

WINTER 2017/2018

SUMMARY :

REVIEW

The RIG-I and STING Alliance

PRODUCTS

RIG-I Pathway

- RIG-I agonists
- RIG-I/MAVS reporter cells

STING Variants

- SAVI STING reporter cells
- Recombinant human STING

Nucleic Acid Complexing Agent

- LyoVec™

Selective Antibiotics

- Cell culture-grade antibiotics

InvivoGen

ASIA

Unit 106, 1F,
15W Phase 3, Hong Kong Science Park,
Pak Shek Kok,
Hong Kong



T: +852 3622 3480
F: +852 3622 3483



info.hk@invivogen.com
www.invivogen.com

The RIG-I and STING Alliance

自然免疫系は、ウイルス感染の予防に必要不可欠であり、ウイルス核酸の認識は、いくつかのパターン認識受容体 (PRR) により行われます¹。これらの PRR には、サイトソル DNA センサー (CDS)、サイクリック GMP-AMP シンターゼ (cGAS)、および細胞質 RNA センサーであるレチノイン酸誘導遺伝子 I (RIG-I) などが挙げられます。活性化されると、これらは異なるシグナル伝達経路を誘導し、さまざまな抗ウイルス分子の産生をもたらします。興味深いことに、これらのシグナル伝達経路が互いに密接に関連し、抗ウイルス反応を強化することを示唆するエビデンスが得られています。

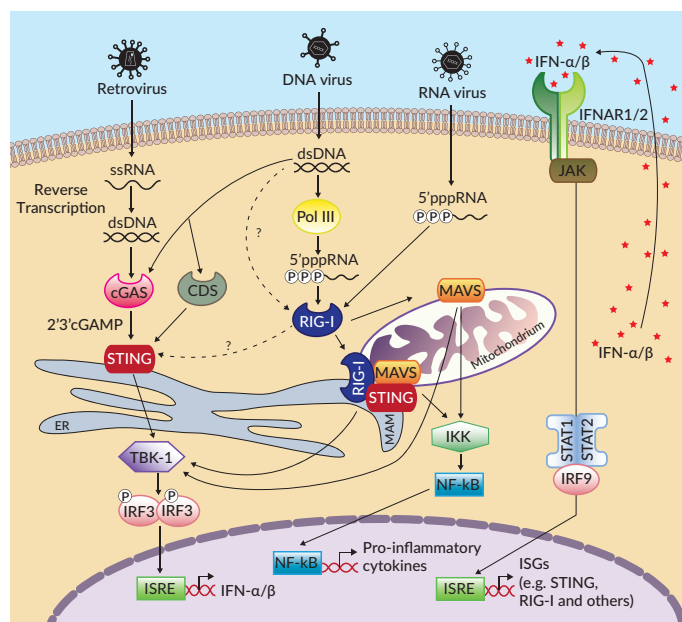
センサーである cGAS や RIG-I は、異なる核酸を認識し、それぞれ異なるアダプターを介してシグナルを伝達します。cGAS は、サイトソル中の DNA の異常な存在や濃度を感知すると、環状ジヌクレオチド 2'3'cGAMP を介して、インターフェロン遺伝子の刺激因子 (STING、または MITA/ERIS/MPYS) をリクルートします²。RIG-I は、非 5'キャップ構造の二/三リン酸末端および平滑末端の短鎖二本鎖 (ds) 部分を提示するウイルス RNA を検出し、ミトコンドリア性抗ウイルスシグナル伝達タンパク質 (MAVS、または IPS-1/VISA/Cardif) に結合します¹。そのような活性化に次いで、cGAS/STING および RIG-I/MAVS は、I 型インターフェロン (IFN) および炎症誘発性サイトカインの産生をもたらす共通のシグナル伝達カスケードを誘発します。

RNA 経路と DNA 経路は、異なるレベルで複雑に相互作用していることが報告されています。第一に、複数の研究グループは、ヒト細胞において、AT に富むサイトソル DNA が RIG-I/MAVS 依存的に I 型 IFN を誘導する (マウス細胞では見られない) ことを実証しています^{3,5}。RIG-I と dsDNA との間の直接的な相互作用も示唆されているものの⁶、RIG-I によるこの認識には、RNA ポリメラーゼ III による poly (dA:dT) の転写が必要であることが示されています^{4,5}。さらに、RIG-I/MAVS 経路における STING の関与は、サイトソル dsRNA またはウイルス感染の応答による、STING 欠損細胞の I 型 IFN 産生能の低下、ならびに共免疫沈降実験での STING および RIG-I の直接会合によって強調されています^{7,8}。これらのデータなどから、STING が、ミトコンドリア関連小胞体膜 (MAM) で MAVS と複合体を形成することによって、活性化 RIG-I のアダプターとして機能することが示唆されます^{7,9}。さらに、cGAS は、逆転写されたウイルス RNA¹⁰ およびサイトソル RNA : DNA ハイブリッド¹¹ の認識に関与し、結晶構造研究で合成 RNA に結合することが報告されています¹²。

RNA 経路と DNA 経路のメディエーター間の物理的な相互作用の他に、STING および RIG-I の発現レベルが協調的に調節されることも指摘されています。実際、STING 発現は、合成アゴニストまたはウイルスアゴニストによる RIG-I 活性化の際に誘導される一方で¹³、RIG-I 発現は、STING 活性化の下流で起こる可能性があります。この場合、上方制御された RIG-I は、過剰な免疫反応を防ぐため、STING 発現の負のフィード

バック調節に関与します¹⁴。

結論として、cGAS/STING および RIG-I/MAVS は、物理的および機能的に相互に連動しています。RNA および DNA 検出におけるクロストーク、およびそれに続くシグナル伝達カスケードは、微生物核酸の多様性に対処するためだけでなく、ウイルスの逃避メカニズムを和らげるためにも必要不可欠なものです。さらに、RIG-I と STING の相互作用は、効率的な抗ウイルス反応と細胞の完全性のバランスをとるのに役立ちます。特筆すべきことに、RIG-I と STING のクロストークは、種や細胞の種類によって大きく異なるのですが、これはおそらく、ウイルスとその細胞標的の共進化を反映しています。核酸感知経路の拮抗剤または阻害剤を今後開発するうえで、それぞれの核酸センサーに対するそれらの影響について、綿密な試験を行う必要があります。



1. Gebhardt A. et al., 2017. Discrimination of Self and Non-Self Ribonucleic Acids. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 37: 184-97.
2. Tao J. et al., 2016. cGAS-cGAMP-STING: The three musketeers of cytosolic DNA sensing and signaling. *IUBMB Life* 68: 858-70.
3. Cheng G. et al., 2007. Double-stranded DNA and double-stranded RNA induce a common antiviral signaling pathway in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 9035-40.
4. Ablasser A. et al., 2009. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* 10: 1065-72.
5. Chiu Y.-H. et al., 2009. RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type I Interferons through the RIG-I Pathway. *Cell* 138: 576-91.
6. Choi M.K. et al., 2009. A selective contribution of the RIG-I-like receptor pathway to type I interferon responses activated by cytosolic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 17870-5.
7. Zhong B. et al., 2008. The Adaptor Protein MITA Links Virus-Sensing Receptors to IRF3 Transcription Factor Activation. *Immunity* 29: 538-50.
8. Ishikawa H. & Barber GN. 2008. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*. 455(7213):674-8.
9. Castanier C. et al., 2010. Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO reports* 11: 133-8.
10. Gao D. et al., 2013. Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune Sensor of HIV and Other Retroviruses. *Science* 341: 903-6.
11. Mankan AK. et al., 2014. Cytosolic RNA:DNA hybrids activate the cGAS-STING axis. *EMBO J.* 33(24):2937-46.
12. Civril F. et al., 2013. Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS. *Nature* 498: 332-7.
13. Liu Y. et al., 2016. RIG-I-Mediated STING Upregulation Restricts Herpes Simplex Virus 1 Infection. *Journal of Virology* 90: 9406-19.
14. Wu X. et al., 2017. RIG-I and IL-6 are negative-feedback regulators of STING induced by double-stranded DNA. *PLOS ONE* 12: e0182961.

RIG-I Pathway

RIG-I Ligands

● 5'ppp-dsRNA

5'ppp-dsRNA は、5'末端三リン酸一本鎖 19-mer ホスホジエステル結合の RNA と、その非三リン酸相補鎖とのハイブリダイゼーションによって得られる 5'末端に三リン酸を有する二本鎖 RNA です。5'ppp-dsRNA の配列は、さまざまな塩基配列の変異体のスクリーニングを経て決定されました。この非 5'キャップ構造の三リン酸 dsRNA は、RIG-1 によって特異的に認識されます。

● 3p-hpRNA

3p-hpRNA は、インフルエンザ A 型 (H1N1) ウイルス由来の塩基配列の *in vitro* 転写によって産生された、5'末端三リン酸ヘアピン型 RNA です。これは、非 5'キャップ構造の三リン酸末端および二本鎖フラグメントを含む 87-mer RNA オリゴヌクレオチドで、RIG-1 に認識される構造的特徴を備えています。3p-hpRNA は、RIG-1 の強力かつ特異的なアゴニストです。



www.invivogen.com/rlr-ligands

RIG-I/MAVS Reporter Cells

InvivoGen 社では、RNA を感知する RIG-1 経路の研究を促進するため、ヒト肺 A549 癌腫、マウス RAW マクロファージ、およびヒト胎児腎 HEK293 細胞に由来する細胞株シリーズを提供しています。これらの細胞は、RIG-1 または MAVS 遺伝子をノックアウトするか (A549 由来または RAW 由来細胞)、または RIG-1 遺伝子の過剰発現を起こします (HEK293 由来細胞)。

- A549-Dual™
- RAW-Lucia™ ISG
- HEK-Lucia™ Null
- A549-Dual™ KO-RIG-I
- RAW-Lucia™ ISG KO-RIG-I
- HEK-Lucia™ RIG-I
- A549-Dual™ KO-MAVS
- RAW-Lucia™ ISG KO-MAVS

Description

すべての RIG-1/MAVS レポーター細胞は、分泌型 Lucia ルシフェラーゼ遺伝子を含む ISG (インターフェロン刺激遺伝子) 誘導性コンストラクトを発現します。RIG-I/MAVS 経路が活性化されると、ISG プロモーターの活性化と Lucia ルシフェラーゼの産生が誘導されます。この産生は、Lucia ルシフェラーゼ検出薬 QUANTI-Luc™ を用いて、細胞上清中で測定可能です。A549 由来細胞は、分泌性胎盤アルカリホスファターゼ (SEAP) 遺伝子を発現する NF-κB 誘導性コンストラクトを保有し、その活性は、SEAP 検出薬 QUANTI-Blue™ を使用して確認できます。RIG-I/MAVS レポーター細胞は、Zeocin™ 単独、または Zeocin™ およびプラスチジンに耐性があります (末頁参照)。

Results

RIG-I リガンドで A549-Dual™ および RAW-Lucia™ ISG 細胞を刺激すると、LyoVec™ と複合体を形成した 5'ppp-dsRNA および 3p-hpRNA が有意な ISG 応答を示します。この応答は、5'ppp-dsRNA と比較して 3p-hpRNA を使用した場合にはるかに高くなり、特に A549-Dual™ 細胞では、複合体型 3p-hpRNA 30ng/ml と、複合体型 5'ppp-dsRNA 300ng/ml で同等の活性が観察されます。対照的に、RIG-I-KO または MAVS-KO 細胞株では、この応答は強く減衰します。RIG-1 リガンドで HEK-Lucia™ Null 細胞を刺激すると、ISG 応答は微弱ですが、HEK-Lucia™ RIG-I 細胞を刺激すると、RIG-1 遺伝子の恒常的な過剰発現によって、その応答ははるかに強くなります。また、3p-hpRNA では 5'ppp-dsRNA よりも、より活発な ISG 応答が観察されます。A549 由来細胞における RIG-1 リガンドに対する NF-κB の応答は、比較的弱いものの、その ISG の応答と類似しています (ウェブサイトのデータ参照)。



www.invivogen.com/rlr-cell-lines



ISG Responses to RIG-I ligands: A549-derived cells were stimulated with 300 ng/ml 5'ppp-dsRNA or 30 ng/ml 3p-hpRNA, while RAW- and HEK-derived cells were induced with 1 µg/ml 5'ppp-dsRNA or 3p-hpRNA. After overnight incubation, the ISG response was assessed by determining Lucia luciferase activity in the supernatant using QUANTI-Luc™ expressed as relative light units (RLUs).

PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
A549-Dual™ cells	3-7 x 10 ⁶ cells	a549d-nfis
A549-Dual™ KO-MAVS cells	3-7 x 10 ⁶ cells	a549d-komavs
A549-Dual™ KO-RIG-I cells	3-7 x 10 ⁶ cells	a549d-korigi
RAW-Lucia™ ISG cells	3-7 x 10 ⁶ cells	rawl-isg
RAW-Lucia™ ISG-KO-MAVS cells	3-7 x 10 ⁶ cells	rawl-komavs
RAW-Lucia™ ISG-KO-RIG-I cells	3-7 x 10 ⁶ cells	rawl-korigi
HEK-Lucia™ Null cells	NEW 3-7 x 10 ⁶ cells	hkl-null
HEK-Lucia™ RIG-I cells	NEW 3-7 x 10 ⁶ cells	hkl-hrigi
5'ppp-dsRNA	25 µg	tlrl-3prna
3p-hpRNA	NEW 25 µg	tlrl-hprna

RELATED PRODUCTS

PRODUCT	DESCRIPTION	CAT. CODE
QUANTI-Luc™	Luciferase detection reagent	rep-qlc1
QUANTI-Blue™	SEAP detection reagent	rep-qb1

For more information, please visit : www.invivogen.com

STING Variants

STING SAVI Reporter Cells

InvivoGen 社では、ヒト THP-1 単球細胞株由来の STING 変異型レポーター細胞シリーズを提供しています。そのうち 2 つのレポーター細胞は、乳児発症性 STING 関連脈管障害 (SAVI) の原因である機能獲得型 STING (S154 および M155) を発現します。SAVI 患者では、STING タンパク質中での単一点突然変異が示され、その恒常的活性化および ISG の過剰活性がもたらされます。S154 は *de novo* の生殖細胞系変異¹ に起因しますが、M155 は遺伝性変異² によります。STING SAVI レポーター細胞は、STING 経路におけるアンタゴニストのスクリーニングに便利で、かつ強力なツールとなります。

● THP1-Dual™ KI-hSTING-S154

● THP1-Dual™ KI-hSTING-M155

Description

THP1-Dual™ KI-hSTING-S154 細胞および THP1-Dual™ KI-hSTING-M155 細胞は、内因性ヒト STING 遺伝子の二対立遺伝子の安定的ノックアウトによって得られた THP-1 に由来する、THP1-Dual™ KO-STING 細胞から構築されました。これらは、Lucia ルシフェラーゼと SEAP (分泌性胎盤アルカリホスファターゼ) という 2 つの誘導性分泌型レポーター遺伝子を安定的に組み込んでいます。THP1-Dual™ KO-STING 細胞は、野生型 R232 hSTING 変異体のイントロンを含まないコード配列³、および S154 または M155 の点突然変異をノックインしています。IRF3 経路および NF-κB 経路は、それぞれ Lucia ルシフェラーゼおよび SEAP の活性をモニタリングすることで検査可能です。レポータータンパク質の活性は、細胞培養上清に QUANTI-Luc™ および QUANTI-Blue™ 検出薬を適用することによってモニターが可能です。SAVI レポーター細胞は、プラスチシジンと Zeocin™ に耐性を示します。

Results

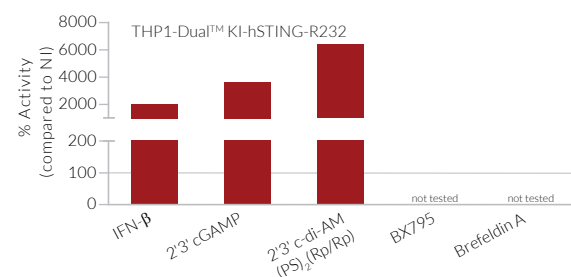
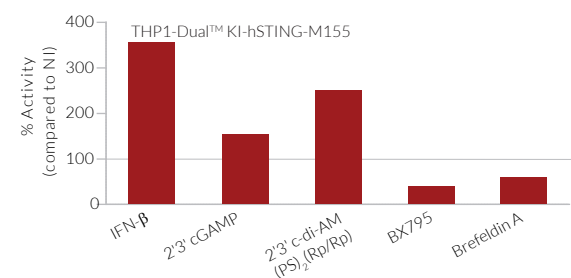
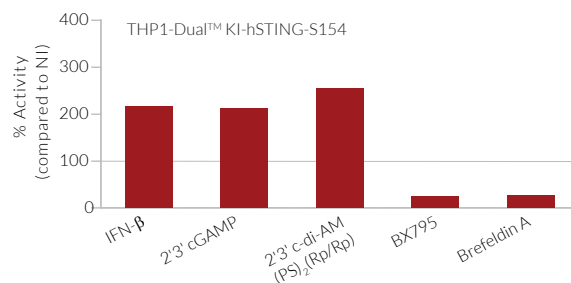
機能獲得型の活性化 - THP1-Dual™ KI-hSTING-S154 細胞および THP1-Dual™ KI-hSTING-M155 細胞はいずれも、恒常的な ISG 応答を示すのに対し、THP-1-Dual™ KI-hSTING-R232 細胞では応答を示しません。IFN-β または STING のアゴニストを添加すると、ISG 応答を活性化させます。なお、これらの結果は、非誘導型 (NI) 細胞におけるバックグラウンドシグナルと比較して示しています。恒常的な STING の活性化により、SAVI 細胞株のバックグラウンドは極めて高く、誘導時の ISG 応答の増加倍数は R232 コントロール細胞よりも低くなります。阻害剤への反応 - TBX-1 阻害剤である BX795、または ER からゴルジ体へのタンパク質輸送を阻害する Brefeldin A を添加すると、SAVI 細胞株における STING シグナル伝達が著しく阻害されます。したがって、これらの細胞を用いて STING アンタゴニストをスクリーニングすることが可能です。

1. Munoz J. et al., 2015. Stimulator of interferon genes-associated vasculopathy with onset in infancy: a mimic of childhood granulomatosis with polyangiitis. *JAMA Dermatology* 151: 872-7.
2. Jeremiah N. et al., 2014. Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations. *The Journal of Clinical Investigation* 124: 5516-20.
3. Yi G. et al., 2013. Single nucleotide polymorphisms of human STING can affect innate immune response to cyclic dinucleotides. *PLOS ONE* 8: e77846.

PRODUCT		QUANTITY	CAT. CODE
THP1-Dual™ KI-hSTING-S154 (SAVI) cells	NEW	3-7 x 10 ⁶ cells	thpd-s154
THP1-Dual™ KI-hSTING-M155 (SAVI) cells	NEW	3-7 x 10 ⁶ cells	thpd-m155

RELATED PRODUCTS

PRODUCT	DESCRIPTION	CAT. CODE
THP1-Dual™ KI-hSTING-R232 cells	R232 variant- ("wild-type") expressing cells	thpd-r232
2'3'-cGAMP	Cyclic dinucleotide	tlrl-nacga23
2'3'-c-di-AM(PS)2 (Rp,Rp)	Cyclic dinucleotide	tlrl-nacda2r-01



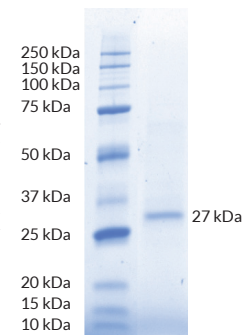
ISG Responses to IFN-β or STING ligands: THP1-Dual™-derived cells were stimulated with 10⁴ U/ml IFN-β, 10 μg/ml 2'3'-cGAMP or 10 μg/ml 2'3'-cGAMP(PS)₂(Rp/Sp), 30 μM BX795 or 10 μg/ml Brefeldin A. After overnight incubation, the ISG response was assessed by determining Lucia luciferase activity in the supernatant using QUANTI-Luc™. Bars represent the % activity normalized on the background signal in non-induced (NI) cells.

STING Screening Services

InvivoGen 社は、さまざまな STING 変異体を誘導または阻害する分子を同定するための STING スクリーニングサービスを幅広く提供しています。詳細については InvivoGen 社までお問い合わせください。

Recombinant Human STING

STING はその細胞質ドメインを介して CDN に結合します。InvivoGen 社は、最も広く使用されているヒト STING アイソフォームである R232 変異体の可溶性細胞質ドメイン (aa 137-379) に対応する組換えヒト STING タンパク質を提供しています。これは、哺乳動物チャイニーズハムスターの卵巣 (CHO) 細胞系で産生され、アフィニティークロマトグラフィーで精製された、27kDa の組換えタンパク質です。タグは含んでいません。また、このタンパク質は、ヒト STING に対して利用できる市販の抗体によって確認されます。



PRODUCT		QUANTITY	CAT. CODE
Recombinant Human STING	NEW	25 μg	rec-hsting

Nucleic Acid Complexing Agent

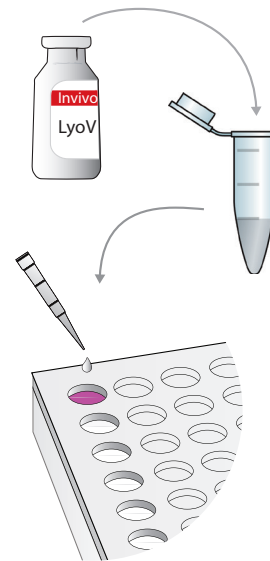
LyoVec™

LyoVec™ は、凍結乾燥させた初のカチオン性脂質ベースのトランスフェクション試薬です。LyoVec™ は、膜の二重層構造の不安定化を促す中性脂質である DiPEE と結合したホスホノ脂質 DTCPTA で構成されているため、*in vitro* でのトランスフェクション効率が向上します。LyoVec™ は陽性荷電であるため DNA に結合でき、そのリン脂質構造によって、DNA 運搬のための細胞膜との融合が促進されます。LyoVec™ はプラスミド DNA トランスフェクション試薬として開発されているため、RNA または DNA ベースのオリゴヌクレオチド、例えば、RIG-1 リガンドの 5'ppp-dsRNA や 3p-hpRNA (2 頁参照)、または cGAS リガンドの HSV60 や VACV70 などが、細胞内へ侵入するのを促進させるための核酸複合体形成薬として効果的に使用することができます。複合体形成の過程は、病原体認識受容体によって誘導された核酸に対する応答を得るために極めて重要です。

PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
LyoVec™	10 ml (200 reactions)	lyec-1
LyoVec™	20 ml (400 reactions)	lyec-2

 www.invivogen.com/transfection-reagents

Procedure



01
Reconstitute lyophilized LyoVec™ with 2 ml of sterile H₂O or PBS

02
Prepare complex at 10 µg/ml:
- In a 1.5 ml tube, add first 1 µl ligand @ 1 mg/ml
- Add drop by drop 100 µl of LyoVec™
- Homogenize gently by tapping the tube
- Incubate for 15-30 minutes at room temperature

Prepare a dilution range

03
Dispense 20 µl of complex in a well of a 96-well plate containing 180 µl of cell suspension

Selective Antibiotics

Cell-culture tested antibiotics

- 無菌
- エンドトキシンフリー
- 機能試験済み

InvivoGen 社は、トランスフェクションした哺乳動物細胞のアーティファクトフリーな選択を確保するため、細胞培養試験済みの抗生物質を幅広く提供しています。これらの抗生物質は無菌かつエンドトキシンフリーであるため、リポポリサッカライド (LPS) として知られる細菌性エンドトキシンがトランスフェクション細胞へ及ぼす悪影響を防ぎます。これらは、厳密な物理化学的、微生物学的、および細胞学的試験を通してその機能性が検証されており、哺乳動物細胞において、細胞毒性を起こすことなく長期的安定性を示すことが証明されています。

InvivoGen 社の選択用抗生物質は、他の選択用抗生物質との組み合わせ、マイコプラズマ、バクテリア、または真菌による細胞培養汚染を防ぐための抗菌薬との組み合わせにより使用することができます。InvivoGen 社では、選択用抗生物質をさまざまなサイズで提供しています。

RELATED PRODUCTS

PRODUCT	DESCRIPTION	CAT. CODE
Fungin™	Anti-fungal agent	ant-fn-1
Normocin™	Anti-microbial agent	ant-nr-1
Plasmocin™	Anti-mycoplasma agent	ant-mpp

Selective antibiotic	Resistance gene	Concentration in bacteria	Concentration in mammalian cells
Blasticidin	<i>bsr</i> gene	25-100 µg/ml	1-10 µg/ml
G418 (Geneticin)	<i>neo</i> gene	-	400-1000 µg/ml
Hygromycin B Gold	<i>hph</i> gene	50-100 µg/ml	50-200 µg/ml
Puromycin	<i>pac</i> gene	-	1-10 µg/ml
Zeocin™	<i>Sh ble</i> gene	25 µg/ml	50-400 µg/ml

PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
Blasticidin	100 mg (10 x 1 ml)	ant-bl-1
G418 (Geneticin)	1 g (10 x 1 ml)	ant-gn-1
Hygromycin B Gold	1 g (10 x 1 ml)	ant-hg-1
Puromycin	100 mg (10 x 1 ml)	ant-pr-1
Zeocin™	1 g (10 x 1 ml)	ant-zn-1

 www.invivogen.com/selective-antibiotics

