

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：12401
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K15178
研究課題名(和文) マイクロRNAによる遺伝子発現ネットワークの制御を介したヒトの生体防御機構の解明

研究課題名(英文) Antiviral gene expression network regulated by endogenous microRNAs in human cells

研究代表者
高橋 朋子 (Takahashi, Tomoko)

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：00738792
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)：ウイルスが生体に感染すると、細胞外ではToll like receptors (TLRs)、細胞内ではRIG-I like receptors (RLRs)といったウイルスセンサータンパク質がウイルス特有の構成成分を認識し、I型インターフェロン(IFN)を誘導して細胞を防御する。我々はセンダイウイルス感染時にIFNにより誘導されたLGP2が、RNAサイレンシングの促進因子であるTRBPに結合し、その機能(miRNA成熟化の促進)を抑制することで特定のmicroRNAのRNAサイレンシングを阻害することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究成果は、細胞内ウイルスセンサータンパク質が転写因子を活性化することで遺伝子発現を制御するだけでなく、microRNAを介したゲノムワイドな転写後遺伝子発現制御にも直接的に関与することを示す研究成果であり、ウイルス感染細胞におけるmicroRNAによる転写後遺伝子発現制御の重要性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：During viral infection, viral nucleic acids are detected by virus sensor proteins including toll-like receptor 3 or RIG-I-like receptors (RLRs) in mammalian cells. Activation of these virus sensor proteins induces type-I interferon production and represses viral replication. We reported that an RLR family member, LGP2, modulates RNA silencing by interacting with an RNA silencing enhancer, TRBP and LGP2 enhances apoptosis by upregulating apoptosis regulatory genes during viral infection via the interaction. Our findings may shed light on the mechanism of apoptosis, induced by the TRBP-bound miRNAs through the interaction of TRBP with LGP2, as an antiviral defense system in mammalian cells.

研究分野：生物情報科学，免疫学，分子生物学

キーワード：自然免疫 microRNA RNAサイレンシング ウイルスセンサー LGP2 TRBP small RNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

I 型インターフェロン (IFN) の誘導を伴った抗ウイルス応答は、哺乳類において保存された機構であり、その分子メカニズムの研究は我々ヒトの生体防御という観点から重要な意味をもつため、ウイルス感染による免疫応答分子の詳細な作用機序に対する研究が進められてきた。しかしながら、細胞内ウイルスセンサータンパク質の 1 つとされる LGP2 はこれまでその機能が明確ではなかった。その理由としては、細胞内ウイルスセンサータンパク質である RLRs のうち、RIG-I と MDA5 はそれぞれ異なる特徴をもつウイルス性 RNA を認識し、CARD と呼ばれるドメインを介して下流にシグナルを伝達することで IFN を誘導するが、LGP2 は CARD を持たないためシグナル伝達能を持たないことがあげられる。一方、細胞内には RNA サイレンシングと呼ばれる遺伝子発現抑制機構があり、microRNA という内在性の小分子二本鎖 RNA とタンパク質との相互作用により、広く多様な遺伝子機能を制御している。RLRs による抗ウイルス応答も RNA サイレンシングもともに細胞質において二本鎖 RNA により誘導される機構であるにも関わらず、それぞれ独立した経路であると考えられてきた。それは、両経路をつなぐメカニズムが未同定であったからである。申請者はこれまでの研究の過程で、LGP2 と RNA サイレンシングの促進因子である TRBP が相互作用することを見出した。さらに、いくつかのウイルスの中で、特にセンドイウイルス (SeV) 感染細胞において IFN により LGP2 が非常に強く発現誘導されること、また発現誘導された LGP2 は TRBP と相互作用し、おそらく特定の microRNA の機能を阻害することで、アポトーシス関連遺伝子群を発現上昇させることを見出した。

2. 研究の目的

細胞内ウイルスセンサータンパク質の 1 つである LGP2 が、microRNA による遺伝子発現ネットワークを制御し、アポトーシス関連遺伝子群を発現上昇させることで生体を防御する、ヒトの抗ウイルス生体防御の分子メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

申請者らはこれまでの研究の過程で、ゲノム編集ツールである CRISPR/Cas9 システムにより、LGP2^{-/-}細胞と TRBP^{-/-}細胞を樹立した。それらを用いて、SeV が感染すると LGP2 が発現誘導され TRBP と相互作用し、RNA サイレンシング活性を制御することで、アポトーシス関連遺伝子群が発現上昇することを、①ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして用いた RNA サイレンシング活性の測定実験や、②ヒト培養細胞を用いた免疫沈降実験によるタンパク質間相互作用解析、③ウイルス感染細胞から抽出した RNA のマイクロアレイ解析により明らかにした。ウイルス感染細胞におけるアポトーシス関連遺伝子群の発現上昇が実際に細胞の生死に与える影響を、LGP2^{-/-}細胞と TRBP^{-/-}細胞におけるウイルス感染による細胞死またはウイルス増殖量を定量的に解析した。

また、申請者らは TRBP と相互作用する microRNA を RNA シークエンスにより解析することで、TRBP は特定の microRNA と相互作用する可能性を見出していた。そこで、TRBP と相互作用する microRNA は SeV 感染時には TRBP から遊離しているのか、また、それによって microRNA の成熟過程や機能にどのような影響があるかを解析した。microRNA 前

駆体から成熟型へのプロセッシングはノザンブロットにより検出した。さらに、TRBP と相互作用している成熟型の microRNA については、それらがアポトーシス関連遺伝子群の発現を制御しているかを、まずバイオインフォマティクスを用いた標的予測により解析した。microRNA の標的予測は既存のウェブツールにより可能であるが、microRNA による標的 mRNA の認識には複数の要素があり、ウェブツールは必ずしも正確ではないため、各種の microRNA 阻害剤を用いた実験的手法により解析結果の検証を行った。また、microRNA の発現量変化と標的遺伝子の発現量変化は時間がずれる可能性があるため、ウイルス感染後の時間の組み合わせを検討し、実験的手法により検証した。

4. 研究成果

SeV 感染時に LGP2 が、抗ウイルス性サイトカインである IFN により強く発現誘導された結果、RNA サイレンシングの促進因子である TAR-RNA binding protein (TRBP) という二本鎖 RNA 結合タンパク質に結合し、その機能 (miRNA 成熟化の促進) を抑制することを見出した。これにより、TRBP が結合する特定の microRNA の成熟化が阻害され、その microRNA 量が減少した。この研究成果は、細胞内ウイルスセンサータンパク質が転写因子を活性化することで遺伝子発現を制御するだけでなく、microRNA を介したゲノムワイドな転写後遺伝子発現制御にも直接的に関与することを示す研究成果であり、ウイルス感染細胞における microRNA による転写後遺伝子発現制御の重要性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takahashi T, Ui-Tei K	4. 巻 21
2. 論文標題 Mutual Regulation of RNA Silencing and the IFN Response as an Antiviral Defense System in Mammalian Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1348 ~ 1348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3390/ijms21041348	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Komori C, Takahashi T, Nakano Y, Ui-Tei K	4. 巻 9
2. 論文標題 TRBP-Dicer interaction may enhance HIV-1 TAR RNA translation via TAR RNA processing, repressing host-cell apoptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.050435	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Yoneyama Mit, Ui-Tei K	4. 巻 48
2. 論文標題 LGP2 virus sensor enhances apoptosis by upregulating apoptosis regulatory genes through TRBP-bound miRNAs during viral infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 1494 ~ 1507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz1143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Murakami F, Komori C, Suzuki Y, Yoneyama M, Ui-Tei K	4. 巻 46
2. 論文標題 LGP2 virus sensor regulates gene expression network mediated by TRBP-bound microRNAs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 9134-9147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gky575	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Yoneyama M, Ui-Tei K	4. 巻 9
2. 論文標題 Virus sensor RIG-I represses RNA interference by interacting with TRBP through LGP2 in mammalian cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes9100511	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi T, Nakano Y, Ui-Tei K	4. 巻 -
2. 論文標題 Current Status for Application of RNA Interference Technology as Nucleic Acid Drug	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 InTechOpen "Gene Expression and Regulation in Mammalian Cells"	6. 最初と最後の頁 149-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5772/intechopen.71965	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 高橋朋子、中野悠子、米山光俊、尾野本浩司、程久美子
2. 発表標題 The RIG-I like receptor LGP2 enhances apoptosis mediated by TRBP-bound miRNAs during viral infection
3. 学会等名 第8回感染症研究グローバルネットワークフォーラム(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋朋子、米山光俊、程久美子
2. 発表標題 LGP2 enhances apoptosis mediated by TRBP-bound miRNAs during Sendai virus infection
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋朋子
2. 発表標題 細胞内ウイルスセンサーLGP2はmicroRNAを介して遺伝子発現ネットワークを制御する
3. 学会等名 第13回ゲノム微生物学会若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋朋子
2. 発表標題 小分子ノンコーディングRNAが制御する抗ウイルス生体防御
3. 学会等名 核酸代謝鶴岡カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋朋子、中野悠子、尾野本浩司、米山光俊、程久美子
2. 発表標題 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ウイルス感染細胞の細胞死を制御する
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋朋子
2. 発表標題 マイクロRNAが制御するヒトのウイルスに対する生体防御
3. 学会等名 慶應義塾大学先端生命科学研究所公開セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋朋子
2. 発表標題 小さなRNAが制御するヒトのウイルスに対する生体防御機構
3. 学会等名 埼玉大学理学部分子生物学科セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋朋子、中野悠子、尾野本浩司、米山光俊、程久美子
2. 発表標題 ウイルス感染により細胞内ウイルスセンサーは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
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会 WS 「抗ウイルス応答とRNAサイレンシング」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋朋子、中野悠子、尾野本浩司、米山光俊、程久美子
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoko Takahashi, Yuko Nakano, Koji Onomoto, Chiaki Komori, Mitsutoshi Yoneyama, Kumiko Ui-Tei
2. 発表標題 LGP2 regulates microRNA-mediated gene expression network by interacting with an RNA silencing enhancer, TRBP
3. 学会等名 EMBO EMBL Symposia, Innate Immunity in Host-Pathogen Interactions (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuko Nakano, Tomoko Takahashi, Koji Onomoto, Mitsutoshi Yoneyama, Kumiko Ui-Tei
2. 発表標題 LGP2, a virus sensor, interacts with TRBP and regulates gene expression via TRBP-bound miRNAs
3. 学会等名 The 7th Global Network Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾野本浩司、高橋朋子、中野悠子、程久美子、米山 光俊
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小森千晶、高橋朋子、中野悠子、程久美子
2. 発表標題 HIV-1感染細胞のアポトーシスを抑制するの生合成とTAR RNAの翻訳はTRBP-Dicerの相互作用によって促進される
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱田真平、高橋朋子、程久美子
2. 発表標題 MicroRNA結合タンパク質TRBPとLIN28の相互作用によるRNAサイレンシング制御機構の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾野本浩司、高橋朋子、中野悠子、程久美子、米山光俊
2. 発表標題 avSGを介した抗ウイルス自然免疫の機能解析
3. 学会等名 第83回日本インターフェロン・サイトカイン学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学大学院理学系研究科プレスリリース（2018） https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2018/5946/ 東京大学大学院理学系研究科 YouTubeチャンネル 研究室の扉 https://www.youtube.com/watch?v=NGStdTzMCVg 東京大学大学院理学系研究科プレスリリース（2019） https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2019/6641/</p>

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