

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15279

研究課題名(和文) ウイルス感染センサーによる内在性RNA認識を介した自然免疫制御

研究課題名(英文) Regulation of innate immune responses via interaction between viral RNA sensors and the endogenous RNAs

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウイルス感染センサーであるRIG-I-like receptor (RLR)による内在性RNAの認識とその相互作用による生理機能の可能性を検討し、新たな抗ウイルス自然免疫制御機構を提示することを目的とした解析を実施した。その結果、RNAポリメラーゼIIIで転写される翻訳制御に関与する一部のRNAがRIG-Iと会合し、抗ウイルスシグナルを誘導できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to examine whether the viral RNA sensor molecule, RIG-I-like receptor (RLR), can recognize endogenous RNA(s) and trigger anti-viral innate immune responses to regulate an unknown physiological activity. Our results demonstrate that several kinds of 5' ppp-containing endogenous RNAs, which are transcribed by RNA polymerase III, induce type I interferon-activating signal in RIG-I-dependent manner, suggesting an possible importance of interaction between viral RNA sensor molecule and self-RNA.

研究分野：分子生物学

キーワード：免疫学 RNA

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ウイルス感染に応答した生体防御は、感染センサーであるパターン認識受容体 (Pattern recognition receptor: PRR) によるウイルス検知によって発動される。哺乳類の PRR の中で、RIG-I 様受容体 (RLR) は、ウイルス感染細胞内でウイルス由来非自己 RNA を特異的に検知し、I 型及び III 型インターフェロン (IFN) 等のサイトカインの過性の発現誘導を介してウイルスを排除する。これまで研究代表者は、ヒトの 3 種の RLR を同定し (*Nat Immunol*, 2004; *J Immunol*, 2005)、それらのウイルス RNA 認識の分子機構と細胞内局在変化によるシグナル活性化機構を明らかにしてきた (*Mol Cell*, 2008; *PLoS One*, 2012)。また多数の研究報告から、多くの RNA ウイルスの検知に関与することが知られる RLR である RIG-I は、ウイルスゲノムが持つ 5' 末端三リン酸 (5' ppp) を有する比較的短い二本鎖 RNA 構造を特異的に認識すること、またこの基質特異性が細胞質内での自己と非自己 RNA 識別の分子基盤であることが明らかにされていた。

(2) 一方で、哺乳類細胞内には 3 種の RNA ポリメラーゼ (pol) が存在し、それぞれが異なる RNA 転写産物を産生することが知られている。RNA pol II によって転写される mRNA は、転写後に Cap (5') と poly(A) (3') が付加され、明確に RIG-I の基質とはなり得ない構造をとる一方で、RNA pol III によって転写される tRNA などは、転写後切断や修飾により同様に RIG-I の認識から逃れると考えられてきた。しかし、同じく RNA pol III により転写される一部の RNA は 5' ppp 構造を持つと考えられており、実際に我々の解析で、細胞内に発現する 5' ppp を保持する内在性 RNA を検出していた (未発表)。しかし、これらの内在性 RNA が RIG-I に認識されか否かは明確になっていなかった。また、我々の解析から、これらの RNA を *in vitro* で合成し細胞内へ導入した場合、RIG-I 依存的な I 型 IFN 産生シグナルが誘導される可能性がある結果を得ていたことから、ある特定の局面においては、内在性 RNA も RIG-I の基質となり、何らかの生物活性を有することを予想していた。すなわち、これまでは厳密に非自己 RNA を認識するとされていた RIG-I を介したシグナルが、これまでとは全く異なる制御を受けている可能性が予想された。研究開始当初は、これら内在性 RNA と RIG-I の会合の可能性やそれによる細胞機能制御についての報告はなく、本研究では、この内在性 RNA がウイルスセンサーによって認識され、それにより何らかの生物機能を発揮する可能性はあるのか? を学問的な問いとして設定した。

## 2. 研究の目的

上記のような知見を背景として、RLR による非自己 RNA の認識メカニズムについての理解

が進み、内在性 RNA は“自己”として RLR には検知されないと理解されていたが、一部の内在性 RNA が RIG-I の基質となり得る可能性があったことから、本研究では、萌芽研究として、内在性 RNA と RIG-I の相互作用を介した新たな自然免疫制御メカニズムの存在を示す知見を得ることを目的とすることとした (図 1)。その結果から得られる生物学的

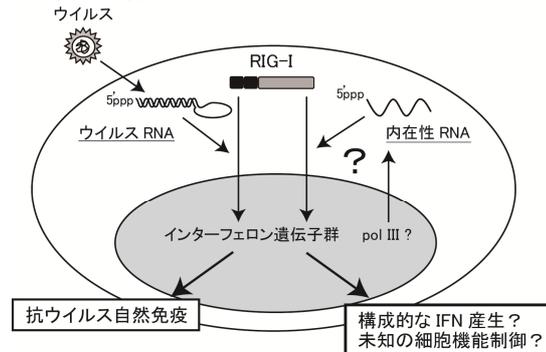


図 1

な重要性としては、内在性 RNA を介した微量の IFN 産生による IFN 誘導遺伝子群 (RLR を含む) の構成的な発現が、ウイルス感染に応答した効率良い IFN 産生に重要な役割を担う可能性である。また、遺伝子変異などによる恒常的な IFN 産生が、ある種の自己炎症性疾患の発症に深く関与することも明らかになっていることから、内在性 RNA を介し IFN 産生が疾患発症に関与することも十分に考えられた。従って、本研究による自己 RNA による抗ウイルス自然免疫の制御についての知見は、IFN 系の誘導についての新たな制御メカニズムを提示すると共に、IFN が関与するウイルス感染症や炎症性疾患に対する新たな治療法開発へつながる可能性があると考えられた。

## 3. 研究の方法

(1) RIG-I と RNA の会合を検討するために、ヒト HEK293T 細胞由来の形質転換株を樹立した。Flag-tag を付加した野生型 RIG-I、RIG-I の RNA 認識に関与する 4 つの塩基性アミノ酸をアラニンに置換した変異体 (RIG-I 4M) および非特異的対照である Green Fluorescent Protein (GFP) をそれぞれ発現する細胞 (293 RIG-I WT, 293 RIG-I 4M, 293 GFP) から細胞抽出液を調整し、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った後、共沈する内在性 RNA を RT-PCR により検出した。

(2) RIG-I と会合することが確認できた RNA について、IFN 誘導シグナルを活性化できるかどうかについて、複数の細胞株を用いて確認した。IFN 遺伝子プロモーター制御下にホタルルシフェラーゼ遺伝子をつないだプラスミドをレポーターとして用い、*in vitro* で合成した RNA で刺激した場合、RIG-I および基質候補となる RNA 発現ベクター (U6 promoter 制御) と共に培養細胞へ導入した場合に、ルシフェラーゼ活性

を検出することで、それらの RNA による RIG-I 依存的な IFN 誘導能を検討した。

(3) タンパク質の発現抑制実験には、short hairpin (sh)RNA を一過的に細胞へ導入し、(2)と同様に IFN 遺伝子プロモーター/ルシフェラーゼレポーターでその影響を検出した。

#### 4. 研究成果

(1) これまでの解析から、RNA pol III によって転写される内在性 RNA のうち複数の RNA が 5' ppp 構造を保持し細胞内に発現していること、またそれらが IFN 系を誘導し得る可能性を示唆する結果を得ていた。本研究ではまず、これらの RNA が RIG-I と会合し得るかどうかを免疫沈降法により検討した。HEK293T 細胞に RIG-I および RNA 結合能が低下した RIG-I 4M、対照として GFP を発現させた細胞を用いた。抗 Flag 抗体で免疫沈降して RIG-I に結合している RNA を定量的 RT-PCR を用いて検討したところ、複数の non-coding RNA が RIG-I と共に沈殿することが検出された。特に、RNA ポリメラーゼ III により転写されることが知られる 7SL RNA, 5S rRNA, *Alu* RNA, U6 snRNA などの RNA が RIG-I に結合し得ることが示唆された。

(2) これら 5' ppp を持つ内在性 RNA が、RIG-I を介したシグナル伝達を誘導し得るか否かをマウス L929 細胞でのレポーターアッセイで検討したところ、RIG-I の基質として知られる合成 RNA の poly(I:C) 刺激よりは弱いものの、7SL RNA および 5S rRNA で処理した場合に、RIG-I との共発現に依存して、有意な IFN レポーター活性が検出された(図 2)。またこの時、RNA の 5' ppp を脱リン酸化酵素処理で除くことでレポ-

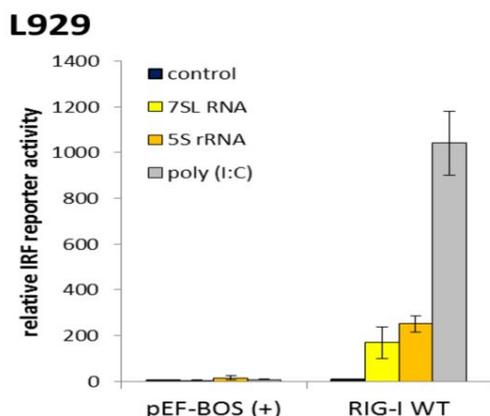


図 2

ター活性が減弱したこと、また RIG-I 4M では活性が見られなかったことから、RIG-I を介してシグナルが活性化されていることが示唆された。さらに、基質 RNA を細胞内で RNA pol III により転写させた場合でも、Huh7、U2OS、HEK293T など複数の

細胞株においてレポーター活性の上昇が観察され、これらの内在性 RNA が RIG-I を介したシグナルを誘導していることが示唆された。

(3) 一方で、内在性 RNA による IFN 誘導シグナルの活性化は、poly(I:C)などの既知の RIG-I 誘導 RNA 刺激よりも著しく低かったことから、細胞は内在性 RNA を介したシグナル活性化を起こさないメカニズムを持つことが予想された。また、7SL RNA の場合、通常の細胞内では signal recognition particle (SRP) と呼ばれるタンパク質群と会合し小胞体膜上での翻訳に関与することが知られていたことから、これらの複合体形成がそこに参与している可能性が予想された。そこで、7SL RNA の 5' ppp 付近に結合することが知られる SRP である SRP14 の発現を減弱させた時の IFN 誘導シグナルについて検討した。その結果、HEK293T、Huh7、U2OS など複数の細胞において、SRP14 に対する shRNA を導入した場合、レポーター活性が有意に上昇することが明らかになった。一方で、SRP9 など他の SRP に対する shRNA 処理でそれらのタンパク質発現を抑制した場合には差がみられなかったことから、SRP14 が 7SL RNA を RIG-I による認識を阻害している可能性が示唆された。SRP14 は、主にこの 7SL RNA の 5' ppp 周囲に結合することが知られていることから、5' ppp 周辺が露出することで、7SL RNA が RIG-I の基質となり得ることが示唆された。

(4) 本研究から、内在性 RNA による RIG-I の活性化の可能性についての新たな知見が得られ、その生理的な機能について解析する端緒が開かれたことから、今後の解析が重要になっている。しかし一方で、本研究の実施期間中に、複数のグループから 7SL RNA を含む内在性の RNA による IFN システムの制御を解析した報告がなされ (Nabet et al., *Cell*, 170, 352-36, 2017; Chiang et al., *Nat Immunol.*, 19, 53, 2018; Jiang et al., *Cell*, 173, 906, 2018) その生理機能についての解析が進んできている。本研究で得られた知見についてさらなる解析を実施することで、内在性 RNA の認識を通じた新たな機能制御機構を迅速に解明する必要がある。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

Yoneyama M. Molecular interaction between host stress responses and

RNA-mediated innate immunity. The 2<sup>nd</sup> cMAV (Center for Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine) Symposium Tokyo イイノホール&カンファレンスセンター (東京都・千代田区) 3.28-29, 2018.  
Yoneyama M. Viral infection and anti-viral innate immune responses in animal cells. 第58回日本植物生理学会年会 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市) 3.16-18, 2017.  
Ban M, Onomoto K, Yoneyama M. Identification of a novel RNA binding proteins that is involved in RLR-mediated signaling. The 15<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市) 9.6-9, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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/bunya\\_kansenmeneki/](http://www.pf.chiba-u.ac.jp/bunya_kansenmeneki/)

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>

## 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) 研究協力者

尾野本 浩司 (ONOMOTO, Koji)

常喜 儒彦 (JOGI, Michihiko)

佐久間 千愛 (SAKUMA, Chiaki)