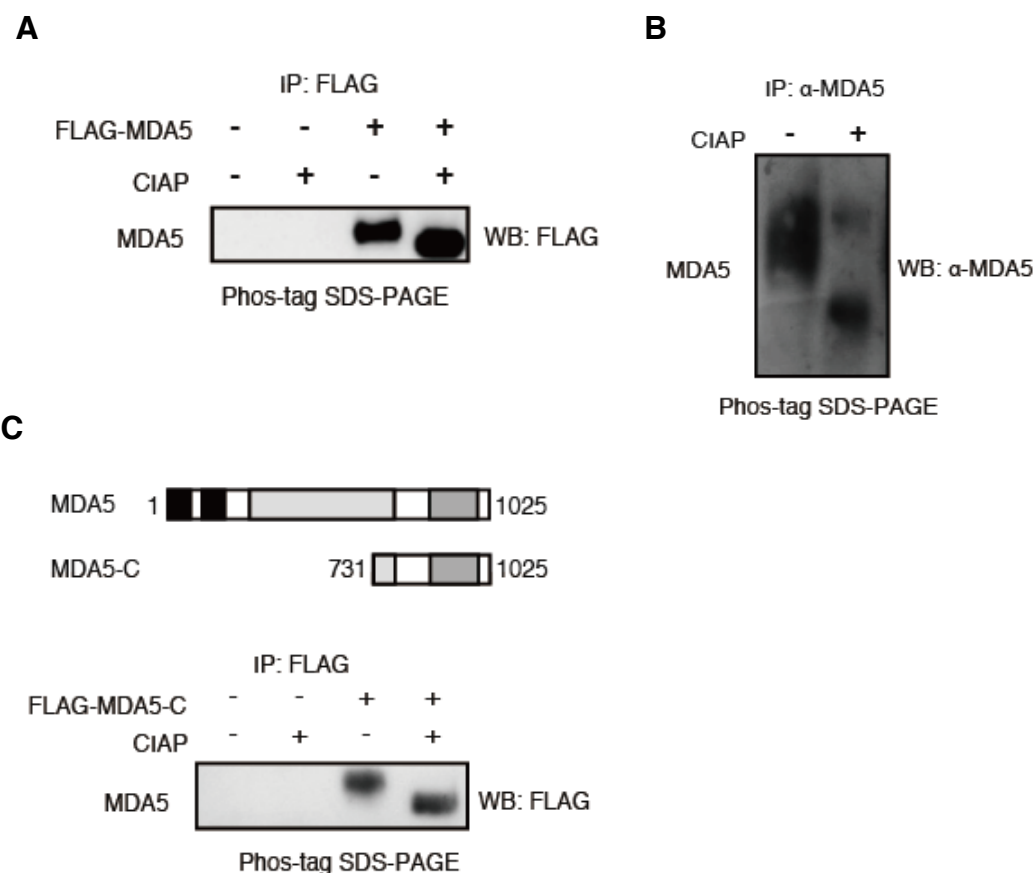


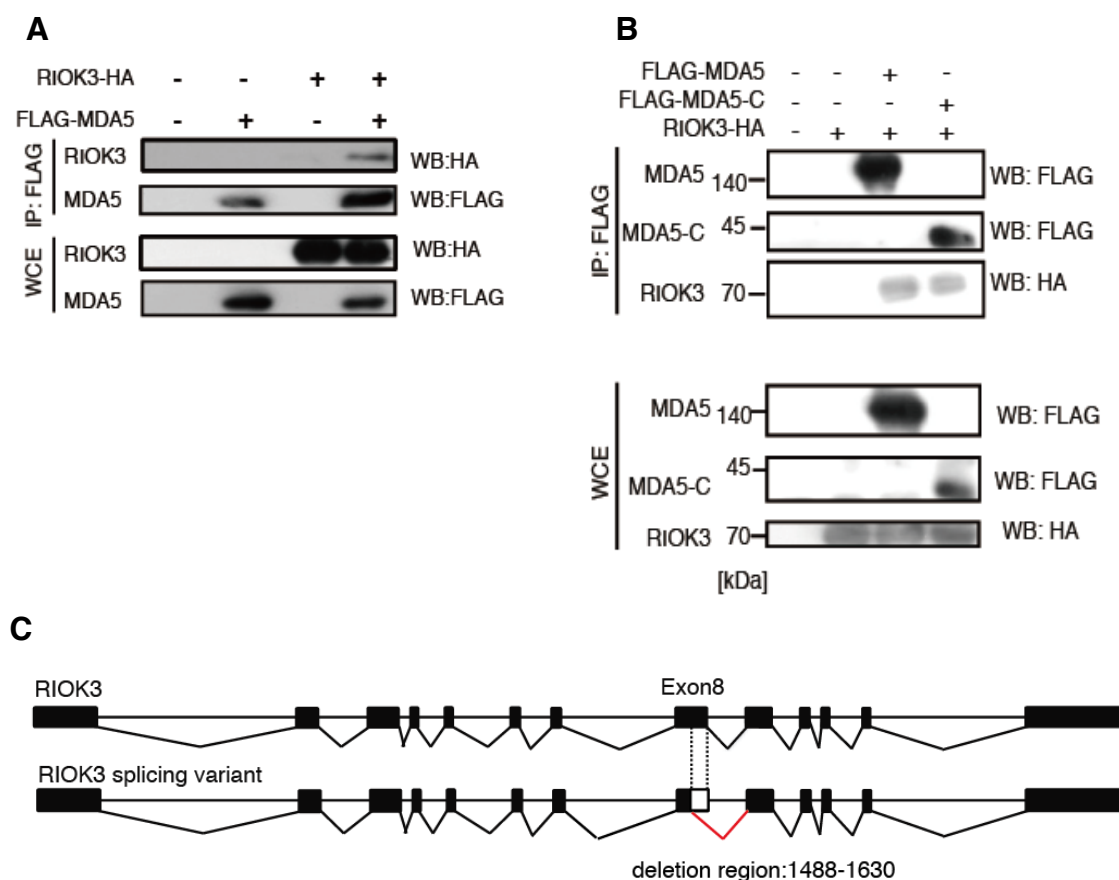
Figure. 1-2-1 MDA5 は定常状態においてリン酸化されている

- (A) HEK293FT 細胞において FLAG-MDA5 を強制発現させ、その細胞可溶化液について抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行なった。得られた免疫複合体について CIAP 処理を行い、サンプルを調整した。その後 Phos-tag を添加した 5% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE (Phos-tag SDS-PAGE) により分離を行い、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロットによってタンパク質を検出した。
- (B) HEK293FT 細胞の細胞可溶化液について抗 MDA5 抗体を用いて免疫沈降を行なった。得られた免疫複合体について CIAP 処理を行い、サンプルを調整した。その後 Phos-tag SDS-PAGE により分離を行い、抗 MDA5 抗体を用いたウェスタンブロットによってタンパク質を検出した。
- (C) HEK293FT 細胞において FLAG-MDA5-C を強制発現させ、その細胞可溶化液について抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行なった。得られた免疫複合体について CIAP 処理を行い、サンプルを調整した。その後 Phos-tag SDS-PAGE により分離を行い、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロットによってタンパク質を検出した。

1-2-2. MDA5 と RIOK3 との哺乳類細胞内での相互作用

RIOK3 と MDA5 の結合が哺乳類細胞内でも生じるか、また全長の MDA5 とも相互作用を示すかを検討するため、それぞれの分子を HEK293 FT 細胞に強制発現させ、免疫沈降を行った。その結果、RIOK3 は哺乳類細胞内においても MDA5 全長及び C 末端領域と相互作用を示すことを確認した (Fig.1-2-2 A, B)。また、RIOK3 のスプライシングバリエーションであるリン酸化ドメイン欠損体 (RIOK3Δ : Fig1-2-2 C) も MDA5 との相互作用を示した (Fig.1-2-2 D)。

次に HA-tag が付加された RIOK3 のみを HEK293 FT 細胞に強制発現させ、内在性の MDA5 との結合を検討した。MDA5 のリガンドである二本鎖 RNA 合成アナログ poly(I:C) による刺激の有無を問わず、内在性 MDA5 と HA-tag が付加された RIOK3 との結合が確認されたが、一方で RLR ファミリーの一つである RIG-I との結合は見られなかった (Fig.1-2-2 E)。以上の結果より、RIOK3 は MDA5 と哺乳類細胞内においても相互作用を示すことが明らかとなった。



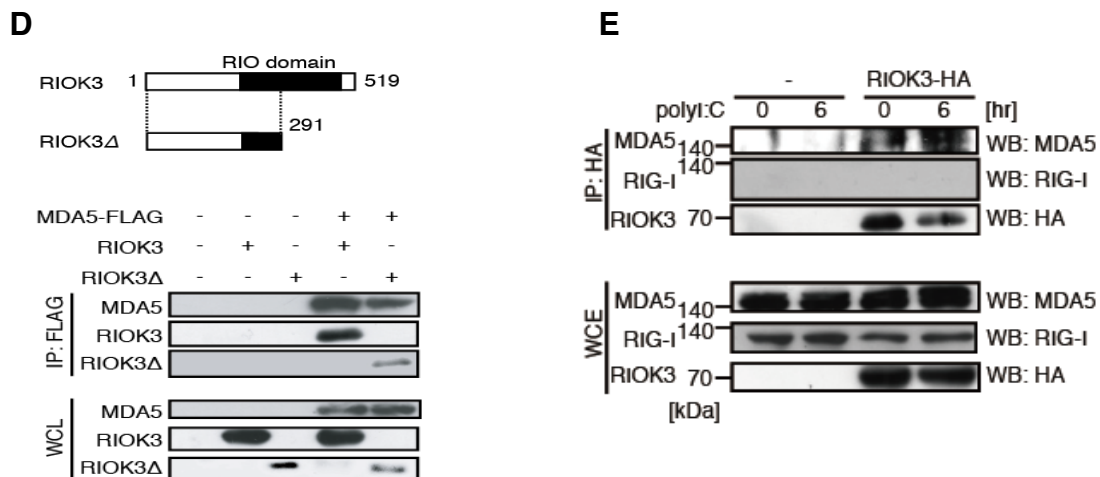
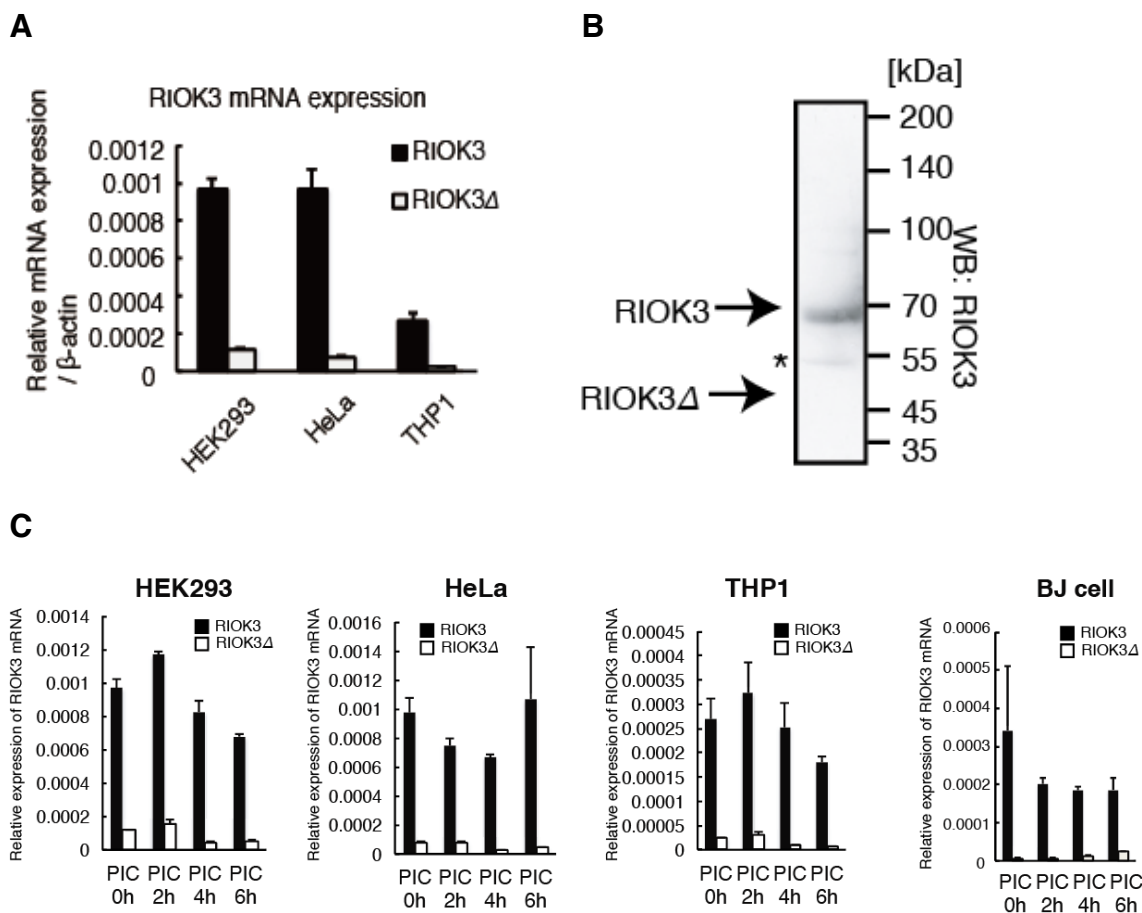


Figure. 1-2-2 RIOK3 と MDA5 との相互作用

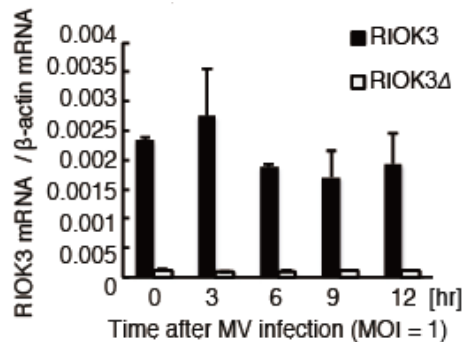
- (A) HEK293FT 細胞において HA-RIOK3 と FLAG-MDA5 とを強制発現させ、その細胞可溶化液について抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行なった。得られた免疫複合体について 7.5%アクリルアミド SDS-PAGE により分離を行い、抗 FLAG 抗体及び抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。
- (B) HEK293FT 細胞において HA-RIOK3 と FLAG-MDA5 及び FLAG-MDA5-C とを強制発現させ、その細胞可溶化液について抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行なった。得られた免疫複合体について 7.5%アクリルアミド SDS-PAGE により分離を行い、抗 FLAG 抗体及び抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。
- (C) RIOK3 及び RIOK3 スプライシングバリエント (RIOK3Δ) のスプライシング部位
- (D) HEK293FT 細胞において HA-RIOK3 及び HA-RIOK3Δ と FLAG-MDA5 とを強制発現させ、その細胞可溶化液について抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行なった。得られた免疫複合体について 7.5%アクリルアミド SDS-PAGE により分離を行い、抗 FLAG 抗体及び抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。
- (E) HEK293FT 細胞において HA-RIOK3 を強制発現させ、その後 polyI:C によって 6 時間の刺激を行なった。その細胞可溶化液について抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行なった。得られた免疫複合体について 7.5%アクリルアミド SDS-PAGE により分離を行い、抗 HA 抗体、抗 MDA5 抗体及び抗 RIG-I 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。

1-2-3. 各種細胞における RIOK3 の発現

次に RIOK3 の発現について確認するため、各細胞株より RNA を抽出し、逆転写反応により得られた cDNA を用いて定量 PCR を行った。HEK293 細胞及び HeLa 細胞において、THP-1 細胞に比べ、RIOK3 mRNA の高発現を認めた (Fig.1-2-3 A)。RIOK3 のスプライシングバリエーションである RIOK3 Δ の mRNA レベルでの発現は各種細胞において全長の RIOK3 の発現に比べ非常に低く (Fig.1-2-3 A)、内在性 RIOK3 Δ のタンパクを検知することはできなかった (Fig.1-2-3 B)。また、poly(I:C)による刺激や麻疹ウイルス (Measles virus: MV) 感染によって RIOK3 の mRNA レベルでの発現は誘導されなかった。(Fig.1-2-3 C,D) 一方で、ヒト初代線維芽細胞株 BJ 細胞において MV を感染させたところ、RIOK3 のタンパク質レベルでの緩やかな発現上昇が認められた (Fig.1-2-3 E)。以上の結果より RIOK3 は dsRNA による刺激によって mRNA レベルでは発現の誘導を受けないが、タンパク質レベルにおいて発現の誘導を受け得ることが示唆された。



D



E

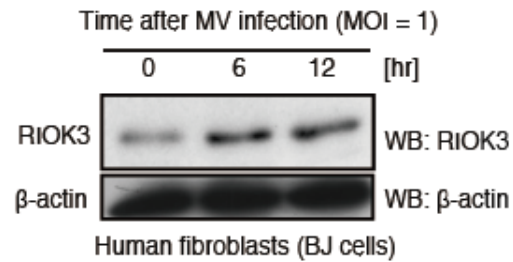
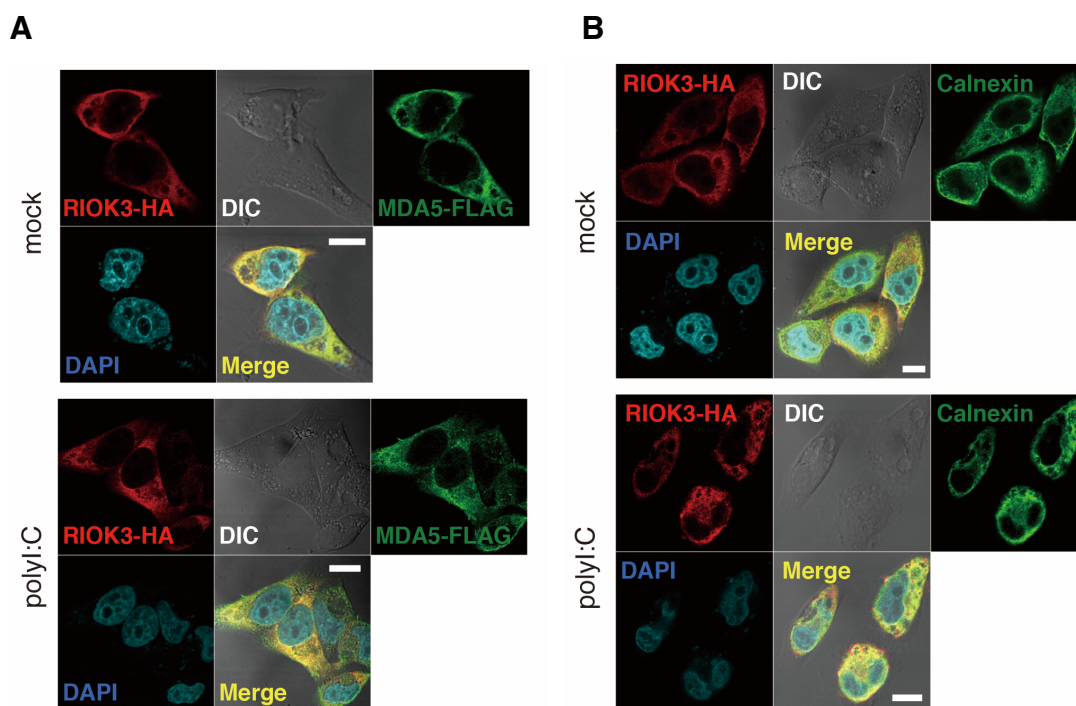


Figure. 1-2-3 各種細胞における RIOK3 の発現

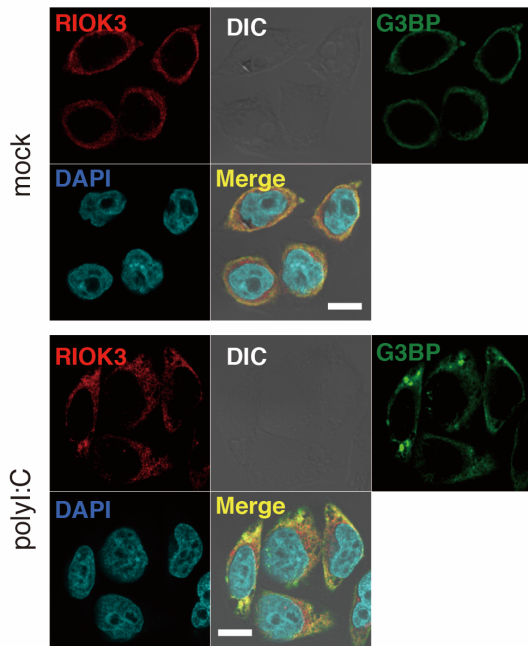
- (A) HEK293、HeLa、THP1 細胞より RNA を抽出し、RT-qPCR により RIOK3 及び RIOK3Δ の mRNA 量を評価した。β-actin を内部標準として、その発現量の比を示した。
- (B) HEK293FT 細胞の細胞可溶化液を用いて、SDS-PAGE によって分離を行い、抗 RIOK3 抗体を用いたウエスタンブロットにより、RIOK3 及び RIOK3Δ タンパクの検出を行なった。*は非特異的なバンドを示している。
- (C) HEK293、HeLa、THP1 細胞、BJ 細胞において polyI:C (100ng/well) による 0、2、4、6 時間の刺激を行なった。各細胞より RNA を抽出し、RT-qPCR により RIOK3 及び RIOK3Δ の mRNA 量を評価した。β-actin を内部標準として、その発現量の比を示した。
- (D) HEK293 細胞において Moi=1 で MV を感染させ、0、3、6、9、12 時間後にそれぞれの感染細胞より RNA を抽出し、RT-qPCR により RIOK3 及び RIOK3Δ の mRNA 量を評価した。β-actin を内部標準として、その発現量の比を示した。
- (E) BJ 細胞において Moi=1 で MV を感染させ、0、6、12 時間後にそれぞれの感染細胞を可溶化し、SDS-PAGE により分離を行なった。その後、抗 RIOK3 抗体及び抗 β-actin 抗体を用いたウエスタンブロットによりタンパク質を検出した。

1-2-4. RIOK3 の細胞内局在

RIOK3 の局在について HeLa 細胞を用い、共焦点顕微鏡による観察を行った。RIOK3 タンパク質は poly(I:C) 刺激の有無を問わず細胞質内に局在し、MDA5 (Fig.1-2-4 A) 及び、小胞体マーカーである Calnexin と部分的に共局在することを確認した (Fig.1-2-4 B)。また刺激時には RIOK3 タンパク質は点状に集積し、stress granules マーカーである Ras-GAP SH3 domain binding protein (G3BP) と共局在することを確認した (Fig.1-2-4 C)。stress granules は RLRs が dsRNA を認識する部位であることが示唆されている。一方で RIOK3 はミトコンドリアマーカーである MitoTracker との共局在は認められず (Fig.1-2-4 D)、ミトコンドリア上には局在しないことが示唆された。



C



D

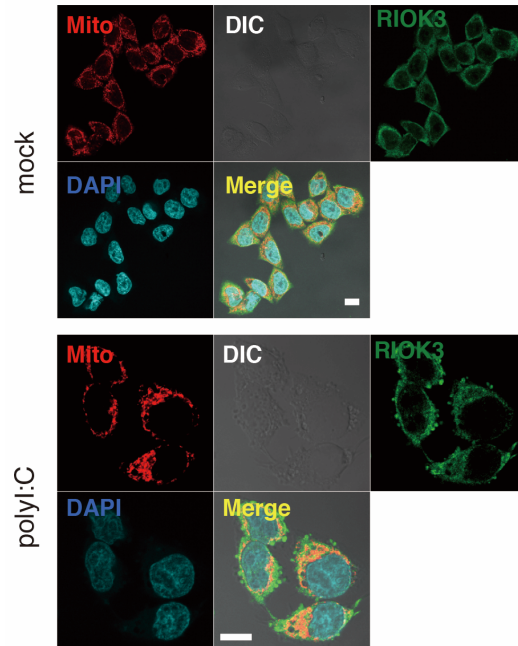


Figure. 1-2-4 RIOK3 の細胞内局在

- (A) HeLa 細胞において HA-RIOK3 及び FLAG-MDA5 を強制発現させ、その後 polyI:C (100 ng/well) によって 0、4 時間の刺激を行なった。抗 HA 抗体及び抗 FLAG 抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。
- (B) HeLa 細胞において HA-RIOK3 を強制発現させ、その後 polyI:C (100 ng/well) によって、4 時間の刺激を行なった。抗 HA 抗体及び抗 Calnexin 抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。
- (C) HeLa 細胞において polyI:C (100 ng/well) によって 0、4 時間の刺激を行なった。抗 RIOK3 抗体及び抗 G3BP 抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。
- (D) HeLa 細胞において polyI:C (100 ng/well) によって 0、4 時間の刺激を行なった。回収 90 分前より 45 分間 Mitotracker と反応させ、その後培養液を交換してさらに 45 分間インキュベートし、サンプルを回収した。抗 RIOK3 抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。それぞれの図において上段は無刺激時、そして下段は polyI:C 刺激時の像である。スケールバーは 10 μ m を示している。

1-2-5. RIOK3 の MDA5 のリン酸化への関与

MDA5 のリン酸化に RIOK3 が関与するかを検討した。まず MDA5 と共に RIOK3 を強制発現させ、免疫沈降による濃縮の後、Phos-tag SDS-PAGE によるリン酸化の検出を行なったところ、RIOK3 の共発現によって MDA5 のリン酸化体の量が増加した (Fig.1-2-5 A)。逆に RIOK3 siRNA を用いた RNA 干渉により内在性 RIOK3 をノックダウンし、内在性 MDA5 のリン酸化状態について検討したところ、RIOK3 のノックダウンにより内在性 MDA5 のリン酸化状態の低下を認めた (Fig.1-2-5 B)。これらの結果より RIOK3 は MDA5 のリン酸化に関与していることが示された。

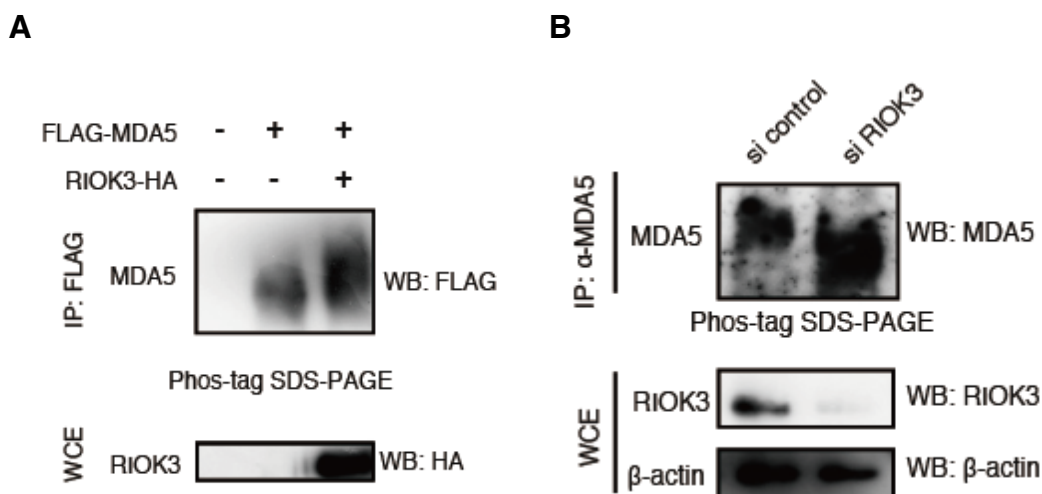


Figure. 1-2-5 RIOK3 は MDA5 のリン酸化に関与する

- (A) HEK293FT 細胞において FLAG-MDA5 及び HA-RIOK3 を強制発現させ、その細胞可溶化液について抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行なった。得られた免疫複合体について Phos-tag SDS-PAGE 及び通常の SDS-PAGE により分離を行い、抗 FLAG 抗体及び抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。
- (B) HEK293FT 細胞において Control siRNA 及び RIOK3 siRNA を導入しノックダウンを行い、その 48 時間後にそれぞれの細胞について可溶化した。その後抗 MDA5 抗体を用いて免疫沈降を行なった。得られた免疫複合体について Phos-tag SDS-PAGE 及び通常の SDS-PAGE により分離を行い、抗 MDA5 抗体、抗 RIOK3 抗体及び抗 β -actin 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。

1-2-6. MDA5 を介するシグナル伝達経路に対する RIOK3 の作用

次に RIOK3 の MDA5 を介するシグナル伝達経路に対する作用を検討した。まず HEK293 細胞に対し MDA5 と RIOK3 を強制発現させ、IFN- β プロモーター活性についてレポーターアッセイにより確認した。その結果、RIOK3 を共発現させることにより用量依存的に MDA5 由来の IFN- β プロモーター活性が減少した (Fig.1-2-6 A, B)。一方で、MDA5 の下流に当たるアダプター分子 MAVS を発現させた場合、RIOK3 を共発現させても MAVS 由来の IFN- β プロモーター活性は影響を受けなかった (Fig.1-2-6 C)。また RIOK3 のリン酸化ドメインである RIO domain を欠いたスプライシングバリエーションである RIOK3 Δ は、MDA5 由来の IFN- β プロモーター活性を抑制することができなかった (Fig.1-2-6 D)。これらの結果より RIOK3 は MDA5 を介したシグナル経路を抑制し、その抑制には RIOK3 のリン酸化ドメインの存在が重要であることが示唆された。

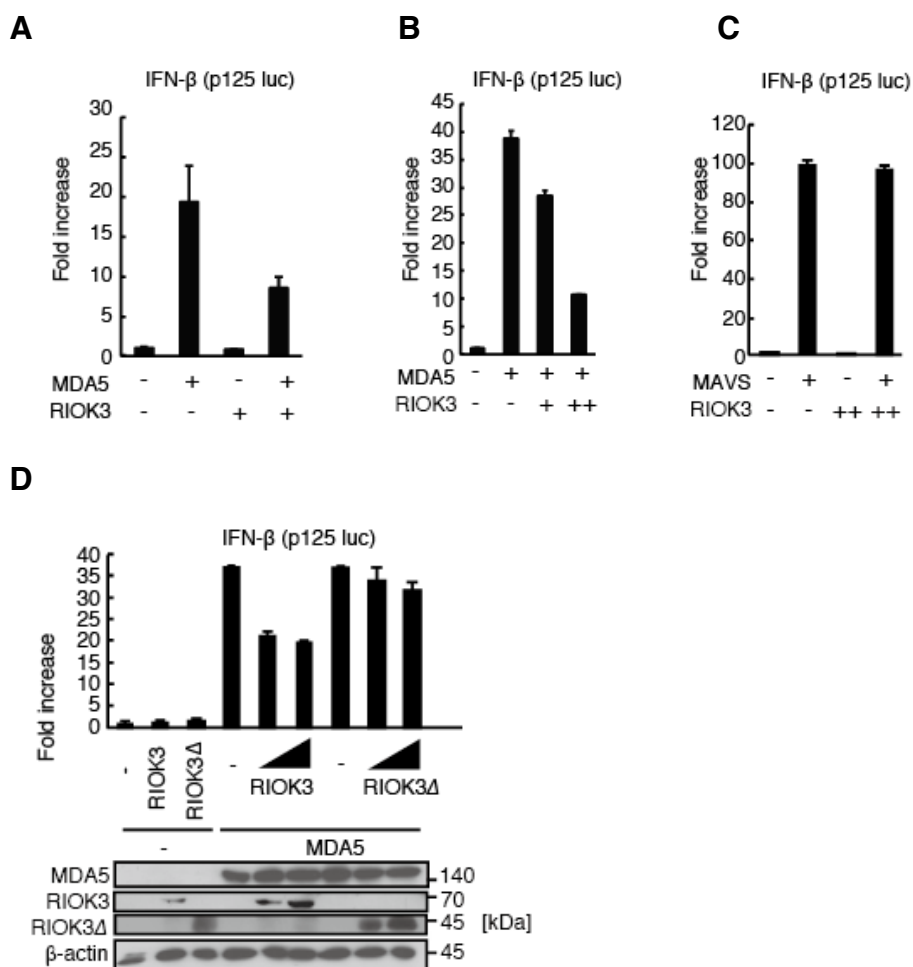


Figure. 1-2-6 RIOK3 は MDA5 の抑制因子である

- (A) HEK293 細胞において p125Luc、レニラプラスミドと MDA5 発現ベクター (100 ng/well) 及び RIOK3 発現ベクター (100 ng/well) を導入し、その 24 時間後に細胞を回収した。レポーターアッセイにより IFN- β プロモーター活性を評価した。
- (B) HEK293 細胞において p125Luc、レニラプラスミドと MDA5 発現ベクター (100 ng/well) 及び RIOK3 発現ベクター (100、200 ng/well) を導入し、その 24 時間後に細胞を回収した。レポーターアッセイにより IFN- β プロモーター活性を評価した。
- (C) HEK293 細胞において p125Luc、レニラプラスミドと MAVS 発現ベクター (100 ng/well) 及び RIOK3 発現ベクター (100 ng/well) を導入し、その 24 時間後に細胞を回収した。レポーターアッセイにより IFN- β プロモーター活性を評価した。
- (D) HEK293 細胞において p125Luc、レニラプラスミド、MDA5 発現ベクター (100 ng/well) と RIOK3 発現ベクター (100、200 ng/well) 及び RIOK3 Δ 発現ベクター (100、200 ng/well) を導入し、その 24 時間後に細胞を回収した。レポーターアッセイにより IFN- β プロモーター活性を評価した。また、その細胞可溶化液について SDS-PAGE によって分離を行い、抗 FLAG 抗体、抗 HA 抗体、抗 β -actin 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。

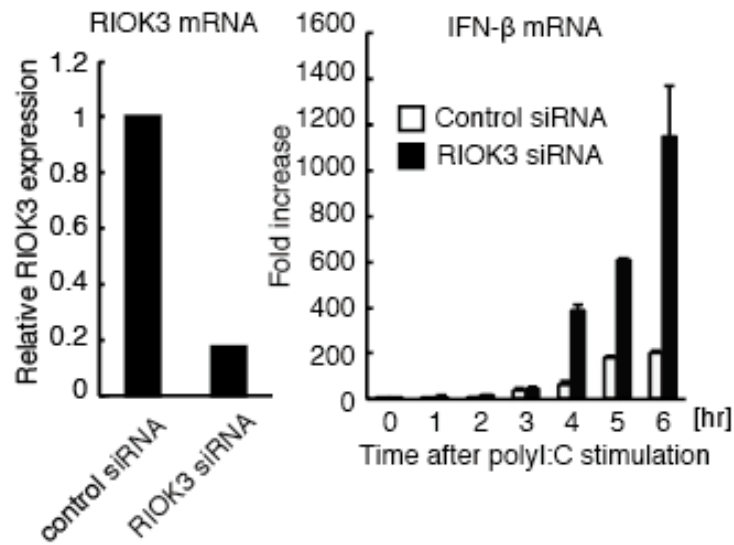
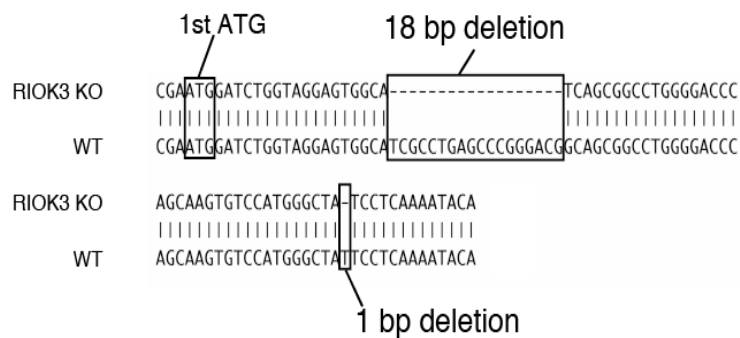
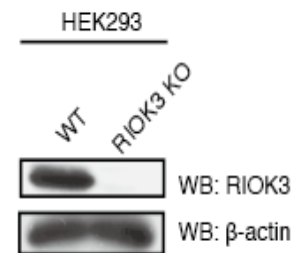
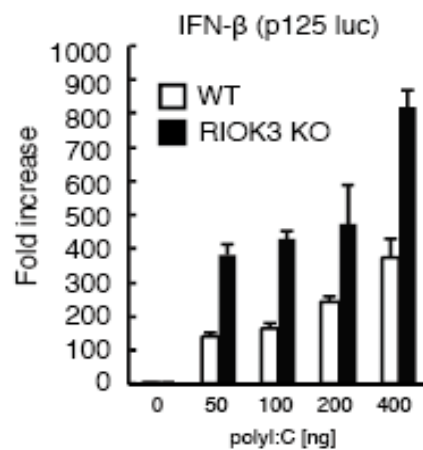
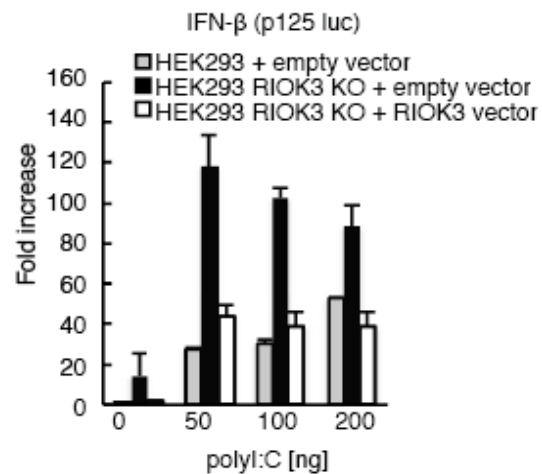
1-2-7. RIOK3 ノックダウン及びノックアウト細胞における dsRNA 刺激への応答

MDA5 シグナル経路への RIOK3 の生理的な作用を検討するため、RNA 干渉によるノックダウンを行った。RIOK3 siRNA 処理により内在性 RIOK3 をノックダウンし、MDA5 のリガンドである polyI:C を用いて刺激を行ったところ、ネガティブコントロール群に比べ RIOK3 ノックダウン群において著明な IFN- β mRNA の発現上昇を認めた (Fig.1-2-7 A)。

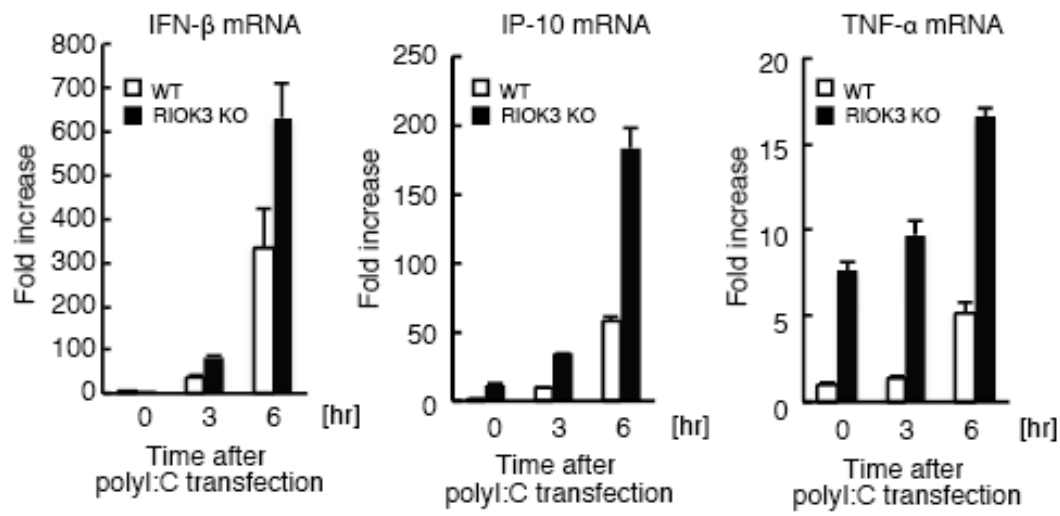
さらに我々は CRISPR/Cas9 システムを用いて RIOK3 ノックアウト HEK293 細胞 (RIOK3 KO-HEK293 細胞) を樹立し、RIOK3 の作用について詳細な解析を行った。この細胞には *Riok3* 遺伝子の Exon1 領域にフレームシフトをきたす変異が生じており (Fig.1-2-7 B)、ウエスタンブロットにより内在性の RIOK3 タンパク質が欠失していることを確認している (Fig.1-2-7 C)。RIOK3 KO-HEK293 細胞を polyI:C で刺激したところ、WT-HEK293 細胞の場合に比べ、IFN- β プロモーター活性の上昇を認めた (Fig.1-2-7 D)。また RIOK3 KO-HEK293 細胞に対し、発現プラスミドにより RIOK3 の発現を回復させると、その IFN- β プロモーター活性の上昇はキャンセルされた (Fig.1-2-7 E)。また RIOK3 を欠失させることにより、polyI:C 刺激に対する IFN- β 、IP-10、TNF- α mRNA の発現がさらに上昇することが明らかになった (Fig.1-2-7 F)。さらに IFN- β mRNA の転写に必須の転写因子である IRF-3 の活性化についても検討した。IRF-3 はリン酸化されて活性化することより二量体を形成し、核へと移行し転写因子として機能する⁸⁷。RIOK3 KO-HEK293 細胞に対し polyI:C 刺激を行ったところ、WT-HEK293 細胞の場合に比べ、リン酸化された IRF-3 タンパク質が増加していることが明らかとなった (Fig.1-2-7 G)。

次にウイルス感染時における RIOK3 の役割を検討した。MDA5 によって認識されるような MV (Nagahata 株)⁸⁰ を RIOK3 KO-HEK293 細胞に感染させたところ、WT-HEK293 細胞に比べて、IFN- β 、IP-10、IFIT-1 mRNA の発現上昇を認めた (Fig.1-2-7 H)。一方で RIG-I によって認識されるようなセンドイウイルス (SeV) を感染させたところ、RIOK3 を欠損させた影響はみられなかった (Fig.1-2-7 I)。なお RIOK3 KO-HEK293 細胞において MDA5 をノックダウンした場合、polyI:C 刺激への応答は消失したため (Fig.1-2-7 J)、RIOK3 KO 細胞で見られる作用は MDA5 経路に依存していることも確認された。また RIOK3 KO-HEK293 細胞に MV を感染させ、MV のウイルス RNA を継時的に定量したところ、WT-HEK293 細胞に感染させた場合に比べて、ウイルス RNA の増殖は非常に抑えられていた (Fig.1-2-7 K)。

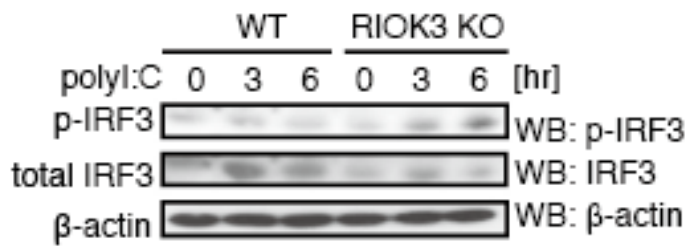
これらの結果より、RIOK3 は polyI:C 刺激や RNA ウイルス感染に対する MDA5 を介したシグナル応答を抑制していることが明らかとなった。

A**B****C****D****E**

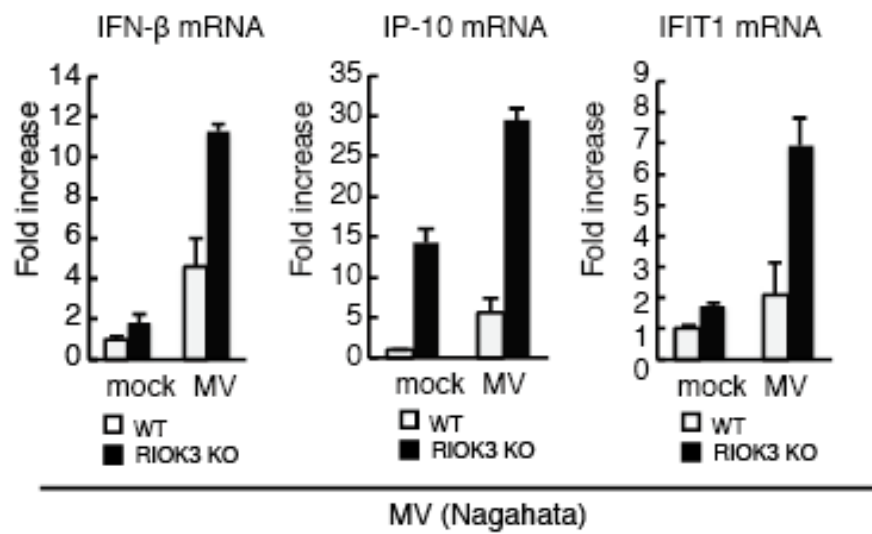
F



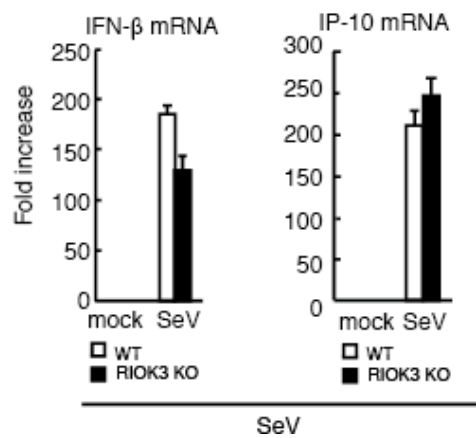
G



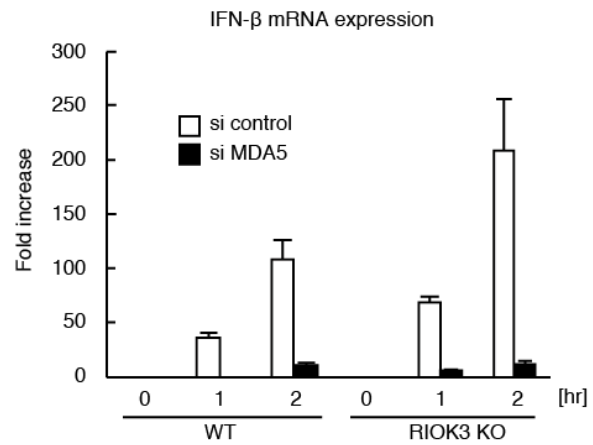
H



I



J



K

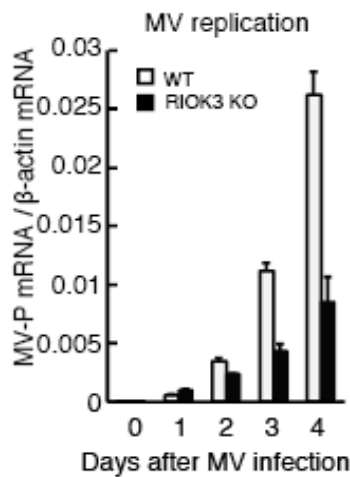


Figure. 1-2-7 RIOK3 は dsRNA 刺激に対する MDA5 経路の応答を抑制する

(A) HEK293 細胞において Control siRNA 及び RIOK3 siRNA を導入し、48 時間後に細胞を回収した。RNA を抽出し、RT-qPCR 法によって RIOK3 mRNA のノックダウン効率について確認した。(左図)

HEK293 細胞において Control siRNA 及び RIOK3 siRNA を導入し、その 48 時間後より polyI:C (100 ng/well) の導入により 0、1、2、3、4、5、6 時間の刺激を行なった。その後 RNA を抽出し、RT-qPCR 法によって IFN-β mRNA の発現量を評価した。β-actin を内部標準とし、その発現量の比を示した。(右図)

(B) *RioK3* 遺伝子の Exon1 領域を標的とし、CRISPR-Cas9 システムにより RIOK3 KO-HEK293 細胞を構築した。図は CRISPR-Cas9 システムにより引き起こされた塩基欠損部位を示している。これらの塩基欠損によりフレームシフトが生じている。

- (C) WT-HEK293 及び R1OK3 KO-HEK293 細胞の細胞可溶化液について SDS-PAGE によって分離を行い、抗 R1OK3 抗体及び抗 β -actin 抗体を用いたウェスタンブロットによってタンパク質の検出を行なった。
- (D) WT-HEK293 及び R1OK3 KO-HEK293 細胞において p125Luc、レニラプラスミドを導入した。その 24 時間後に polyI:C (0、50、100、200、400 ng/well) をさらに導入し、20 時間の刺激を行った後に細胞を回収した。レポーターアッセイにより IFN- β プロモーター活性を評価した。
- (E) WT-HEK293 及び R1OK3 KO-HEK293 細胞において p125Luc、レニラプラスミド、Empty vector (pEFBOS) 及び R1OK3 発現ベクターを 200 ng/well 導入した。その 24 時間後に polyI:C (0、50、100、200 ng/well) をさらに導入し、20 時間の刺激を行った後に細胞を回収した。レポーターアッセイにより IFN- β プロモーター活性を評価した。
- (F) WT-HEK293 及び R1OK3 KO-HEK293 細胞において polyI:C (100 ng/well) の導入により 0、3、6 時間の刺激を行なった。各細胞より RNA を抽出し、RT-qPCR 法によって IFN- β 、IP-10 及び TNF- α mRNA の発現量を評価した。 β -actin を内部標準とし、その発現量の比を示した。
- (G) WT-HEK293 及び R1OK3 KO-HEK293 細胞において polyI:C (100 ng/well) の導入により 0、3、6 時間の刺激を行なった。各細胞について可溶化を行い、SDS-PAGE によって分離した。その後、抗 IRF3 抗体、抗リン酸化 IRF3 (p-IRF3) 抗体、及び抗 β -actin 抗体を用いたウェスタンブロットによってタンパク質を検出した。
- (H) WT-HEK293 及び R1OK3 KO-HEK293 細胞において、麻疹ウイルス (MV) を $\text{Moi}=1$ で感染させた。24 時間後に細胞を回収し、RNA を抽出した。RT-qPCR 法によって IFN- β 、IP-10 及び IFIT-1 mRNA の発現量を評価した。 β -actin を内部標準とし、その発現量の比を示した。
- (I) WT-HEK293 及び R1OK3 KO-HEK293 細胞において、センダイウイルス (SeV) を $\text{Moi}=1$ で感染させた。24 時間後に細胞を回収し、RNA を抽出した。RT-qPCR 法によって IFN- β 及び IP-10 mRNA の発現量を評価した。 β -actin を内部標準とし、その発現量の比を示した。
- (J) WT-HEK293 及び R1OK3 KO-HEK293 細胞において、Control siRNA 及び MDA5 siRNA を導入し、ノックダウンを行なった。その 48 時間後より polyI:C (100 ng/well) の導入によって 0、1、2 時間の刺激を行い、細胞を回収した。各細胞より RNA を抽出し、RT-qPCR によって IFN- β mRNA の発現量を評価した。 β -actin を内部標準とし、その発現量の比を示した。
- (K) WT-HEK293 及び R1OK3 KO-HEK293 細胞において、麻疹ウイルス (MV) を $\text{Moi}=1$ で感染させた。1、2、3、4 日後に細胞を回収し、RNA を抽出した。RT-qPCR 法によって MV-P mRNA の発現量を評価した。 β -actin を内部標準とし、その発現量の比を示した。

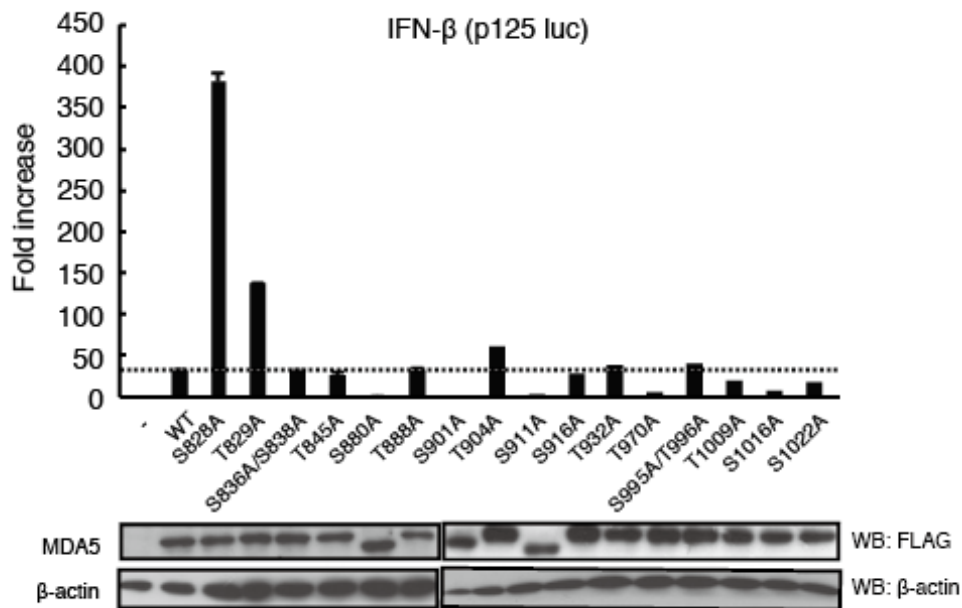
1-2-8. MDA5 C 末端領域におけるリン酸化部位 Ser-828 の同定

これまでの実験結果よりセリン・スレオニンリン酸化酵素である RIOK3 は MDA5 C 末端領域に結合し、MDA5 のリン酸化に寄与していることが明らかになった。また RIOK3 はそのリン酸化酵素活性依存的に MDA5 を介するシグナル伝達を抑制していることが示唆された。したがって RIOK3 は MDA5 C 末端領域をリン酸化することにより、MDA5 を介するシグナル伝達を抑制していると予想された。

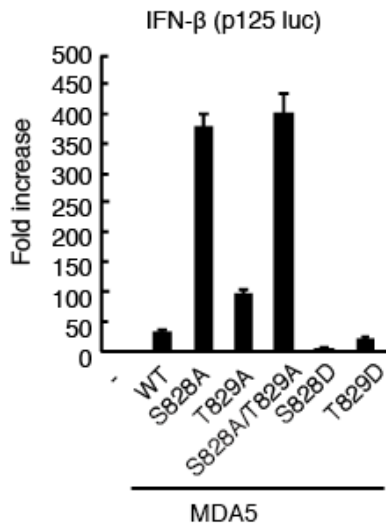
そこで我々は MDA5 由来のシグナル活性制御に関与するリン酸化部位の同定を目的とし、site-directed mutagenesis により MDA5 C 末端領域に存在するセリン (Ser)・スレオニン (Thr) 残基をアラニン (Ala) に置換した各種変異体を構築した。RIOK3 が関与する MDA5 のリン酸化部位が Ala に置換されていた場合、RIOK3 によるリン酸化を受けることができず、MDA5 由来のシグナル活性は上昇することが予想された。

我々はこれらの変異体を HEK293 細胞に強制発現させて IFN- β プロモーター活性を確認した。その結果、MDA5 Ser-828 を Ala に置換した MDA5 S828A 変異体を強制発現させた際に、WT 及び他の変異体に比べ、非常に強い IFN- β プロモーター活性の上昇を認めた (Fig.1-2-8 A)。また Ser-828 に隣接する Thr-829 を Ala 置換した T829A 変異体を用いた際にも、緩やかな IFN- β プロモーター活性の上昇を認めた (Fig.1-2-8 A)。次に我々はこれらの部位について、恒常的なリン酸化を模倣するようなアスパラギン酸置換体を作成し、さらに解析を行った。その結果、Ser-828 をアスパラギン酸置換した S828D 変異体を強制発現させたところ、WT の MDA5 に比べ IFN- β プロモーター活性が顕著に減少していることが明らかとなった。一方で T829D 変異体を発現させた場合では、IFN- β プロモーター活性の減少は緩徐であった (Fig.1-2-8 B, C)。これらの結果より MDA5 Ser-828 のリン酸化は MDA5 のシグナル活性の制御に寄与することが明らかとなった。

A



B



C

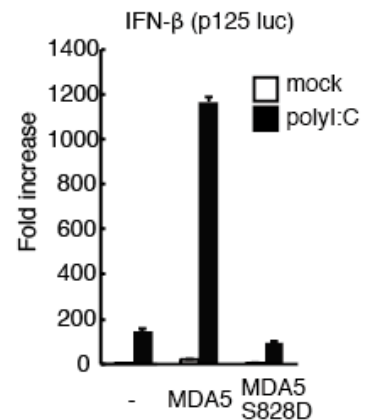


Figure. 1-2-8 MDA5 C 末端領域におけるリン酸化部位 Ser-828 の同定

(A) HEK293 細胞において p125Luc、レニラプラスミドと各種 MDA5 の変異体 (100 ng/well) を導入し、その 24 時間後に細胞を回収した。レポーターアッセイにより IFN-β プロモーター活性を評価した。また、その細胞可溶化液について SDS-PAGE によって分離を行い、抗 FLAG 抗体及び抗β-actin 抗体を用いたウェスタンブロットによってタンパク質を検出した。

- (B) HEK293 細胞において p125Luc、レニラプラスミドと MDA5 Ser-828、Thr-829 についての各種変異体 (100 ng/well) を導入し、その 24 時間後に細胞を回収した。レポーターアッセイにより IFN- β プロモーター活性を評価した。
- (C) HEK293 細胞において p125Luc、レニラプラスミドと MDA5 WT 及び S828D 変異体 (100 ng/well) を導入した。その 24 時間後に polyI:C (100 ng/well) の導入によって 20 時間の刺激を行い、細胞を回収した。レポーターアッセイにより IFN- β プロモーター活性を評価した。

1-2-9. RIOK3 の MDA5 Ser-828 リン酸化への関与

この MDA5 Ser-828 のリン酸化に RIOK3 が関与するか検討した。まず MDA5 WT 及び S828A 変異体をそれぞれ RIOK3 とともに HEK293 細胞に強制発現させ、IFN- β プロモーター活性の変化を観察した。その結果、MDA5 WT と共に RIOK3 を発現させた際は、以前の結果と同様に RIOK3 の容量依存的に MDA5 を介する IFN- β プロモーター活性が減少した。しかし MDA5 S828A 変異体と共に RIOK3 を発現させた際は、RIOK3 の容量を増加させた場合においても MDA5 由来の IFN- β プロモーター活性の減少は見られなかった (Fig.1-2-9 A)。

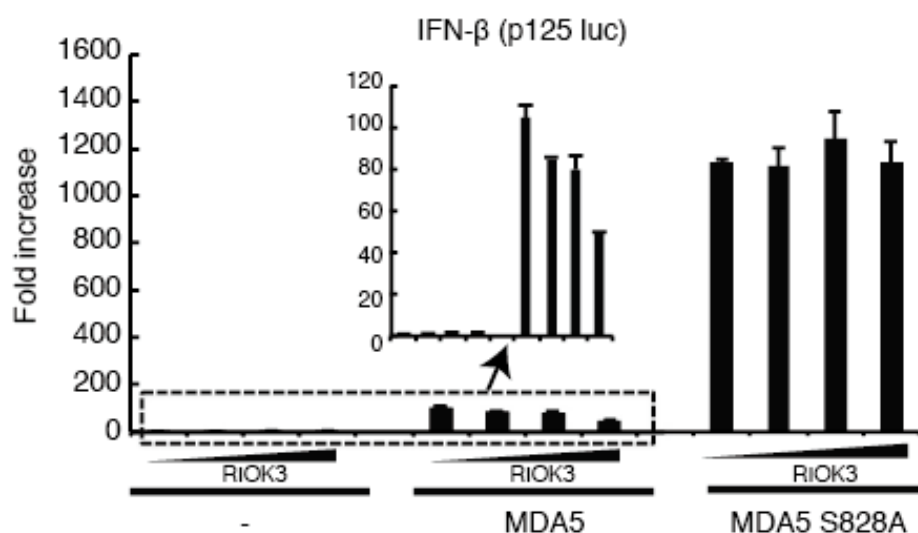
次に Phos-tag SDS-PAGE を用いて MDA5 S828A 変異体の RIOK3 によるリン酸化状態の変化の有無について検討した。MDA5 S828A 変異体と RIOK3 とを HEK293FT 細胞に強制発現させ、免疫沈降による濃縮の後、Phos-tag SDS-PAGE を行った。その結果、MDA5 WT と RIOK3 とを共発現させた場合は、MDA5 タンパクの泳動度は低下し、リン酸化レベルの増加を認めたが、一方で MDA5 S828A 変異体と RIOK3 を共発現させた場合には MDA5 S828A タンパクのリン酸化レベルに変化は認められなかった (Fig.1-2-9 B)。以上の結果より、MDA5 Ser-828 のリン酸化に RIOK3 が関与していることが示唆された。

さらに MDA5 Ser-828 のリン酸化について詳細な解析を行うため、我々は MDA5 CTD (826-1025 aa) に存在する 18 個の Ser、Thr について Ala に置換した変異体 (MDA5-C-A18) を作成した (Fig.1-2-9 C)。Phos-tag SDS-PAGE 用いた解析により MDA5-C-A18 変異体は MDA5-C に比べ、リン酸化レベルが著しく減少していることが明らかとなった (Fig.1-2-9 D)。次に Ser-828 以外の MDA5 CTD (826-1025 aa) に存在する Ser/Thr を Ala に置換した MDA5-C-S828-A17 変異体を作成した (Fig.1-2-9 C)。MDA5-C-S828-A17 変異体と RIOK3 を共発現させ通常の SDS-PAGE を行ったところ、MDA5-C-S828-A17 変異体のバンドの移動が認められ、リン酸化が生じていることが示唆された (Fig.1-2-9 E)。またこのバンドの移動は CIAP 処理により消失することが

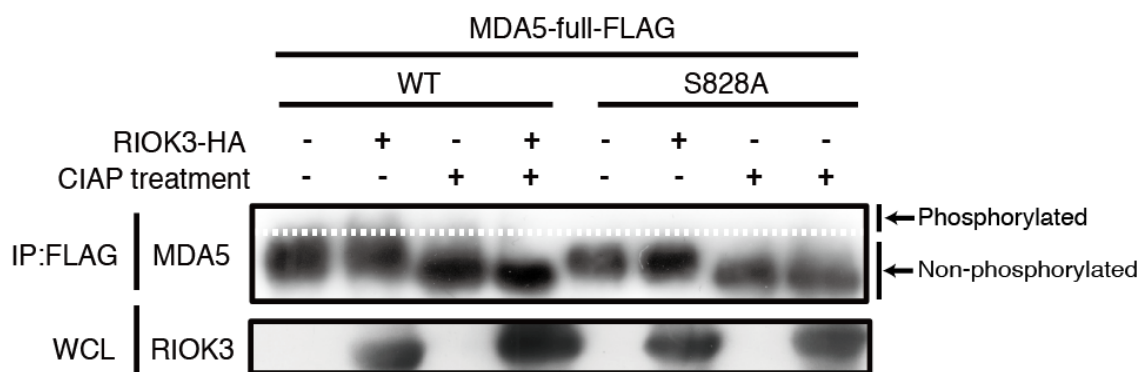
確認されたので (Fig.1-2-9 F)、この移動はリン酸化により生じたものであることが示された。またこの RIOK3 による MDA5-C-S828-A17 変異体のリン酸化は polyI:C 刺激により継時的に減少していくことも明らかとなった (Fig.1-2-9 G)。

さらに RIOK3 が MDA5 Ser-828 のリン酸化を担っていることを確かめるため、*In vitro* kinase assay を行った。まず RIOK3 と RIOK3Δ を HEK293FT 細胞に強制発現させ、免疫沈降を行って濃縮した。次に *In vitro* において合成された MDA5-C-S828-A17 タンパクを RIOK3 または RIOK3Δ と反応させ、Phos-tag SDS-PAGE を行ったところ、RIOK3 と共発現させた際にのみ MDA5-C-S828-A17 変異体のリン酸化レベルの亢進を認めた (Fig.1-2-9 H)。以上の結果より RIOK3 が MDA5 Ser-828 のリン酸化を担っていることが明らかとなった。

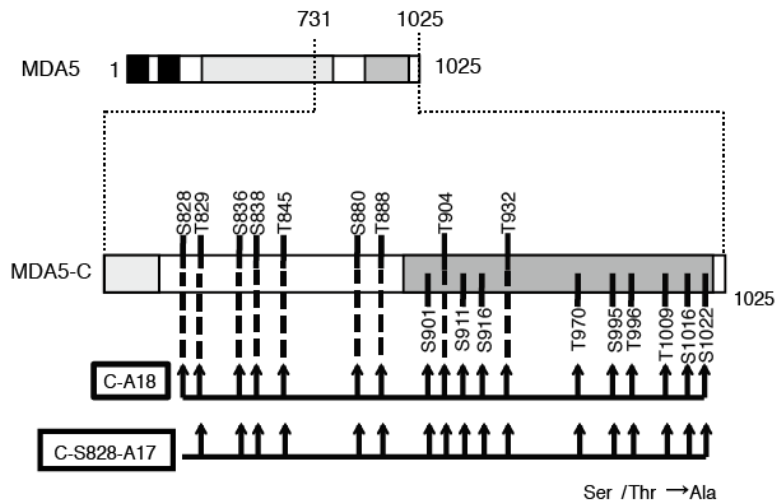
A



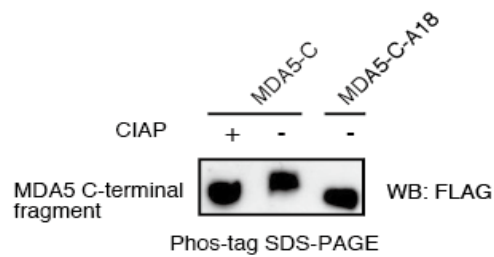
B



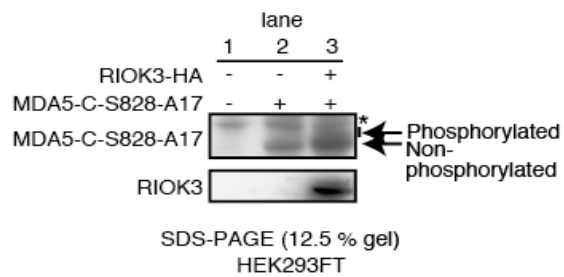
C



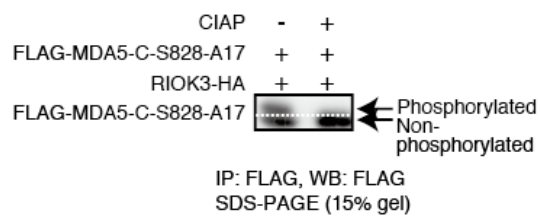
D



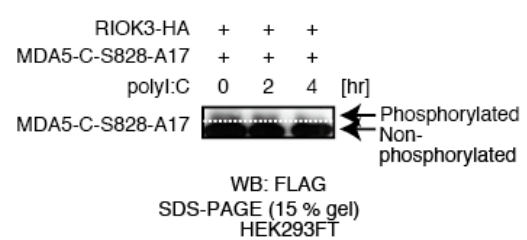
E



F



G



H

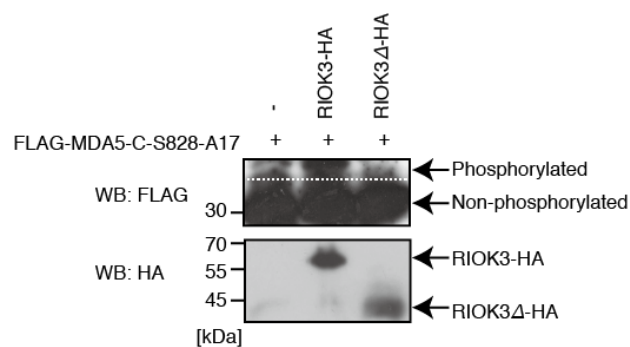


Figure. 1-2-9 RIOK3 は MDA5 Ser-828 をリン酸化する

- (A) HEK293 細胞において p125Luc、レニラプラスミド、RIOK3 発現ベクター (0、100、200、400 ng/well) と MDA5 WT 及び S828A 変異体 (100 ng/well) 発現ベクターを導入し、24 時間後に細胞を回収した。レポーターアッセイにより IFN- β プロモーター活性を評価した。
- (B) HEK293FT 細胞において HA-RIOK3 と FLAG-MDA5 及び MDA5 S828A を強制発現させ、その細胞可溶化液について抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行なった。得られた免疫複合体について CIAP 処理を行い、サンプルを調整した。その後 Phos-tag SDS-PAGE により分離を行い、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。
- (C) MDA5-C-A18 及び MDA5-C-S828-A17 変異タンパク質についての模式図
- (D) HEK293FT 細胞において FLAG-MDA5-C 及び FLAG-MDA5-C-A18 を強制発現させ、その細胞可溶化液について抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行なった。得られた免疫複合体について CIAP 処理を行い、サンプルを調整した。その後 Phos-tag SDS-PAGE により分離を行い、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。
- (E) HEK293FT 細胞において HA-RIOK3 及び FLAG-MDA5-C-S828-A17 を強制発現させ、その細胞可溶化液について抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行なった。得られた免疫複合体について 12.5%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分離を行い、抗 FLAG 抗体及び抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。*は非特異的なバンドを示している。
- (F) HEK293FT 細胞において HA-RIOK3 及び FLAG-MDA5-C-S828-A17 を強制発現させ、その細胞可溶化液について抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行なった。得られた免疫複合体について CIAP 処理を行い、サンプルを調整した。その後 15%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分離を行い、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。
- (G) HEK293FT 細胞において HA-RIOK3 及び FLAG-MDA5-C-S828-A17 を強制発現させ、その後 polyI:C (400 ng/well) を導入し 0、2、4 時間の刺激を行なった。それぞれの細胞について可溶化を行い、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行なった。得られた免疫複合体について 15%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分離を行い、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。
- (H) In vitro kinase assay によって、RIOK3 及び RIOK3 Δ の MDA5-C-S828-A17 のリン酸化への関与を調べた。HEK293FT 細胞において HA-RIOK3 及び HA-RIOK3 Δ を強制発現させ、その細胞可溶化液について抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行なった。得られた免疫複合体を当アッセイのリン酸化酵素として用いた。T7 promoter 配列を付加した PCR 産生物より TNT T7 Quick for PCR DNA を用いて *in vitro* において転写・翻訳を行い、基質となる MDA5-C-S828-A17 タンパク質を合成した。リン酸化酵素及び基質を 37°C において 1 時間反応させ、15%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分離を行い、抗 FLAG 抗体及び抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。

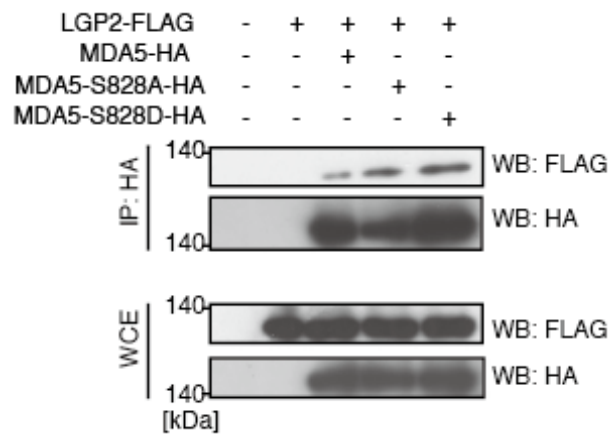
1-2-10. リン酸化による MDA5 多量体形成への影響

これまでの実験結果より RIG3 は MDA5 Ser-828 をリン酸化することにより、そのシグナル活性を抑制していることが明らかとなった。次に MDA5 のリン酸化によってシグナル活性が減少する機構について解析を行った。

他のグループより RLRs の一つである LGP2 が MDA5 の足場タンパクとして機能し、MDA5 の活性化に寄与していることが近年報告された²⁸。そこで我々は MDA5 Ser-828 のリン酸化が LGP2 との相互作用を阻害しているのではないかと考え、MDA5 変異体を用いて解析を行った。まず LGP2 と MDA5 S828A または S828D 変異体とを HEK293FT 細胞に強制発現させ免疫沈降を行い、両者の相互作用について検討した。その結果、S828A、S828D 変異体共に LGP2 と結合し、MDA5 のリン酸化は MDA5 と LGP2 との相互作用を阻害しないことが明らかとなった (Fig.1-2-10 A)。

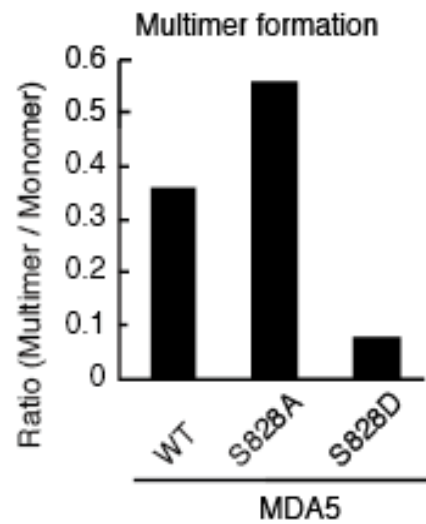
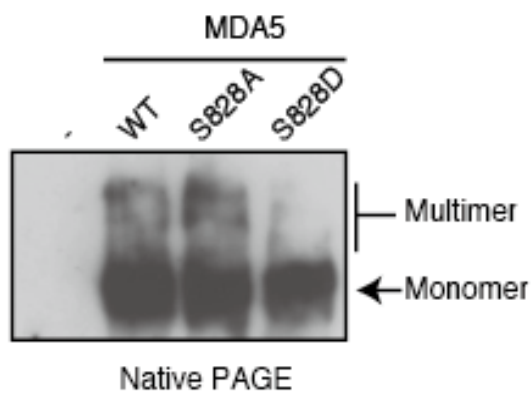
次の可能性として、MDA5 の多量体形成に注目した。前述の通り MDA5 は細胞質内において dsRNA を認識すると、その dsRNA に沿ってフィラメント状の多量体を形成することが知られており、その多量体形成は MDA5 シグナルの活性化に必須である。そこで我々は MDA5 Ser-828 のリン酸化が MDA5 の多量体形成に影響を及ぼしているのではないかと考え、解析を行った。MDA5 と同様、RLRs の 1 つである RIG-I も dsRNA による刺激に応じて多量体形成を行うことが報告されており、その多量体は Native PAGE によって検出することが可能である。そこで我々は、MDA5 の多量体について Native PAGE による検出を試みた。その結果、強制発現させた MDA5 は多量体を形成していることを見出した (Fig.1-2-10 B)。また MDA5 S828A 変異体ではさらに多量体形成は促進されており、一方で恒常的リン酸化を模倣する MDA5 S828D 変異体では多量体形成は著しく抑制されていることが認められた (Fig.1-2-10 B)。また polyI:C による刺激を加えた場合では、MDA5 WT 及び S828A 変異体では同程度の多量体形成が認められたが、MDA5 S828D 変異体において多量体形成はみられなかった (Fig.1-2-10 C)。以上の結果より、MDA5 Ser-828 のリン酸化により MDA5 の多量体形成が阻害されていることが明らかとなった。

A



B

No stimulation



C

polyI:C stimulation

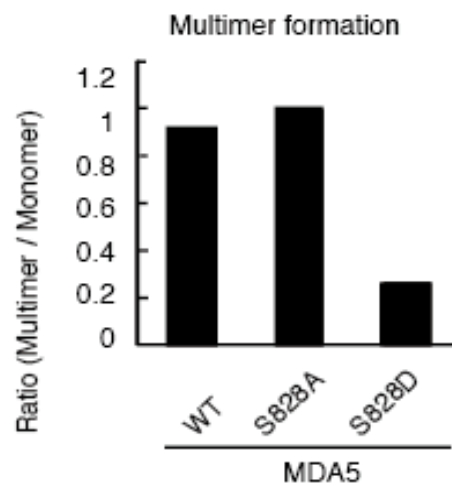
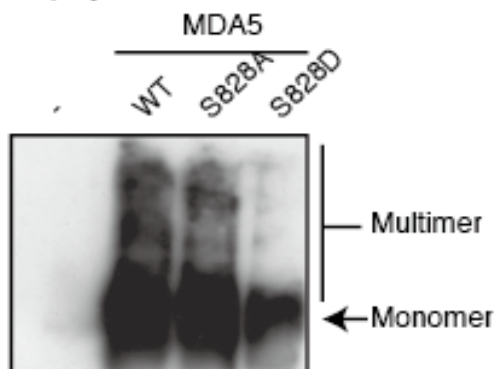


Figure. 1-2-10 MDA5 Ser-828 のリン酸化は MDA5 の多量体形成を阻害する

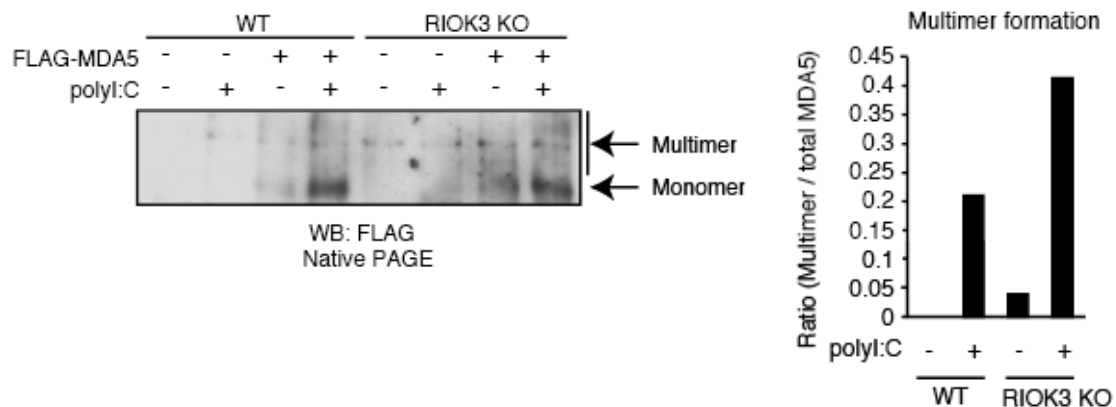
- (A) HEK293FT 細胞において FLAG-LGP2 と HA-MDA5、HA-MDA5 S828A、及び HA-MDA5 S828D を強制発現させ、その細胞可溶化液について抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行なった。得られた免疫複合体について 7.5%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分離を行い、抗 FLAG 抗体及び抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。
- (B) HEK293FT 細胞において FLAG-MDA5、FLAG-MDA5 S828A、及び FLAG-MDA5 S828D を強制発現させ、その細胞可溶化液について Native PAGE を行なった。その後抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。右図はバンドのシグナル強度を数値化し、Monomer 領域に対する Multimer 領域のシグナル強度の比を示している。
- (C) HEK293FT 細胞において FLAG-MDA5、FLAG-MDA5 S828A、及び FLAG-MDA5 S828D を強制発現させた。その後 polyI:C (400 ng/well) を導入し 12 時間の刺激を行ない、その細胞可溶化液について Native PAGE を行なった。その後抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。右図はバンドのシグナル強度を数値化し、Monomer 領域に対する Multimer 領域のシグナル強度の比を示している。

1-2-11. RIOK3 による MDA5 多量体形成への影響

これまでの結果より RIOK3 は MDA5 Ser-828 のリン酸化を担うことが明らかになっているため、次に MDA5 の多量体形成の制御に対する RIOK3 の関与について検討した。まず WT 又は RIOK3 KO-HEK293 細胞にそれぞれ MDA5 を強制発現させ、polyI:C による刺激を行った際に多量体形成に影響が出るか否か検討した。その結果、RIOK3 を欠損させることにより、polyI:C 刺激の有無を問わず MDA5 の多量体形成は促進されることが明らかになった (Fig.1-2-11 A)。

さらに内在性 MDA5 の多量体形成についても検討を行った。WT 又は RIOK3 KO-HEK293 細胞にそれぞれ IFN- α 及び polyI:C 刺激を行い、多量体形成を Native PAGE により確認した。その結果、RIOK3 を欠損させることにより内在性 MDA5 の多量体形成が促進することが明らかとなった (Fig.1-2-11 B)。以上の結果より、RIOK3 は MDA5 Ser-828 をリン酸化し、MDA5 の多量体形成を阻害することにより、そのシグナル伝達を抑制していることが示された。

A



B

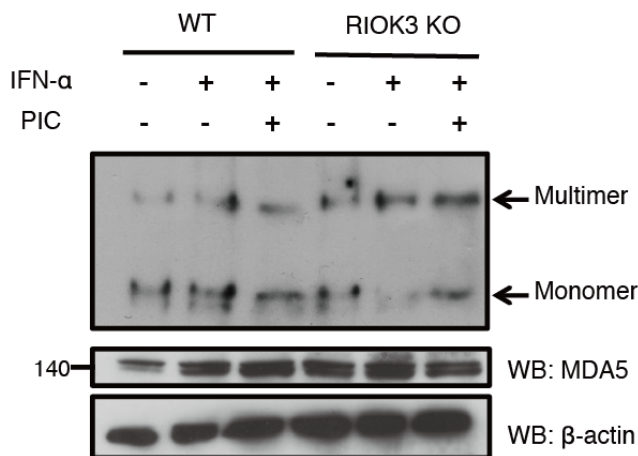


Figure. 1-2-11 RIOK3 による MDA5 Ser-828 のリン酸化は MDA5 の多量体形成を阻害する

- (A) WT-HEK293 及び RIOK3 KO-HEK293 細胞において FLAG-MDA5 を強制発現させ、その後 polyI:C (400 ng/well) により 12 時間の刺激を行なった。その細胞可溶化液について Native PAGE を行なった。その後抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。右図はバンドのシグナル強度を数値化し、Total MDA5 領域に対する Multimer 領域のシグナル強度の比を示している。
- (B) WT-HEK293 及び RIOK3 KO-HEK293 細胞において、IFN-α (1000 U/well) で 6 時間処理し、その後 polyI:C (400 ng/well) により 6 時間の刺激を行なった。その細胞可溶化液について Native PAGE 及び SDS-PAGE を行なった。その後抗 MDA5 抗体及び抗 β-actin 抗体を用いたウエスタンブロットによってタンパク質を検出した。

考察

本研究において、RIOK3 は MDA5 Ser-828 をリン酸化し、MDA5 の多量体形成を阻害することにより、そのシグナル伝達を抑制していることが示された。

この解析中にハーバード大学の Gack (現:シカゴ大学) らのグループにより、MDA5 は N 末端 CARD 領域に存在する Ser-88 のリン酸化と脱リン酸化により活性制御されていることが報告された⁸⁸。dsRNA 刺激時には脱リン酸化酵素 PP1 α/γ によって MDA5 が脱リン酸化され、そのシグナル活性が亢進する⁸⁸。また最近になり、麻疹ウイルスの構成タンパクである V タンパクが Ser-88 の脱リン酸化を競合的に阻害し、MDA5 経路の活性化を阻害することで免疫応答からの逃避が起きていることが明らかとなった⁸⁹。今回、我々の解析よりリン酸化酵素 RIOK3 は MDA5 C 末端領域に存在する Ser-828 をリン酸化することにより MDA5 経路の活性を制御していることが示された。これらの知見より、MDA5 はその N 末端及び C 末端領域の両方においてリン酸化による活性制御を受けていることが明らかとなった。RLR ファミリーの一つの RIG-I も N 末端 CARD 領域及び C 末端領域においてリン酸化⁹⁰ 及びユビキチン化¹⁷⁻¹⁹ などの翻訳後修飾による活性制御を受けることが知られており、RLR が N 末端及び C 末端のそれぞれの領域において厳密な制御を受けていることがわかる。

RIOK3 によるリン酸化、または Ser-828 の恒常的リン酸化模倣変異 (S828D) により MDA5 の多量体形成は阻害され (Fig.1-2-10 B,C 及び Fig.1-2-11)、I 型 IFN 産生が減弱する (Fig.1-2-6 A, B 及び Fig.1-2-8 B, C)。MDA5 は dsRNA 上に密に詰まった繊維状構造を形成することが知られている。隣接し合う MDA5 単量体の存在が MDA5 と RNA との結合の安定化に必要であり、MDA5 単量体は共同して繊維状の集合体を形成する²⁵。今回の我々の解析より、RIOK3 による MDA5 C 末端 Ser-828 のリン酸化は dsRNA 上での MDA5 の会合を阻害し、MDA5 と dsRNA との繊維状構造の形成が破綻することにより MDA5 シグナルが減弱しているというモデルが考えられる。一方で、MDA5 N 末端 Ser-88 のリン酸化は MDA5 と MAVS の会合を阻害し、下流のシグナル活性を抑制している⁸⁸。MDA5 Ser-88 のリン酸化は MDA5 CARD 領域同士の多量体形成、または MDA5 CARD 領域と MAVS の相互作用を阻害しており、そして MDA5 Ser-828 のリン酸化は MDA5-dsRNA の複合体の形成を阻害しているというように、同じリン酸化による修飾を受けていても、その修飾部位によってその意義が異なる可能性がある。

MDA5 の過剰発現により、リガンド刺激がない状況においても MDA5 経路の活性化が生じ (Fig.1-2-6 A)、また RIOK3 を欠失させることにより無刺激下においても内

在性 MDA5 の多量体形成が促進する (Fig.1-2-11 B)。これらの結果より RIOK3 は無刺激下において MDA5 の過剰な活性化を抑制していると考えられる。最近、京都大学 藤田教授のグループより MDA5 G821S 変異もまた、リガンド刺激がない状況下においても MDA5 経路を過剰に活性化し、ループス様の自己免疫応答を引き起こすことが報告された⁹¹。G821S 変異は Ser-828 の近傍であるため、この変異は RIOK3 による MDA5 のリン酸化を阻害し、過剰な MDA5 多量体形成を引き起こしているのかもしれない。

一般的にリン酸化酵素は複数の分子をその標的としている。今回我々は MDA5 の活性制御における RIOK3 の重要性を明らかにしたが、他のグループの報告によると RIOK3 は Caspase-10、TBK1、及び非リボソーム性 Pre-40S 粒子の構成因子と会合することが明らかとなっている⁹²⁻⁹⁴。また我々の免疫染色の結果より、RIOK3 は細胞質内に一様に分布しているため (Fig.1-2-3 C,D)、RIOK3 は細胞質内の複数の分子と相互作用し、様々な生命現象に関与している可能性がある。

過剰なインターフェロン及びサイトカインの産生は生体にとって有害である。通常、ウイルス感染においてこれらの因子は抗ウイルス応答に正に寄与するが、過剰なインターフェロン及びサイトカインの産生は自己免疫応答を励起することが知られている。近年では MDA5-MAVS-IFN- β 産生という経路の過剰な活性化が複数の自己免疫疾患に関与することが指摘されている。RIOK3 による MDA5 の活性制御機構が生体内でどのような意味を持つのか、また自己免疫疾患への関与があるのか、今後 RIOK3 ノックアウトマウスの解析を通じて明らかにする予定である。

第三節

DNAJB1 / HSP70 複合体による MDA5 の活性制御機構

第一章第三節の内容は論文掲載の関係より省略させていただきます。
(2017年3月16日現在)

第二章

腫瘍微小環境における STING 経路の役割

緒言

RNA のみならず DNA も自然免疫機構を賦活化することが知られている。エンドソームにおいて TLR9 が細菌やウイルスに由来する CpG DNA を認識することが以前より知られていたが、最近になって細胞質内における DNA センサーとして cGAS (cyclic-GMP-AMP-synthase) が同定された⁵⁷。細胞質内において cGAS が二本鎖 DNA を認識すると、ATP や GTP を基質とし、セカンドメッセンジャー分子である cGAMP (cyclic-GMP-AMP) を産生する⁶³。産生された cGAMP は小胞体上に存在するアダプター分子 STING により認識され、TBK1/IRF3 経路を介した I 型インターフェロンの産生やその他の炎症性サイトカインの産生を引き起こす^{57,63,100}。

最近では抗腫瘍免疫における STING 経路の重要性が非常に注目を浴びている⁶⁷。腫瘍微小環境では、低酸素状態または生体の免疫応答に曝露された腫瘍細胞が障害されることにより DNA が放出され、DNA が豊富な環境であることが以前より知られている。腫瘍微小環境において DC 等の抗原提示細胞が腫瘍由来の DNA を取り込み、STING 経路を活性化させる。そしてその際に産生される I 型インターフェロンが抗原特異的 T 細胞(Cytotoxic T-lymphocyte: CTL)の活性化を促し、腫瘍の成長を抑制することが示唆されている^{75,76}。近年では放射線療法の効果が STING 経路の活性化に大きく依存することも明らかになっており⁷⁶、また一方で STING リガンドである cGAMP をはじめとする Cyclic-di-nucleotide (CDN) を免疫賦活化剤(免疫アジュバント)として用いることにより、抗腫瘍免疫応答を効率良く誘導するという戦略が注目を浴びるようになってきた^{60,101}。

腫瘍免疫には抗原特異的 CTL のみならず NK 細胞なども深く関与しているが、それらの細胞を介した腫瘍進展の抑制機構に関する STING 経路の役割については明らかになっていない。そこで今回 NK 細胞を介した抗腫瘍免疫応答における STING 経路の役割を解明することを目的とし、解析を行った。NK 細胞の活性化は活性化リガンドと抑制性リガンドのバランスにより制御される。腫瘍細胞の中には NK 細胞の抑制性リガンドである Histocompatibility Complex (MHC) class I 分子の発現が低いものが存在し、それらが NK 細胞の標的になると考えられている。今回は STING KO マウスに対し、当研究室において樹立された MHC class I 分子の発現が低いマウスメラノーマ細胞株である B16D8 細胞を皮下移植する担癌マウスモデルを用いて解析を行なった。

その結果、宿主細胞の STING 経路は IL-33 及び IP-10 の腫瘍内における発現誘導に寄与し、NK 細胞依存的な腫瘍増殖制御に重要な役割をきたすことが明らかとなった。

一方で、腫瘍組織の大部分は腫瘍細胞によって構成されているため、次に腫瘍細胞自体の STING 経路が抗腫瘍免疫応答に与える影響についても検討した。その結果、腫瘍細胞自体の STING 経路は CCL5 及び IP-10 の腫瘍内での発現誘導に寄与し、宿主の細胞と協調して NK 細胞依存的な腫瘍増殖制御に寄与していることが明らかとなった。

材料と方法

1.実験材料

前章までに記載されたものは一部省略する。

1-1 マウス

C57BL/6 マウスは CLEA 社より購入した。STING 欠損マウスは NPO 法人発生工学研究会（大阪大学微生物病研究所 伊川正人教授、岡部勝名誉教授）との共同研究により作出した。作出手順については下記実験方法において記載する。全てのマウスは北海道大学大学院医学研究科付属動物実験施設において SPF 環境で飼育した。動物実験は北海道大学動物実験に関する規定に従い、承認を受けて行った。

1-2. 細胞

溶液及び緩衝液の組成

ACK lysis buffer	150 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0.1 mM Na ₂ EDTA
------------------	--

以下の試薬を各メーカーより購入した。

HEPES	GIBCO-Invitrogen
-------	------------------

B16D8 細胞 / STING KO-B16D8 細胞

マウスメラノーマ細胞株 B16D8 細胞は当研究室において樹立された。また STING KO-B16D8 細胞は CRISPR/Cas9 システムを用いて当研究室において樹立された。樹立方法に関しては下記実験方法において記載する。あらかじめ 56°C で 30 分加熱し非働化した 10% (v/v) ウシ胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 µg/ml Streptomycin を添加した RPMI1640 を用い、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。細胞の継代は confluent になり次第行い、細胞の回収はトリプシン液を用いた。

マウス骨髄由来樹状細胞 (Bone marrow derived dendritic cell : BMDC)

培養液としてあらかじめ56°Cで30分加熱し非働化した10% (v/v) ウシ胎児血清FBS、10 mM HEPES、100 mU/ml PenicillinG、100 µg/ml Streptomycin、55 µM 2-ME を添加したRPMI1640を用いた。まずマウスより大腿骨を摘出し、70%エタノールで2分間処理し、PBSで2回洗浄を行った。大腿骨の両端を切断し、RPMIに浸し、24 Gの針をつけたシリンジを用いて、骨髄細胞を回収した。メッシュを通し、15 mlのチューブに移し、1,500 rpm、5分間遠心した。沈殿した細胞を1 mlのACK lysis bufferに懸濁し、赤血球を溶解した。10 mlの培地で洗浄後10 ng/ml GM-CSF (PeproTech)を含むRPMIを用いて 1×10^6 cells/mlになるよう再懸濁し、1 ml/wellで24 well plateに播種した(day0)。2日に一度、培養液を新しい培養液に交換し(day2及びday4)、軽いピペッティングにより浮遊細胞及び軽度の付着細胞をBMDCとして回収した(day6)。

1-3. その他の試薬

STING リガンドである2'-3'-cGAMPはInvivogenより購入した。

2. 実験方法

2-1. CRISPR/Cas9 システムによる STING 欠損マウスの樹立

CRISPR/Cas9 システムによる STING 欠損マウス (STING KO マウス) の樹立のため、まず STING をコードする遺伝子である *Tmem173* の Exon3 を標的とする gRNA 配列 (5'-CACCTAGCCTCGCACGAACT-3') を設計した。導入ベクターとしては gRNA、Cas9 を発現する pX330 ベクターを使用した。*Tmem173* を標的とした gRNA 配列を組み込んだ pX330 ベクターを C57BL6 マウスの受精卵に注入し、*Tmem173* Exon3 に 5 塩基ヘテロ欠損をもつファウンダー世代マウス (*Tmem173*^{Cr5/+}) を得た。遺伝子欠損はサンガーシーケンスにより確認した。*Tmem173*^{Cr5/+} マウス同士を掛け合わせることでより 5 塩基ホモ欠損マウス (*Tmem173*^{Cr5/Cr5}) を得た。*Tmem173*^{Cr5/Cr5} マウスの脾細胞溶解液を用いてウエスタンブロットを行い、STING タンパクの欠損を確認した。塩基配列及びウエスタンブロットの結果は実験結果に記載し、標的配列及び標的配列近傍のゲノム配列の増幅に用いたプライマーセットを以下表 2-1 に示す。以降 *Tmem173*^{Cr5/Cr5} マウスを STING KO マウスと呼称する。

2-2. CRISPR/Cas9 システムによる STING 欠損 B16D8 細胞の樹立

B16D8 細胞において CRISPR/Cas9 システムを利用し、以下の手順で STING を欠損させた。導入ベクターとしては pX330-PGK-Puro-3F ベクターを用い、目的遺伝子に応じた guide RNA (gRNA) 配列をこのベクターに組み込んで使用した。gRNA 配列については、STING 欠損マウスを樹立した際に用いた配列を使用した。

B16D8 細胞を 24 well plate に播種し、翌日 Lipofectamin 2000 を使用し、*Tmem173* Exon3 を標的とした gRNA が挿入された pX330-PGK-Puro-3F (100 ng/well) を遺伝子導入した。48 時間後、終濃度 3 mg/ml の割合で Puromycin を添加し、さらに 48 時間後に付着細胞を回収した。得られた細胞集団について限界希釈を行い、1 細胞/1well の割合で 96 well plate に播種した。約 2-3 週間後に得られた各細胞株について標的配列近傍のゲノム配列を確認すると共に、ウエスタンブロットを行ってタンパクの欠失を確認することにより、ノックアウト細胞のスクリーニングを行った。標的配列及び標的配列近傍のゲノム配列の増幅に用いたプライマーセットを以下に示す。

表 2-1. CRISPR-Cas9 標的配列 (STING)

	gRNA sequence (5'→3')
<i>Tmem173</i> (coding STING)	CACCTAGCCTCGCACGAACT

表 2-2. 標的配列近傍のゲノム配列の増幅に用いた Primer list

	Primer sequence (5'→3')
Forward:	ATGGGACTAGCTGGGCTGGGAGACCCAAG
Reverse:	GCTTAGGGACTTATAGAGGACCAGAAGGCC

表 2-3. ウェスタンブロットに用いた抗体

		希釈倍率
Anti-STING (D2P2F) pAb	Cell signaling	1/1,000
Anti-β-actin mAb	SIGMA	1/500
HRP-conjugated secondary antibodies	Biosource	1/40,000

2-3. B16D8 細胞を用いた腫瘍移植実験

腫瘍移植実験には 8-12 週齢の C57BL6 雌マウスを用いた。背部の毛を刈り、 6×10^5 個の B16D8 細胞を背部に皮下移植した。腫瘍容積は 2-3 日毎にノギスを用いて測定した。腫瘍容積は以下の式を用いて算出した。腫瘍容積 (mm^3) = 長径 × 短径 × 短径 × 0.4。また NK 細胞の除去実験は、腫瘍径が $700\text{-}1000 \text{ mm}^3$ に到達した時点で抗 NK1.1 抗体を含むマウス腹水を腹腔内投与した。

2-4. 抗体染色ならびに FACS 解析

溶液及び緩衝液の組成

FACS buffer 10% FCS, 5 mM EDTA-PBS(-)

以下の抗体を各メーカーより購入した。

			希釈倍率
Purified anti-mouse CD16/32 (2.4G2) antibody	Biolegend		1/500
FITC-conjugated anti-mouse NKp46 (29A1.4) antibody	Biolegend		1/200
FITC-conjugated anti-mouse H-2K ^b (AF6-88.5) antibody	Biolegend		1/200
FITC-conjugated anti-mouse H-2D ^b (CL9009F) antibody	Biolegend		1/200
PE- conjugated anti-mouse CD4 (GK1.5) antibody	Biolegend		1/200
APC- conjugated anti-mouse CD8a (53-6.7) antibody	Biolegend		1/200
Alexa Fluor [®] 700-conjugated anti-mouse CD3 (17A2) antibody	Biolegend		1/200
PE/Cy7-conjugated anti-mouse NK1.1 (PK136) antibody	Biolegend		1/200
APC/Cy7-conjugated anti-mouse CD45 (30-F11) antibody	Biolegend		1/200

解析対象となる細胞懸濁液について、FACS buffer で2回洗浄した後、anti-mouse CD16/32 抗体を用いて 4°C、5 分間のブロッキングを行なった。5 分後、蛍光抗体を用いて 4°C、15 分間の染色を行なった後、FACS buffer で洗浄した。蛍光抗体により染色した細胞は FACS Aria II (BD) 及び FACS caliber (BD) を用いて解析を行なった。

2-5. 腫瘍組織内に浸潤した免疫細胞の解析

溶液及び緩衝液の組成

Enzyme mix solution 50 mg/ml Collagenase Type I (SIGMA), 50 mg/ml
Collagenase Type IV (Invitrogen), 25 mg/ml
Hyaluronidase (Rhoche), 10 mg/ml DNase I (Roche)
in Hank's balanced salt solution (HBSS: SIGMA)

腫瘍移植後 12-15 日に担癌マウスより腫瘍を回収し、HBSS 中でハサミ・カミソリを用いて細断した。懸濁液に Enzyme mix solution を 1/20 vol. 分加え、33°C において 15 分間反応させた。その後、100 μ m cell strainer (BD) を用いて濾過し、ACK Lysis 処理によって赤血球を除去した。HBSS で洗浄後、さらに 40 μ m cell strainer (BD) を用いて濾過を行った。得られた細胞懸濁液について蛍光標識された抗体によって染色し、FACS Aria II を用いて腫瘍細胞中の細胞集団について解析を行った。

2-5. 腫瘍組織全体の遺伝子発現の解析

腫瘍移植後 12-15 日に担癌マウスより腫瘍を回収し、HBSS 中でハサミ・カミソリを用いて細断した。懸濁液の一部を回収し、3,000 rpm、2 分間遠心し、得られたペレットを Trizol に溶解した。第 1 章で述べた手順通りに RNA を回収し、DNaseI 処理、EDTA 処理を行なった後、逆転写反応によって cDNA を合成した。得られた cDNA を用いて定量 PCR を行い、各種遺伝子の発現について検討した。定量 PCR に用いたプライマーの配列については以下に示す。

表 3: 定量 PCR primer list

Target gene		Sequence (5'→3')
Mouse Rae-1	F	TGGACACTCACAAGACCAATG
	R	CCCAGGTGGCACTAGGAGT
Mouse IFN- β	F	CCAGCTCCAAGAAAGGACGA
	R	CGCCCTGTAGGTGAGGTTGAT
Mouse IFN- γ	F	GATATCTGGAGGAACTGGCAAAAG
	R	AGAGATAATCTGGCTCTGCAGGAT
Mouse GzmB (Granzyme B)	F	TCCTGCTACTGCTGACCTTGTC
	R	ATGATCTCCCCTGCCTTTGTC
Mouse Prf1 (Perforin)	F	CAAGGTAGCCAATTTTGCAGC
	R	GGCGAAAACGTACATGCGAC
Mouse IL-33	F	CATGCCAACGACAAGGACTA
	R	GCTCTCATCTTTCTCCTCCA
Mouse IP-10	F	GTGTTGAGATCATTGCCACGA

	R	GCGTGGCTTCACTCCAGTTAA
Mouse CCL5	F	TGCCCACGTCAAGGAGTATTT
	R	TCGAGTGACAAACACGACTGC
Mouse GAPDH	F	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
	R	TTGATTTTGGAGGGATCTCG

2-6. WST-1 assay

以下の試薬を各メーカーより購入した。

2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, Dojindo.
monosodium salt (WST-1)

1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate (1-Methoxy PMS) Dojindo.

B16D8、Control-B16D8及びSTING KO-B16D8を5000個/wellの割合で96 well plateに播種し、37°C、24時間及び48時間培養した。1-Methoxy PMSで10倍に希釈したWST-1を培養上清に1/10量添加し、37°Cで4時間静置した。4時間後、培養上清を450 nmの吸光度を測定し、細胞生存能とした。

実験結果

2-1. STING 欠損マウスの樹立

当研究室で樹立されたマウスメラノーマ細胞株 B16D8 は MHC class 1 発現が低く、また NK 細胞の活性化リガンドである *Rae-1* が高発現している細胞であり、NK 細胞の標的となりうる腫瘍細胞と考えられる。今回 NK 細胞を介した腫瘍増殖抑制機構に STING 経路が関与しているか検討するため、WT、STING KO マウスに B16D8 細胞を皮下移植する担癌マウスモデルを構築した。まず CRISPR-Cas9 システムを用いて STING KO マウスを樹立した。このマウスは STING をコードする遺伝子である *Tmem173* の Exon3 領域に 5 塩基欠損が生じた変異マウスであり (Fig.2-1 A)、フレームシフトが起きた結果 (Fig.2-1 B)、STING タンパクが欠失している (Fig.2-1 C)。マウスの骨髄より誘導した樹状細胞を用意し、STING のリガンドとして知られる 2'-3'-cGAMP で刺激を行なったところ、STING KO マウスにおいては 2'-3'-cGAMP への応答性が消失することも確認された (Fig.2-1 D)。以降このマウスを用いて解析を行う。

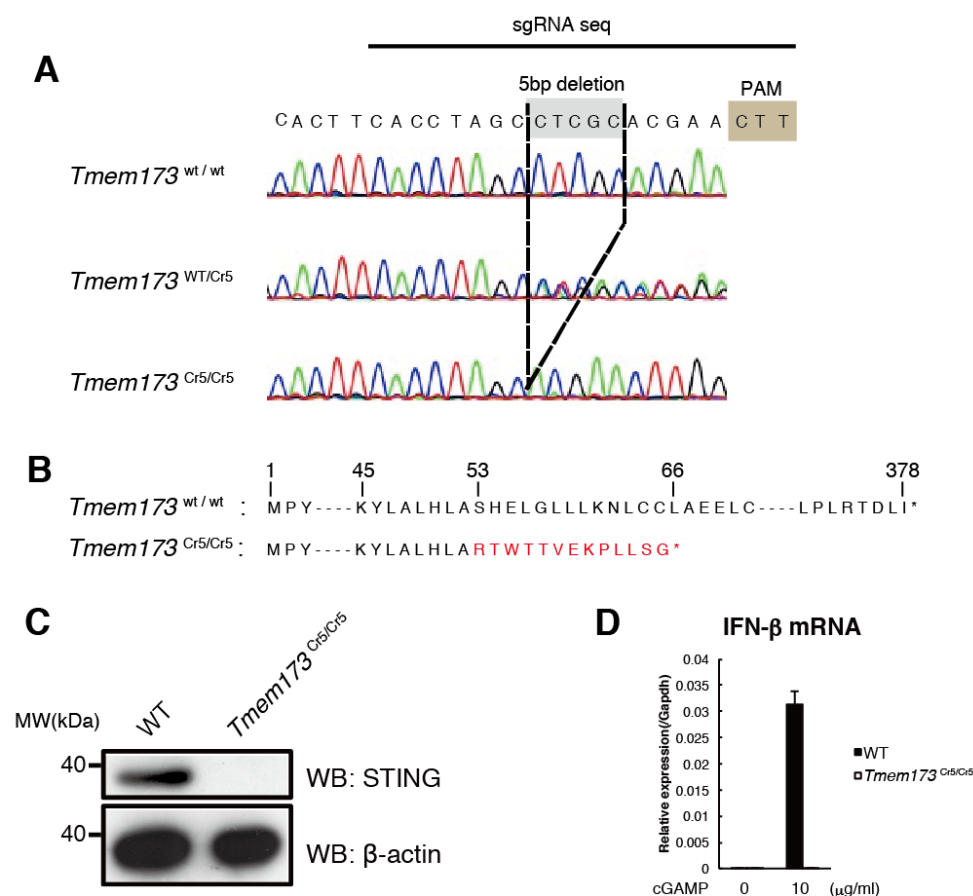


Figure. 2-1 CRISPR-Cas9 システムによる STING ノックアウトマウスの樹立

- (A) C57BL/6/J (WT)、*Tmem173*^{WT/Cr5}、及び *Tmem173*^{Cr5/Cr5} マウスのゲノム配列を示している。gRNA 配列及び PAM 配列はゲノム配列の上部に示した。標的配列の近傍領域配列を PCR 反応において増幅し、その断片のシーケンスを確認した。5 塩基の欠損については以降 Cr5 と表記し、配列については図において灰色で示した。
- (B) WT 及び *Tmem173*^{Cr5/Cr5} マウスにおける STING のアミノ酸配列を示している。*Tmem173*^{Cr5/Cr5} マウスにおいては Ser-53 よりフレームシフトによる変化が生じており、アスタリスク (*) で示した時点でストップコドンが生じている。
- (C) WT 及び *Tmem173*^{Cr5/Cr5} マウスの脾細胞における STING タンパク質の発現を検討した。これらのマウスより脾細胞を回収し、その細胞可溶化液について SDS-PAGE によって分離した。その後抗 STING 抗体及び抗 β -actin 抗体を用いたウエスタンブロットによって、タンパク質の検出を行なった。ここで *Tmem173*^{Cr5/Cr5} マウスにおける STING タンパク質の欠損が確認されたので、以降の実験において STING KO マウスと呼称する。
- (D) WT 及び *Tmem173*^{Cr5/Cr5} (STING KO) マウスの骨髄より樹状細胞 (BMDC) を誘導し、それぞれに STING リガンドである 2'-3'-cGAMP (0, 10 μ g/ml) による 4 時間の刺激を行なった。その後各細胞より RNA を抽出し、RT-qPCR 法により IFN- β mRNA の発現量を評価した。GAPDH を内部標準とし、その発現量の比を示した。

2-2. STING KO マウスでは NK 細胞依存的な B16D8 の増殖制御機構が破綻する

実際に NK 細胞を介した腫瘍増殖抑制機構に STING 経路が関与しているか検討するため、WT、STING KO マウスの背側に B16D8 を移植し、腫瘍増殖を評価したところ、WT に比べ STING KO マウスにおいて著名な腫瘍の増大を認めた (Fig.2-2 A)。次に NK1.1 抗体を投与して NK 細胞を除去したところ、WT マウスにおいては無処理群に比べ有意な腫瘍の増大を認めた (Fig.2-2 B 左図)。一方で、STING KO マウスにおける腫瘍の増殖については、NK 細胞の除去の影響は認められなかった (Fig.2-2 B 右図)。

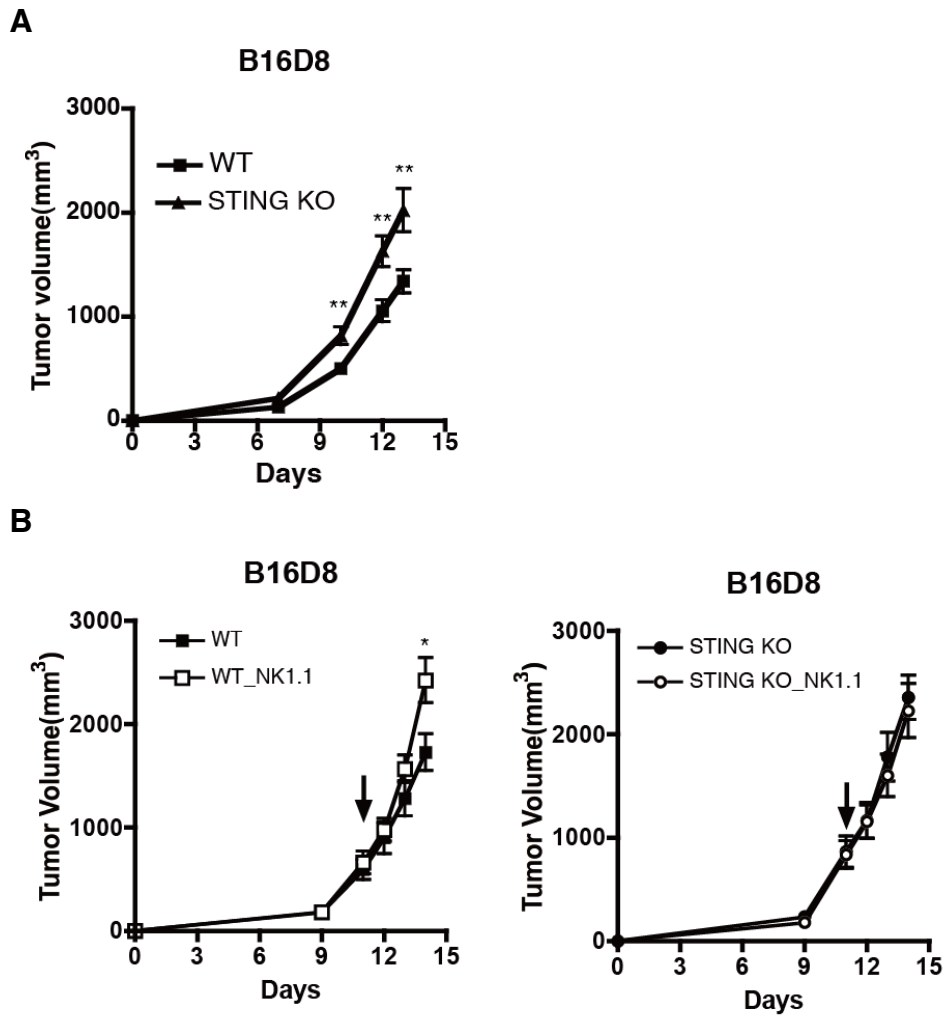


Figure. 2-2 STING は NK 細胞依存的な腫瘍増殖制御に重要な役割を果たす。

(A) WT (n=5-15) 及び STING KO (n=5-7) マウスに B16D8 細胞を皮下移植し、腫瘍径を測定した。

(B) WT (左図：各群 n=5) 及び STING KO (右図：各群 n=5) マウスに B16D8 細胞を皮下移植し、腫瘍系が 700-1000 mm³ に到達した段階で抗 NK1.1 抗体を含むマウス腹水を腹腔内投与し NK 細胞の除去を行った。矢印はマウス腹水を投与した日を示す。

各々の測定値は独立した 2 回の実験のうちの代表例であり、腫瘍径±標準偏差を示している。*; p<0.05、**; p<0.01

2-3. STING KO マウスでは腫瘍浸潤 NK 細胞の割合が低下する

STING KO マウスではB16D8に対するNK細胞依存的な腫瘍制御機構が破綻していると考えられたので、その原因について検討した。まず腫瘍内に浸潤しているNK細胞をはじめとするエフェクター細胞の割合についてフローサイトメーターを用いて解析した。その結果、STING KO マウスにおいて腫瘍内に浸潤するNK細胞の割合が著減していることが明らかとなった (Fig.2-3 A)。一方で、腫瘍内に浸潤するCD8⁺T細胞またはCD4⁺T細胞の割合は変化していなかった (Fig.2-3 B)。

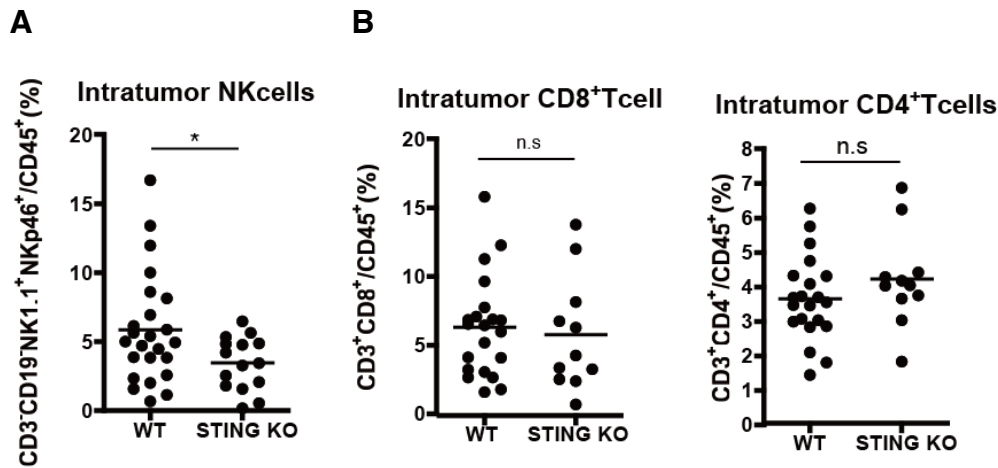


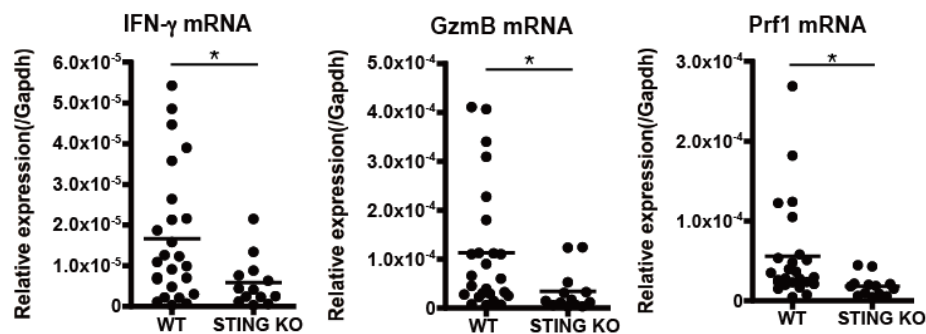
Figure.2-3 STING KOマウスでは腫瘍内に浸潤するNK細胞の割合が減少する。

WT 及び STING KO マウスに B16D8 を皮下移植し、移植後 13 または 14 日後に腫瘍組織を回収し、腫瘍内に浸潤している CD45⁺細胞中の NK 細胞 (A)、CD8⁺T 細胞及び CD4⁺T 細胞 (B) の割合を FACS Aria II を用いて解析した。このとき CD3⁺CD19⁺NK1.1⁺NKp46⁺の細胞集団を NK 細胞とし、CD3⁺CD8⁺を CD8⁺T 細胞、CD3⁺CD4⁺を CD4⁺T 細胞とした。n.s; not significant、*; p<0.05

2-4. STING KO マウスでは B16D8 腫瘍内において 1 型免疫応答が減弱する

次にこの腫瘍組織から RNA を抽出し、腫瘍組織全体における遺伝子発現の変化を確認した。その結果、STING KO マウスの腫瘍組織において IFN- γ 、Granzyme B、Perforin など 1 型免疫応答を担う各種エフェクター分子や、I 型 IFN の一つである IFN- β の発現が低下していることが明らかとなった (Fig.2-4 A,B)。一方 NK 細胞の活性化因子である Rae-1 の発現については、変化は認められなかった Fig.2-4 B)。

A



B

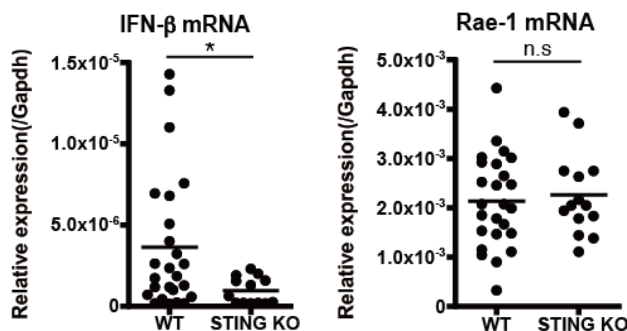


Figure.2-4 STING KO マウスでは腫瘍内における 1 型免疫応答が減弱する。

WT 及び STING KO マウスに B16D8 を皮下移植し、移植後 13 または 14 日後に腫瘍組織を回収した。腫瘍組織を細断し RNA を抽出し、RT-qPCR 法により IFN- γ 、Granzyme B、Perforin (A)、IFN- β 、Rae-1 (B) の mRNA 量を定量した。GAPDH を内部標準とし、その比を示した。n.s; not significant、*; $p < 0.05$

2-5. STING KO マウスにおける B16D8 腫瘍内における NK 細胞誘導因子の発現

STING KO マウスにおいて NK 細胞が腫瘍組織内に浸潤できない可能性として、腫瘍内に NK 細胞を誘引する機構に問題があると考え、各種ケモカインに着目した。これまでの報告から腫瘍内への NK 細胞の誘引には IFN- γ や CXCR3 リガンドである IP-10 が重要であることが知られており¹⁰²、近年になって IL-33 も NK 細胞の腫瘍内への誘引に寄与する因子であることが明らかになってきた。まずこれらの因子への影響について検討したところ、STING KO マウスの腫瘍組織において IL-33 及び IP-10 の遺伝子発現が減弱していることが明らかとなった (Fig.2-5 A,B)。一方で、NK 細胞の腫瘍内への誘引、活性化に寄与するケモカインである CCL5¹⁰³ の発現には影響はみられなかった (Fig.2-5 C)。

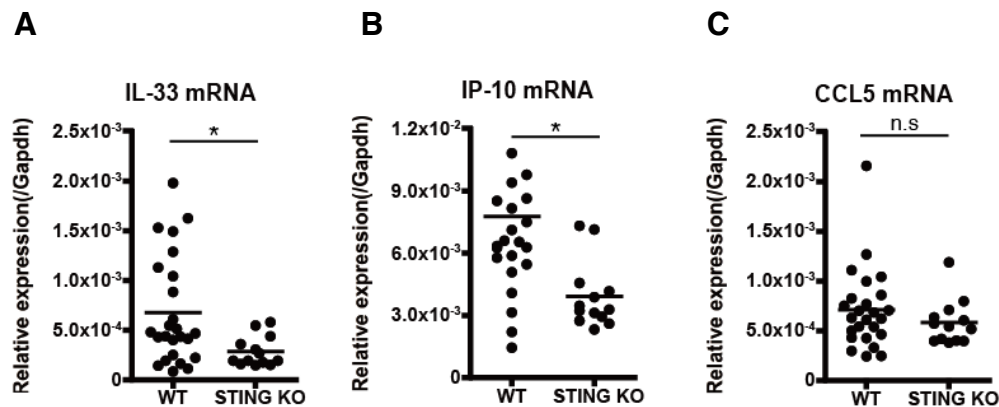


Figure.2-5 STING KO マウスでは腫瘍内における IL-33 及び IP-10 の発現が減少する。

WT 及び STING KO マウスに B16D8 を皮下移植し、移植後 13 または 14 日後に腫瘍組織を回収し、腫瘍組織より RNA を抽出し、RT-qPCR 法により IL-33 (A)、IP-10 (B)、CCL5 (C) の mRNA 量を評価した。GAPDH を内部標準とし、その比を示した。n.s; not significant, *; $p < 0.05$

2-6. STING 欠損 B16D8 細胞の樹立

これまでの結果より、腫瘍組織に存在する生体側の細胞の STING 経路が IP-10 及び IL-33 の誘導に寄与し、NK 細胞を腫瘍組織中に誘導することで NK 細胞依存的な抗腫瘍効果を導くことが示唆された。一方で腫瘍組織の大部分は腫瘍細胞によって構成されているが、腫瘍細胞自体の STING 経路が腫瘍微小環境にどのような影響を与えているかについては多くの部分が明らかになっていない。我々は次に腫瘍細胞自体の STING 経路が腫瘍微小環境にどのような影響を及ぼすか検討するため、CRISPR-Cas9 システムを用いて STING 欠損 B16D8 細胞 (STING KO-B16D8 細胞) を樹立した。このとき gRNA 配列を含まない pX330 ベクターを導入し、STING KO-B16D8 と同様に薬剤選抜することで樹立した細胞株 (Control-B16D8 細胞) をコントロール株として用いた。まずウエスタンブロットにより STING タンパクの欠失を確認した (Fig.2-6 A)。STING を欠損させた場合においても、*in vitro* においてはその生存や細胞増殖に影響は及ぼさなかった (Fig.2-6 B)。また MHC class1 及び Rae-1 の発現についても STING を欠損させたことによる変化は認められなかった (Fig.2-6 C,D)。次に STING リガンドである 2'-3'-cGAMP による刺激への応答性について確認したところ、B16D8 細胞及び Control-B16D8 細胞においてはわずかではあるが IFN- β の発現誘導が生じたが、STING KO-B16D8 細胞に 2'-3'-cGAMP による刺激を行っても IFN- β の発現誘導は全くみられなかった (Fig.2-6 E)。以上の結果より、STING KO-B16D8 細胞はその細胞増殖や生存に関して影響はなく、また MHC class1 及び Rae-1 の発現についても変化はないため、親株である B16D8 と同様に NK 細胞の標的となる細胞である可能性が高い。また STING KO-B16D8 細胞は STING リガンドへの応答性が欠如しており、STING 経路の破綻が生じていることが確認された。以降、これらの細胞株を用い腫瘍実験を行なった。

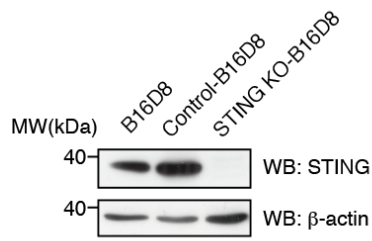
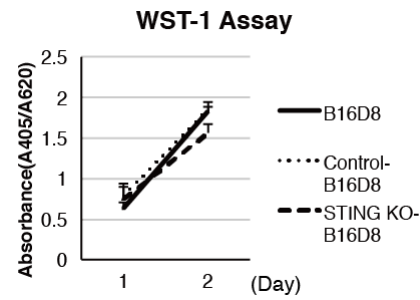
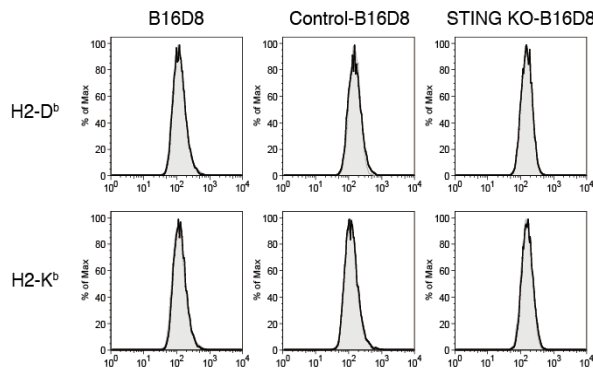
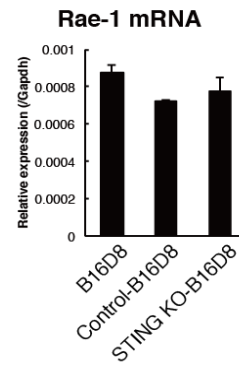
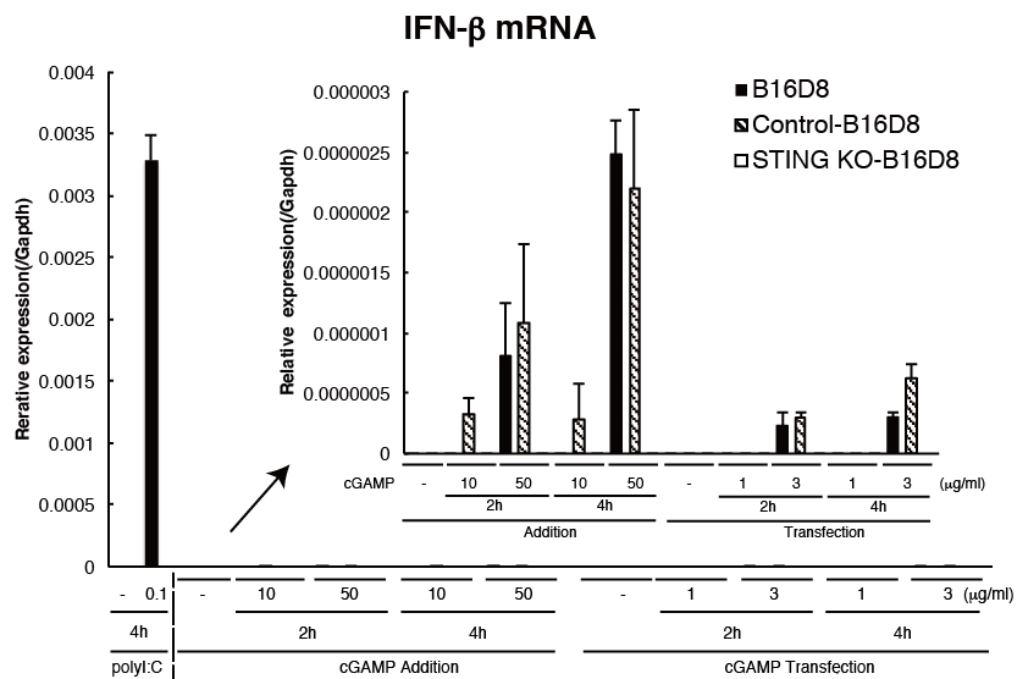
A**B****C****D****E**

Figure.2-6 CRISPR-Cas9 システムによる STING KO-B16D8 細胞の樹立とその性質の検討

- (A) B16D8、Control-B16D8 及び STING KO-B16D8 の細胞可溶化液について SDS-PAGE によって分離し、その後抗 STING 抗体及び抗 β -actin 抗体を用いたウエスタンブロットによりタンパク質を検出した。
- (B) B16D8、Control-B16D8 及び STING KO-B16D8 を 5000 個/well の割合で 96 well plate に播種し、WST-1 assay により 24 時間及び 48 時間後の細胞増殖及び生存を検討した。
- (C) B16D8、Control-B16D8 及び STING KO-B16D8 を蛍光標識抗 H2-D^b 抗体及び抗 H2-D^b 抗体により染色し、FACS Clibur により解析した。
- (D) B16D8、Control-B16D8 及び STING KO-B16D8 より RNA を抽出し、RT-qPCR 法により Rae-1 mRNA の発現量を評価した。GAPDH を内部標準とし、その発現量の比を示した。
- (E) B16D8、Control-B16D8 及び STING KO-B16D8 において 2'-3'-cGAMP を用いて 0、2、4 時間の刺激を行った。2'-3'-cGAMP を培養液中に添加する場合は終濃度が 10 μ g/ml、50 μ g/ml となるように、リポフェクション試薬により細胞内に導入する場合は 1 μ g/ml、3 μ g/ml の濃度とした。刺激後、各細胞より RNA を抽出し、RT-qPCR 法により IFN- β mRNA の発現量を評価した。GAPDH を内部標準とし、その発現量の比を示した。ポジティブコントロールとして B16D8 細胞に polyI:C (100 ng/well) による刺激を行なった際の IFN- β mRNA の発現量を示した。

2-7. 腫瘍細胞自体の STING 経路も抗腫瘍免疫応答に対し正に働く

腫瘍微小環境に対する腫瘍細胞の STING 経路の影響を明らかにするため、STING を欠損させた腫瘍細胞株 (STING KO-B16D8 株) を WT マウスに移植し、腫瘍の増大について観察した。その結果、まず WT マウスにおいて Control に比べ STING KO-B16D8 腫瘍において腫瘍の増大が確認された (Fig.2-7 A)。また、次に生体の STING 経路と腫瘍細胞の STING 経路の役割の違いを検討するため、STING KO マウスに STING 欠損腫瘍株を移植し、全体として STING を欠く担癌マウスモデルを構築した。その結果、STING KO マウスにおいて Control に比べ STING KO-B16D8 腫瘍の有意な増大が確認された (Fig.2-7 B)。

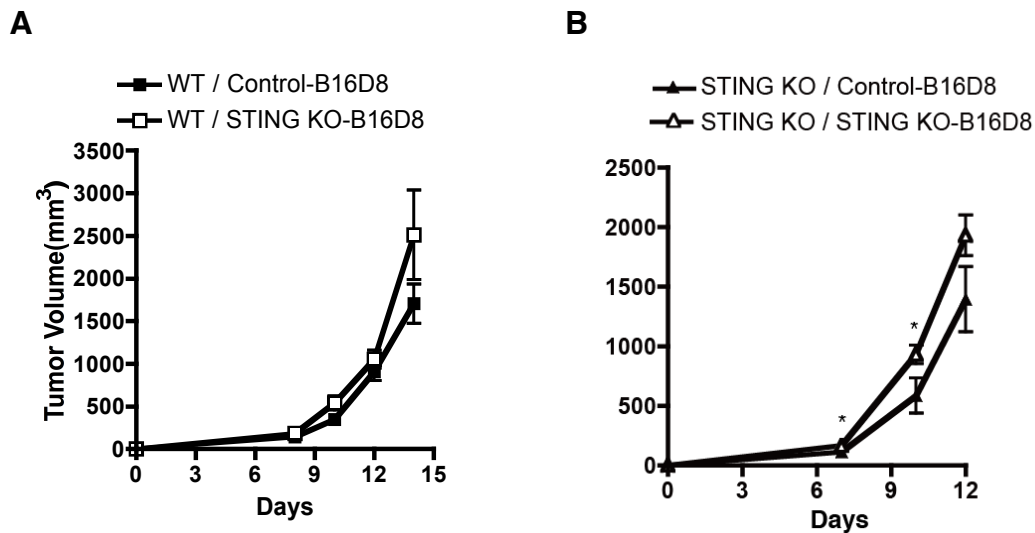


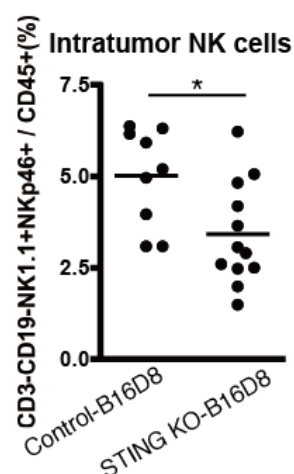
Figure. 2-7 腫瘍細胞自体の STING 経路も抗腫瘍免疫応答に寄与する。

WT (A) 及び STING KO (B) (各群 n=4-6) マウスに Control-B16D8 及び STING KO-B16D8 細胞を 6×10^5 /匹で皮下移植し、腫瘍径を測定した。各々の測定値は独立した 2 回の実験のうちの代表例であり、腫瘍径 $\pm$ 標準偏差を示している。*; $p < 0.05$

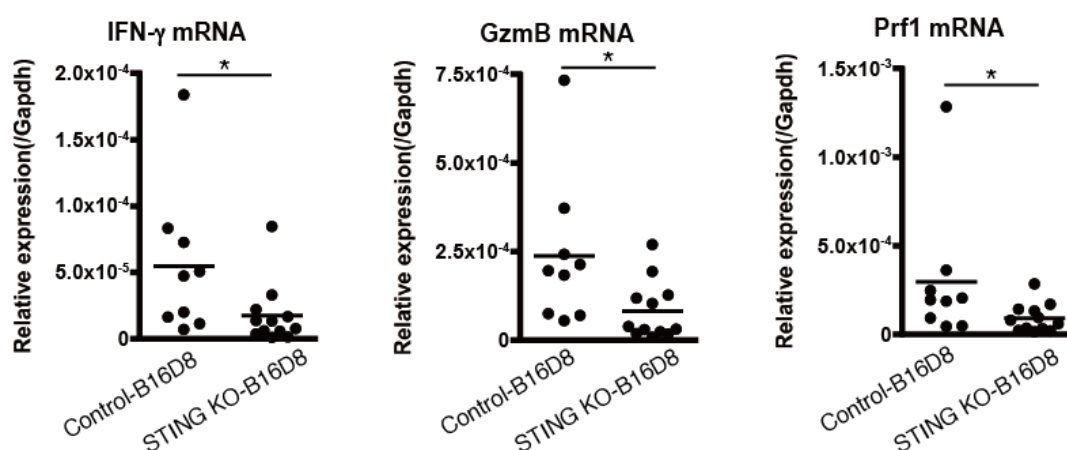
2-8. 腫瘍細胞の STING 経路も NK 細胞の腫瘍内への誘引に寄与し、I 型免疫応答を誘導する

腫瘍細胞自体の STING 経路が腫瘍微小環境にどのような影響を及ぼしているか検討するため、まず腫瘍内に浸潤している NK 細胞の割合について解析した。STING KO マウスに Control-B16D8 及び STING KO-B16D8 細胞を移植し、12 日目に腫瘍塊を回収した。フローサイトメーターを用いた解析を行なったところ、STING KO 腫瘍を移植した群において、腫瘍内に浸潤する NK 細胞の割合が減少していることが明らかとなった (Fig.2-8 A)。次にこの腫瘍組織から RNA を抽出し、腫瘍組織全体における遺伝子発現の変化を確認した。その結果、STING KO 腫瘍において IFN- γ 、Granzyme、Purfolin といった I 型免疫応答を担う分子の mRNA 発現が低下していることが明らかになった (Fig.2-8 B)。またこのとき IFN- β や Rae-1 の発現について大きな変化は見られなかった (Fig.2-8 C)。

A



B



C

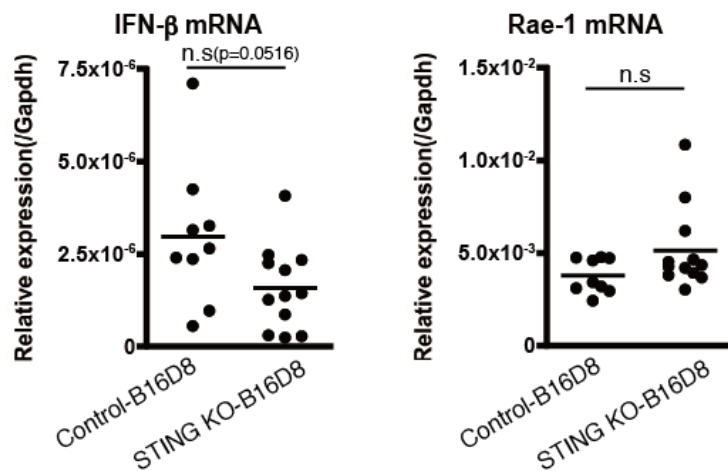
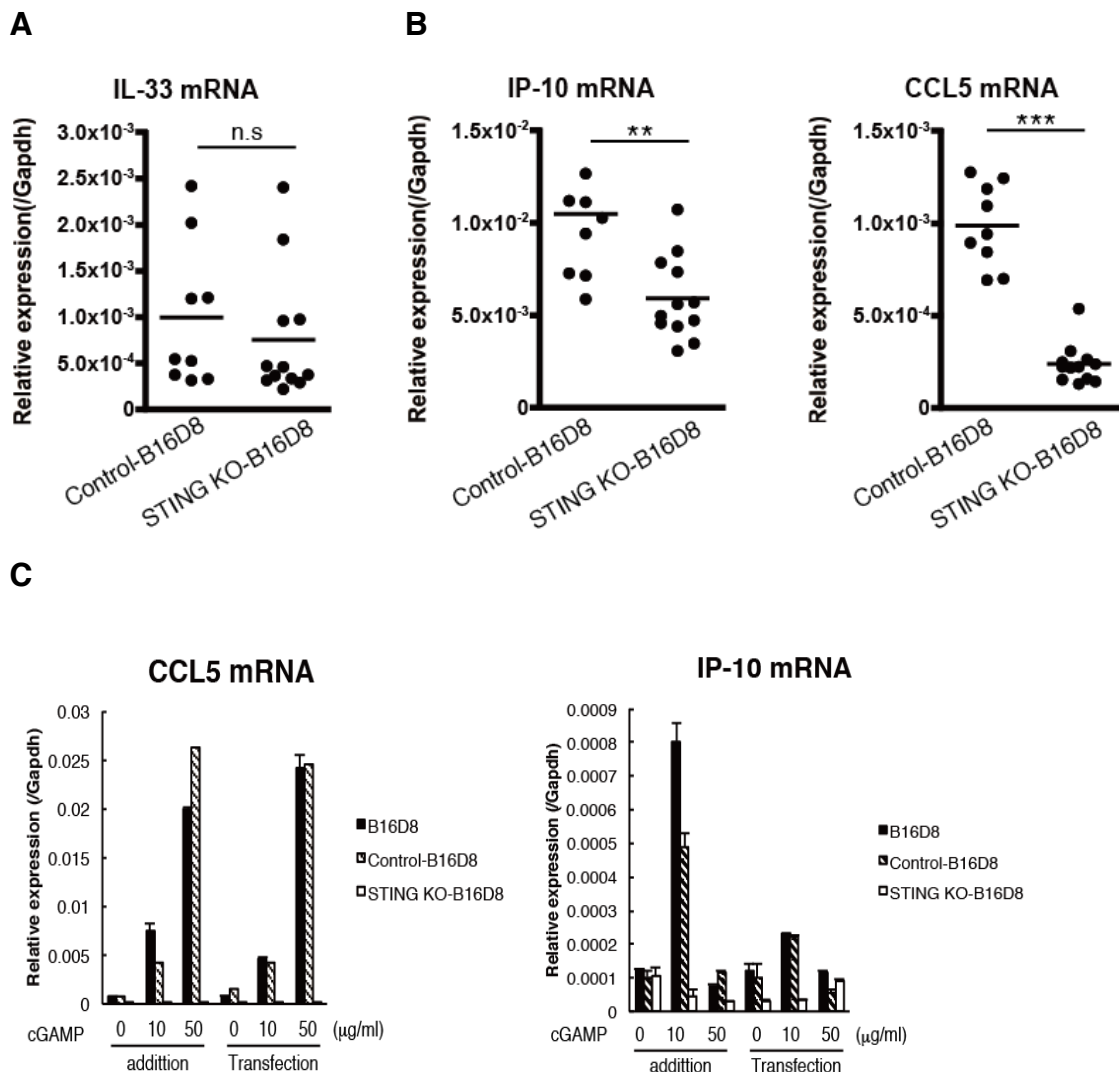


Figure. 2-8 腫瘍細胞の STING 経路も NK 細胞を腫瘍内に誘引し、I 型免疫応答を誘導する。

STING KO (各群 n=4-6) マウスに Control-B16D8 及び STING KO-B16D8 細胞を 6×10^5 /匹で皮下移植し、12 日後に腫瘍塊を回収した。腫瘍組織を細断したのちに Enzyme mix 処理を行い、得られた細胞懸濁液について NK 細胞の割合を FACS Aria II を用いて解析した (A)。このとき $CD3^-CD19^-NK1.1^+NKp46^+$ の細胞集団を NK 細胞とした。また、細断した腫瘍組織から RNA を回収し、RT-qPCR 法により IFN- γ 、Granzyme、Purfolin (B)、IFN- β 、及び Rae-1 (C) の mRNA 発現量を評価した。GAPDH を内部標準とし、その比を示した。各々の測定値は独立した 2 回の実験の結果の合算である。n.s; not significant、*; $p < 0.05$

2-9. STING KO-B16D8 腫瘍内における NK 細胞誘導因子の発現

腫瘍細胞自体の STING 経路が NK 細胞の腫瘍内への誘因に寄与していることが示唆されたため、次に STING KO 腫瘍組織全体における NK 細胞誘引因子の遺伝子発現について検討を行った。その結果、腫瘍細胞の STING を欠損させた場合において IL-33 の発現について変化はないが (Fig.2-9 A)、一方で IP-10 及び CCL5 の発現が著明に減少していることが明らかとなった (Fig.2-9 B)。また *in vitro* において B16D8、Control-B16D8、及び STING KO-B16D8 細胞に cGAMP による刺激を行なったところ、STING 依存的に CCL5 及び IP-10 mRNA 発現の亢進を認めた (Fig.2-9 C)。この時、無刺激時における発現を比較したところ、STING を欠損させることにより B16D8 細胞における CCL5 mRNA 発現が著減していることが明らかとなった (Fig.2-9 D)。



D

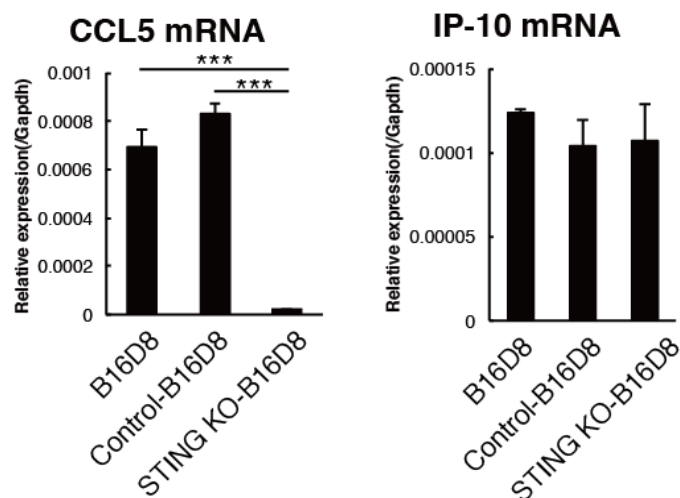


Figure. 2-9 腫瘍細胞の STING 経路は腫瘍内における IP-10 及び CCL5 の発現誘導に寄与する。

(A,B) STING KO (各群 n=4-6) マウスに Control-B16D8 及び STING KO-B16D8 細胞を 6×10^5 /匹で皮下移植し、12 日後に腫瘍塊を回収した。腫瘍組織を細断したのち、RNA を回収し、RT-qPCR 法により IL-33、IP-10、及び CCL5 の mRNA 量を評価した。GAPDH を内部標準とし、その比を示した。各々の測定値は独立した 2 回の実験の結果の合算である。

n.s.; not significant, *; $p < 0.05$

(C,D) B16D8、Control-B16D8 及び STING KO-B16D8 において 2'-3'-cGAMP を用いて 4 時間の刺激を行った。終濃度が $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $50 \mu\text{g/ml}$ となるように 2'-3'-cGAMP を培養液中に添加、又はリポフェクション試薬により細胞内に導入し刺激を行なった。刺激後、各細胞より RNA を抽出し、RT-qPCR 法により CCL5 及び IP-10 mRNA の発現量を評価した。GAPDH を内部標準とし、その発現量の比を示した。(D) は無刺激時の遺伝子発現について細胞株間で比較をしている。

考察

本研究において、STING KO マウス及び B16D8 メラノーマ細胞株を用いた解析により、腫瘍微小環境における生体及び腫瘍細胞自体の STING 経路が NK 細胞依存的な腫瘍増殖制御に寄与することが明らかになった。腫瘍組織に浸潤している宿主側の細胞の STING 経路は IP-10、IL-33 の発現誘導に重要であり、一方で腫瘍細胞側の STING 経路は IP-10、CCL5 の発現誘導に寄与する。これらの遊走生因子が NK 細胞を腫瘍内へ誘引し、NK 細胞依存的な抗腫瘍免疫応答を引き起こすものと考えられる。宿主及び腫瘍細胞のいずれの STING 経路も NK 細胞依存的な抗腫瘍効果を引き起こすために必要であると考えられるが、そこに関与する因子については違いがあることも示唆された。

過去の報告によると腫瘍内に存在する樹状細胞等の抗原提示細胞^{75,76}、または血管内皮細胞¹⁰⁴など様々な宿主細胞の STING 経路が I 型 IFN 産生を介した抗腫瘍効果の誘導に関与していることが明らかにされてきた。I 型 IFN はそれ自体が NK 細胞及び T 細胞の活性化に寄与し、また IFN 誘導性遺伝子の発現を促進することによって抗腫瘍免疫応答を起動させる⁷⁴。今回の解析においても宿主細胞の STING 経路は腫瘍組織内における I 型 IFN の発現に寄与していることが確認され (Fig.2-4 B)、NK 細胞を介した抗腫瘍免疫応答の増強に寄与していることが示唆される。

一方で最近になって、腫瘍細胞由来の I 型 IFN が抗腫瘍作用に寄与するという可能性が示唆された。腫瘍細胞内では DNA 損傷応答が活発であり、そこから細胞質内で発生した DNA 断片により STING 経路依存的に I 型 IFN 産生が誘導され、また Rae-1 の発現に寄与する場合もあることが報告されている¹⁰⁵。しかし B16D8 の場合はこの見解との一致は認められなかった。確かに B16D8 細胞において cGAMP の刺激により、STING 依存的に I 型 IFN の発現はわずかに誘導されるが、その発現量はごく微量であった (Fig.2-6 E)。また腫瘍細胞の STING を欠損させたことによる腫瘍組織全体での I 型 IFN の発現減少は有意なものではなく (Fig.2-8 C)、B16D8 細胞自体の STING 経路は、I 型 IFN の発現誘導という側面での抗腫瘍免疫応答への関与は小さいと考えられる。そもそも STING は組織ごとに発現の程度は大きく異なっており、腫瘍細胞株の由来によって STING 経路の意義は異なる可能性が高いと考えられる。

1 つの細胞が複数のサイトカインやケモカインによって遊走が調節されることが以前より知られている。IP-10 は NK 細胞¹⁰²のみならず T 細胞の腫瘍内への誘導にも関与する因子である¹⁰⁶。

今回の我々の解析において STING KO マウスにおいて腫瘍内の NK 細胞の割合は著減を示したが、T 細胞の割合はあまり変化しなかった (Fig.2-3)。最近になって IL-33 が腫瘍内へ NK 細胞を選択的に誘引する因子であることが示唆され¹⁰⁷、また STING KO マウスでは腫瘍内での IL-33 発現が減少していたことより (Fig.2-5 A)、この今回の STING KO マウスにおける NK 細胞選択的な浸潤機構の破綻には、宿主細胞由来の IL-33 の影響があると想定される。IL-33 は腸管上皮細胞において STING-IRF3 経路依存的に発現が誘導されることが報告されており¹⁰⁸、今回の我々の結果と合わせて考えると、腫瘍微小環境においても同様の機構が存在するものと予想される。また今回の解析では腫瘍微小環境において IL-33 及び IP-10 を産生する宿主細胞の同定には至っておらず、さらなる解析が求められる。

腫瘍微小環境において宿主の STING 経路を刺激しているのは死んだ腫瘍由来の DNA であることが示唆されているが^{75,76}、その取り込み機構や取り込んだ DNA が細胞質内へ移行する機構については未だ不明である。また、この際の DNA センサーは cGAS なのか、また他のセンサー分子はどのような働きを持つのか、今後の解析が待たれる。

また B16D8 細胞自体の STING 経路は IL-33 の発現誘導に寄与しないことが明らかになった (Fig.2-9 A)。一方で NK 細胞の遊走、活性化に寄与する CCL5 または IP-10 の発現誘導については B16D8 細胞の STING 経路の寄与が示唆された (Fig.2-9 B)。さらに *in vitro* での解析の結果、B16D8 細胞において cGAMP 刺激により STING 依存的に CCL5 及び IP-10 の発現が誘導される (Fig.2-9 C)。また興味深いことに STING を欠損させると定常状態においてすでに CCL5 の発現が著減することが確認された

(Fig.2-9 D)。前述の通り腫瘍細胞内では DNA 損傷応答が盛んであり、細胞質内には正常細胞より DNA 断片が豊富に含まれていることが知られており^{105,109}、定常状態において STING 経路依存的に CCL5 産生がなされている可能性がある。

また IP-10 は STING 経路依存的に発現誘導が生じる遺伝子ではあるが、一方で I 型及び II 型 IFN によって発現誘導されることが知られている¹⁰⁶。*in vitro* での解析において IP-10 は STING を欠損させても定常状態において発現の減少は認められなかったが (Fig.2-9 D)、腫瘍細胞の STING 経路が欠損すると腫瘍組織全体における IP-10 の発現は減少を認めた (Fig.2-9 B)。実際の腫瘍組織内では、何らかの刺激により B16D8 細胞内において DDR が促進し、リガンドである dsDNA が豊富になることにより STING 経路の活性化が直接生じている可能性と、STING 経路依存的に発現誘導された他の因子の関与によって腫瘍内に誘引された NK 細胞による IFN- γ 産生などによって、二次的に IP-10 の発現が誘導されている可能性が考えられる。

実際に腫瘍細胞内の STING 経路を刺激しているリガンドが DDR に由来する細胞質内 DNA であるならば、その DNA センサーは cGAS なのか、他のセンサー分子はどのような働きを持つかという点に関しても検討課題である。また一方で、*in vitro* の解析において B16D8 細胞に cGAMP を培養上清中に加えたのみでも STING 経路依存的な応答が見られたことから、B16D8 細胞は cGAMP を取り込むことが可能であると考えられる (Fig.2-8 C 及び Fig.2-9 C)。この結果より、腫瘍細胞内の STING 経路を刺激するリガンドとして、死細胞から放出された cGAMP などの小分子の可能性も考えられ、今後解析を行なってゆく。

STING 経路依存的に発現に影響を受ける因子は多数存在するため、その中で NK 細胞依存的な抗腫瘍効果を引き起こす因子が IL-33、IP-10、CCL5 以外にも存在する可能性は高いと考えられる。今後、網羅的な解析を通じて、この自発的な NK 細胞依存的な抗腫瘍効果への STING 経路の関与の全体像を明らかにしていくことが求められる。

また一方で腫瘍内における NK 細胞の割合が減少する原因として、他にも NK 細胞自体の遊走能の異常、または腫瘍内での NK 細胞の維持機構の破綻が想定され、これらについてもさらなる検討が必要である。

昨今、抗腫瘍免疫療法において免疫アジュバントとして STING アゴニストを投与する試みが盛んになされている。生理的なリガンドである cGAMP などの CDN の活用のみならず、それに化学修飾を施し CDN の構造を変化させる、又はドラッグデリバリーの手法を工夫することによって STING 経路の活性化をより効率よく誘導する研究も進行している⁷⁷⁻⁷⁹。今回の解析において、少なくとも B16D8 細胞においては宿主のみならず腫瘍細胞の STING 経路も抗腫瘍免疫応答に寄与するが、関与する因子には違いがあることが示唆された。これは STING アゴニストの投与による抗腫瘍効果が生体の細胞のみならず腫瘍細胞そのものに作用した影響を含んでいる可能性を示唆しており、宿主及び腫瘍細胞それぞれの STING 経路を適切に活性化することにより、より強い腫瘍免疫応答を導くことができる可能性があると考えられる。

今後 B16D8 以外の様々な腫瘍細胞において STING 経路の意義を理解することにより、宿主細胞のみならず腫瘍細胞の STING 経路を標的とした抗腫瘍免疫療法の開発が期待される。

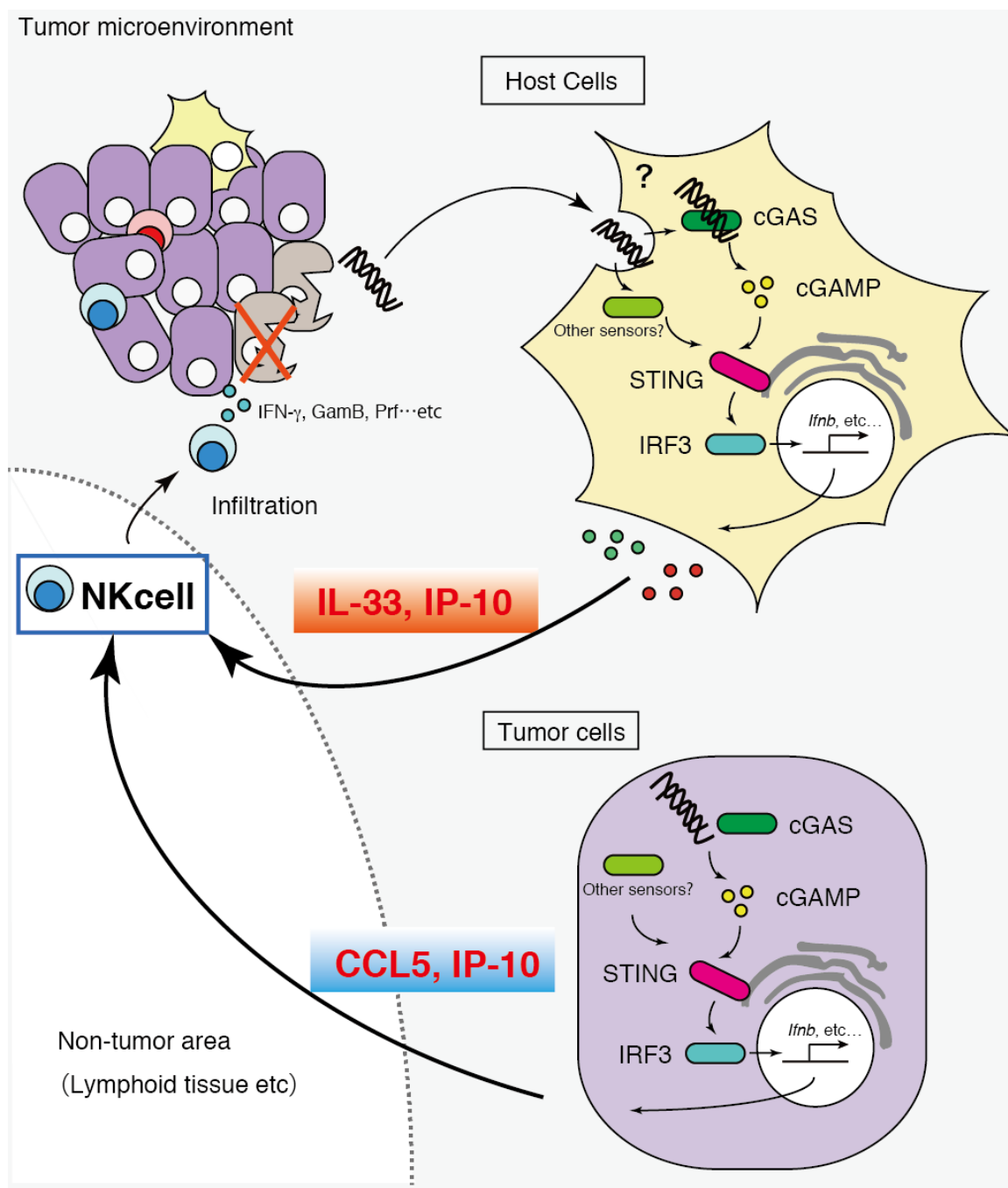
総括および結論

本研究において、以下の知見が得られた。

1. MDA5 の新規結合因子として RIOK3 及び DNAJB1 を同定した。
2. RIOK3 は MDA5 由来の自然免疫応答を抑制する。
3. RIOK3 は MDA5 の Ser-828 をリン酸化する。
4. RIOK3 によるリン酸化によって MDA5 の多量体形成は阻害され、そのシグナル活性は抑制される。

＜第一章第三節に関する事項は論文掲載の関係より省略させていただきます。(2017 年 3 月 16 日現在)＞

5. 腫瘍微小環境において宿主及び腫瘍細胞自体の STING 経路が NK 細胞依存的な腫瘍増殖制御に寄与する。
6. 腫瘍微小環境において宿主細胞の STING 経路は IL-33 及び IP-10 の発現誘導に寄与し、腫瘍細胞の STING 経路は CCL5 及び IP-10 の発現誘導を担っている。



第一章において MDA5 の新規活性制御機構が明らかとなった。

まずリン酸化酵素 RIOK3 による MDA5 Ser-828 のリン酸化が MDA5 の多量体形成を阻害し、シグナル活性を抑制していることを示した。MDA5 はその N 末端及び C 末端においてリン酸化による厳密な制御を受けていると考えられる。MDA5 はその活性化に多量体形成が必須であるが、その制御を行う機構はこれまで明らかにされていなかった。RIOK3 欠損細胞を用いた実験より、RIOK3 は定常状態においてリン酸化を

介して MDA5 の多量体形成及び過剰な活性化を抑制していることが示唆された。これらの知見から MDA5 タンパク質は翻訳からほどなくして RIOK3 によってリン酸化され、不活性化状態を維持してされていると予想しているが、時空間的な制御メカニズムの解明は今後の課題である。また近年 MDA5 と自己免疫疾患の関与が示唆されており、今回明らかとなった知見より RIOK3 は MDA5 に由来する過剰な自己免疫応答を制御している可能性が考えられる。今後 RIOK3 ノックアウトマウスの解析より、RIOK3 の自己免疫疾患への関与などについて検討していきたい。

＜第一章第三節の内容は論文掲載の関係より省略させていただきます。(2017 年 3 月 16 日現在)＞

第二章において腫瘍微小環境における宿主及び腫瘍細胞自体の STING 経路の意義について、新たな知見を得た。腫瘍内に浸潤する抗原提示細胞の STING 経路が抗腫瘍免疫応答を励起するするために必要であることが知られていたが、I 型インターフェロンによる制御が議論の中心であった。今回の研究により STING 経路依存的なサイトカイン及びケモカインの発現誘導も NK 細胞依存的な自発的な抗腫瘍応答に重要な役割を果たすことが示唆された。また腫瘍細胞自体の STING 経路については解析が不十分であったが、今回の解析により腫瘍細胞の STING 経路も抗腫瘍免疫応答に寄与している可能性が提示され、そこに関与する因子は宿主細胞のそれとは異なる可能性が示唆された。

昨今、腫瘍免疫療法が脚光を浴びており、STING リガンドを免疫アジュバントとして投与する試みも非常に活発である。今回の我々の知見より、STING 経路に依存した抗腫瘍免疫応答が、抗原提示細胞をはじめとする宿主の細胞のみならず、腫瘍細胞自体も引き起こし得ることが示唆された。自発的な応答のみならず、リガンド投与による活性化の誘導においても今回の研究で得られた知見が適用されるか、今後の検討課題である。抗腫瘍免疫応答における STING 経路の意義の解明は未だ始まったばかりであり、その全体像の解明及び今後の治療への応用が期待される。

謝辞

まず本研究を遂行するにあたり、多大なる御理解と御支援を賜りました北海道大学大学院医学研究科分子病理学分野 笠原正典教授に深く感謝いたします。また、終始適切な御指導、御討論を賜りました北海道大学大学院医学研究科免疫学分野 瀬谷司客員教授ならびに松本美佐子客員教授に深く感謝いたします。

全くの素人であった私に、分子生物学実験の手技手法のみならず研究の素晴らしさ、研究に対する真摯な姿勢など、沢山のことを御指導下さいました熊本大学大学院生命科学研究部感染免疫学講座免疫学分野 押海 裕之教授に心より感謝いたします。

本論文を審査して頂きました、北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野 村上正晃教授、北海道大学大学院医学研究科分子病理学分野 笠原正典教授、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病原微生物学分野 森松組子准教授に深く感謝いたします。

研究および様々な面で大変お世話になりました、北海道大学大学院医学研究科 免疫学分野の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、長い学生生活を様々な面で支え続けてくれた両親に感謝します。

2017 年 3 月

引用文献

1. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
2. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* **327**, 291–295 (2010).
3. Loo, Y.-M. & Gale, M. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* **34**, 680–692 (2011).
4. Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.M., Gale, M. Jr., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A. & Fujita, T. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J. Immunol.* **175**, 2851–2858 (2005).
5. Saito, T., Hirai, R., Loo, Y.M., Owen, D., Johnson, C.L., Sinha, S.C., Akira, S., Fujita, T. & Gale, M. Jr. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 582–587 (2007).
6. Takahashi, K., Yoneyama, M., Nishihori, T., Hirai, R., Kumeta, H., Narita, R., Gale, M. Jr., Inagaki, F. & Fujita, T. Nonspecific RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Molecular Cell* **29**, 428–440 (2008).
7. 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).
8. Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O. & Akira, S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* **6**, 981–988 (2005).
9. Xu, L.G., Wang, Y.Y., Han, K.J., Li, L.Y., Zhai, Z. & Shu, H.B. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Molecular Cell* **19**, 727–740 (2005).
10. Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R. & Tschopp, J. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167–1172 (2005).
11. Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., Endres, S. & Hartmann, G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994–997 (2006).

12. Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, CP., Näslund, TI., Liljeström, P., Weber, F. & Reis e Sousa, C. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**, 997–1001 (2006).
13. Goubau, D., Schlee, M., Deddouche, S., Pruijssers, AJ., Zillinger, T., Goldeck, M., Schuberth, C., Van der Veen, AG., Fujimura, T., Rehwinkel, J., Iskarpatyoti, JA., Barchet, W., Ludwig, J., Dermody, TS., Hartmann, G. & Reis e Sousa, C. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature* **514**, 372–375 (2014).
14. Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, TS., Fujita, T. & Akira, S. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med.* **205**, 1601–1610 (2008).
15. Gitlin, L., Barchet, W., Gilfillan, S., Cella, M., Beutler, B., Flavell, RA., Diamond, MS. & Colonna, M. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 8459–8464 (2006).
16. Saito, T. & Gale, M. Differential recognition of double-stranded RNA by RIG-I-like receptors in antiviral immunity. *J. Exp. Med.* **205**, 1523–1527 (2008).
17. Gack, MU., Shin, YC., Joo, CH., Urano, T., Liang, C., Sun, L., Takeuchi, O., Akira, S., Chen, Z., Inoue, S. & Jung, JU. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* **446**, 916–920 (2007).
18. Oshiumi, H., Matsumoto, M., Hatakeyama, S. & Seya, T. Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 807–817 (2009).
19. Oshiumi, H., Miyashita, M., Inoue, N., Okabe, M., Matsumoto, M. & Seya, T. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell Host & Microbe* **8**, 496–509 (2010).
20. Jiang, X., Kinch, LN., Brautigam, CA., Chen, X., Du, F., Grishin, NV. & Chen, ZJ. Ubiquitin-induced oligomerization of the RNA sensors RIG-I and MDA5 activates antiviral innate immune response. *Immunity* **36**, 959–973 (2012).
21. Patel, JR., Jain, A., Chou, YY., Baum, A., Ha, T. & García-Sastre, A. ATPase-driven oligomerization of RIG-I on RNA allows optimal activation of type-I interferon. *EMBO Rep.* **14**, 780–787 (2013).

22. Peisley, A., Wu, B., Yao, H., Walz, T. & Hur, S. RIG-I forms signaling-competent filaments in an ATP-dependent, ubiquitin-independent manner. *Molecular Cell* **51**, 573–583 (2013).
23. Peisley, A., Lin, C., Wu, B., Orme-Johnson, M., Liu, M., Walz, T. & Hur, S. Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 21010–21015 (2011).
24. Berke, I. C. & Modis, Y. MDA5 cooperatively forms dimers and ATP-sensitive filaments upon binding double-stranded RNA. *The EMBO Journal* **31**, 1714–1726 (2012).
25. Wu, B., Peisley, A., Richards, C., Yao, H., Zeng, X., Lin, C., Chu, F., Walz, T. & Hur, S. Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell* **152**, 276–289 (2013).
26. Komuro, A. & Horvath, C. M. RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. *Journal of Virology* **80**, 12332–12342 (2006).
27. Satoh, T., Kato, H., Kumagai, Y., Yoneyama, M., Sato, S., Matsushita, K., Tsujimura, T., Fujita, T., Akira, S. & Takeuchi, O. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 1512–1517 (2010).
28. Bruns, A. M., Leser, G. P., Lamb, R. A. & Horvath, C. M. The innate immune sensor LGP2 activates antiviral signaling by regulating MDA5-RNA interaction and filament assembly. *Molecular Cell* **55**, 771–781 (2014).
29. Hou, F., Sun, L., Zheng, H., Skaug, B., Jiang, QX. & Chen, ZJ. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* **146**, 448–461 (2011).
30. Xu, H., He, X., Zheng, H., Huang, LJ., Hou, F., Yu, Z., de la Cruz, MJ., Borkowski, B., Zhang, X., Chen, ZJ. & Jiang, QX. Structural basis for the prion-like MAVS filaments in antiviral innate immunity. *eLife* **3**, e01489 (2014).
31. Liu, S., Chen, J., Cai, X., Wu, J., Chen, X., Wu, YT., Sun, L. & Chen, ZJ. MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *eLife* **2**, e00785 (2013).
32. 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).
33. Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K. & Seya, T. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded

- RNA-mediated signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **293**, 1364–1369 (2002).
34. 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).
 35. Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, LP., Allavena, P. & Mantovani, A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* **164**, 5998–6004 (2000).
 36. Ercolini, A. M. & Miller, S. D. The role of infections in autoimmune disease. *Clin. Exp. Immunol.* **155**, 1–15 (2009).
 37. Kato, H. & Fujita, T. RIG-I-like receptors and autoimmune diseases. *Current Opinion in Immunology* **37**, 40–45 (2015).
 38. Smyth, DJ., Cooper, JD., Bailey, R., Field, S., Burren, O., Smink, LJ., Guja, C., Ionescu-Tirgoviste, C., Widmer, B., Dunger, DB., Savage, DA., Walker, NM., Clayton, DG. & Todd, JA. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat. Genet.* **38**, 617–619 (2006).
 39. Liu, S., Wang, H., Jin, Y., Podolsky, R., Reddy, MV., Pedersen, J., Bode, B., Reed, J., Steed, D., Anderson, S., Yang, P., Muir, A., Steed, L., Hopkins, D., Huang, Y., Purohit, S., Wang, CY., Steck, AK., Montemari, A., Eisenbarth, G., Rewers, M. & She, JX. IFIH1 polymorphisms are significantly associated with type 1 diabetes and IFIH1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 358–365 (2009).
 40. Molineros, JE., Maiti, AK., Sun, C., Looger, LL., Han, S., Kim-Howard, X., Glenn, S., Adler, A., Kelly, JA., Niewold, TB., Gilkeson, GS., Brown, EE., Alarcón, GS., Edberg, JC., Petri, M., Ramsey-Goldman, R., Reveille, JD., Vilá, LM., Freedman, BI., Tsao, BP., Criswell, LA., Jacob, CO., Moore, JH., Vyse, TJ., Langefeld, CL., Guthridge, JM., Gaffney, PM., Moser, KL., Scofield, RH., Alarcón-Riquelme, ME; BIOLUPUS Network., Williams, SM., Merrill, JT., James, JA., Kaufman, KM., Kimberly, RP., Harley, JB. & Nath, SK. Admixture mapping in lupus identifies multiple functional variants within IFIH1 associated with apoptosis, inflammation, and autoantibody production. *PLoS Genet.* **9**, e1003222 (2013).
 41. Sato, S., Kuwana, M., Fujita, T. & Suzuki, Y. Anti-CADM-140/MDA5 autoantibody titer correlates with disease activity and predicts disease outcome in patients with

- dermatomyositis and rapidly progressive interstitial lung disease. *Mod. Rheumatol.* **23**, 496–502 (2013).
42. Miner, J. J. & Diamond, M. S. MDA5 and autoimmune disease. *Nat. Genet.* **46**, 418–419 (2014).
 43. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511 (2004).
 44. Ishii, KJ., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., Sato, S., Yamamoto, M., Uematsu, S., Kawai, T., Takeuchi, O. & Akira, S. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat. Immunol.* **7**, 40–48 (2006).
 45. Stetson, D. B. & Medzhitov, R. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* **24**, 93–103 (2006).
 46. Ishikawa, H. & Barber, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674–678 (2008).
 47. Ishikawa, H., Ma, Z. & Barber, G. N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* **461**, 788–792 (2009).
 48. Jin, L., Waterman, PM., Jonscher, KR., Short, CM., Reisdorph, NA. & Cambier, JC. MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 5014–5026 (2008).
 49. Zhong, B., Yang, Y., Li, S., Wang, YY., Li, Y., Diao, F., Lei, C., He, X., Zhang, L., Tien, P. & Shu, HB. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* **29**, 538–550 (2008).
 50. Sun, W., Li, Y., Chen, L., Chen, H., You, F., Zhou, X., Zhou, Y., Zhai, Z., Chen, D. & Jiang, Z. ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 8653–8658 (2009).
 51. Takaoka, A., Wang, Z., Choi, MK., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., Ohba, Y. & Taniguchi, T. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* **448**, 501–505 (2007).
 52. Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.-W., Datta, P., Wu, J. & Alnemri, E. S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* **458**, 509–513 (2009).

53. 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.* **11**, 997–1004 (2010).
54. Zhang, Z., Yuan, B., Bao, M., Lu, N., Kim, T. & Liu, YJ. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat. Immunol.* **12**, 959–965 (2011).
55. Zhang, X., Brann, TW., Zhou, M., Yang, J., Oguariri, RM., Lidie, KB., Imamichi, H., Huang, DW., Lempicki, RA., Baseler, MW., Veenstra, TD., Young, HA., Lane, HC. & Imamichi, T. Cutting edge: Ku70 is a novel cytosolic DNA sensor that induces type III rather than type I IFN. *J. Immunol.* **186**, 4541–4545 (2011).
56. Kondo, T., Kobayashi, J., Saitoh, T., Maruyama, K., Ishii, KJ., Barber, GN., Komatsu, K., Akira, S. & Kawai, T. 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).
57. 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).
58. Barber, G. N. STING-dependent cytosolic DNA sensing pathways. *Trends in Immunology* **35**, 88–93 (2014).
59. 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).
60. Li, XD., Wu, J., Gao, D., Wang, H., Sun, L. & Chen, ZJ. Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science* **341**, 1390–1394 (2013).
61. Kranzusch, P. J., Lee, A. S.-Y., Berger, J. M. & Doudna, J. A. Structure of human cGAS reveals a conserved family of second-messenger enzymes in innate immunity. *Cell Rep.* **3**, 1362–1368 (2013).
62. Li, X., Shu, C., Yi, G., Chaton, CT., Shelton, CL., Diao, J., Zuo, X., Kao, CC., Herr, AB. & Li, P. Cyclic GMP-AMP synthase is activated by double-stranded DNA-induced oligomerization. *Immunity* **39**, 1019–1031 (2013).
63. Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C. & Chen, ZJ. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* **339**, 826–830 (2013).

64. Dobbs, N., Burnaevskiy, N., Chen, D., Gonugunta, VK., Alto, NM. & Yan, N. STING Activation by Translocation from the ER Is Associated with Infection and Autoinflammatory Disease. *Cell Host & Microbe* **18**, 157–168 (2015).
65. Mukai, K., Konno, H., Akiba, T., Uemura, T., Waguri, S., Kobayashi, T., Barber, GN., Arai, H. & Taguchi, T. Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi. *Nat. Comms.* **7**, 11932 (2016).
66. Tanaka, Y. & Chen, Z. J. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci. Signal.* **5**, ra20–ra20 (2012).
67. Barber, G. N. STING: infection, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 760–770 (2015).
68. Paijo, J., Döring, M., Spanier, J., Grabski, E., Nooruzzaman, M., Schmidt, T., Witte, G., Messerle, M., Hornung, V., Kaefer, V. & Kalinke, U. cGAS Senses Human Cytomegalovirus and Induces Type I Interferon Responses in Human Monocyte-Derived Cells. *PLoS Pathog.* **12**, e1005546 (2016).
69. Lio, CW., McDonald, B., Takahashi, M., Dhanwani, R., Sharma, N., Huang, J., Pham, E., Benedict, CA. & Sharma, S. cGAS-STING Signaling Regulates Initial Innate Control of Cytomegalovirus Infection. *Journal of Virology* **90**, 7789–7797 (2016).
70. Zhang, G., Chan, B., Samarina, N., Abere, B., Weidner-Glunde, M., Buch, A., Pich, A., Brinkmann, MM. & Schulz, TF. Cytoplasmic isoforms of Kaposi sarcoma herpesvirus LANA recruit and antagonize the innate immune DNA sensor cGAS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, E1034–43 (2016).
71. Lam, E., Stein, S. & Falck-Pedersen, E. Adenovirus detection by the cGAS/STING/TBK1 DNA sensing cascade. *Journal of Virology* **88**, 974–981 (2014).
72. Gao, D., Wu, J., Wu, YT., Du, F., Aroh, C., Yan, N., Sun, L. & Chen, ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science* **341**, 903–906 (2013).
73. Chen, Q., Sun, L. & Chen, Z. J. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat. Immunol.* **17**, 1142–1149 (2016).
74. Zitvogel, L., Galluzzi, L., Kepp, O., Smyth, M. J. & Kroemer, G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 405–414 (2015).
75. Woo, SR., Fuertes, MB., Corrales, L., Spranger, S., Furdyna, MJ., Leung, MY., Duggan, R., Wang, Y., Barber, GN., Fitzgerald, KA., Alegre, ML. & Gajewski, TF. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity* **41**, 830–842 (2014).

76. Deng, L., Liang, H., Xu, M., Yang, X., Burnette, B., Arina, A., Li, XD., Mauceri, H., Beckett, M., Darga, T., Huang, X., Gajewski, TF., Chen, ZJ., Fu, YX. & Weichselbaum, RR. STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity* **41**, 843–852 (2014).
77. Fu, J., Kanne, DB., Leong, M., Glickman, LH., McWhirter, SM., Lemmens, E., Mechette, K., Leong, JJ., Lauer, P., Liu, W., Sivick, KE., Zeng, Q., Soares, KC., Zheng, L., Portnoy, DA., Woodward, JJ., Pardoll, DM., Dubensky, TW. Jr. & Kim, Y. STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1 blockade. *Sci. Transl. Med.* **7**, 283ra52–283ra52 (2015).
78. Wang, Z. & Celis, E. STING activator c-di-GMP enhances the anti-tumor effects of peptide vaccines in melanoma-bearing mice. *Cancer Immunol. Immunother.* **64**, 1057–1066 (2015).
79. Corrales, L. & Gajewski, T. F. Molecular Pathways: Targeting the Stimulator of Interferon Genes (STING) in the Immunotherapy of Cancer. *Clin. Cancer Res.* **21**, 4774–4779 (2015).
80. Shingai, M., Ebihara, T., Begum, NA., Kato, A., Honma, T., Matsumoto, K., Saito, H., Ogura, H., Matsumoto, M. & Seya, T. Differential type I IFN-inducing abilities of wild-type versus vaccine strains of measles virus. *J. Immunol.* **179**, 6123–6133 (2007).
81. Takaki, H., Watanabe, Y., Shingai, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M. & Seya, T. Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- β -inducing potential. *Molecular Immunology* **48**, 497–504 (2011).
82. Radons, J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones* **21**, 379–404 (2016).
83. Kampinga, H. H. & Craig, E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 579–592 (2010).
84. Tanaka, T., Shibazaki, A., Ono, R. & Kaisho, T. HSP70 mediates degradation of the p65 subunit of nuclear factor κ B to inhibit inflammatory signaling. *Sci. Signal.* **7**, ra119–ra119 (2014).
85. Srivastava, P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 185–194 (2002).
86. Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E. & Koike, T. Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **4**, 1513–1521 (2009).
87. Honda, K. & Taniguchi, T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 644–658 (2006).

88. Wies, E., Wang, MK., Maharaj, NP., Chen, K., Zhou, S., Finberg, RW. & Gack, MU. Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PP1 is essential for innate immune signaling. *Immunity* **38**, 437–449 (2013).
89. Davis, ME., Wang, MK., Rennick, LJ., Full, F., Gableske, S., Mesman, AW., Gringhuis, SI., Geijtenbeek, TB., Duprex, WP. & Gack, MU. Antagonism of the phosphatase PP1 by the measles virus V protein is required for innate immune escape of MDA5. *Cell Host & Microbe* **16**, 19–30 (2014).
90. Gack, M. U., Nistal-Villán, E., Inn, K.-S., García-Sastre, A. & Jung, J. U. Phosphorylation-mediated negative regulation of RIG-I antiviral activity. *Journal of Virology* **84**, 3220–3229 (2010).
91. Funabiki, M., Kato, H., Miyachi, Y., Toki, H., Motegi, H., Inoue, M., Minowa, O., Yoshida, A., Deguchi, K., Sato, H., Ito, S., Shiroishi, T., Takeyasu, K., Noda, T. & Fujita, T. Autoimmune disorders associated with gain of function of the intracellular sensor MDA5. *Immunity* **40**, 199–212 (2014).
92. Shan, J., Wang, P., Zhou, J., Wu, D., Shi, H. & Huo, K. RIOK3 interacts with caspase-10 and negatively regulates the NF-kappaB signaling pathway. *Mol. Cell Biochem.* **332**, 113–120 (2009).
93. Feng, J., De Jesus, PD., Su, V., Han, S., Gong, D., Wu, NC., Tian, Y., Li, X., Wu, TT., Chanda, SK. & Sun, R. RIOK3 is an adaptor protein required for IRF3-mediated antiviral type I interferon production. *Journal of Virology* **88**, 7987–7997 (2014).
94. Baumas, K., Soudet, J., Caizergues-Ferrer, M., Faublader, M., Henry, Y. & Mougín, A. Human RioK3 is a novel component of cytoplasmic pre-40S pre-ribosomal particles. *RNA Biol.* **9**, 162–174 (2012).
95. Schlecht, R., Scholz, SR., Dahmen, H., Wegener, A., Sirrenberg, C., Musil, D., Bomke, J., Eggenweiler, HM., Mayer, MP. & Bukau, B. Functional analysis of Hsp70 inhibitors. *PLoS ONE* **8**, e78443 (2013).
96. Greene, M. K., Maskos, K. & Landry, S. J. Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 6108–6113 (1998).
97. Michels, A. A., Kanon, B., Bensaude, O. & Kampinga, H. H. Heat shock protein (Hsp) 40 mutants inhibit Hsp70 in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 36757–36763 (1999).
98. Onomoto, K., Jogi, M., Yoo, JS., Narita, R., Morimoto, S., Takemura, A., Sambhara, S., Kawaguchi, A., Osari, S., Nagata, K., Matsumiya, T., Namiki, H., Yoneyama, M. & Fujita, T. Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity. *PLoS ONE* **7**, e43031 (2012).

99. Zhang, P., Li, Y., Xia, J., He, J., Pu, J., Xie, J., Wu, S., Feng, L., Huang, X. & Zhang, P. IPS-1 plays an essential role in dsRNA-induced stress granule formation by interacting with PKR and promoting its activation. *Journal of Cell Science* **127**, 2471–2482 (2014).
100. Ishikawa, H. & Barber, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **456**, 274–274 (2008).
101. Li, T., Cheng, H., Yuan, H., Xu, Q., Shu, C., Zhang, Y., Xu, P., Tan, J., Rui, Y., Li, P. & Tan, X. Antitumor Activity of cGAMP via Stimulation of cGAS-cGAMP-STING-IRF3 Mediated Innate Immune Response. *Sci. Rep.* **6**, 19049 (2016).
102. Wendel, M., Galani, I. E., Suri-Payer, E. & Cerwenka, A. Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands. *Cancer Res.* **68**, 8437–8445 (2008).
103. Lavergne, E., Combadière, C., Iga, M., Boissonnas, A., Bonduelle, O., Maho, M., Debré, P. & Combadiere, B. Intratumoral CC chemokine ligand 5 overexpression delays tumor growth and increases tumor cell infiltration. *J. Immunol.* **173**, 3755–3762 (2004).
104. Demaria, O., De Gassart, A., Coso, S., Gestermann, N., Di Domizio, J., Flatz, L., Gaide, O., Michielin, O., Hwu, P., Petrova, TV., Martinon, F., Modlin, RL., Speiser, DE. & Gilliet, M. STING activation of tumor endothelial cells initiates spontaneous and therapeutic antitumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 15408–15413 (2015).
105. Lam, AR., Le Bert, N., Ho, SS., Shen, YJ., Tang, ML., Xiong, GM., Croxford, JL., Koo, CX., Ishii, KJ., Akira, S., Raulet, DH. & Gasser, S. RAE1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by STING-dependent DNA sensor pathways in lymphoma. *Cancer Res.* **74**, 2193–2203 (2014).
106. Neville, L. F., Mathiak, G. & Bagasra, O. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **8**, 207–219 (1997).
107. Gao, X., Wang, X., Yang, Q., Zhao, X., Wen, W., Li, G., Lu, J., Qin, W., Qi, Y., Xie, F., Jiang, J., Wu, C., Zhang, X., Chen, X., Turnquist, H., Zhu, Y. & Lu, B. Tumoral Expression of IL-33 Inhibits Tumor Growth and Modifies the Tumor Microenvironment through CD8⁺ T and NK Cells. *J. Immunol.* **194**, 438–445 (2014).
108. Negishi, H., Miki, S., Sarashina, H., Taguchi-Atarashi, N., Nakajima, A., Matsuki, K., Endo, N., Yanai, H., Nishio, J., Honda, K. & Taniguchi, T. Essential contribution of

- IRF3 to intestinal homeostasis and microbiota-mediated Tslp gene induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 21016–21021 (2012).
109. Chen, Q., Boire, A., Jin, X., Valiente, M., Er, EE., Lopez-Soto, A., Jacob, LS., Patwa, R., Shah, H., Xu, K., Cross, JR. & Massagué, J. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature* **533**, 493–498 (2016).