

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12501

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20112009

研究課題名（和文） ウイルス RNA センサーによる RNA 識別と細胞機能制御

研究課題名（英文） Regulation of cellular function by viral RNA sensors

研究代表者

米山 光俊 (YONEYAMA MITSUTOSHI)

千葉大学・真菌医学研究センター・教授

研究者番号：40260335

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞内ウイルス RNA センサーである RIG-I like receptor (RLR) による RNA 認識機構および内在性 RNA 認識を介した細胞機能制御を明らかにすることを目的として、複数の観点から解析を行った。その結果、RLR がストレス顆粒様の凝集体に集積することで自然免疫応答を制御していること、ある種の microRNA の発現を誘導することでウイルス感染を負に制御していること、さらに RIG-I が一部の内在性 RNA と会合して機能している可能性があることなどの知見が得られ、RLR を介した細胞機能制御の理解が進んだ。

研究成果の概要（英文）：RIG-I-like receptors (RLRs) are viral RNA sensors, which initiate antiviral innate immunity. In this work, we tried to elucidate molecular machinery underlying RNA recognition by RLRs and physiological significance of RLR-mediated signaling. We revealed 1) accumulation of RLRs in stress granule-like aggregates to trigger antiviral signaling, 2) inhibition of viral infection via induction of specific microRNA, which downregulates viral receptor expression and 3) possible interaction of RIG-I with endogenous self RNA. These observations made substantial progress for understanding of biological function of RLRs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2009年度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
2010年度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
2011年度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
2012年度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
総計	57,000,000	17,100,000	74,100,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：ウイルス、シグナル伝達、RNA

## 1. 研究開始当初の背景

内在性 RNA は高度な多様性と正確性をもって生命活動の維持に深く関与している。一方で、細胞は外来 RNA の侵入すなわちウイルスなどの感染に曝されている。ウイルスは、宿主細胞の機能を巧みに利用することで増殖するが、宿主細胞はそれらウイルス由来の外

来 RNA を特異的に検知し、自然免疫系を働かせることで対処している。この RNA 検知における分子メカニズムと生理機能の解明は、ウイルス感染に対する生体防御の理解や新規抗ウイルス薬剤開発につながる可能性があり、また内在性 RNA との差別化あるいは逆に相互作用という観点からの細胞運命決定に

において重要な知見をもたらすことが期待された。

高等脊椎動物において、抗ウイルス自然免疫で中心的な役割を担っているのは、I 型インターフェロン (IFN) システムである。細胞にウイルスが感染すると、細胞はウイルス由来の核酸などを異物=感染として検知し、速やかに IFN の発現を誘導する。分泌された IFN は周囲の細胞に発現する IFN 受容体を介したシグナルにより、強力な抗ウイルス作用をもたらす。この IFN 誘導に必須な役割を担うウイルスセンサーとして、我々は世界に先駆けて、retinoic acid inducible gene I (RIG-I)-like receptor (RLR) を同定し、その機能を明らかにした (*Nat. Immunol.*, 2004; *J. Immunol.*, 2005)。哺乳類がもつ RLR は、RIG-I、MDA5、LGP2 の三種からなり、いずれも RNA ヘリカーゼ分子である。これらうち RIG-I と MDA5 は、N 末端に caspase recruitment domain (CARD) を持ち、ミトコンドリア外膜上に発現するアダプター分子 IFN- $\beta$  promoter stimulator (IPS-1) との CARD 同志での会合により、下流へと IFN 誘導シグナルを伝達することが示された。さらにノックアウトマウスを用いた解析などから、RIG-I と MDA5 はそれぞれ異なったウイルスの検知に関わっており、それはそれぞれが認識する RNA 構造の違いによることなどが明らかにされた。また我々は、本研究の開始直前までに、RIG-I の基質となる RNA 構造の特異性の詳細を解明するとともに、RIG-I の RNA 結合に関与するドメインを同定し、その三次元立体構造を報告した (*Mol. Cell*, 2008)。また他のグループの報告などから、MDA5 による RNA 認識機構も明らかになりつつあった。従って、その機能が明らかになっていなかった LGP2 を含めて、RLR ファミリー分子群による RNA 検知の分子機構の解明と、それによってもたらされる生理的な細胞機能の制御についてのさらなる検討が求められる状況にあった。特に、RLR が認識する RNA 構造が明らかになったことは、ウイルス由来の外來性 RNA と細胞内に発現する内在性 RNA とがどのように識別されているのか、RLR が認識する内在性 RNA は存在しないのか、もし存在するならばそれはどのような役割を担っているのかといった疑問を解明するため、本研究の計画提案を行うに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、RLR ファミリー分子の機能に焦点をあて、外來ウイルス RNA と内在性 RNA の識別についての分子メカニズムを解明すると共に、RIG-I ファミリー分子による内在性 RNA 認識を含めた細胞機能制御について検討することを目的とした。

(1) RLR の機能を理解するうえで、それらによる RNA 認識の分子機構を理解することは必要不可欠である。我々は、2008 年までの解析から、RIG-I が認識する RNA 構造が 5' 三リン酸を持つ一本鎖 RNA および 5' 一リン酸を持つ二本鎖 RNA であること、その認識に関与するドメインとして C-terminal domain (CTD) が必須であることを明らかにし、その三次元構造を決定した。これらに知見を基に、三種の RLR による基質特異性と RNA 認識様式を生化学的に明らかにする。また、ウイルス感染刺激の有無などにおける RLR の細胞内での挙動について細胞生物学的に検討することにより、RLR の機能と細胞内局在変化を明らかにする。これらの解析を通じて、RLR による RNA 認識の分子メカニズムを明確にする。

(2) RLR による細胞制御機構を明らかにするために、人工的なシグナル誘導系を用いた検討を行う。既に我々は、RIG-I のシグナル伝達ドメインである CARD の多量体形成を薬剤で誘導することで、RIG-I を介したシグナルを人為的に誘導する実験系を確立していた。この実験系を培養細胞あるいはマウス個体に導入し、ウイルス感染なしにこのシグナルの生理機能を検討することで、RLR シグナルによる細胞制御機能を解析する。主に細胞周期制御と microRNA を介した細胞機能制御に注目した解析を行う。

(3) RLR の基質特異性の解析から、多くの内在性 RNA は転写後修飾などによって RLR に認識されない構造をとると考えられている。しかし一方で、RIG-I ファミリーの基質となり得るような構造をもつ内在性 RNA も細胞内に存在する可能性があり、それらがどのように差別化されているのかについては明確な説明がなされていなかった。また、RIG-I の遺伝子破壊マウスが胎生致死あるいは大腸炎を発症すること、MDA5 遺伝子内の変異が I 型糖尿病発症に関与する可能性などが報告されており、RIG-I が内在性 RNA と何らかの関係を持って機能している可能性が示唆されていた。そこで、RLR の基質となり得るような内在性 RNA が存在しているのか、もしそうであれば、それらがどのような細胞機能に関与しているのかについて検討し、RLR による細胞運命決定について新たな知見を得ることを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) RLR による RNA 認識機構の解析

2008 年までに明らかにしてきた RIG-I のリコンビナントタンパク質を用いた RNA 認識の分子メカニズムについての検討を、MDA5 と LGP2 についても行うことで、RLR による RNA 認識メカニズムを明確にする。特にこれまで

解析を続けている CTD に注目し、RNA 認識に関与する可能性のあるアミノ酸残基などに変異を入れた RLR 変異体を作製し、RNA 結合能や分子の活性化状態への移行などについて、生化学的に検討する。また、核磁気共鳴 (NMR) を用いた CTD の三次元構造解析を行う。

#### (2) RLR の細胞内局在変化の検討

ウイルス感染などの刺激に応答した RLR の細胞内局在変化を、免疫染色法や蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法 (FISH) などの細胞生物学的な手法を用いて検討する。また、下流のアダプター分子である IPS-1 についても同様に検討を加え、RLR シグナルの細胞内での動的な変化を理解する。

#### (3) RLR シグナルによる細胞機能制御の解析

2008 年までに開発した人工的なシグナル誘導系を培養細胞に導入した場合に、RLR シグナルの細胞増殖、細胞分化、細胞死などへの影響について検討する。またマイクロアレイを用いたシグナルの標的遺伝子の検討を行い、このシグナルの生理機能を理解する。

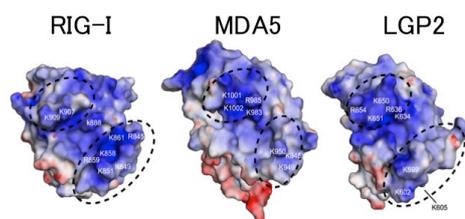
#### (4) RLR と内在性 RNA の介護の検討

RIG-I の基質が 5' 三リン酸を持つ RNA であることが明らかになっていたことから、内在性に 5' 三リン酸 RNA が存在することを分子生物学的に検討したうえで、それらを in vitro で合成することで、RLR との会合やシグナルへの影響を検討する。また、RLR と結合する RNA を網羅的に同定することで、RLR と内在性 RNA との会合の可能性を検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) RLR CTD による RNA 認識

RLR による RNA の認識ドメインである CTD に注目した解析を行った。NMR による三次元立体構造解析の結果、いずれの CTD も片側に塩基性アミノ酸に富んだ溝状の構造をとり、基質 RNA と結合し得ることが予想された (図 1)。このうち RIG-I と LGP2 の CTD は、比較的閉じた溝状構造をとっているのに対して、MDA5 の CTD は開いた構造をとっているため、

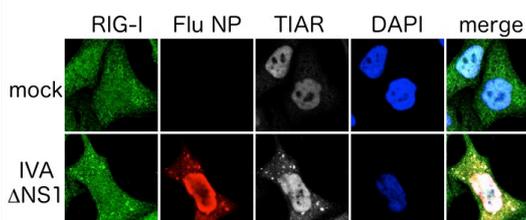


(図1) RLR CTD の三次元立体構造

単独での RNA 結合は困難であることが予想された。実際に、リコンビナントタンパク質を用いた RNA 結合実験によって RIG-I と LGP2 の CTD は強く RNA に結合するのにに対して、MDA5 の CTD は単独でほとんど RNA 結合能を持たないことが確認された。これらの知見は、RLR 間で RNA 認識機構に違いがあること、MDA5 は RNA 結合に補助的に働く因子が関与する可能性があることなどを示唆している。

#### (2) RLR の細胞内局在変化と機能解析

RIG-I CTD の N 末側のペプチドを抗原とする抗 RIG-I 抗体を新たに作成し、細胞内での RIG-I の挙動を検討した。モデル系として、既に RIG-I によって検知されることが明らかになっている A 型インフルエンザウイルス (IAV) を用いた。その結果、野生型の IAV 感染では特に顕著な変化は見られなかったが、IFN 系に強力な抑制効果を持つことが知られるウイルスタンパク質 NS1 を欠失したウイルス (IAV ΔNS1) を感染させた場合、RIG-I が細胞質で凝集することが観察された (図 2)。また、FISH 法を用いてウイルス RNA を検出したところ、ウイルス RNA も同じ凝集体に集まっていることが明らかになった。さらに、この凝集体の構成成分を検討したところ、様々なストレスに応答して形成されることが知られているストレス顆粒 (SG) を構成するタンパク質が共局在していることが検出された。SG は、ストレスに応答して翻訳が停止した mRNA-タンパク質複合体を“保管”しておく危機管理的な機能が知られており、我々が見いだした結果は、ウイルス感染による翻訳抑制がストレスとして作用することで、宿主 RNA とともにウイルス RNA と RIG-I が凝集し、そこでウイルス検知を行っている可能性が強く示唆された。実際に、siRNA を用いて SG 形成に必須であることが明らかになっている分子の発現を抑制し SG 形成を阻害した場合に、IFN の産生が強く抑制されたことから、ウイルス感染に応答した SG 形成が、自然免疫制御に重要な役割を担っていることが明らかになった。これらの知見は、RLR によるウイルス RNA 検知と自己 RNA の管理機構が密接に関連していることを示している。

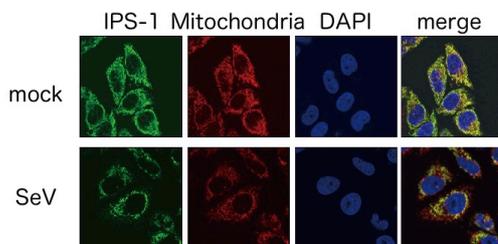


(図2) IAV 感染に応答した SG 誘導

Flu NP: ウイルスヌクレオカプシド、  
TIAR: SG マーカー、DAPI: DNA

一方で、下流のアダプター分子 IPS-1 の局在変化について検討したところ、通常はミトコンドリア上に広く発現している IPS-1 が、センダイウイルス (SeV) 感染に反応して大きく局在を変え、核膜周辺部のミトコンドリアに集積すると共に、ウイルス誘導性 SG と近接して集合することでシグナルの増強に關与していることが明らかになった (図 3)。また、この IPS-1 の局在変化には、Mitofusin-1 と呼ばれるミトコンドリアの融合に關与する分子が重要な役割を担っていることが明らかになった。上記の成果は、RLR シグナルが細胞内の大きな局在変化によって制御されていることを示しており、RLR による細胞機能制御において重要な要素であることが考えられた。

(3)miRNA を介した新たな抗ウイルス作用  
我々が開発した人工的な RLR シグナル誘導



(図3)IPS-1の細胞内局在変化

系を用い、RLR を介した細胞制御機構を検討した。細胞周期への影響について検討したところ、RLRシグナルがIFN誘導とは独立して、細胞周期の進行を直接阻害していることが明らかになった。このことは、RLRシグナルによる新たな細胞増殖抑制の作用機序を示唆している。一方で、RLRシグナルによって誘導される遺伝子をマイクロアレイ法を用いて網羅的に検討したところ、複数のmicroRNA (miRNA) の発現が増強されることを見いだした。それらの中からmiR-23bに注目して解析したところ、miR-23bと呼ばれるmiRNAが、風邪ウイルスとして知られるライノウイルスの細胞への感染に必要なVLDL receptor分子の発現を抑制することで、抗ウイルス活性を誘導していることが明らかになった。この結果は、miRNAの誘導を介した新たな抗ウイルス作用を初めて明らかにしたものである。

(4)RIG-Iと内在性RNAの会合

内在性の5'三リン酸RNAを検出したところ、複数のRNAの存在が示唆された。これらのRNAを合成して細胞に導入したところ、IFN誘導が検出されたことから、内在性RNAによ

るRIG-I活性化の可能性が示唆された。これらの知見は、今後のRLRに結合するRNAの網羅的な解析やそれによる細胞機能への影響についての検討を通じて、RLRを介した新たな細胞制御機構の解明へつながることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計17件)

- ① Takamatsu S, Onoguchi K, Onomoto K, Narita R, Takahashi K, Ishidate F, Fujiwara TK, Yoneyama M, Kato H, Fujita T, Functional characterization of domains of IPS-1 characterizing an inducible oligomerization system. *PLoS One*, 査読有, 2013, 8, e53578  
DOI: 10.1371/journal.pone.0053578
- ② Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M, Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology*, 査読有, 2013, 57, 46-58  
DOI:10.1002/hep.26017
- ③ Onomoto K, Jogi M, Yoo J-S, 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*, 査読有, 2012, 7, e430331  
DOI:10.1371/journal.pone.0043031
- ④ Ouda R, Onomoto K, Takahashi K, Edwards MR, Kato H, Yoneyama M, Fujita T, Retinoic Acid-inducible Gene I-inducible miR-23b Inhibits Infections by Minor Group Rhinoviruses through Down-regulation of the Very Low Density Lipoprotein Receptor. *J Biol Chem*, 査読有, 2011, 286, 26210-26219  
DOI:10.1074/jbc.M111.229856
- ⑤ 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 USA*, 査読有, 2010,

- 107, 1512-7  
DOI:10.1073/pnas.0912986107
- ⑥ Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, Julkunen I, Namiki H, Yoneyama M, Fujita T, Virus-infection or 5' ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1. *PLoS Pathog*, 査読有, 2010, 6, e1001012  
DOI:10.1371/journal.ppat.1001012
- ⑦ Yoneyama M, Fujita T, Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol*, 査読有, 2010, 20, 4-22  
DOI:10.1002/rmv.633
- ⑧ Yoneyama M, Fujita T, RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol. Rev.*, 査読無, 2009, 227, 54-65  
DOI:10.1111/j.1600-065X.2008.00727.x
- ⑨ Shigemoto T, Kageyama M, Hirai R, Zheng J, Yoneyama M, Fujita T, Identification of loss of function mutations in human genes encoding RIG-I and MDA5: implications for resistance to type I diabetes. *J Biol Chem*, 査読有, 2009, 284, 13348-54  
DOI:10.1074/jbc.M809449200
- ⑩ Yoneyama M, Fujita T, Structural mechanism of RNA recognition by RIG-I-like receptors. *Immunity*, 査読無, 2008, 29, 178-81  
DOI:10.1016/j.immuni.2008.07.009

[学会発表] (計 28 件)

- ① Yoneyama M, Stress granule-like aggregates play a critical role in anti-viral innate immunity. The 11<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2012.9.12, Awaji
- ② 米山光俊、ウイルス感染に应答した自然免疫誘導の分子機構、第1回千葉大学感染症研究ネットワーク研究会、2012年6月23日、千葉
- ③ Onomoto K, Fujita T, Yoneyama M, Analysis of intracellular localization of viral RNA sensor, RLR. The 22<sup>nd</sup> CDB Meeting "RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II, 2012.6.11-13, Kobe
- ④ Yoneyama M, Viral non-self RNA is detected by RIG-I-like receptors in cytoplasmic granules. 第40回日本免疫学会学術集会、2011年11月27日、千葉
- ⑤ Yoneyama M, Molecular machinery for detection of viral RNA in innate immune responses. Singapore-Japan Joint

- Forum Emerging Concepts in Microbiology, 2011.11.15, Singapore
- ⑥ Yoneyama M, Molecular machinery underlying recognition of non-self viral RNA by RIG-I-like receptors (RLRs). NTU-JST Joint Meeting on RNA & Biofunctions-Asia Studies, 2011.11.10-12, Taipei, Taiwan
- ⑦ Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Fujita T, Formation of granule-like structure in detection of viral non-self RNA by RIG-I-like receptor, The 16<sup>th</sup> Annual Meeting of the RNA Society, 2011.6.18, Kyoto
- ⑧ Onomoto K, Yoneyama M, Fujita T, Analysis of intracellular localization of viral RNA sensor, RIG-I. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 2010.8.25, Kobe
- ⑨ 米山光俊、RIG-IファミリーによるウイルスRNA認識機構、第82回日本生化学会大会、2009年10月25日、神戸
- ⑩ Yoneyama M, Non-self RNA sensing mechanism of RIG-I-like receptors, The 8<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2008.9.10, Awaji

[その他]

ホームページ (上記以外の研究成果) :  
[http://www.pf.chiba-u.ac.jp/bunya\\_kanse\\_nmeneki/bunya\\_kansenmeneki/Mol.\\_Immunol.\\_jpn.html](http://www.pf.chiba-u.ac.jp/bunya_kanse_nmeneki/bunya_kansenmeneki/Mol._Immunol._jpn.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米山 光俊 (YONEYAMA MITSUTOSHI)  
千葉大学・真菌医学研究センター・教授  
研究者番号 : 40260335

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

尾野本 浩司 (ONOMOTO KOJI)  
千葉大学・真菌医学研究センター・助教  
研究者番号 : 10612202