

## 【第46回 小島三郎記念文化賞】

## 細胞質ウイルスセンサー RIG-I ファミリーの発見

Discovery of the RIG-I family as cytoplasmic viral sensor

ふじ た たか し  
藤 田 尚 志  
Takashi FUJITA

## はじめに

早いものでインターフェロン (IFN) に関する研究に携わって三十数年が過ぎました。今回、栄えある小島三郎記念文化賞を受賞するにあたり、IFN 研究の歴史、並びに受賞対象となりました RIG-I ファミリー (RIG-I-like Receptors, RLR) の発見の経緯、その生理的役割について紹介させていただきます。

## I. IFN の発見

ウイルスの干渉 (interference) という現象、すなわち一つの種類のウイルス (たとえば紫外線等で不活化したウイルス) が感染した後では別のウイルスの増殖が抑制されるということが知られていた。これは感染後数時間から観察されることから、活性化まで数週間かかる抗体による免疫とは明らかに異なる現象であった。この現象を引き起こしている因子について長野、小島によって 1954<sup>1)</sup>、そして Isaacs、Lindenmann によって 1957<sup>2)</sup> に独立に報告された。特に後者はその因子をインターフェロンと命名し、現在もその名前は使われている。発見の経緯から、これらの因子は現在の I 型 IFN (さまざまな種類の分子量約 2 万のタンパク質) に属するものと考えられる。

## II. IFN 蛋白質、遺伝子の同定

しばらくの間 IFN の実体は不明であったが、IFN 蛋白質の精製、遺伝子クローニングが '70 年代の後半に行われるに至って一群の蛋白質 (サイトカイン

と総称される) のひとつであることが明らかとなった。IFN には大別して I 型、II 型および今世紀になって発見された III 型があり、それぞれ独立して進化したものと考えられている。I 型にはイントロンが無いが II 型および III 型はイントロンのある遺伝子にコードされている。I 型と III 型はウイルス感染などによって活性化される。II 型は T 細胞の活性化や IL-18 によって誘導されるため、直接ウイルス感染による誘導応答というよりは獲得免疫の応答として捉えられるのが普通である。IFN 遺伝子ファミリーでの分類によれば、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\tau$ ,  $\omega$ ,  $\kappa$ ,  $\epsilon$  は I 型であり、 $\gamma$  のみが II 型である。III 型には  $\lambda$  (IL28, 29 とも呼ばれる) が含まれる。

## III. IFN の作用機序の解明

I 型、II 型および III 型 IFN は共通して抗ウイルス活性を細胞に誘導する。IFN の作用機序については '80 ~ '90 年代に解明された。IFN は細胞表面に発現する受容体に結合することで細胞にシグナルを与える (図 1)。それぞれの型の IFN 受容体は特異的な 2 種類の受容体鎖より形成されていて、IFN が結合すると細胞内で JAK ファミリーのキナーゼが活性化され、それらが転写因子 STAT ファミリーの活性化を行う。最終的には I 型、III 型 IFN では STAT1/STAT2/IRF9 複合体 (ISGF3 とも呼ばれる) が、II 型では STAT1 のホモダイマー (GAF とも呼ばれる) が主として活性化される。活性化されたこれらの転写因子は数百ある IFN-stimulated genes (ISGs) を活性化して、それらの一部がウイルス増殖のさまざまなステップを抑制するものと考えられている。

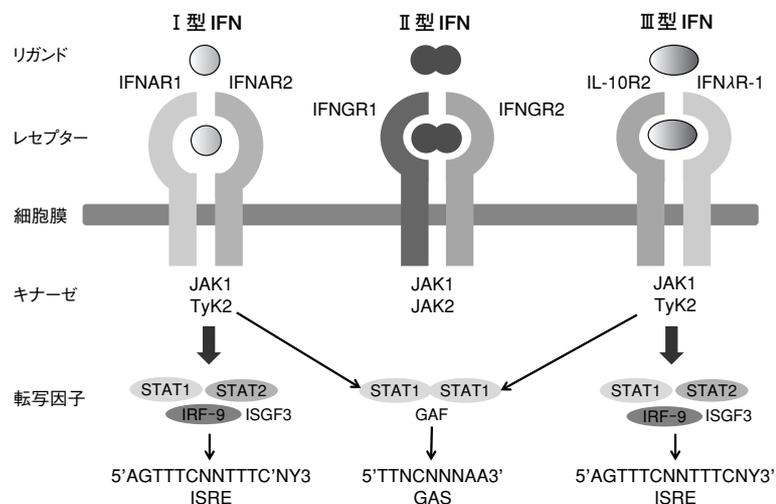


図1 IFN受容体とシグナル伝達

I型、II型、III型IFNはそれぞれの受容体に結合して細胞内にシグナルを伝達する。それぞれ下流で活性化されるキナーゼ、転写因子を示す。

#### IV. IFN 遺伝子発現機構の研究

IFNは普段発現していないが、感染によって発現誘導される。その際に最も効率の良いインデューサーはウイルスである。バクテリアのエンドトキシンや二重鎖RNAが非ウイルス性のインデューサーとして機能することも古くから知られていた。I型IFN遺伝子自体の発現制御についてはIFN遺伝子がクローンされた後に解析が開始され、'80年代半ばにはウイルスによる誘導に応答するエンハンサー配列の同定、そこに結合する転写因子である Interferon Regulatory Factor (IRF) ファミリーが発見されている。ヒトゲノムの解析が終了した'90年代にはIRFファミリーのうち、IRF-3が通常、細胞質に蓄積しており、ウイルス感染によって誘導されるシグナルによってリン酸化されて核移行してIFN遺伝子の活性化を担っている事が明らかとなった<sup>3,4)</sup>。転写因子活性化からIFN遺伝子活性化に至る経路の概要はこのようにして解明されたが、どのような機構でウイルス侵入を細胞が感知するのかについてはIFN発見以来の謎であった。

#### V. 哺乳類におけるTLRの自然免疫反応のセンサーとしての役割の発見

'90年代後半の研究によって哺乳類における Toll-

like Receptor (TLR) の機能がノックアウトマウスの解析によって明らかとなった。TLRは細胞表面やエンドソームに発現しており、病原体由来分子パターン、Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP) を認識する。その刺激によってシグナルが伝達され、最終的に転写因子の活性化、IFNを含むサイトカイン遺伝子群の活性化が誘導される(図2)<sup>5)</sup>。ウイルス由来のPAMPsである2重鎖RNAはTLR3によって<sup>6)</sup>、一本鎖RNAはTLR7, 8によって<sup>7)</sup>、非メチルRNA (CpG DNA) はTLR9によって認識される<sup>8)</sup>。TLR3は貪食細胞や一部の繊維芽細胞に発現しており、エンドサイトーシスによってエンドソームに取り込まれた2重鎖RNAを認識してシグナルを伝える。核酸認識のTLRではTLR3が最も良く解析されている。2重鎖RNAとTLR3の結合はTLR3の細胞内ドメインであるTIRドメインの会合を誘導し<sup>9)</sup>、アダプターTRIF, TRAF3, TRAF6などを巻き込むことによって蛋白質キナーゼであるTBK-1, IKK-iあるいはIKK kinaseを活性化する。その結果転写因子IRF-3, -7, NF-κBあるいはMAPK経路を活性化することによってインターフェロン遺伝子の活性化を引き起こす。TLR7, 8, 9は特殊な細胞 plasmacytoid dendritic cell や一部のB細胞で発現しており<sup>10)</sup>、この細胞は大量のIFNαを産生して血流中のインターフェロンを上昇させることに貢献している。エンドソームでの認識はエンドソームの酸性化が認識に必要であるため、クロロキンのような薬剤によってそ

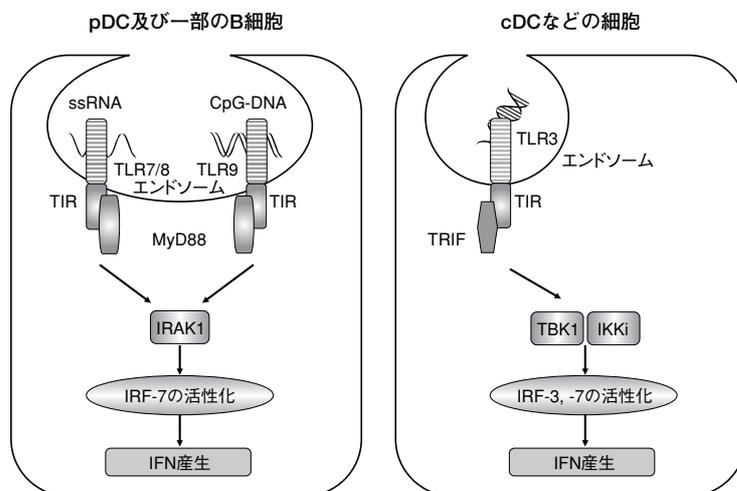


図2 TLRによる核酸認識とIFN産生

プラズマ細胞様樹状細胞 (pDC) および、一部のB細胞ではTLR7/8および9が、その他の樹状細胞やTLR3の発現する細胞ではTLR3が外来性の核酸を認識してIFN産生を誘導する。

の認識が強く阻害される<sup>11, 12)</sup>。このことによって細胞質での認識 (後述) と区別される。

TLRの機能が明らかになったことで宿主細胞がウイルス感染を感知するメカニズムが解明されたかのように思われたが、原理的にTLRは(ウイルス感染細胞が死ぬことによって)細胞外に放出された核酸を認識する受容体であり、ウイルスの細胞内への侵入をいち早く感知する分子ではないと考えられた。事実TLR3を欠失する細胞はウイルス感染によるIFN産生は正常であった。

## VI. 発現ライブラリースクリーニングとRIG-Iの機能の発見

われわれのグループは'93年より東京都臨床研で研究を行っており、'98年にIRF-3がウイルス感染の刺激の結果、リン酸化されて活性型になることを見出してから、そのリン酸化酵素の探索を行っていた。その目的のためさまざまなアプローチを試みた。その中には酵母を用いた2-hybrid法でIRF-3に結合する分子のスクリーニング、二重鎖RNAと結合する分子の精製とペプチド配列の決定、IRF-3と結合する分子の抗IRF-3抗体による免疫沈降による単離などが含まれていた。しかしこれらの探索の結果、何も目ぼしいものは得られなかった。物理的に結合するということで得られたものでも機能の解析を改めて行わなければならない、二度手間であることを痛

感し、発現cDNAライブラリーを機能を指標にスクリーニングすることを決めた。当時研究員であった米山光俊君(現、千葉大学真菌医学研究センター教授)と相談してストラテジーを練った。すでに他の目的でさまざまな細胞の検討によって、赤芽白血病細胞のK562細胞はウイルス感染をしてもIRF-3が活性化されないことを見出していた。この細胞はI型IFN遺伝子が脱落していて自らIFNを作ることができないがIFN応答性は保持されていて、IFN処理してからウイルスを感染させるとIRF-3の活性化が誘導されることがわかった。そこで発現ライブラリーをIFN処理したK562細胞から調製することにした。また、とりあえず10万クロンのcDNAをスクリーニングすることにした。スクリーニングは細胞に発現cDNAライブラリーをウイルス応答性のルシフェラーゼレポーター遺伝子とともに培養細胞にトランスフェクションし、次の日に人工二重鎖RNAであるポリI:Cをさらにトランスフェクションした後にルシフェラーゼの活性を測定するというやや複雑なものであった。単一クローンを10万回アッセイするのはいかにも大変なのでコロニーを20ずつプールして(ポジティブクローンを他の19クローンと混ぜてアッセイしてシグナルが検出される最低限であることは確認した)プラスミドを調製してそれを5000回トランスフェクションによって調べることにした。96穴プレートで1穴/20クローンとして約50枚分であり、ポジティブが出た場合は

その再現性のチェック、さらには含まれるクローンについて二次スクリーニングを行うのでさらに多くのアッセイが必要であった。米山君は数カ月の間このアッセイを続け、結局 10 ほどの候補クローンを得ることができた。その中には残念ながら当初目的とした IRF-3 をリン酸化するキナーゼらしきものは無かった。事実、われわれのスクリーニングが終了するまでに IRF-3 キナーゼはすでに 2 つのグループによって同定されていた。また明らかにスクリーニング系を非特異的に活性化したと思われるクローンがあり、それを除くと数クローンにまで絞られた。その中で IRF と NF- $\kappa$ B を再現性良く活性化する 1 つのクローンに注目した。その cDNA は全長ではなく、N 末端側の 200 ほどのアミノ酸しかコードしていなかった。それは短い cDNA が発現しているのではなく合成のプライマーとして用いた oligo dT が cDNA 中の A の繰り返りに結合して合成されたためと考えられた。コードされた短い蛋白質は caspase recruitment and activation domain (CARD) というモチーフの 2 回繰り返しをコードしていた。全長はアミノ酸約 900 からなる蛋白質であり、すでに retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) として登録されていたが、その機能は全く不明であった。RIG-I は RNA ヘリカーゼに保存されたモチーフを有しており、ヒトゲノム上に存在する数百のヘリカーゼ遺伝子の一つであることが判明した。その中でも RIG-I と特に相同性の高いヘリカーゼ、MDA5、LGP2 があることがわかった。K562 細胞の結果からも想像されるように、これら 3 種のヘリカーゼは IFN によって合成が誘導されることも判明した。RNA ヘリカーゼは二重鎖 RNA を一重鎖に解く酵素であることから、IFN を誘導する二重鎖 RNA の認識に関わっているのではないかという希望を持ってさらに解析を進めた。実際に全長の RIG-I は二重鎖 RNA 結合能を有していた。また興味深いことに CARD のみを持つクローンはそれを発現するだけで IFN 発現を誘導することが判明した。これに反して全長の RIG-I は高発現しても活性化能が低いこと、それは抑制ドメインがあり、普段は IFN が作られないように制御されているからだということが後に明らかとなった。またスクリーニングに用いたポリ I:C は別のヘリカーゼ MDA5 が認識することがその後の解析で判明した (後述)。RIG-I がこのスクリーニ

ングで得られたことは多くの幸運に恵まれたことによる。すなわち CARD のみをコードする cDNA が合成されてクローニングされたこと、その発現によって少量の IFN が合成され、その結果 MDA5 が合成されてポリ I:C に反応してより大量の IFN ができたためと想像できる。

## VII. RLR による IFN 誘導の制御

TLR に習ってこのファミリーは RIG-I-Like Receptor (RLR) と総称されるようになった。RLR の機能の概略を示す (図 3)<sup>13)</sup>。RLR は共通して DExHD のモチーフを有する RNA ヘリカーゼドメインを有している。また C 末端側には保存されたドメイン (CTD) がある<sup>14~17)</sup>。RIG-I と MDA5 は N 末端側に CARD ドメインを有している。二重鎖 RNA は CTD によって認識されると考えられている。RIG-I と LGP2 の CTD は二重鎖 RNA への結合活性が高く、MDA5 の CTD の結合は著しく低い。このアフィニティの相違はこれらの CTD の立体構造の相違を反映している。RIG-I と LGP2 の CTD には表面の塩基性のへこみがあり、NMR による滴定実験、さらにはモデリングによってこの構造が二重鎖 RNA との結合を可能にしていることが示唆されている。MDA5 の CTD はへこみが浅いこと、そこに存在する RNA 結合

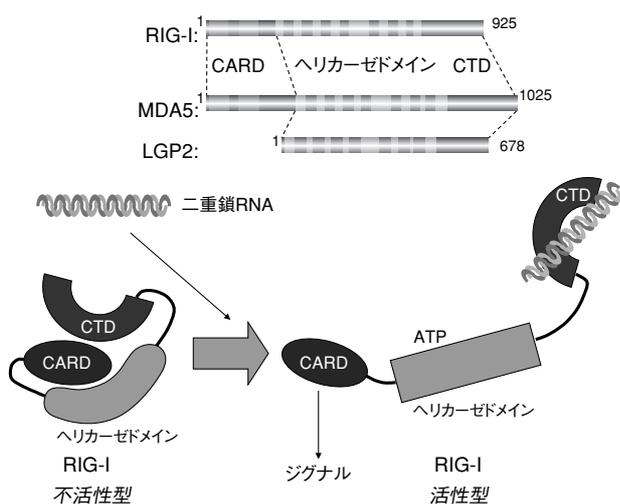


図 3 RLR のドメイン構造と構造変化による RIG-I の活性化<sup>13)</sup>

RLR のドメイン構造を上を示す。LGP2 には CARD を欠いている。RIG-I は通常閉じた構造をしていると考えられているが、ウイルス由来の二重鎖 RNA などの結合によって構造変化を引き起こし、CARD が露出する。CARD は下流の蛋白質と相互作用しシグナルを伝達する。

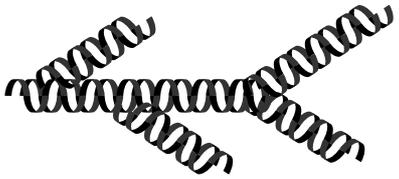
RNA	構造	RLR	文献
短いPoly (I:C) (300塩基対)		RIG-I	39
長いPoly (I:C) (4,000塩基対以上)	PP5'  5'PP	MDA5	39
試験管内転写産物 T7ポリメラーゼ コーヒーバック構造を有する	PPP5' 	RIG-I	40, 41
C型肝炎 ウイルスゲノムRNA (パンハンドル構造)	PPP5'  (U) <sub>n</sub> 	RIG-I	42
インフルエンザA ウイルスゲノムRNA (パンハンドル構造)		RIG-I	43
RNase L 分解産物	3'p  p3'	RIG-I, MDA5	44
高分子RNA (織物状構造?)		MDA5	45

図4 合成、天然の非自己RNA構造とそれを感知するRLR  
詳細は文献参照。

ループに存在する重要なフェニルアラニン残基がシステインに置換されているなどの理由によってアフィニティが低いものと考えられる。ノックアウトマウス/細胞の解析により、RIG-I、MDA5のウイルス識別には特異性があることが明らかになった<sup>18)</sup>。初期の結果からはMDA5はピコルナウイルスを、RIG-Iはその他のウイルスの感知を行っていることが示唆されたが、その後の報告ではウイルスの種類というよりはウイルスの作り出すRNAの構造の認識に特異性があることが明らかとなった(図4)。LGP2はCARDを持たず、トランスフェクションによって過剰発現するとウイルスによるインターフェロン生成を抑制したため、当初は抑制因子と考えられた<sup>19)</sup>。しかし、ノックアウトマウス/細胞の解析結果はウイルスの種類によってRIG-IまたはMDA5と協調的にウイルスの感知を行っていることが明らかとなっている<sup>20, 22)</sup>。

## VIII. RLRの活性化制御

RLRは通常閉じた構造を取っているためにCARDが隠されることによって不活性型となっていると考えられている(図3)。CTDに存在するRNA結合ド

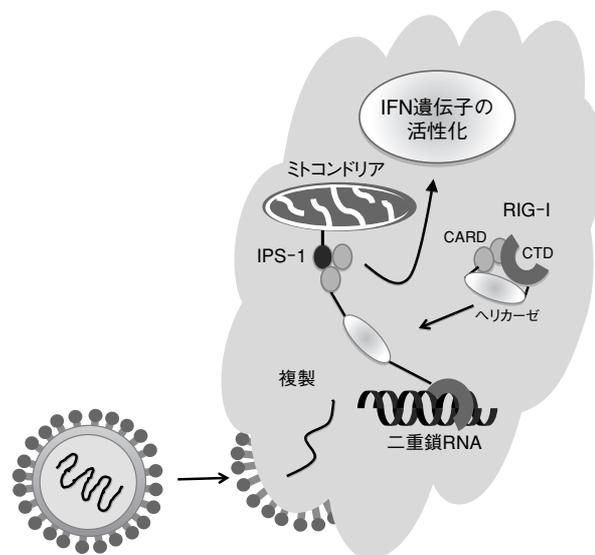


図5 ウイルスの侵入と細胞による  
ウイルスの感知機構

ウイルスは細胞内に核酸を導入する事によって複製を開始する。二重鎖RNAなどの複製産物はRIG-Iやその他のRLRによって認識され、シグナルはミトコンドリア外膜上に発現するアダプター、IPS-1を介してIFN遺伝子活性化が誘導される。

メインがウイルス由来の二重鎖RNAなどと結合すると立体構造が活性型に変化し、CARDが露出する。このCARDはミトコンドリア外膜上に発現するIPS-1<sup>27)</sup>(MAVS, VISA, Cardifとも呼ばれる)と相互作用することによってシグナルが伝達される(図5)。

IPS-1はミトコンドリア上に発現することがその機能に必須であるが、その理由は最近まで良くわからなかったが、ミトコンドリアの融合を制御する蛋白質 Mitofusin 1 (MFN1) がIPS-1の凝集体形成を制御しており、抗ウイルス反応にミトコンドリアの機能が深くかかわっていることが明らかになってきた。

IPS-1から先のシグナル伝達にはTRAF3, 6などの多くのアダプター分子が関与している<sup>23-31</sup>。ER、Golgi、ミトコンドリアなどに局在するアダプター分子の機能は全体としての流れの中で深く理解されているとはいえない。RIG-Iを含めたいくつかの分子のユビキチン化の報告もある<sup>32-37</sup>。細菌試験管内でのRIG-Iの活性化とIRF-3のリン酸化による活性化が報告され、その中でRIG-Iの活性化にはその直接のユビキチン化ではなく、遊離のポリユビキチン鎖が制御に関与するというモデルが提唱されている<sup>38</sup>。

## IX. RLR 発見のインパクト

われわれのRIG-Iがウイルスセンサーであるという報告の後、世界中のウイルス研究者によってRLRがRNAウイルスのみならずDNAウイルスの感知にも重要である事が明らかにされた。下流のシグナル伝達の研究も盛んに行われるようになり、すでに数十の活性化因子、抑制因子の報告がなされている。また、RLRによるシグナルが抗ウイルス反応に重要であることはウイルス側から見た場合、その一連の反応を阻害することが生存の戦略となる。RLRとその下流のシグナル分子群がウイルスの標的になっている事も明らかになってきた。例えばインフルエンザAウイルスはNS1蛋白質をコードしているが、これはRIG-Iの活性を阻害している事が明らかとなった。

### おわりに

RLRは侵入してきたウイルスのセンサーとして機能する事が明らかとなった。今後の研究の展開はどのようなだろうか。RLRは基本的にRNAを感知するが、自己と非自己の相違は絶対的なのだろうかという疑問がある。自己のRNAのメタボリズム、例えばマイクロRNAによる制御との接点はあるのだ

ろうか。また植物や無脊椎動物では侵入してきたウイルスは主としてRNAiのシステムによって排除される。これまでの研究によってRLRは直接RNAiの制御は行っていないと考えられている。それではどのようにして細胞内のRNAがこれらの異なるシステムによって監視、代謝されているのだろうか。これらの問題は今後の研究によって明らかになるであろう。

またウイルスに対する自然免疫反応が過剰に起こることがその後の自己免疫発症の引き金になっている可能性がいくつか報告されている。1つはコクサッキーウイルスと細胞質センサーMDA5を介した1型糖尿病発症の関連である。もう1つは皮膚筋炎の新たに同定された自己抗原がMDA5であったという報告である。自己のRNAを認識することによって生理的、あるいは病的な反応が起きている可能性は将来の課題であろう。

## 謝 辞

このたび伝統ある小島三郎記念文化賞を戴く事になり大変喜んでおります。選考に当たられた先生方、また推薦の労をとっていただきました松岡雅雄先生、影山龍一郎先生に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Nagano, Y. and Kojima, Y.: *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, **148**: 1700-1702, 1954.
- 2) Isaacs, A. and Lindenmann, J.: *Proc. R. Soc. Ser B*, **147**: 258-267, 1957.
- 3) Yoneyama, M. et al.: *J. Interferon Cytokine Res.*, **22**: 73-76, 2002.
- 4) Levy, D.E. et al.: *J. Interferon Cytokine Res.*, **22**: 87-93, 2002.
- 5) S. Akira, S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Cell* **124** (4): 783, 2006.
- 6) L. Alexopoulou, A. C. Holt, R. Medzhitov et al., *Nature* **413** (6857): 732, 2001.
- 7) V. Hornung, M. Guenther-Biller, C. Bourquin et al., *Nat Med* **11** (3): 263, 2005.
- 8) H. Hemmi, O. Takeuchi, T. Kawai et al., *Nature* **408** (6813): 740, 2000.
- 9) L. Liu, I. Botos, Y. Wang et al., *Science* **320** (5874): 379, 2008.
- 10) M. Kerkmann, S. Rothenfusser, V. Hornung et al., *J Immunol* **170** (9): 4465, 2003.
- 11) O. de Bouteiller, E. Merck, U. A. Hasan et al., *The Journal*

- of biological chemistry* **280** (46): 38133, 2005.
- 12) A. Kumar, J. Zhang, and F. S. Yu, *Immunology* **117** (1): 11, 2006.
  - 13) M. Yoneyama and T. Fujita, *Immunol Rev* **227** (1): 54, 2009.
  - 14) S. Cui, K. Eisenacher, A. Kirchhofer et al., *Mol Cell* **29**(2): 169, 2008.
  - 15) K. Takahasi, H. Kumeta, N. Tsuduki et al., *The Journal of biological chemistry* **284** (26): 17465, 2009.
  - 16) K. Takahasi, M. Yoneyama, T. Nishihori et al., *Mol Cell* **29** (4): 428, 2008.
  - 17) D. A. Pippig, J. C. Hellmuth, S. Cui et al., *Nucleic acids research* **37** (6): 2014, 2009.
  - 18) H. Kato, O. Takeuchi, S. Sato et al., *Nature* **441** (7089): 101, 2006.
  - 19) M. Yoneyama, M. Kikuchi, K. Matsumoto et al., *J Immunol* **175** (5): 2851, 2005.
  - 20) T. Satoh, H. Kato, Y. Kumagai et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107** (4): 1512, 2010.
  - 21) T. Venkataraman, M. Valdes, R. Elsby et al., *J Immunol* **178** (10): 6444, 2007.
  - 22) T. Saito, R. Hirai, Y. M. Loo et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** (2): 582, 2007.
  - 23) G. Oganessian, S. K. Saha, B. Guo et al., *Nature* **439** (7073): 208, 2006.
  - 24) S. K. Saha, E. M. Pietras, J. Q. He et al., *EMBO J* **25** (14): 3257, 2006.
  - 25) L. G. Xu, Y. Y. Wang, K. J. Han et al., *Mol Cell* **19** (6): 727, 2005.
  - 26) S. Balachandran, E. Thomas, and G. N. Barber, *Nature* **432** (7015): 401, 2004.
  - 27) T. Kawai, K. Takahashi, S. Sato et al., *Nat Immunol* **6**(10): 981, 2005.
  - 28) M. C. Michallet, E. Meylan, M. A. Ermolaeva et al., *Immunity* **28** (5): 651, 2008.
  - 29) H. Ishikawa and G. N. Barber, *Nature* **455** (7213): 674, 2008.
  - 30) W. Sun, Y. Li, L. Chen et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** (21): 8653, 2009.
  - 31) B. Zhong, Y. Yang, S. Li et al., *Immunity* **29** (4): 538, 2008.
  - 32) M. U. Gack, Y. C. Shin, C. H. Joo et al., *Nature* **446** (7138): 916, 2007.
  - 33) K. Arimoto, H. Takahashi, T. Hishiki et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** (18): 7500, 2007.
  - 34) N. Kayagaki, Q. Phung, S. Chan et al., *Science* **318** (5856): 1628, 2007.
  - 35) R. Lin, L. Yang, P. Nakhaei et al., *The Journal of biological chemistry* **281** (4): 2095, 2006.
  - 36) T. Saitoh, M. Yamamoto, M. Miyagishi et al., *J Immunol* **174** (3): 1507, 2005.
  - 37) Y. Y. Wang, L. Li, K. J. Han et al., *FEBS Lett* **576** (1-2): 86, 2004.
  - 38) W. Zeng, L. Sun, X. Jiang et al., *Cell* **141** (2): 315, 2010.
  - 39) Kato H, et al : *J Exp Med* **205** : 1601-1610, 2008.
  - 40) Schlee M, et al : *Immunity* **31** : 25-34, 2009.
  - 41) Schmidt A, et al : *Proc Natl Acad Sci USA* **106** : 12067-12072, 2009.
  - 42) Saito T, et al : *Nature* **454** : 523-527, 2008.
  - 43) Rehwinkel J, et al : *Cell* **140** : 397-408, 2010.
  - 44) Malathi K, et al : *Nature* **448** : 816-819, 2007.
  - 45) Pichlmair A, et al : *J Virol* **83** : 10761-10769, 2009.