

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07589

研究課題名(和文) 抗ウイルス性ストレス顆粒形成による自然免疫応答シグナル制御機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of avSG-mediated antiviral innate immune signaling.

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画では、細胞質内ウイルスRNAセンサーであるRLRを介した抗ウイルス自然免疫応答におけるantiviral stress granule (avSG)の生理的機能を解析し、その分子メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、3つの新規分子がRLRシグナルまたはSG形成を介した抗ウイルス自然免疫応答を制御しているのが明らかとなった。さらにそのうちの1つの標的分子のKOマウスを作製し、生体内における生理機能を解析した。また、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)を用いてIFN産生とavSG形成との関連性についての解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、細胞内凝集体であるStress Granule (SG)が細胞の恒常性の維持やアルツハイマー病などの神経変性疾患にも関与していることが明らかになり、その形成制御機構が注目を集めている。本研究によりウイルスRNAにより形成されるSGを介した抗ウイルス免疫応答の制御機構がin vitro及びin vivoの双方から解明できれば、これまで内在性のRNAの機能制御に関与していると考えられていたSGが抗ウイルス自然免疫とクロストークしているという新たな抗ウイルス免疫制御機構を提示することができ、将来的なSGを標的とした抗ウイルス薬の開発につながる可能性もあり、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 tried to understand the function of antiviral stress granule (avSG) in RLR-mediated innate immune response. avSGs are membrane-less cytoplasmic aggregates that serve as a platform for foreign viral RNAs by RLRs. However, the molecular function of avSG formations remains unclear in antiviral innate immunity. To elucidate the role of avSG, we identified several novel molecules that regulated avSG formations and RLR-mediated IFN signals using both in vivo and in vitro approaches. Moreover, we also investigated the role of avSG formations in SARS-CoV-2 infected cells.

研究分野：抗ウイルス自然免疫

キーワード：ウイルス感染 ストレス顆粒 自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

これまで抗ウイルス自然免疫応答は非特異的な免疫応答であると考えられてきた。しかし、ウイルス由来の核酸 (DNA/RNA) を感知する細胞内外に発現している様々な感染センサーが同定されたことで、自己と非自己由来の分子を特異的に認識することで発動し、I 及び III 型 Interferon (IFN) を中心としたサイトカインの産生を誘導する厳密に制御された免疫機構であることが明らかとなった。我々の研究室では、細胞質内ウイルス RNA センサーである RIG-I, MDA5, LGP2 の 3 つの分子からなる RIG-I-like receptor (RLR) を同定し、その生理的機能とシグナル伝達機構を明らかにしてきた。一方で、RLR が細胞質内のどこでウイルス RNA を感知しているかについては明らかとなっていなかった。そこで申請者は、RLR がウイルス RNA を感知する『場』に主眼をおき、RLR の細胞質内局在の解析を行い、ストレス適応機構の 1 つである Stress Granule (SG) と呼ばれる mRNA, RNA 結合タンパク質などからなる細胞内凝集体が RLR のウイルス RNA 検知とそれに伴い誘導される IFN を中心とした抗ウイルス自然免疫誘導に重要であることを明らかにし、これを antiviral SG (avSG) と命名した。複数のウイルスタンパク質が avSG 形成を阻害することで RLR を介した抗ウイルス免疫応答から逃れていることも明らかにした。これらの知見は、これまで同じ生体防御反応の 1 つでありながら、それぞれ独立した経路であると考えられてきた内在性の mRNA の翻訳制御に関与している SG と RLR を介した抗ウイルス自然免疫応答が密接にクロストークし、RLR シグナルが時空間レベルで制御されていることを示唆している。さらに近年、SG 形成異常がアルツハイマー病などの神経変性疾患や癌などに関与していることが報告され、SG の翻訳抑制以外の生理機能が注目され始めている。一方で、SG はストレス環境下で一過的に形成される膜を持たない動的且つ可逆的な凝集体であり、その形成メカニズムや詳しい構成因子などについて未だ不明な点が多く残されている。また、RLR の細胞内局在変化に伴うシグナル活性化の制御機構についての研究報告は我々以外には殆どなく、個々のウイルス感染時における avSG 形成の重要性及びその生理機能についてはよく分かっていない。

## 2. 研究の目的

これまでの研究により RLR 及び RLR シグナルを制御する複数の分子が avSG に局在することが報告されたことから、avSG が RLR によるウイルス RNA 認識及び下流のアダプター分子との結合に重要なプラットフォームとして機能していることが明らかとなった。しかし、RLR による非自己 RNA 認識とストレス応答機構の 1 つである SG がどのように分子レベルで相互作用し、SG という細胞内凝集体内で制御されているのかについての詳細はほとんど明らかとなっていない。そこで本研究では『avSG の形成制御及びその構成因子が抗ウイルス免疫応答の普遍的な分子メカニズムに関与しているのか?』を核心的な問いとして設定し研究を行う。特に本研究計画期間では、生化学・分子生物学・細胞生物学的に avSG を解析し、抗ウイルス自然免疫に関わる新規分子を同定し、その詳しい生理機能を *in vitro* 及び *in vivo* の実験系を用いて明らかにすることで、抗ウイルス免疫応答の空間的制御メカニズムの解明と新規抗ウイルス治療薬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

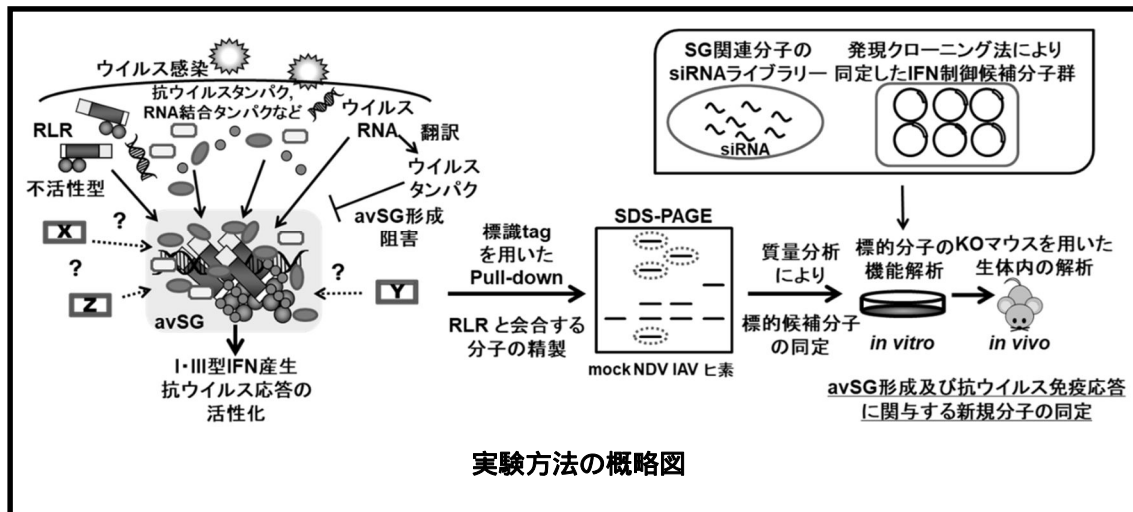
### (1) avSG 形成及び抗ウイルス自然免疫応答に関わる分子の同定

インフルエンザウイルス (IAV) やニューカッスル病ウイルス (NDV) などのウイルス感染時に RLR と特異的に結合する分子を精製し、質量分析により網羅的に解析した。また既知の SG 関連分子を標的にした siRNA ライブラリー及び発現クローニング法を用いて新規制御分子のスクリーニングを並行して行った。

### (2) 同定した新規制御分子の機能解析

同定した標的候補分子群の中から、avSG 形成または RLR シグナルへの関与が強く疑われた 3 つの分子 (分子 , 分子 , 分子 ) に着目し、それぞれの発現ベクターを用いた過剰発現または siRNA による発現抑制を行った際のウイルス感染時の avSG 形成への影響を超解像顕微鏡による蛍光免疫染色を用いて、IFN シグナルへの影響をレポーターアッセイ、Real Time PCR、Western Blotting などにより解析した。また、それらの分子メカニズムを解明するために RLR シグナルとのタンパク質間の相互作用を免疫沈降法による解析を行った。さらに CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウト (KO) 細胞株を樹立し、その機能を上記と同様な方法で解析した。さらに、分子 においては生体内における生理機能を解析するために CRISPR/Cas9 システムを用いて KO マウスを作製し、ウイルス感染時の IFN 及び炎症性サイトカインの産生量及び生存率などの解析を行った。

(3) 新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)感染時の avSG 形成及び抗ウイルス応答の解析  
 国立感染症研究所から分与された SARS-CoV-2 (JPN/TY/WK-521 株)を用いて、感染細胞における IFN 産生、avSG 形成及び培養上清中のウイルス量を Real Time PCR、蛍光免疫染色、TCID50 などを用いて解析した。また SARS-CoV-2 のウイルスタンパク質の発現ベクターを作成し、細胞に強制発現させた際の機能解析を行った。



#### 4. 研究成果

##### (1) 同定した新規制御分子の機能解析

研究方法(1)により同定した標的候補分子群の中から、これまでに RLR を介した抗ウイルス応答への関与が明らかになっておらず且つ IFN 産生への関与が強く疑われた分子、分子 1、分子 2 に着目し、それらの機能解析を行った。

まず、これらの分子の発現を発現ベクターによる過剰発現または siRNA 及び CRISPR/Cas9 システムにより発現抑制した細胞株を用いて、これら分子の細胞内局在及び avSG 形成への関与について蛍光免疫染色法により解析した。その結果、分子 1 と 分子 2 はウイルス感染時に avSG に局在していたが、KO 細胞でも avSG が形成されたことから avSG 形成に必須な分子ではなく、受動的に avSG 内に取り込まれている分子であることが示唆された。一方で、興味深いことに 分子 1 を過剰発現させた細胞では顕著に avSG 形成が阻害されていたことから avSG 形成の抑制因子であることが明らかとなった。次に、RLR を介した IFN シグナルへの影響を同様に解析した結果、分子 1 と 分子 2 は抗ウイルス自然免疫応答を正に、分子 3 は負に制御する分子であることが明らかとなった。

そこで、これら分子の制御機構を明らかにするために RLR シグナル分子との結合について免疫沈降法により解析した。その結果、分子 1 と 分子 2 は RLR と、分子 3 は RLR の下流のシグナル伝達分子の 1 つとそれぞれ特異的に結合していることが明らかとなった。さらに 分子 1 は RNA 結合タンパク質であることからウイルス RNA との結合を RNA 免疫沈降法により解析した結果、ウイルス RNA と直接結合していた。さらに RNA 結合ドメインの欠損変異体を用いた解析からウイルス RNA との結合が IFN シグナルへの増強及び avSG への局在に重要であることが明らかとなった。そのため 分子 1 は avSG 内でウイルス RNA と結合し avSG 内で RLR と協調的に機能している可能性が示唆された。また 分子 2 はウイルス感染時に標的分子との結合が増強したことから、このタンパク質同士による複合体形成が IFN シグナルの増強に重要であることが示唆された。一方、分子 3 は avSG 形成の制御因子の 1 つとも特異的に結合し、その分子の活性化を抑制していることで avSG 形成を阻害していることが明らかとなった。現在、これらの分子の生理機能を詳細に解析するために、それぞれのドメイン欠損変異体など作製し avSG 形成及び IFN シグナルへの影響についての研究を進めている。

さらに、分子 1 については生体内における機能を解析するために CRISPR/Cas9 システムを用いて KO マウスを作製した。KO マウスはメンデルの法則に従って生まれ、胎生致死などの顕著な表現系を示さなかった。そこで次にこれら KO マウスを用いてウイルス感染時における抗ウイルス応答への影響について解析した。その結果、IAV 感染時に KO マウスでは野生型(WT)のマウスと比較し、生存率、体重変化が優位に減少し、肺における IFN 及び炎症サイトカインの産生量が著しく減少していた。一方で、肺におけるウイルス量は WT に比較して増加していた。さらに KO マウス由来の腹腔マクロファージにおいても WT と比較して、複数のウイルス感染時の IFN 及び炎症性サイトカインの産生が減少した。以上の結果から 分子 1 は *in vivo* においても RLR を介した抗ウイルス応答を正に制御する分子であることが示唆された。現在、IAV 感染マウスから摘出した肺の病理学的解析及び IAV 以外の RNA ウイルス感染時の生理機能の解析を進めている。

## (2) SARS-CoV-2 感染時の avSG 形成及び抗ウイルス応答の解析

まず、SARS-CoV-2 の培養細胞を用いた *in vitro* での実験系を構築するため、SARS-CoV-2 の受容体である ACE-2 を恒常的に発現する細胞株を複数の細胞株で樹立し、avSG 形成及び抗ウイルス応答についての解析を行った。その結果、SARS-CoV-2 感染細胞では avSG が形成されず IFN の発現量も他の RNA ウイルス感染細胞に比べて殆ど増加していなかった。そこで次に、SARS-CoV-2 のウイルスタンパク質の発現ベクターを構築し、細胞に強制発現させた際の avSG 形成及び IFN シグナルの阻害効果を検討した。その結果、一部のウイルスタンパク質が avSG 形成を阻害し、RLR を介した IFN 産生を強く抑制していることを示唆する知見を得た。さらに、本実験計画で同定した分子 の SARS-CoV-2 感染時の機能についても過剰発現及び KO 細胞を用いて検討を加えた。今後は avSG 形成阻害の詳細な分子メカニズムについて解析を進め、将来的な創薬ターゲットに繋がる知見を得ることを目指していく予定である。

## 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 2件）

1. 著者名 尾野本浩司, 米山光俊, 浅倉聡, 松本伸一, 海宝龍夫	4. 巻 50
2. 論文標題 ヨウ素の新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 不活化作用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本防菌防黴学会誌	6. 最初と最後の頁 97-103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Yushi, Suzuki Hidenori, Nakajima Wataru, Uehara Ikuno, Tanimura Atsuko, Himeda Toshiki, Koike Satoshi, Katsuno Tatsuya, Kitajiri Shin-ichiro, Koyanagi Naoto, Kawaguchi Yasushi, Onomoto Koji, Kato Hiroki, Yoneyama Mitsutoshi, Fujita Takashi, Tanaka Nobuyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Virus-infection in cochlear supporting cells induces audiosensory receptor hair cell death by TRAIL-induced necroptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0260443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0260443	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 Onomoto Koji, Onoguchi Kazuhide, Yoneyama Mitsutoshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Regulation of RIG-I-like receptor-mediated signaling: interaction between host and viral factors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular & Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 539 ~ 555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41423-020-00602-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Yushi, Suzuki Hidenori, Nakajima Wataru, Uehara Ikuno, Tanimura Atsuko, Himeda Toshiki, Koike Satoshi, Katsuno Tatsuya, Kitajiri Shin-ichiro, Koyanagi Naoto, Kawaguchi Yasushi, Onomoto Koji, Kato Hiroki, Yoneyama Mitsutoshi, Fujita Takashi, Tanaka Nobuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Cochlear supporting cells function as macrophage-like cells and protect audiosensory receptor hair cells from pathogens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63654-9	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 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 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahasi K, Onomoto K, Horiuchi M, Kato H, Fujita T, Yoneyama M.	4. 巻 517
2. 論文標題 Identification of a new autoinhibitory domain of interferon-beta promoter stimulator-1 (IPS-1) for the tight regulation of oligomerization-driven signal activation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 662-669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.07.099.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Koji Onomoto, Miyu Watanabe, Tomoko Takahashi, Yuko Nakanao, Kumiko Ui-Tei, Mitsutoshi Yoneyama
2. 発表標題 Functional analysis of TRBP in RLR mediated antiviral innate immune signal
3. 学会等名 The 8th Global Network Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoko Takahashi, Yuko Nakanao, Mitsutoshi Yoneyama, Koji Onomoto, Kumiko Ui-Tei
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 The 8th Global Network Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2020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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学真菌医学研究センター感染免疫分野 <a href="http://www.pf.chiba-u.ac.jp/project_immunerresponses/">http://www.pf.chiba-u.ac.jp/project_immunerresponses/</a> 千葉大真菌医学研究センター <a href="http://www.pf.chiba-u.ac.jp/research/project/yoneyama.html">http://www.pf.chiba-u.ac.jp/research/project/yoneyama.html</a> 千葉大学真菌医学研究センター感染免疫分野 <a href="http://www.pf.chiba-u.ac.jp/project_immunerresponses/publication.html">http://www.pf.chiba-u.ac.jp/project_immunerresponses/publication.html</a>
--

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------