

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07536

研究課題名（和文）二重鎖RNAストレスからの回復における二重鎖RNA処理機構の解明

研究課題名（英文）Processing of double-stranded RNA during recovery of the cell from the double-stranded RNA stress

研究代表者

竹内 健司（Takeuchi, Kenji）

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：40236419

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：二重鎖RNA（dsRNA）がウイルス感染細胞内で検出されると抗ウイルス応答が起こり、最終的に、感染細胞は死ぬか或いはウイルス排除に成功して生残するだろう。生残する場合、ウイルス由来のdsRNAは感染細胞内からなくなっていると思われるが、その過程はまだ明らかでない。本研究では、Dicer等6つのRNA切断・修飾酵素がdsRNAの細胞内処理に関わるか検討したが、いずれも関連しないことが判った。また、dsRNAの処理に与る遺伝子を遺伝子ノックアウトライブラリの中から検索・同定すべく、生細胞中のdsRNAを測定する方法の新規開発を目指したが、開発には至らず、関連遺伝子を同定することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で我々が得たのはいずれもネガティブデータだが、それでも細胞内dsRNAの処理機構がどのようなものなのか、ある程度絞り込むことはできたと考えている。DicerなどのdsRNA切断酵素はこの過程に関与せず、dsRNA塩基配列のA-to-I変換も関係しない。また、オートファジーも無関係のように思われる。dsRNAの処理は細胞がdsRNAストレスから回復するのに必須の過程だと思われ、解明すべき問題であることに変わりはない。

研究成果の概要（英文）：Double-stranded RNA (dsRNA) is the first indication of viral infection. Detection of dsRNA triggers antiviral responses in virus-infected cells, and ultimately, the infected cell will either die or survive by successfully clearing the virus. For survival, viral dsRNA must be cleared from infected cells, but this process remains unclear. In this study, we investigated whether six RNA cleavage/modification enzymes, including Dicer, are involved in the processing of intracellular dsRNA, but found that none of them are involved. In addition, we aimed to develop a new method to measure dsRNA in living cells in order to search for and identify genes involved in dsRNA processing in a gene knockout library, but we were unable to develop this method and were unable to identify the relevant genes.

研究分野：ウイルス学

キーワード：二重鎖RNA ウイルス感染 ストレス応答 自然免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

二重鎖 RNA (dsRNA) の存在はウイルス感染を示す第一級所見である (引用文献①)。dsRNA がウイルス感染細胞内で検出されると抗ウイルス応答が起こり、最終的に、感染細胞はアポトーシスを起こすか、或いはウイルスの排除に成功して生残するだろう。生残する場合、ウイルス由来の dsRNA は感染細胞内からなくなっていなくてはならないと思われるが、その過程はまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) 細胞が dsRNA ストレスから回復する過程で dsRNA がどのように処理されるのかを観察し、既知の dsRNA 切断酵素等がこの過程に関わるかどうかを解明する。

(2) 生細胞中の dsRNA を測定する方法を新たに開発し、これを用いて dsRNA の処理に与る遺伝子を遺伝子ノックアウト (KO) ライブラリの中から検索・同定する。

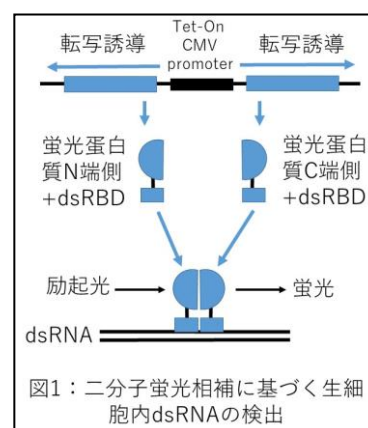
3. 研究の方法

(1) West-northern blot による dsRNA 定量法 (WNB 法) の開発

試験管内で合成した二本の相補的 RNA から dsRNA を調製・精製し、これを培養細胞にトランスフェクトした。そののち、細胞を溶解して細胞内 RNA を回収、アガロースゲルにて電気泳動した。泳動した RNA をナイロンメンブレンにトランスファーしたのち、dsRNA 特異抗体を用いて dsRNA の検出を試みた。

(2) 二分子蛍光相補 (Bi-molecular fluorescence complementation: BiFC) に基づく生細胞内 dsRNA 検出法の開発

BiFC (引用文献②) に基づく生細胞内 dsRNA の検出 (図 1) を行うため、ウイルスタンパク質由来 dsRNA 結合ドメイン (dsRBD) に蛍光タンパク質 Venus の N 端側または C 端側ドメインを結合したキメラ蛋白質を共発現するようなプラスミド DNA を作成した。このとき、プロモーターとしてテトラサイクリン依存性 (Tet-On) かつ二方向性の転写を可能とする CMV プロモーターを選んだ。作成したプラスミド DNA を Tet リプレッサー発現 HEK293 細胞にトランスフェクト、薬剤耐性によりプラスミド DNA がゲノム DNA に組み込まれた細胞を選択した。



4. 研究成果

(1) 既知の dsRNA 切断・修飾酵素が細胞内 dsRNA の処理に及ぼす影響の検討

まず、トランスフェクトしたときに HEK293 細胞を殺さないような dsRNA の上限量を決め、トランスフェクトされた dsRNA の時間経過を開発した WNB 法で追跡した。その結果、トランスフェクトされた dsRNA は、実際、24 時間弱の半減期で細胞内から徐々に消えていくことが判った (図 2、+cont1 siR)。

次に、RNase III に分類されるヒトの dsRNA 切断酵素である Dicer と Drosha、dsRNA 修飾酵素である ADAR1 と ADAR2、および、RNase L と RNase T2 を選び、CRISPR/Cas9 法で遺伝子を KO した HEK293 細胞を樹立するか、あるいは、短鎖干渉 (si) RNA でこれら酵素の発現をノックダウン (KD) することによって、これらの酵素がトランスフェクトされた dsRNA の処理に影響するかどうかを検討した。結果として、これら 6 つの酵素は細胞内 dsRNA の処理に影響しないことが判った。一例として、ADAR1 と ADAR2 を同時に KD した結果を図 2 に示す。また、我々は、dsRNA の細胞内処理に影響しない RNase L を KO した 293T 細胞をもとに他の遺伝子を KO したダブル KO 細胞を数種類樹立したが、いずれの細胞株でも dsRNA の細胞内処理に影響は見られなかった。

dsRNA を基質とするエンドヌクレアーゼはヒトの場合 Dicer と Drosha のみであり、これら 2 つの酵素が細胞内 dsRNA の処理に寄与しないという結果は意外であった。ADAR1 & 2 は dsRNA のアデノシンをイノシンに変換する酵素であるが、この修飾はその後の dsRNA 分解等の前提となっているわけではないことも推測された。RNase L の活性化はオートファジーを誘導することが報告されている (引用文献③) ことから、オートファジーが dsRNA の細胞内処理に関係して

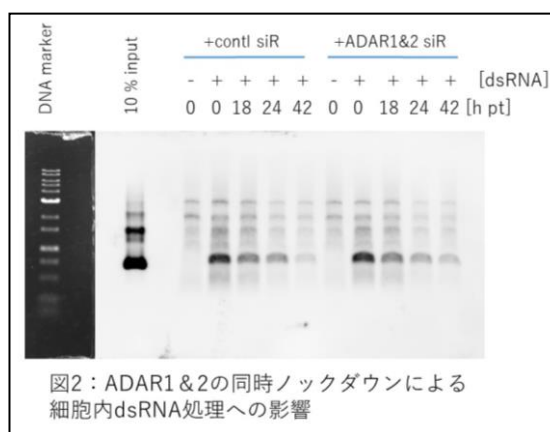


図2: ADAR1 & 2 の同時ノックダウンによる細胞内 dsRNA 処理への影響

いる可能性も低いと思われる。RNase T2 はリソソームで機能する RNA 分解酵素だが、これも dsRNA の細胞内処理には関係していないようである。これら 6 つの酵素以外の遺伝子産物が dsRNA の処理に関わっていると思われ、次に、遺伝子 KO ライブラリの中から関係する遺伝子を検索・同定することを目的として以下の実験を行った。

(2) BiFC に基づく生細胞内 dsRNA 検出法開発の試み

我々の当初の計画では、まず、1) 生細胞中の dsRNA を測定する方法を新規開発し、次に、2) 組換えレンチウイルスを用いた遺伝子 KO ライブラリを作成、3) この KO ライブラリの中から dsRNA の処理が遅延している細胞をセルソーターで濃縮、dsRNA の細胞内処理に与る遺伝子の同定を目指した。以下、その最初のステップ 1) を行った。

図 1 に示したが、BiFC に与る 2 つのタンパク質分子として、1) 蛍光タンパク質 Venus の N 端側ドメインにインフルエンザウイルス NS1 タンパク質の dsRBD またはフロックハウスウイルス B2 タンパク質の dsRBD を結合したキメラタンパク質、および、2) 蛍光タンパク質 Venus の C 端側ドメインに NS1 タンパク質の dsRBD または B2 タンパク質の dsRBD を結合したキメラタンパク質、の両者を共発現させるような cDNA コンストラクトを作成した。NS1 タンパク質や B2 タンパク質の dsRBD は dsRNA 上で二量体を形成することが知られており (引用文献④)、この知見から、dsRNA に依存して会合した Venus タンパク質両末端ドメインから蛍光が発せられることに期待したわけである。

このやり方は、既に、植物細胞ではうまくいくことが報告されており (引用文献⑤)、動物由来培養細胞でも当然うまくいくと思われた。そして、実際、両キメラタンパク質をテトラサイクリン (ドキシサイクリン) 依存性に HEK293 細胞で共発現させてみたところ、残念ながら、dsRNA 依存性の蛍光は観察されなかった。なぜうまくいかなかったのかその理由は不明である。動物細胞の場合、植物細胞とは違って、ウイルスタンパク質由来の dsRBD が dsRNA にアクセスできないような何らかの仕組みがあるのではないだろうか。この仕組みを明らかにできれば、新たな知見が得られるとともに、今回の研究ではうまくいかなかった生細胞内 dsRNA 検出法も開発できるだろう。

<引用文献>

- ① Son KN, et al. Double-stranded RNA is detected by immunofluorescence analysis in RNA and DNA virus infections, including those by negative-stranded RNA viruses. *J Virol.* 2015;89(18):9383-92.
- ② 藤井雄太、児玉豊. 「誤解しない BiFC 法のすゝめ」植物の生長調節. 2016;51(1):48-51.
- ③ Chakrabarti A, et al. RNase L triggers autophagy in response to viral infections. *J Virol.* 2012; 86(20): 11311-21.
- ④ Lingel A, et al. The structure of the flock house virus B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition. *EMBO Rep.* 2005;6:1149-55.
- ⑤ Cheng X, et al. Visualizing double-stranded RNA distribution and dynamics in living cells by dsRNA binding-dependent fluorescence complementation. *Virology.* 2015;485:439-51.

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〕

ゲノム科学・微生物学
<https://www.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/genome/>

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
研究分担者	千原 一泰 (Chihara Kazuyasu) (00314948)	福井大学・学術研究院医学系部門・准教授 (13401)	
研究分担者	定 清直 (Sada Kiyonao) (10273765)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授 (13401)	

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
---------	---------