

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15166

研究課題名(和文)モノネガウイルス・リードスルーRNAのウイルス増殖と宿主免疫応答における機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Mononegavirus read-through RNA in viral replication and host immunity

研究代表者

呉 成旭 (Oh, Seong-Wook)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・研究員

研究者番号：30817416

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)：本研究では、細胞内ウイルスセンサー分子RIG-Iが、マイナス一本鎖RNAウイルス(モノネガウイルス)の転写エラー産物であるリードスルーRNAを検知して自然免疫応答を発動していることを見出した。さらに、モノネガウイルスの一種であるRSウイルスに焦点を当て、リードスルーRNAの産生量を様々なヒト培養細胞株を用いて比較したところ、肺胞基底上皮腺癌細胞であるA549細胞においてより多く産生されることがわかった。また、この細胞では抗ウイルス性サイトカインであるインターフェロン(IFN)、特にIII型IFNに分類されるIFN- $\gamma$ が強く発現誘導されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RIG-IはモノネガウイルスのウイルスRNAを検知して自然免疫応答を発動するが、実際の感染においてRIG-Iが標的とするRNA種については不透明なままであった。本研究では、RSウイルスのリードスルーRNAをRIG-Iが検知して自然免疫応答を引き起こすということ、また免疫応答の結果としてIII型IFNが強く発現誘導されるという知見を得た。リードスルーRNAの詳細な産生メカニズム、またRIG-Iを介したIII型IFNの選択的な誘導メカニズムをさらに究明することが、RSVなどの臨床重要ウイルスが含まれるモノネガウイルス感染を制御する上で極めて重要であるという可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we discovered that intracellular viral sensor molecule RIG-I elicits an innate immune response by detecting a read-through RNA, which is a transcription error product of Mononegaviruses (negative-sense single-stranded RNA viruses). We focused on RSV, which is a type of Mononegavirus, to measure and compare the amount of read-through RNA production in various human cell lines. We found that A549 cells (alveolar basal epithelial adenocarcinoma cells) potentially produce read-through RNA. In addition, we demonstrated that antiviral cytokine interferons (IFNs), particularly IFN- $\gamma$  (type III IFN) are significantly induced in the cells by RSV infection.

研究分野：ウイルス免疫学

キーワード：モノネガウイルス RSウイルス リードスルーRNA 自然免疫 RIG-I インターフェロン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) モノネガウイルス目には、狂犬病ウイルスや麻疹ウイルス、RSウイルス(RSV)、エボラウイルスなど、ヒトに重篤な病原性を示すウイルスが数多く含まれる。モノネガウイルスは非分節型のマイナス極性一本鎖RNAをゲノムに持ち、感染細胞内にてゲノムRNAの転写、翻訳、複製の増殖サイクルを経て感染を拡大するが、一方でモノネガウイルスへの宿主免疫応答には細胞内ウイルスセンサー分子であるRIG-Iが強く関与する。RIG-Iは、感染細胞内にてウイルスRNAを検知し、迅速な自然免疫応答を惹起する。ウイルスRNAに結合したRIG-Iはさらに下流のシグナル分子を活性化し、抗ウイルス性サイトカインであるインターフェロン(IFN)の産生を誘導する。
- (2) これまでの *in vitro* 実験系による研究から、RIG-Iは5'三リン酸(非キャップ)構造と部分的な二本鎖構造を有するRNAをリガンドとして認識することが示された。実際のウイルス感染でも、RIG-Iがこのような構造を持つウイルスのゲノムRNA、あるいはその複製中に生じるRNA中間体を認識して活性化されるものと考えられて来た。しかしながら、我々の先行研究によって、モノネガウイルスであるニューカッスル病ウイルス、RSV、水疱性口炎ウイルスの転写過程でエラー産物として作られるリードスルーRNAがRIG-Iを活性化してIFN産生を誘導することが明らかになった(Oh *et al.*, 2016)。
- (3) リードスルーRNAはウイルスのゲノムRNA上の3'末端リーダー配列(Le)とそれに続く一番目の遺伝子にまたがる融合転写産物で、Leの転写終結エラーによって生じるものである。LeリードスルーRNA(Le-RT RNA)はLe由来の5'三リン酸構造、続く遺伝子由来の3'ポリアデニル化構造を持ち、さらに内部で部分的な二本鎖構造を取ってRIG-Iを活性化する。Le-RT RNAがストレス顆粒(SGs)という細胞質内の構造物に堆積してRIG-Iと共局在すること、また感染細胞内ではウイルスのゲノムRNAや複製中間体などのRNA種を凌駕するほどのウイルス転写産物が産生されることを考慮して、Le-RT RNAがRIG-Iの主たるRNAリガンドとなっている可能性を着想し、その生理的機能のさらなる解析に至った。

### 2. 研究の目的

- (1) 本研究では、特に临床上重要な麻疹ウイルスとRSVに焦点を当て、Le-RT RNAのウイルス増殖と宿主免疫応答における生理的な機能を明らかにすることを目的とする。
- (2) Le-RT RNAを利用した新たな核酸アジュバントの開発など、臨床応用への可能性を探索する。

### 3. 研究の方法

- (1) Le-RT RNAの産生動態と、ウイルス増殖、宿主免疫応答との動的関連性を調べるため、通常のRT-qPCR法によりウイルス遺伝子とIFN遺伝子の発現動態を解析した。
- (2) ウイルス感染細胞におけるLe-RT RNAの継時的な産生動態を把握し、さらに産生量を定量するため、ストランド特異的なノザンプロット法およびRT-qPCR法を用いた解析を行った。また、3'ポリアデニル化されたLe-RT RNAをトータルRNAから分離するために、オリゴd(T)セルロースビーズを用いた分画法によりポリ(A)陽性RNA画分を得た。

#### 4. 研究成果

- (1) RSV 感染に適した細胞を採択するため、三種類のヒト培養細胞(肺胞基底上皮腺癌由来 A549 細胞、喉頭癌由来 HEp-2 細胞、子宮頸癌由来 HeLa 細胞)について RSV への感受性を調べた。各細胞を MOI=0.01、0.1、1、10 の四段階の多重感染度にて感染させ、感染後 72 時間まで 12 時間ごとに RSV-N 遺伝子(ウイルス増殖の指標)と IFN- $\gamma$  遺伝子(宿主免疫応答の指標)の発現量を解析したところ、A549 細胞が両遺伝子をとりわけ高発現していた。MOI=1 時、RSV-N 遺伝子と IFN- $\gamma$  遺伝子の発現のピークはともに感染後 48 時間であった。以上より、ウイルス感染と宿主免疫応答の両側面から、A549 細胞が RSV 高感受性の細胞であることがわかった。
- (2) ウイルス感染時には、I 型 IFN である IFN- $\alpha$  遺伝子とともに III 型 IFN である IFN- $\gamma$  が同様の転写制御を受けて発現誘導される。上記三種類の細胞株において RSV 感染時の IFN- $\alpha$  遺伝子群(IFN- $\alpha$  1、2、3)の発現動態を同様に調べたところ、A549 細胞において IFN- $\alpha$  遺伝子よりもはるかに強い発現が認められた。いずれの IFN- $\alpha$  遺伝子の発現のピークも IFN- $\alpha$  遺伝子よりもやや遅れた感染後 60 時間であり、なかでも IFN- $\alpha$  3 の発現量が顕著に高かった。IFN- $\alpha$  遺伝子は HEp-2 細胞や HeLa 細胞においてもわずかながら発現が認められたが、IFN- $\alpha$  遺伝子群はこれらの細胞ではまったく発現誘導されなかった。以上より、RSV に高感受性を示す細胞において、III 型 IFN が抗ウイルス免疫応答において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。
- (3) A549 細胞では、IFN- $\alpha$  遺伝子と IFN- $\gamma$  遺伝子の発現はそれぞれ感染後 48 時間と 60 時間にピークを迎え、それ以降は収束に向かうが、興味深いことに RSV-N 遺伝子は IFN 遺伝子の発現収束に反して一度下がった発現量が感染後 60 時間以降に再び向上することがわかった。本研究の実施期間中にはアプローチすることができなかったが、RSV が宿主免疫応答を回避するメカニズム等、今後のさらなる解析が望まれる。
- (4) スtrand特異的なノザンプロット法および RT-qPCR 法を用いた解析により、RSV を感染させた A549 細胞のポリ(A)陽性 RNA 画分中に Le-RT RNA を検出した。Le-RT RNA の継時的な産生動態を把握するため、上記と同様の感染条件で各strand特異的検出法にて解析を行う用意であったが、検出に用いるポリ(A)陽性 RNA 画分を得るために相当量のトータル RNA を要することなどが障害となり、本研究の実施期間中に解析を完了することが叶わなかった。RNA 分画法の効率化に加え、検出法の高感度化についてもさらに検討して改善する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----