

令和元年5月28日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15699

研究課題名(和文) 抗ウイルス自然免疫応答の時空間的制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of spatiotemporal regulation in antiviral innate immunity

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞質内ウイルス感染センサーであるRIG-I-like receptor (RLR)によるウイルスRNA検知に重要なストレス顆粒様凝集体(antiviral stress granule :avSG)を解析し、抗ウイルス自然免疫に関わる新規制御分子同定しその機能を解明することを目的として行った。その結果、ウイルス感染時にavSGに局在し、抗ウイルス自然免疫応答を制御するRNA結合タンパク質を複数同定した。またPKRの活性化を制御する分子であるTRBPがLGP2と結合し、特定のmicroRNAの発現を制御していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、翻訳制御以外のSGの生理的機能や疾患との関連性は殆ど明らかになっておらず、ウイルス感染時に形成されるavSGの形成メカニズム及びその機能が解明できれば、ウイルス学のみならず、免疫学、RNA学などの複数の分野においても新たな知見をもたらすことが考えられる。また、本研究結果によりRLRによるウイルス感知システムへの機能解析が進み、薬剤によりavSG形成を誘導できればウイルス感染症や炎症性疾患に対する新たな治療薬及び診断薬の開発へつながる可能性が期待でき、学術的意義だけでなくウイルス感染症の克服のためにも非常に重要であると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on antiviral stress granules (avSG), which is important for detecting viral RNA and induce antiviral innate immune signals via cytoplasmic viral RNA sensors, RIG-I-like receptor (RLR). We identified that several novel antiviral proteins which localized in avSG and enhanced RLR-mediated signal activation in viral infected cells. We also found that TAR RNA-binding protein (TRBP) interacted with LGP2 and regulated microRNA expression.

研究分野：自然免疫

キーワード：自然免疫 ウイルス感染 ストレス応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染に応答した生体防御反応の1つである抗ウイルス自然免疫は、パターン認識受容体(pattern recognition receptors: PRRs)と呼ばれる感染センサーによるウイルス検知によって発動される。我々の研究グループはPRRの1つとしてRIG-I, MDA5, LGP2の3つからなるRLRを同定し、これまでにRLRが細胞質内のウイルスRNAを感知し、I・III型Interferon(IFN)を中心とした抗ウイルス自然免疫応答を発動するための必須な分子群であることを明らかにしてきた(*Nat. Immunol.*, 2004, *J. Immunol.*, 2005)。これらの知見は、ウイルス感染に対する生体防御への理解を飛躍的に進展させた。一方で細胞はウイルス感染をストレスとしても認識し、ストレス顆粒(stress granule: SG)と呼ばれるmRNA, RNA結合タンパク質などからなる凝集体を一過的に形成し翻訳を抑制することが知られている。しかし、これまでにRLRの細胞内局在についての研究報告は殆どなく、RLRによるウイルスRNA検知とSG形成との関連性及びその重要性も明らかとなっていない。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がウイルス感染時に一過的に凝集しウイルスRNAと共局在していることを明らかにした(図1)。

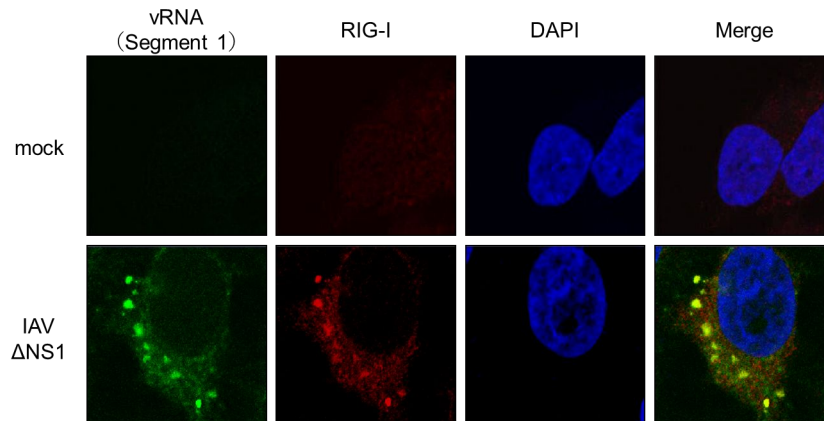


図1: IAV NS1感染時のRIG-I及びウイルスRNA (Segment 1)の局在解析

さらに興味深いことに、この顆粒はSGのマーカータンパク質や種々の抗ウイルスタンパク質と共局在しており、SGの抗ウイルス応答への関与が予想された。実際にこの顆粒形成を阻害するとIFN産生を含む抗ウイルス応答が著しく抑制されたことから、RLRによるウイルスRNA検知とシグナル活性化に重要な顆粒であることが明らかとなり、これを“antiviral SG (avSG)”と命名した(*PLoS ONE*, 2012)。また、申請者はインフルエンザウイルス(IAV)や脳筋炎ウイルス(EMCV)などのウイルスタンパク質がavSG形成を阻害し抗ウイルス自然免疫を回避していることやニューカッスル病ウイルス(NDV)感染細胞内ではウイルスのRNA及びタンパク質などからなる複製複合体(viral replication complex:vRC)と呼ばれる異種の顆粒が形成され、vRCが感染初期、avSGが感染後期のRIG-Iを介したIFN産生に重要であることを明らかにした(*PLoS Pathog.*, 2016)。さらに、複数の研究グループによりRipletやTRIM25, OASL, MEX3C, DHX36, PUM1/2などのRLRシグナルを制御する様々な分子がSGに局在することが明らかになり、SGの翻訳制御以外の生理的機能が明らかにされつつある(*Trends Immunol.* 2014)。一方で、SG形成は一過的且つ可逆的なため、個々のウイルス感染時におけるSGの詳細な分子機構や構成因子を網羅的に解析した報告は殆どなく、SGの抗ウイルス免疫応答制御に果たす役割は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

これまでの研究によりavSGがRLRによるウイルスRNA検知及び抗ウイルスシグナル伝達の足場として機能していることを強く示唆する結果を得た。そこで本研究計画では、細胞質内におけるavSG及びRLRとウイルスRNAの局在を時空間的観点から解析し、その普遍的な分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。特に、avSGの形成メカニズムを生化学・分子生物学的に解析し、抗ウイルス自然免疫応答に参与する新規制御分子を同定し、その生理機能を解明することで、SGの抗ウイルス免疫応答制御に果たす役割を明らかにし、SGを標的とした新規抗ウイルス治療薬及び診断薬への開発につながる知見を得ることを目指す(図2)。

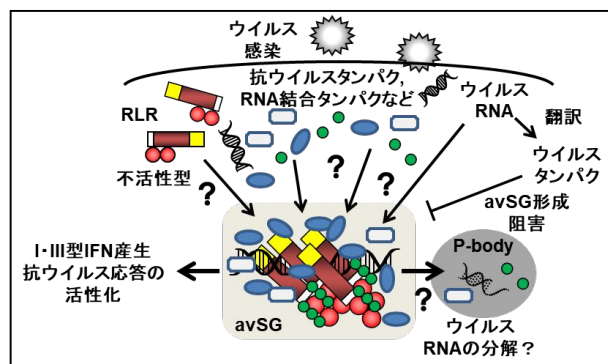


図2: 研究計画 概念図

3. 研究の方法

- (1) avSG の構成成分を明らかにするために外来遺伝子を1コピーのみゲノムに挿入できる Flp-in システムとテトラサイクリン誘導性プロモーターを組み合わせた発現系により RIG-I の発現量を一定化した細胞株を用いて、種々のウイルス感染細胞から avSG を単離抽出し、その構成成分を生化学的に解析し、新規構成分子の同定を行った。
- (2) 上記の実験より同定した標的候補分子に対して培養細胞を用いた過剰発現および siRNA や CRISPR/Cas を用いた遺伝子発現抑制実験を行うことにより、ウイルス感染時における細胞内局在と avSG 形成への影響を免疫染色で、抗ウイルス免疫応答への影響を Reporter Assay 及び Real Time PCR 法によりそれぞれ解析した。
- (3) 並行して既知の RNA 結合タンパク質及び SG 関連タンパク質に標的を絞って作製した siRNA ライブラリーを用いて、各種ウイルス感染時における avSG 形成と IFN シグナルへの影響を指標にスクリーニングを行い標的候補分子の同定を行った。

4. 研究成果

- (1) まず、培養細胞を用いて上記実験方法により得られた標的分子群のウイルス感染時における細胞内局在を SG マーカータンパク質に蛍光タンパク質を連結した融合タンパク質 (GFP-G3BP) を恒常的に発現する細胞株を用いて解析した。その結果、IAV NS1 感染細胞において avSG に局在する分子を複数得ることができた(図3にはそのうちの1つの標的候補分子 X の局在を示す)。

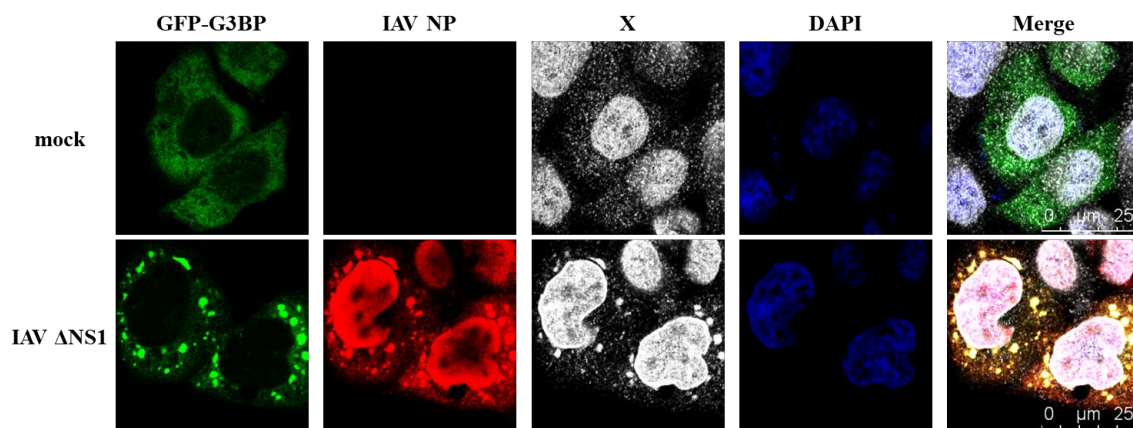


図3: ウイルス感染時の細胞内局在
細胞に IAV NS1 を9時間感染させた後、IAV NP 及び
標的候補分子 (X) に対する抗体を用いてそれぞれの局在を解析した。

次に、標的候補分子の発現ベクターを作製し、IFN シグナルへの影響を IFN- β 及び IRF、NF- κ B それぞれのレポータープラスミド((a)p-125Luc, (b)p-55C1BLuc, (c)p-55A2Luc)を用いて解析した(図4)。その結果、過剰発現により NDV 及び IAV NS1 感染時のレポーター活性が増加した。さらに CRISPR/Cas9 システムを用いて KO 細胞株を樹立し、ウイルス感染時の IFN- β mRNA 量を Real Time PCR を用いて測定した。その結果、KO 細胞では WT 細胞と比較してウイルス感染時の IFN- β mRNA 発現量が減弱した。以上より標的候補分子 X は RLR を介した IFN 産生を正に制御する分子であることが示唆された。現在、ノックアウト (KO) マウスの作製に着手しており、KO マウスが作製出来次第、ウイルス感染実験により個体レベルにおける生理機能の解析を推し進める予定である。

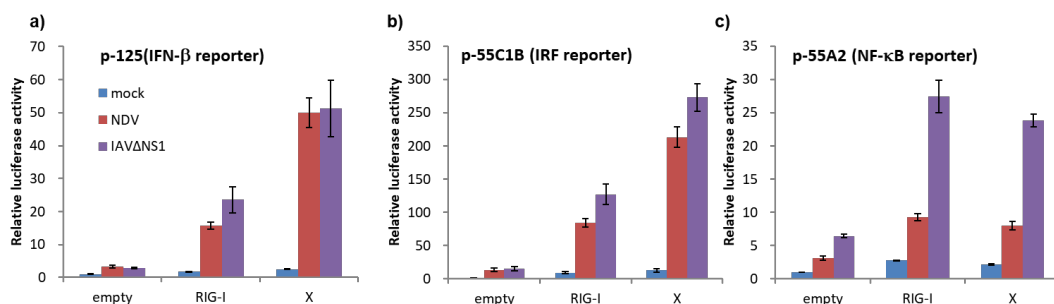


図4: ウイルス感染時における Reporter 活性の測定
レポーター遺伝子 (p-125Luc (a)、p-55C1B (b) または p-55A2Luc (c)) と共に、
発現プラスミドを transfection し、ウイルス感染12時間後の各レポーター活性を測定した。

(2) 既知のRNA結合タンパク質及びSG局在分子の中から、標的候補分子のスクリーニングを行い、avSG形成に重要なPKRの活性化を制御する分子としてTAR-RNA binding protein(TRBP)に着目し、その機能解析を行った。これまでTRBPはRNAサイレンシングの主要分子の1つとして知られていたが、RNAサイレンシング機構とRLRを介した抗ウイルス免疫応答の関連性については明らかとなっていなかった。そこで、免疫沈降法を用いてTRBPとRLRとの結合を解析した結果、TRBPがRLRの1つであるLGP2とRNA binding domainを介して特異的に結合していることが明らかとなった。さらに、CRISPR/Casを用いたKO細胞などを用いて、その生理機能を解析した結果、LGP2がTRBPと結合することで、特定のmicroRNAを制御していることが明らかとなった(図5)(*Nucleic acids research*, 2018)。本研究から、これまで独立した経路であると考えられてきた自然免疫応答機構とRNAサイレンシング機構が相互に制御する関係にあることが示唆された。

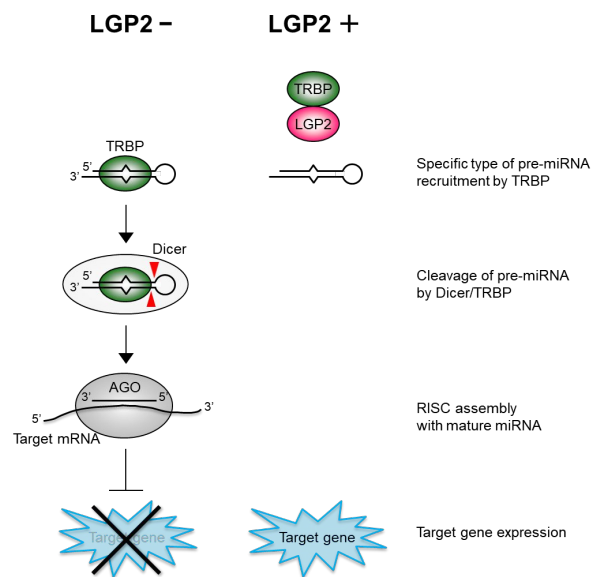


図5:LGP2によるTRBPを介したRNAサイレンシングの制御機構のモデル図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Ohto T, Konishi M, Tanaka H, Onomoto K, Yoneyama M, Nakai Y, Tange K, Yoshioka H, Akita H. Inhibition of the Inflammatory Pathway Enhances Both the in Vitro and in Vivo Transfection Activity of Exogenous in Vitro-Transcribed mRNAs Delivered by Lipid Nanoparticles. *Biol Pharm Bull*, 42,299-302, 2019. doi: 10.1248/bpb.b18-00783 査読有

Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Yoneyama M, Ui-Tei K. Virus Sensor RIG-I Represses RNA Interference by Interacting with TRBP through LGP2 in Mammalian Cells. *Genes*, 9, pii: E511,2018. doi: 10.3390/genes9100511. 査読有

Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Murakami F, Komori C, Suzuki Y, Yoneyama M, Ui-Tei K. LGP2 virus sensor regulates gene expression network mediated by TRBP-bound microRNAs. *Nucleic acids research*, 46,9134-9147,2018. doi: 10.1093/nar/gky575. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

尾野本浩司, 高橋朋子, 中野悠子, 程久美子, 米山光俊. RLRを介した抗ウイルス自然免疫応答におけるTRBPの機能解析. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年11月

筒場千穂, 尾野本浩司, 伴万里江, 米山光俊. 抗ウイルス自然免疫応答に關与する新規制御分子の同定と機能解析. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年11月

高橋朋子, 中野悠子, 尾野本浩司, 米山光俊, 程久美子. ウイルス感染による細胞内ウイルスセンサーLGP2はRNAサイレンシングを介して遺伝子発現ネットワークを制御する. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年11月

中野悠子, 高橋朋子, 尾野本浩司, 村上文則, 鈴木穰, 米山光俊, 程久美子. LGP2-TRBP相互作用により制御されるmicroRNAの同定と、そのターゲット遺伝子の網羅的発現解析. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年11月

筒場千穂, 尾野本浩司, 伴万里江, 米山光俊. RLRシグナル伝達経路に關与するRNA結合タンパク質の新規同定. 第20回日本RNA学会年会, 2018年7月

高橋朋子, 中野悠子, 尾野本浩司, 米山光俊, 程久美子. 細胞内ウイルスセンサーLGP2は TRBP との相互作用を介して RNA サイレンシングを制御する. 第 20 回 日本 RNA 学会年会, 2018 年 7 月

尾野本浩司, 高橋朋子, 中野悠子, 程久美子, 米山光俊. avSG を介した抗ウイルス自然免疫の機能解析. 第 83 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 2018 年 7 月

呉成旭, 尾野本浩司, 脇本舞, 小野口和英, 石館文善, 藤原敬宏, 米山光俊, 加藤博己, 藤田尚志. 細胞ストレスとしてのウイルス感染と抗ウイルス免疫応答の誘導. 第 90 回日本生化学会大会, 2017 年 12 月

中野悠子, 高橋朋子, 尾野本浩司, 米山光俊, 程久美子. 自然免疫応答における RNA サイレンシング活性の調節機構とそれに伴う遺伝子発現変動. 第 40 回分子生物学会, 2017 年 12 月

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

1 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
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_immuneresponses/

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。