

- R., Tanabe, A., Golden, S.-S., Johnson, C.-H., & Kondo, T. (1998) *Science*, 281, 1519–1523.
- 5) Nishiwaki, T., Iwasaki, H., Ishiura, M., & Kondo, T. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 495–499.
 - 6) Xu, Y., Mori, T., & Johnson, C.-H. (2003) *EMBO J.*, 22, 2117–2126.
 - 7) Iwasaki, H., Nishiwaki, T., Kitayama, Y., Nakajima, M., & Kondo, T. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 15788–15793.
 - 8) Kitayama, Y., Iwasaki, H., Nishiwaki T., & Kondo, T. (2003) *EMBO J.*, 22, 2127–2134.
 - 9) Pattanayek, R., Wang, J., Mori, T., Xu, Y., Johnson, C.-H., & Egli, M. (2004) *Mol. Cell*, 15, 375–388.
 - 10) Nishiwaki, T., Satomi, Y., Nakajima, M., Lee, C., Kiyohara, R., Kageyama, H., Kitayama, Y., Temamoto, M., Yamaguchi, A., Hijikata, A., Go, M., Iwasaki, H., Takao, T., & Kondo, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 13927–13932.
 - 11) Xu, Y., Mori, T., Pattanayek, R., Pattanayek, S., Egli, M., & Johnson, C.-H. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 13933–13938.
 - 12) Hayashi, F., Iwase, R., Uzumaki, T., & Ishiura, M. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 348, 864–872.
 - 13) Tomita, J., Nakajima, M., Kondo, T., & Iwasaki, H. (2005) *Science*, 307, 251–254.
 - 14) Ito, H., Kageyama, H., Mutsuda, M., Nakajima, M., Oyama, T., & Kondo, T. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14, 1084–1088.
 - 15) Nishiwaki, T., Satomi, Y., Kitayama, Y., Terauchi, K., Kiyohara, R., Takao, T., & Kondo, T. (2007) *EMBO J.*, 26, 4029–4037.
 - 16) Rust, M.-J., Markson, J.-S., Lane, W.-S., Fisher, D.-S., & O’Shea, E.-K. (2007) *Science*, 318, 809–812.
 - 17) Kageyama, H., Kondo, T., & Iwasaki, H. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 2388–2395.
 - 18) Kageyama, H., Nishiwaki, T., Nakajima, M., Iwasaki, H., Oyama, T., & Kondo, T. (2006) *Mol. Cell*, 23, 161–171.
 - 19) Akiyama, S., Nohara, A., Ito, K., & Maeda, Y. (2008) *Mol. Cell*, 29, 703–716.
 - 20) Terauchi K., Kitayama, Y., Nishiwaki, T., Miwa, K., Murayama, Y., Oyama, T., & Kondo, T. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 16377–16381.
 - 21) Murakami, R., Miyake, A., Iwase, R., Hayashi, F., Uzumaki, T., & Ishiura, M., (2008) *Genes Cells*, 13, 387–395.

大川(西脇) 妙子

(名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻
時間生物学研究グループ)

Phosphorylation of cyanobacterial clock protein KaiC
Taeko Ohkawa-Nishiwaki (Division of Biological Science,
Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho,
Chikisa-ku, Nagoya 464-8602, Japan)

ウイルス RNA センサー RIG-I による非自己 RNA 認識機構

はじめに

ウイルスは、我々の細胞に感染しその機能を巧みに利用して増殖する。一方で細胞は、感染を検知し自然免疫などの生体防御システムを発動させてウイルスの増殖を抑制する。ウイルス感染症の発症と治癒は、これらのバランスが重要なファクターとなる。これまで、ウイルス感染特に RNA ウイルスに対する生体防御機構として I 型インターフェロン (IFN) の発現誘導を介した自然免疫についての解析が進んできた。近年、実際にウイルス RNA を検知する分子が発見されたことで、その非自己 RNA 検知とシグナル誘導の分子メカニズムが急速に解明されつつある。そのひとつが細胞外やエンドソーム内で感染を検知する Toll like receptor (TLR) である。TLR3 と TLR7 はそれぞれウイルス由来の二重鎖 RNA (dsRNA) と一重鎖 RNA (ssRNA) を検知し、IFN や炎症性サイトカインを誘導する。これらは主に樹状細胞などにおける獲得免疫制御に深く関わっていることが知られている。一方、細胞質でウイルス RNA を検知する分子として、retinoic acid inducible gene I (RIG-I) とそのファミリー分子が同定されている。RIG-I は RNA ヘリカーゼであるが、N 末に caspase recruitment domain (CARD) を二つ持つことが特徴であり、ヘリカーゼの RNA 結合能を利用してウイルス RNA を検知し、CARD を介して下流へとシグナルを伝達する。RIG-I ファミリーは多くの組織に発現しており、RNA ウイルス感染に応答した自然免疫誘導において必須な役割を担っている。本稿では、最近明らかになった RIG-I による非自己 RNA 認識機構について概説する。

1. RIG-I ファミリーによる IFN 誘導

RIG-I ファミリーは RIG-I, melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5), laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2) の三種からなる (図 1)^{1,2)}。それぞれ高い相同性を示すヘリカーゼドメインを持つが、N 末に CARD を持つのは RIG-I と MDA5 である。ノックアウトマウスの解析から、両者は共にウイルス検知とそれに続く IFN 誘導において必須な役割を担うことが明らかになっている^{3,4)}。ウイルス RNA を検知した RIG-I と MDA5 は、ATP

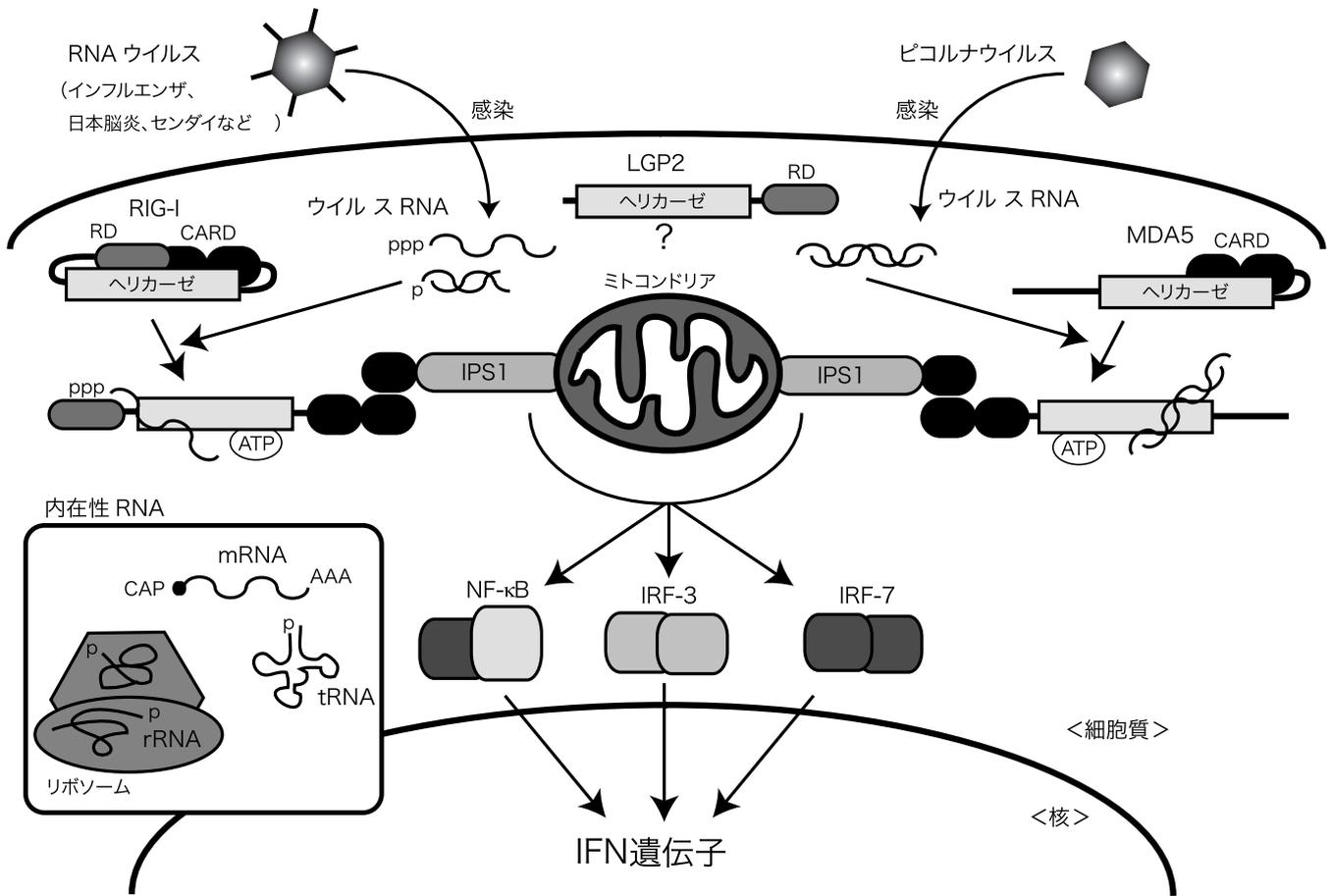


図1 RIG-Iファミリーによるシグナル伝達機構

RIG-IとMDA5は異なるウイルス感染を検知する。RIG-Iは5′三リン酸を持つssRNAを認識することが報告されており、MDA5はdsRNAを認識しているのではないかと予想されている。重要なことは、内在性のRNAを検知しないことである。ウイルスRNAを検知するとATP依存的な構造変化によりCARDが露出し、ミトコンドリア外膜に局在するIPS-1のCARDと会合できるようになり、そこにリクルートされてくるシグナル分子を介して、IRFやNF-κBなどの転写因子が活性化され、シグナルが核内へと伝達される。

依存的に構造変化を起こし、同じくCARDを持つ下流のアダプター分子IPS-1（別名MAVS/VISA/Cardif）と会合する。そこへリクルートされてくるTRAF3, FADD, RIP1, IKKキナーゼファミリーなどのシグナル分子の活性化を介して、転写因子IRF-3, IRF-7, NF-κBなどが活性化され、IFN遺伝子が誘導されると考えられている（図1）。もうひとつのファミリー分子であるLGP2は、CARDを持たないことからRIG-IやMDA5を負に制御する調節機能を持つと考えられていたが、最近のノックアウトマウスの報告では、一部のウイルス感染に対して正の機能を持つことが示されており⁵⁾、その生理的な役割については今後の解析が必要である。

RIG-IのC末端は、repressor domain (RD)として機能

していることが示されている（図1）⁶⁾。すなわち、RDはCARDおよびヘリカーゼドメインの中にあるリンカー領域と分子内会合することで、RIG-Iを不活性状態に保つ役割を担っている。LGP2のC末端も同じくRDとして働く能力を持っているが、MDA5のC末端はその活性を持たないことが示されている。LGP2のRDがどのようにシグナルに関与しているのか、MDA5がどのように不活性型をとっているのかなどについてはまだ明らかになっていない。

2. RIG-Iファミリーの基質特異性

RIG-IとMDA5は共にウイルスRNAのセンサーとして機能するが、その基質特異性は大きく異なることがわかっ

ている⁴⁾。RIG-Iはインフルエンザや日本脳炎、センダイウイルスなど多くのウイルス検知を行うが、MDA5は主にピコルナウイルス科に属するウイルスの検知に関与している(図1)。人工的なRNAでは、RIG-Iは*in vitro*で合成したRNAを、MDA5はpolyI:Cなどの比較的長い合成dsRNAを認識してシグナルを伝達する。認識するRNAの特異性については、RIG-IがssRNAの5'三リン酸を認識することが報告されている^{7,8)}。この知見から、細胞質でのRIG-Iによる自己と非自己のRNA識別が明確に説明されている。すなわち内在性のほとんどの自己RNAは、mRNAに対するキャップ構造の付加、tRNAやrRNAに見られる転写後のプロセッシングなどで5'末端に露出した三リン酸を持たないためにRIG-Iによって認識されない。それに対して多くのウイルスRNAは細胞内で5'三リン酸を持つ局面があるために、RIG-Iによって検知されることになる(図1)。例外であるピコルナウイルスは、共通してウイルスタンパク質であるVPgがウイルスRNAの5'末に共有結合しているためにRIG-Iには認識されないと考えられる。現時点でMDA5の基質RNAの特異性決定因子は明確に示されていないが、ピコルナウイルスが感染細胞内でdsRNAとして蓄積することから、二重鎖というRNA構造がMDA5によって認識されていることが予想されて

いる⁹⁾。

我々は最近、RIG-IによるRNA認識機構をさらに詳細に検討するために、リコンビナントタンパク質を用いた*in vitro*での解析を行った⁹⁾。特に、RNA結合能と共に、ATPase活性およびRNAヘリカーゼ活性とシグナル伝達能との関係を明確にした。その結果RIG-Iは、1) 5'三リン酸を持つssRNAだけでなく様々なdsRNAとも結合しATPase活性を示すこと、2) 3'側に15塩基以上の一本鎖RNA突出を持つdsRNAに対してヘリカーゼ活性を示すが、平滑末端や5'突出を持つdsRNAに対してヘリカーゼ活性を示さないこと、3) ヘリカーゼによってほどかれないdsRNAによってのみシグナルが誘導されることなどが明らかになった(図2)。すなわち、RIG-Iはヘリカーゼ活性とシグナル伝達活性が逆相関することになる。このことは、RIG-Iが基質RNAと安定な構造をとることがシグナル分子としての機能に必須であることを示唆している。さらに両端が平滑末端で25bp程度の短いdsRNAも、RIG-Iと結合して安定な構造をとりシグナル誘導できることがわかってきた。この場合、どちらかの5'末端にリン酸基がつくことで細胞内でのdsRNA自体の安定性が増し、結果としてRIG-Iとも強固なシグナル誘導複合体を形成できるらしい。しかし、5'三リン酸ssRNAだけでなくdsRNAも

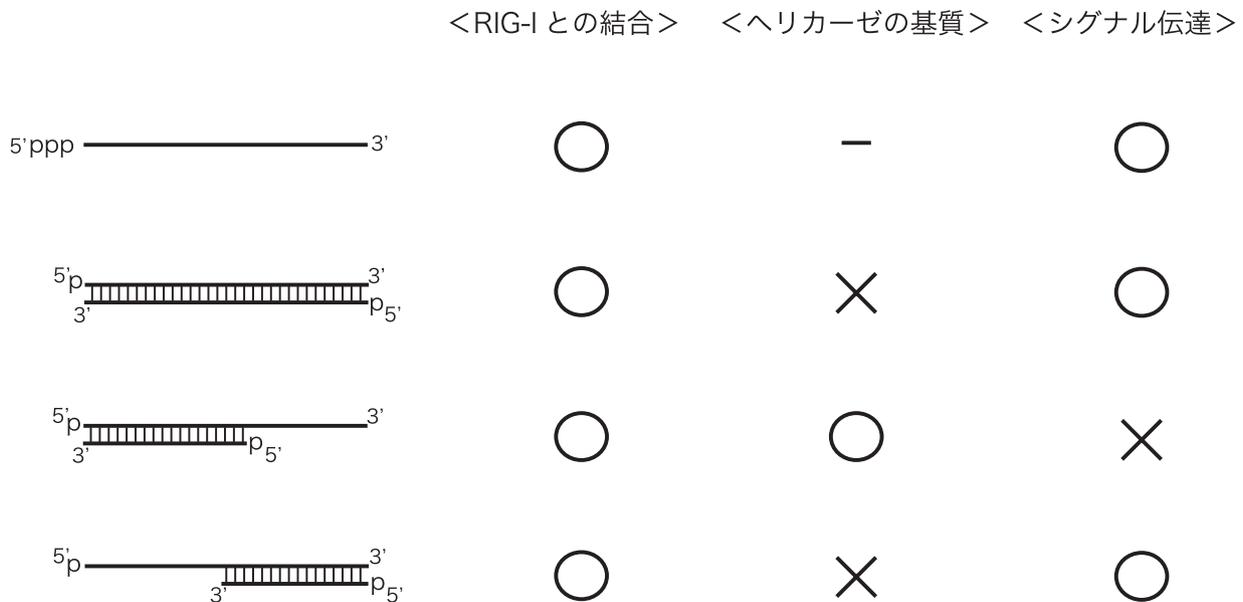


図2 RIG-Iの機能と基質RNAとの関係

5'三リン酸ssRNAとdsRNAは共にRIG-Iと結合することができる。dsRNAのうち、3'に突出を持つものはRIG-Iのヘリカーゼ活性によりほどかれるが、5'突出や平滑末端を持つdsRNAはほどかれない。しかし、RIG-Iのシグナル分子としての機能は、ほどかれないdsRNAによって誘導される。従って、RIG-Iと基質RNAの安定な複合体形成と、それに伴う構造変化がシグナル伝達に必須であることがわかる。

RIG-Iの基質となり得るといふこの知見は、microRNA前駆体などの内在性の短い二重鎖構造をとるRNAがどのようにRIG-Iに識別されているのかという新たな疑問を提示している。一方で、比較的長いdsRNAであるpolyI:Cの場合は、RIG-Iと結合してATPase活性を誘導し、かつヘリカーゼ活性によってほどかれないと考えられるものの、シグナルを伝達できない。従って、polyI:Cの場合はRIG-Iと正しい構造変化を伴った複合体を形成できないためにシグナル誘導できないものと考えられる(下記参照)。

3. RIG-IのRNA認識ドメインとその立体構造

では、実際にRIG-Iはどのように基質RNAを認識しているのだろうか? RIG-IとRNAが安定な構造をとることが示唆されたことから、我々はこの複合体を検出するためにトリプシンに対する感受性を検討した。その結果、シグナルを伝達する複合体からはトリプシンに抵抗性の17 kDaの断片が検出された。一方、基質とならないpolyI:Cとの複合体からは60 kDaの断片が得られたことから、両者が全く異なった高次構造を形成していることが確認された。この17 kDaの断片のアミノ酸配列を決定したところ、RDにオーバーラップするC末端領域(792-925; CTD)であることが判明した。そこで、この領域のリコンビナントタンパク質を作製してそのRNA結合能を検討したところ、基質となるRNAと特異的に結合することが明らかとなり、この領域がRNA結合ドメインとして機能していることが確かめられた。また同時に、ヘリカーゼのリンカー領域とも結合することが示されたことから、CTDがRNA認識ドメインおよびRDとしての機能を併せ持つことが示唆された。

そこで次に、このCTDの三次元立体構造をNMRによって決定した⁹⁾。CTDは、中心部に六つの β シート($\beta 3 \sim 8$)がantiparallelに並び、その上にもうひとつのantiparallelな三つの β シート($\beta 1, \beta 2, \beta 9$)が乗った構造をとっている(図3A)。構造が類似するタンパク質として、RabファミリーGTPaseのGDP/GTP exchange factorであるMSS4が報告されている。MSS4はZnイオンが結合していることが知られており、両者の構造の共通性からCTDにもZnイオンが含まれることが予想された。実際、X線結晶構造解析でCTDの立体構造を明らかにしたHopfnerらのグループは、CTDの結晶生成にZnイオンが必要であること、Znイオンとの相互作用に関与することが予想される四つのシステイン残基の変異がRIG-Iの機能を失活させることを報告しており¹⁰⁾、Znイオンの結合がRIG-Iによ

るRNA認識に必須であることが示唆されている。さらに興味深いことに、NMRと結晶を用いた両報告共にCTDは片側が塩基性アミノ酸に富んだ溝状の構造を形成しており(図3B)、酸性アミノ酸がその反対側に位置することを示している。このことは、この溝状の構造で基質RNAを検知していることを強く示唆している。基質RNAの存在下でNMR解析を行うと、塩基性に富んだアミノ酸のシグナル消失が観察されたことから(図3C)、これらのアミノ酸残基がRNA結合に関与していると考えられた。さらに、それらの塩基性アミノ酸に変異を導入したRIG-Iは、基質RNAとの結合能と共にシグナル伝達能を失っていたことから、実際にRIG-IがこのCTDの溝状の構造で基質RNAを特異的に認識していることが明らかになった。一方で、アミノ酸残基に富む逆側の面は、おそらくRDとしての機能に関与していると考えられる。しかし、ヘリカーゼドメインから離れたところで起こるCTDとRNAとの結合が、どのようにしてATP依存的な構造変化を引き起こし、RDによる抑制を解除するのかなどについての詳細な分子メカニズムはまだ明らかになっていない。また複数のグループがRIG-Iが二量体あるいは多量体を形成することでシグナルを伝達することを示しており、RNA結合と多量体形成との構造学的な解析が今後の課題になっている。

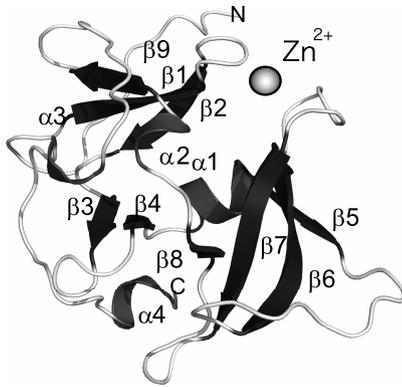
おわりに

IFNの発見から50年が過ぎ、ようやく21世紀に入ってその遺伝子発現に至るシグナル伝達の分子メカニズムが明らかになってきた。特に、ウイルスRNAセンサーによる細胞内での自己と非自己RNA認識機構の解明は、ウイルス感染と自然免疫の理解をさらに進めると共に、新たな抗ウイルス戦略へとつながる新たな知見をもたらす期待がある。一方で、センサー分子と疾病との関係についてもその可能性を示す報告がなされており、内在性RNAとの関係という観点からも興味深い。今後の解析が期待される。

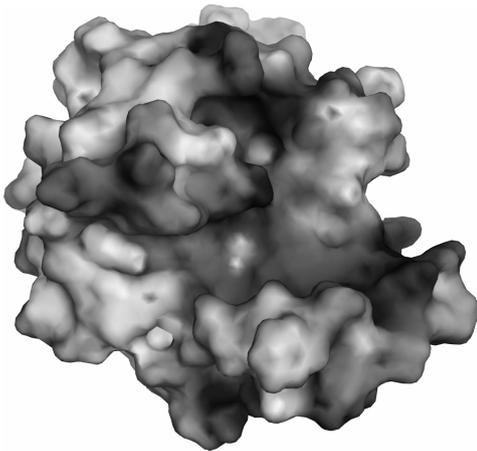
なお、本稿で紹介したRIG-Iの基質特異性の解析等は、京都大学ウイルス研究所の平井玲子助教、大学院生の成田亮さんが行ったものである。またNMRによる立体構造解析は、共同研究として北海道大学大学院薬学研究院の高橋清大研究員、稲垣冬彦教授らによってなされたものである。

- 1) Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., & Fujita, T.

A



B



C

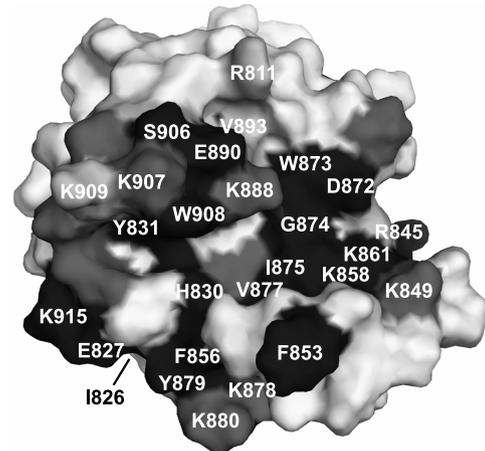


図3 RIG-I CTDの三次元構造

A. NMRによって解かれたRIG-I CTDの構造。β3からβ8までの六つのβシート構造の上に、二つのαヘリックスをはさんで三つのβシートが乗った構造をとる。上下の構造から出ているループに四つのシステイン残基があり、それを介してZnイオンが結合していることが示唆されている。B. CTDの表面電荷を示している。溝状の構造に黒で示した正電荷が集中している。ここでは示していないが、この裏面には負電荷が露出している。C. 5'三リン酸ssRNAの存在下でNMRのシグナルが消失したアミノ酸残基を示している。溝状の構造に集中していることがわかる。858, 861, 888, 907のリジン残基をアラニンに置換した変異体RIG-Iがシグナル伝達能を失うことから、この面で基質RNAを認識していると考えられる。

(2004) *Nat. Immunol.*, 5, 730-737.

- 2) 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. (2005) *J. Immunol.*, 175, 2851-2858.
- 3) Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., & Akira, S. (2005) *Immunity*, 23, 19-28.
- 4) Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C.S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., & Akira, S. (2006) *Nature*, 441, 101-105.
- 5) Venkataraman, T., Valdes, M., Elsbey, R., Kakuta, S., Caceres, G., Saijo, S., Iwakura, Y., & Barber, G.N. (2007) *J. Immunol.*, 178, 6444-6455.
- 6) Saito, T., Hirai, R., Loo, Y.M., Owen, D., Johnson, C.L., Sinha, S.C., Akira, S., Fujita, T., & Gale, M., Jr. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 582-587.
- 7) Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato,

- H., PoECK, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., Endres, S., & Hartmann, G. (2006) *Science*, 314, 994-997.
- 8) Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Naslund, T.I., Liljestrom, P., Weber, F., & Reis e Sousa, C. (2006) *Science*, 314, 997-1001.
- 9) Kato, H., Takeuchi, O., Mikano-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., & Akira, S. (2008) *J. Exp. Med.*, 205, 1601-1610.
- 10) Takahashi, K., Yoneyama, M., Nishihori, T., Hirai, R., Kumeta, H., Narita, R., Gale, M., Jr., Inagaki, F., & Fujita, T. (2008) *Mol. Cell*, 29, 428-440.
- 11) Cui, S., Eisenacher, K., Kirchhofer, A., Brzozka, K., Lammens, A., Lammens, K., Fujita, T., Conzelmann, K.K., Krug, A., & Hopfner, K.P. (2008) *Mol. Cell*, 29, 169-179.

米山 光俊^{1,2}, 藤田 尚志¹

(¹ 京都大学ウイルス研究所・分子遺伝学研究分野,

² 科学技術振興機構さきがけ研究員)

Non-self RNA-sensing mechanism of RIG-I RNA helicase Mitsutoshi Yoneyama^{1,2} and Takashi Fujita¹ (¹Laboratory of Molecular Genetics, Institute for Virus Research, Kyoto University, 53 Shogoinkawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan; ²PRESTO, Japan Science and Technology Agency, 4-1-8 Honcho Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan)

誘発突然変異と損傷乗り越え DNA 合成 —REV1 の構造と生化学的機能—

1. はじめに

誘発突然変異は、電離放射線や紫外線、化学物質などの変異誘発剤によって誘発される突然変異を指す。変異誘発剤は Watson-Crick 型の塩基対合を変化させるような DNA 損傷を引き起こすが、突然変異が誘発されるためには、DNA 損傷に加えて細胞内の積極的な機能が必要不可欠である。REV1 遺伝子 (reversionless) は、この突然変異誘発に必要不可欠な酵母の遺伝子として同定された。本稿では、酵母及びヒト REV1 の構造と生化学的特性から突然変異誘発における機能を概説する。

2. 誘発突然変異と損傷乗り越え DNA 合成

細胞に紫外線が照射されると、新生 DNA 鎖の断片化が観察される。これは、複製型の DNA ポリメラーゼ (pol δ または pol ϵ) が、紫外線損傷に対して DNA 伸長反応を停止することに起因する。その後、この断片化した DNA は

より大きな DNA に移行するが、この過程を複製後修復 (post-replication repair) と呼ぶ。複製後修復では、損傷塩基は除去せずに、断片化した DNA どうしを繋げることにより、複製過程で生じたギャップを修復する^{1,2)}。

酵母では、RAD (radiation sensitivity) 遺伝子群として同定された遺伝子の中で、複製後修復に関与する遺伝子群は RAD6 エピスタシス群として分類される。複製後修復経路は、ユビキチンリガーゼ E2-E3 である RAD6-RAD18 複合体による proliferating cell nuclear antigen (PCNA) のモノユビキチン化により制御される。損傷乗り越え DNA 合成 (translesion DNA synthesis, TLS) 経路は RAD6-RAD18 の下流で機能する複製後修復経路の一つである。TLS 経路では、特殊な DNA ポリメラーゼ (TLS ポリメラーゼ) が、損傷塩基を鋳型とした DNA 合成反応により、DNA 複製を回復する^{1,2)}。

酵母の REV1 遺伝子は、紫外線による突然変異の誘発が抑制される変異体として同定された。rev1 株では、紫外線や電離放射線をはじめ、様々な種類の薬剤による突然変異の誘発が抑制され、同時にそれら薬剤に対する感受性が増大する³⁾。Lawrence のグループは 1996 年に酵母の REV1 タンパク質が DNA 損傷の一つ、脱塩基部位 (DNA 上の塩基が脱離しデオキシリボースだけになった状態の DNA 損傷) に対して、dCMP を対合するデオキシシチジルトランスフェラーゼであることを発見した⁴⁾。

一方、色素性乾皮症バリエーション群 (XP-V) に分類される患者由来の細胞では、紫外線による誘発突然変異頻度が高いこと、紫外線照射後の複製後修復に欠損のあることが知られていた²⁾。花岡のグループは 1999 年に XP-V の責任遺伝子がシクロブタン型チミンダイマーに対して dAMP を対合する活性をもつ pol η をコードすることを明らかにした⁵⁾。TLS 経路で機能するこれらの酵素は構造的に類似しており、Y-ファミリーの DNA ポリメラーゼとして分類されている⁶⁾。XP-V の患者由来の細胞では pol η の代わりに、別の TLS ポリメラーゼが働き、dAMP 以外の塩基を挿入した結果、突然変異頻度が上昇すると考えられている²⁾。

Y-ファミリーの DNA ポリメラーゼは、原核生物から高等真核生物まで広く保存されており、ヒトでは pol η , pol ι , pol κ , REV1 の 4 種類が存在する (図 1)⁶⁾。REV1 は Y-ファミリーのメンバーではあるが、その活性は dCMP 転移活性に限られ、他の基質 dATP, dGTP, dTTP に対する親和性は極めて低く、実質上ポリメラーゼ活性はない。真核生物のポリメラーゼでは、触媒ドメイン以外にも多くの類似