

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890029

研究課題名（和文） ウイルス感染検知に関与する細胞質内顆粒の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of intracellular granule that recognizes viral infection

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

研究成果の概要（和文）：新型インフルエンザや SARS など多種多様なウイルスが日々出現しており、ウイルス感染症は人々の健康を脅かす重大な疾患である。ウイルス感染センサーである RLR は細胞質内のウイルス RNA を感知し自然免疫応答を発動する。しかし RLR がどうやってウイルス RNA を検知しているのかはよく分かっていない。本研究では、RLR が細胞質内に一過的に顆粒状に集積しウイルス RNA を検知し抗ウイルス応答を誘導していることを明らかにし、これを avSG と命名した。

研究成果の概要（英文）：Emergence of new epidemic viruses such as swine flu and SARS spread rapidly and sometimes causes devastating impact. Innate immune system detects viral infection and protects host with viral sensors. Cytoplasmic viral RNA sensors, RLRs, sense viral RNA and initiate antiviral response, however it has been unclear how RLRs encounter viral RNA in cytoplasm. We revealed that RLRs localized in virus-induced granules together with viral RNA and trigger antiviral signal. We termed these aggregates as antiviral stress granules (avSGs).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：自然免疫、RLR、インターフェロン、ウイルス、RNA

1. 研究開始当初の背景

高等脊椎動物では自然免疫と獲得免疫という 2 種類の免疫機構がそれぞれ協調しながらウイルス感染症に対する防御システムとして働いている。ウイルス感染に対する自然免疫応答は、細胞がウイルス由来の核酸 (DNA/RNA) を感知することによって発動す

る。近年、細胞内外にあるウイルス感染センサーの研究が盛んに行われ、その生理的機能やシグナル伝達機構が明らかにされてきた。我々の研究グループは、2004 年に細胞質内のウイルス RNA センサーとして RNA ヘリカーゼである RLR (RIG-I, MDA5, LGP2) を同定し、その機能及びドメイン構造などを明

らかにしてきた(図 1)。

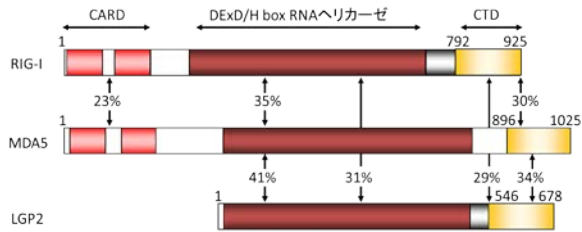


図 1. RLR のドメイン構造

これまでの研究から、RIG-I/MDA5 は RNA および DNA ウイルスの感染によって細胞質内に産生・放出されるウイルス特異的な二重鎖や 5'三リン酸構造を持つ RNA などを C 末端側の CTD を介して結合する。その後 N 末端側の CARD を介してミトコンドリアや小胞体に局在するアダプター分子である IPS-1 と結合し、IFN や炎症性サイトカインを産生することが明らかとなっている。また、それぞれのノックアウトマウスを用いた解析から RIG-I と MDA5 はそれぞれ異なった構造のウイルス RNA を認識することが明らかとなった。LGP2 は、CARD を持っておらず、単独ではシグナルを伝達出来ないと考えられているが、その詳細な機能はよく分かっていない。

一方でウイルスはその種類によって異なる増殖・複製様式を持っており、RLR が細胞質内で複製中のウイルス RNA をどこで感知しているかについてはいまだ不明な点が多く残されている。抗ウイルスタンパク質として知られる PKR や OAS などの分子は宿主のタンパク質や RNA には殆ど影響を与えずウイルスタンパク質の翻訳阻害やウイルス RNA の分解を行っていることが知られている。これは PKR や OAS の活性化が細胞質内のごく限られた場所でのみ起っていることを示唆しており、ウイルスが細胞質内の特定の場所で感知されていることが考えられる。

2. 研究の目的

上記の通り、これまで RLR がどこでウイルス RNA を感知しているかについての研究報告は殆どなく、その重要性も明らかになっていなかった。RLR を特異的に認識する抗体を作製し、RIG-I/MDA5/LGP2 それぞれの細胞質内局在を蛍光顕微鏡や電子顕微鏡を用いて解析した。その結果、ウイルス感染により RLR が細胞質内に顆粒状に集積していることが明らかとなった。そこで本研究計画では、ウイルス感染細胞内での RLR 及びウイルス RNA の局在を明らかにし、顆粒形成のメカニズムとその生理的機能の解明を目的とした。

3. 研究の方法

抗ウイルス自然免疫応答を分子及び時空間的レベルで解析し、その普遍的な分子メカニズムを明らかにするために、以下の方法で実験を行った。またウイルスは RIG-I によって認識される事が既に報告されているインフルエンザウイルス (IAV) (PR8 株) とその変異体 IAV ΔNS1 (NS1 タンパク質欠損株) を主に用いた。

1) 蛍光顕微鏡・電子顕微鏡を用いた顆粒形成の構成成分の解析。

- ① RLR や PKR, OAS などの抗ウイルスタンパク質及びウイルスタンパク質に対する抗体を用いた免疫染色法による局在解析。
- ② FISH 法によるウイルス RNA の局在解析。
- ③ 既存の細胞内顆粒形成マーカータンパク質や細胞小器官マーカーとの局在解析
- ④ 蛍光ラベルしたタンパク質を発現する細胞株を用いたライブイメージによる顆粒形成メカニズムの解析

2) ウイルスタンパク質による顆粒形成の阻害とその機能解析。

3) RLR と共局在が確認された分子に対して、遺伝子発現抑制実験により顆粒形成への関与及び抗ウイルスシグナルへの影響を解析

4. 研究成果

1) RLR を特異的に認識する抗体を用いた免疫染色の結果、通常細胞質に広く分布している RLR が IAVΔNS1 感染させた細胞では顆粒状に集積していた。さらにこの顆粒は IAV の RNA と共局在を示した(図 2)。

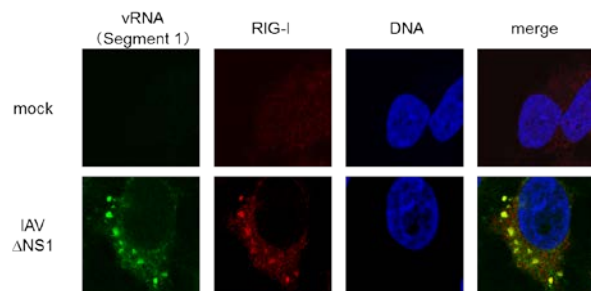


図 2. IAV vRNA と RIG-I の局在解析

また、ミトコンドリア上に発現している RLR のアダプター分子である IPS-1 もウイルス感染に伴い一部のミトコンドリア上に集積し、RIG-I の周囲に集まっていた。さらに PKR や OAS などの抗ウイルスタンパク質もウイ

ルス感染に伴い顆粒状に集積し、RIG-I と共局在を示した。さらに IAV Δ NS1 以外の RNA ウイルスである NDV や HCV 感染によっても RIG-I の顆粒形成が観察された。

次に RIG-I の顆粒を電子顕微鏡で観察した結果、どの細胞小器官とも共局在せずに細胞質内に集積していることが明らかになった。以上から RLR の顆粒が Heat shock や酸化ストレスなどによって誘導される stress granule (SG) と構造が非常に類似していると推測されたため、SG マーカータンパク質に特異的な抗体を用いて RLR との局在を解析した。その結果、IAV Δ NS1 感染で一過的に SG が形成され、RIG-I とウイルスタンパク質(NP)が SG マーカータンパク質(TIAR)と共局在を示した (図 3)。

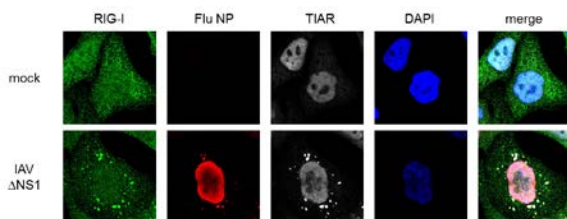


図 3. IAV 感染細胞の局在変化

2) RLR の顆粒は野生型の IAV 感染細胞では形成されず、IAV Δ NS1 の感染細胞でのみ形成されるため、IAV の非構造タンパク質 1 つである NS1 がこの RLR の集積を阻害していることが推測された。そこで、NS1 の機能の解析を行った結果、NS1 の N 末端側にある RNA binding domain が RIG-I の顆粒形成及び IFN 産生を抑制していることが明らかになった。

3) RLR を介した抗ウイルスシグナルと SG 形成について解析を行った。siRNA を用いて SG マーカータンパク質の 1 つである G3BP の発現を抑制し SG 形成を阻害すると、IAV Δ NS1 感染時の RIG-I の顆粒形成も阻害され、同時に IFN の産生が顕著に抑制された。さらに解析の結果 IAV Δ NS1 感染では PKR を介して eIF2 α がリン酸化され SG 及び RLR の顆粒が形成されることが明らかになった。G3BP 同様に siRNA により PKR の発現を抑制した細胞では、IAV Δ NS1 感染による RIG-I の顆粒形成及び IFN 産生が抑制された。これらの結果から、この顆粒状の集積を avSG と命名し、avSG 形成は RLR による、IAV の RNA 認識及び IFN 産生に必須な役割を担っていることが明らかになった (図 4)。

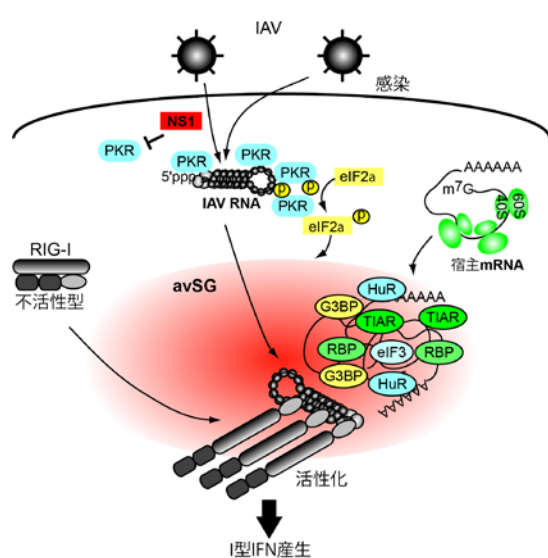


図 4 avSG 形成と抗ウイルス反応のモデル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Takamatsu S, Onoguchi K, Onomoto K, Narita R, Takahashi K, Ishidate F, Fujiwara TK, Yoneyama M, Kato H, Fujita T. Functional Characterization of Domains of IPS-1 Using an Inducible Oligomerization System. PLoS ONE, 8(1), e53578, 2013 (査読 有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0053578.
- ② Xing F, Matsumiya T, Onomoto K, Hayakari R, Imaizumi T, Yoshida H, Yoneyama M, Fujita T, Satoh K. Foreign RNA induces the degradation of mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS): the role of intracellular antiviral factors. PLoS ONE, 7(9), e45136, 2012 (査読 有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0045136.
- ③ Onomoto K, Jogi M, Yoo J, Narita R, Morimoto S, Takemura A, Sambhara S, Kawaguchi A, Osari S, Nagata K, Matsumiya T, Namiki H, Yoneyama M, Fujita T. Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral Detection and Innate Immunity. PLoS ONE, 7(8), e43031, 2012 (査読 有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0043031.
- ④ Marumoto S, Yamamoto SP, Nishimura H, Onomoto K, Yatagai M, Yazaki K, Fujita T, Watanabe T. Identification of germicidal compound against

picornavirus in bamboo pyroligneous acid. Journal of Agricultural and Food chemistry. 60(36), 9106-9111, 2012 (査読 有)
DOI: 10.1021/jf3021317.

- ⑤ Ouda R, **Onomoto K**, Takahashi K, Edwards MR, Kato H, Yoneyama M, Fujita T. Retinoic Acid-inducible Gene I-inducible miR-23b Inhibits Infections by Minor Group Rhinoviruses through Down-regulation of the Very Low Density Lipoprotein Receptor. The Journal of Biological Chemistry, 286(29), 26210-26219, 2011 (査読 有)
DOI: 10.1074/jbc.M111.229856
- ⑥ **Onomoto K**, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, Murakami Y. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. PLoS ONE, 6 (5), e19799, 2011 (査読 有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0019799

[学会発表] (計 6 件)

- ① **Onomoto K**, Yoneyama M. Stress granule-like aggregate plays an important role for detecting of viral RNA by RIG-I-like receptors. The 2nd Meeting on RNA and Biofunctions -ASIA Study “RNA biofunctions and Viruses”, 2013 年 1 月 10 日, 博多
- ② **Onomoto K**, Fujita T, Yoneyama M. Analysis of Intracellular Localization of Viral RNA Sensor, RLR. The 22nd CDB Meeting “RNA Sciences in Cell and Development Biology II”, 2012 年 6 月 12 日, 神戸
- ③ Yoneyama M, **Onomoto K**, Jogi M, Fujita T. Subcellular localization of RIG-I-like receptors in virus-infected cells. 9th Joint Meeting of International Cytokine Society and International Society for Interferon and Cytokine Research, 2011 年 10 月 10 日, Italy
- ④ Jogi M, **Onomoto K**, Fujita T, Yoneyama M. Granular-like accumulation of RIG-I-like receptors in virus-infected cells. XV International Congress of Virology, 2011 年 9 月 15 日, 札幌
- ⑤ Yoneyama M, **Onomoto K**, Jogi M, Fujita T. Detection of viral non-self RNA by RIG-I-like receptors in

cytoplasmic granule-like structure. XV International Congress of Virology, 2011 年 6 月 29 日, 北海道

- ⑥ **Onomoto K**, Yoneyama M, Fujita T. Analysis of intracellular localization of viral RNA sensor. Experimental Biology 2011 (Joint Meeting of AAA, AOS, ASBMB, ASIP, ASN and ASPET), 2011 年 4 月 13 日, USA

[図書] (計 1 件)

- ① **尾野本 浩司**, 米山 光俊
ウイルスセンサーによる RNA 認識とシグナル活性化の分子メカニズム
実験医学増刊号「感染・共生・生体防御システム」 Vol.30, No.20, p3180-3187 (総ページ数 8), 羊土社

[その他]

ホームページ等
千葉大学真菌医学研究センター
<http://myco2.pf.chiba-u.jp/index.html>

千葉大学真菌医学研究センター プロフィールページ
http://myco2.pf.chiba-u.jp/profile/profile_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://myco2.pf.chiba-u.jp/bunya_kansenmeneki/bunya_kansenmeneki/Mol._Immunol._jpn.html

6. 研究組織

(1) 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・
感染免疫分野・助教
研究者番号：10612202

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：