

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19103

研究課題名(和文) 抗ウイルス自然免疫応答に関するavSGの機能解析

研究課題名(英文) The role of avSG in antiviral innate immune response.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ウイルス感染センサーであるRIG-I-like receptor (RLR)が細胞質内でウイルスRNAを検知する場に焦点をあて、ウイルス感染により形成されるavSGを介した抗ウイルス免疫応答を明らかにすることを目的とし解析を行った。その結果、NDV感染において感染初期に形成されるviral replication complex (vRC)と呼ばれる複製複合体と、感染後期に形成されるavSGの両方がRIG-Iを介したIFN産生に重要であることを明らかにした。またavSGに局在する分子の中から抗ウイルス免疫応答に関与する分子を複数同定し、今後その詳細な機能解析を行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：RIG-I-like receptors (RLRs), cytoplasmic viral RNA sensors, induce antiviral innate immunity, including production of IFN. In this project, we focused on cellular localization of RLRs and detail mechanism of antiviral stress granules (avSGs), which plays critical role for sensing viral RNA by RLRs to trigger RLRs-mediated antiviral innate immune signals. We found that in Newcastle disease virus (NDV)-infected cells, RIG-I localized in viral replication complex (vRC), consisting of viral proteins and RNAs, at early phase and subsequently in avSGs which contains viral read-through RNAs. Both vRCs and avSGs are important for detecting viral RNAs and primary and secondary production of IFN by RIG-I. We also found several novel candidate proteins that involved RLR-mediated signals among avSG localized proteins. For further study, we will analyze regulatory mechanisms of these candidate proteins and elucidate avSG-mediated RLR signaling.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ウイルス学 自然免疫 RLR ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

抗ウイルス自然免疫応答は、細胞がウイルス感染を感知することで発動される。我々の研究グループは、2004年に細胞内のウイルス感染センサーとして RIG-I, MDA5, LGP2 の3つの分子からなる RIG-I-like receptor (RLR)を同定し、RLRがウイルス由来の非自己RNA(2本鎖RNAなど)を認識しI型 Interferon (IFN)を中心とした抗ウイルス免疫応答を発動することを明らかにした (*Nat. Immunol*, 2004, *J. Immunol*, 2005)。さらに、それぞれのノックアウトマウスなどを用いた解析から、そのドメイン構造やシグナル伝達機構を明らかにしてきた。これらの知見は、ウイルス感染に対する生体防御機構への理解を飛躍的に進展させた。しかし、一方で RLR が細胞質内のどこでウイルス RNA を検知しているのかについては殆ど分かっていなかった。

そこで申請者は RLR がウイルス RNA を感知する『場』に着目し、これまでに RLR がウイルス感染に反応し一過的に細胞質内で顆粒状に集積しウイルスタンパク質 (NP) 及びウイルス RNA と共局在していることを明らかにした。またこの時、種々のストレスに反応して一過的に形成されるストレス顆粒 (Stress Granule : SG) と呼ばれる細胞質内構造体のマーカータンパク質及び PKR などの抗ウイルスタンパク質が RLR と共局在することが明らかとなった (図 1)。さらに、この顆粒形成を阻害すると RLR を介した IFN 産生が著しく抑制されたことなどから本顆粒を “antiviral SG (avSG)” と命名した (*PLoS One*, 2012)。

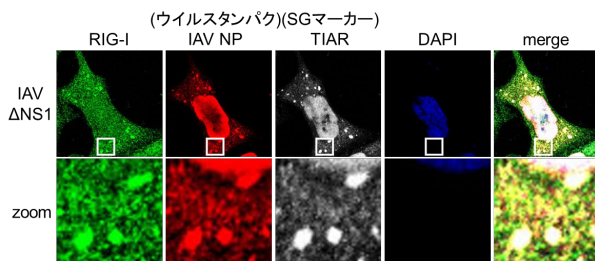


図 1: IAV NS1 感染時の RIG-I の局在解析

さらにインフルエンザウイルス (IAV) や脳心筋炎ウイルス (EMCV) のウイルスタンパク質が avSG 形成を阻害することで、抗ウイルス自然免疫応答を回避していることも明らかにした (*J. Virol*, 2013)。さらに avSG 形成及び RIG-I シグナルの新規制御分子として DHX36 と呼ばれる RNA ヘリカーゼが PKR の活性化を介して、avSG 形成を制御していることや RIG-I シグナルを制御している TRIM25 と呼ばれるユビキチンリガーゼがウイルス感染特異的に avSG に局在していることを明らかにした (*PLoS Pathog*, 2014)。

しかし、avSG はウイルス感染時に一過的に形成され、SG 同様に膜構造を持たない非常に不安定な凝集体であり、またその形成様式はウイルスの種類により異なっている。そのた

め個々のウイルスにおける avSG の構成分子及び形成メカニズムとその生理的機能についてはまだ殆ど明らかになっていない。

2. 研究の目的

これまでの解析から、avSG が RLR によるウイルス RNA の検知とシグナル伝達の足場として機能していることが強く示唆された。そこで本研究計画では、個々のウイルスにおける avSG の機能解析と avSG 形成に関与する分子の同定及びその形成メカニズムの時空間的な解析を行い、抗ウイルス自然免疫における avSG の機能を解明することで、新規抗ウイルス治療や予防薬への開発につながる知見を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究目的を達成するために以下の方法を用いて解析を行った。

(1) avSG の生理的機能の解析

種々のウイルスを用いて、ウイルス感染細胞内における avSG の形成及び RLR やウイルスタンパク質の局在を免疫蛍光染色法により、ウイルス RNA 及び IFN mRNA の局在を FISH 法によりそれぞれ解析した。また蛍光標識した SG マーカータンパク質 (GFP-G3BP) 発現細胞株を用いてウイルス感染時の avSG 形成をライブイメージング撮影により解析した。また IFN- mRNA の発現量を Real Time PCR 法により定量した。

(2) avSG 形成及び抗ウイルス自然免疫応答に関与する新規分子の同定

ウイルス感染細胞から avSG を生化学的手法により単離・抽出し、RIG-I と特異的に結合する分子の網羅的解析を行った。得られた標的分子の過剰発現及び siRNA や CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子発現抑制実験を行うことにより、ウイルス感染時の avSG 形成及び抗ウイルス自然免疫応答への影響を免疫蛍光染色法と Real Time PCR 法によりそれぞれ解析した。

既知の RNA 結合タンパク質や SG 関連タンパク質を標的に siRNA を用いた遺伝子発現抑制実験を行い、ウイルス感染時の avSG 形成及び IFN- mRNA の発現量を免疫蛍光染色法及び Real Time PCR 法によりそれぞれ解析した。

4. 研究成果

(1) RIG-I によって認識されるウイルスの1つである Newcastle Disease Virus (NDV) を用いた解析から、NDV 感染初期の細胞質内ではウイルスタンパク質 (L や N protein) などからなる avSG とは別の顆粒が最初に形成され、avSG は感染後期に形成されることが明らかとなった (図 2)。

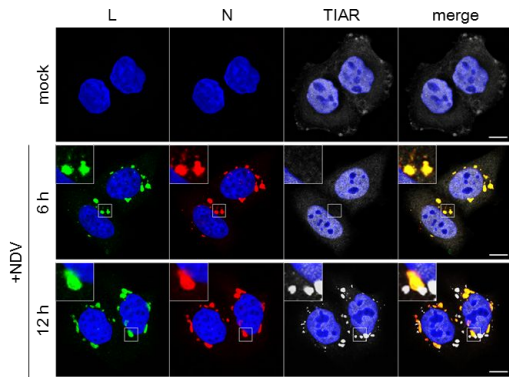


図 2 : NDV 感染細胞でのウイルスタンパク質及び avSG の局在解析

さらに RIG-I は avSG とウイルスタンパク質 (N protein) からなる顆粒の両方に局在していることが明らかとなった(図 3)。

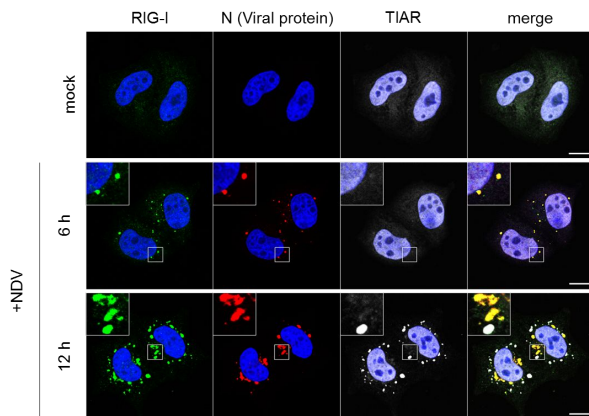


図 3 : NDV 感染細胞での RIG-I の局在解析

そこで次に、ウイルス RNA の局在を FISH 法により解析した。その結果、感染初期では +鎖と -鎖の両方が N protein と共局在していたことから、この顆粒が NDV のウイルス複製複合体(viral replication complex: vRC)であることが明らかとなった。また、感染後期には +鎖の vRNA が avSG に局在することが明らかとなった(図 4)。さらに、avSG に局在するウイルス RNA をノーザンブロット法などにより詳細に解析した。その結果、5' 末端に CAP 構造を持たず 3' 末端に polyA を持ったウイルス RNA(read-through RNA)が avSG 内で RIG-I により認識されていることを明らかにした。

さらに siRNA を用いて avSG 形成を阻害したところ、NDV 感染時の IFN の mRNA の発現量が減弱したことから、vRC が感染初期に、avSG が感染後期の RIG-I を介した IFN 産生に重要であることが明らかとなった (*PLoS Pathog*, 2016, 雑誌論文)。

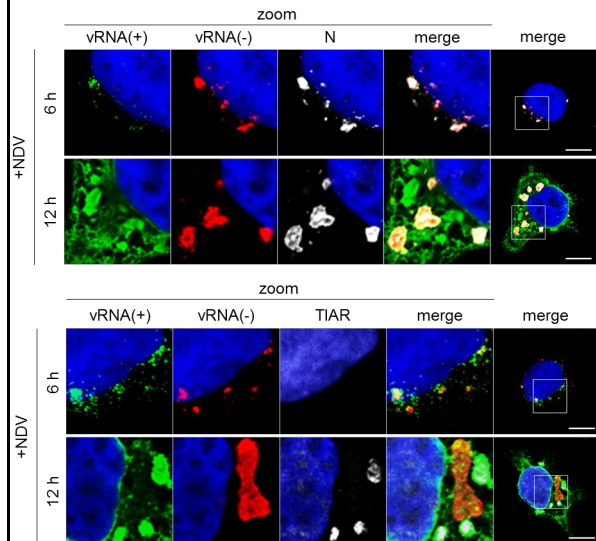


図 4 : NDV 感染細胞での vRNA の局在解析

(2) IAV NS1 及び NDV を感染させた細胞から avSG を生化学的手法を用いて単離・抽出し、RIG-I と特異的に結合する分子を解析した。さらにヒ素処理した細胞から抽出した SG と比較することでウイルス感染特異的に RIG-I と結合する分子として既知の SG 関連タンパク質を含む複数の標的候補分子を得ることが出来た。現在、標的候補分子の詳細な機能解析を行っている。

(3) siRNA により既知の RNA 結合タンパク質及び SG 関連タンパク質の発現を抑制した細胞にウイルスを感染させ、RLR を介した IFN の産生誘導への影響を Real Time PCR で解析した。IFN 産生誘導への関与が強く示唆された分子については細胞への過剰発現実験ならびに CRISPR/Cas9 システムにより KO 細胞を樹立し詳細な解析を行った。その結果、RLR のシグナル制御に関する新規の RNA 結合タンパク質を同定することが出来た。現在、様々な変異体を作製し、その詳細な分子機構の解明を行っている。

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 2 件)

Yoneyama M, Jogi M, Onomoto K. Regulation of antiviral innate immune signaling by stress-induced RNA granules. *J Biochem*. 2016, 159 (3):279-86. (査読なし)
doi: 10.1093/jb/mvv122.

Oh SW, Onomoto K, Wakimoto M, Onoguchi K, Ishidate F, Fujiwara T, Yoneyama M,

Kato H, Fujita T. Leader-Containing Uncapped Viral Transcript Activates RIG-I in Antiviral Stress Granules. PLoS Pathog. 2016,12(2):e1005444.(査読有り)
doi: 10.1371/journal.ppat.1005444.

http://www.pf.chiba-u.ac.jp/research/scientists_list/onomoto.html

千葉大学真菌医学研究センター
感染免疫分野 ホームページ
http://www.pf.chiba-u.ac.jp/project_immunerresponses/

〔学会発表〕(計 4 件)

Marie Ban, Koji Onomoto, Mitsutoshi Yoneyama. Identification of a novel RNA binding protein that is involved in RLR-mediated signaling., The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2016年9月6日~9日、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市)

Seong-Wook Oh, Koji Onomoto, Mai Wakimoto, Kazuhide Onoguchi, Fumiyoshi Ishidate, Takahiro Fujiwara, Mitsutoshi Yoneyama, Hiroki Kato, Takashi Fujita. Leader-containing uncapped viral transcript activates RIG-I in antiviral stress granules., The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2016年9月6日~9日、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市)

尾野本 浩司、米山 光俊 抗ウイルス自然免疫応答におけるストレス顆粒の機能解析、第1回 RNA 顆粒/RNA タンパク質複合体研究会、2016年7月16日~17日、自然科学研究機構基礎生物学研究所(愛知県・岡崎市)

尾野本 浩司、伴 万里江、米山 光俊 自然免疫応答に関与する RNA 結合タンパク質の同定と機能解析、第80回インターフェロンサイトカイン学会、2015年7月17日~18日、東京工業大学大岡山キャンパス蔵前会館蔵前ホール(東京都・目黒区・長津田町)

〔図書〕(計 1 件)

尾野本 浩司、米山 光俊
ウイルス感染応答時の翻訳制御と抗ウイルス自然免疫応答
メディカル秀潤社、細胞工学, Vol.34, No.8,
p.772-777, 2015

〔その他〕

ホームページ等
千葉大学真菌医学研究センター
ホームページ
<http://www.pf.chiba-u.ac.jp/>

千葉大学真菌医学研究センター
研究者リスト

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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