

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670225

研究課題名(和文) RNAウイルスの認識と制御に関わる核内機構の解明

研究課題名(英文) Analysis on RNA virus sensing machinery in the cell nucleus

研究代表者

朝長 啓造 (Keizo, Tomonaga)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：10301920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、インフルエンザウイルスやボルナウイルスなどの細胞核で増殖するRNAウイルスがどのように核内で認識され、細胞の健全免疫応答が引き起こされるかについて解析を行った。その結果、核内でのDNAウイルスセンサーであるIFI16が、RNAウイルスのリボ核酸タンパク質と核内分子であるHMGB1との複合体を認識して、抗ウイルス応答を引き起こすことが明らかとなった。以上の結果より、IFI16は核内におけるRNAウイルスセンサーであることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Viral RNAs are recognized by nucleic acid sensors in the cytoplasm of host cells. However, it is still unclear whether or not the host cells sense RNA virus infection inside the nuclear membrane. Here we demonstrate that host cells harbor the sensing machinery of intranuclear viral ribonucleoproteins (RNPs) leading to antiviral responses. We found that RNPs of intranuclear replicating RNA viruses, Borna disease virus and influenza virus, are recognized by IFI16 in the nucleus. Knockdown of IFI16 enhanced the replication of these viruses in the nucleus. Our data may provide a novel host machinery to recognize intranuclear non-self RNAs in the nucleus.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス 細胞核 RNA 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染に対する自然免疫応答は、宿主細胞に感染したウイルスを細胞内のセンサー分子により認識することで開始される。これまでの研究から、宿主細胞に侵入したウイルス由来核酸を感知するセンサー分子が数多く同定され、その特異性も明らかにされてきた¹⁾。しかしながら、そのほとんどはエンドゾームを含む細胞質に存在する分子であり、核内に存在するウイルス核酸に対しては、機能しないことが示されている。一方で、核内でのウイルス認識に関しては、唯一、DNA ウイルスであるヘルペスウイルスを認識し、免疫応答を誘導する因子が報告されている²⁾。しかしながら、インフルエンザウイルスやポルナウイルスなど、細胞核で増殖するなどの RNA ウイルスがどのように核内で認識され、細胞の防御反応が惹起されるのかについては全く明らかになっていない。

本研究の研究代表者は、細胞核で持続感染するポルナウイルスを中心に研究を行ってきた。これまでに、ポルナウイルスの内在化や核内持続感染機構の解明をはじめ^{3,4)}、ポルナウイルスの核内動態に関して多くの知見を明らかにしてきている。その中において、哺乳類に感染するポルナウイルスであるボルナ病ウイルス (Borna disease virus: BDV) のリボ核酸複合体 (RNP) の主要構成因子であるリン酸化 (P) タンパク質が、核内において宿主のクロマチン結合因子である HMGB1 (High mobility group box protein 1) と相互作用することを発見し報告してきた^{5,6)}。HMGB1 は多機能性タンパク質であり、核内で DNA の構造変換や p53 の転写活性化因子として機能することが知られている。また、細胞外にも放出され、RAGE と呼ばれる細胞外レセプターを介することで、様々な細胞内シグナルを誘導するサイトカイン様の働きも報告されている。さらに最近の研究により、HMGB1 は細胞質においてウイルス核酸をウイルスセンサーに誘導する機能分子であることが示されている⁷⁾。

一方、同じく核内で転写・複製する RNA ウイルスであるインフルエンザウイルスのヌクレオプロテイン (NP) が HMGB1 と結合することが報告されており、HMGB1 との結合がインフルエンザウイルスの複製を促進する結果も得られている⁸⁾。

これらの背景は、HMGB1 が核内において RNA ウイルスの RNP と結合することで、未同定の RNA ウイルスセンサーにシグナルを誘導する役割を果たしている可能性を示している。

研究開始当初、研究代表者は核内において HMGB1 と BDV RNP との複合体に結合するいくつかの候補分子を同定していた。それらの中には、核内でヘルペスウイルスの DNA

を認識すると考えられている interferon γ -inducible protein 16 (IFI16) が存在していた。本研究課題は、HMGB1 と IFI16 を中心分子として、核内における RNA ウイルス認識に関する宿主機構の解析を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞核において RNA ウイルスの増殖を感知するセンサー分子を同定し、その認識メカニズムとウイルス制御機構を明らかにすることにある。

これまでの研究は、細胞質におけるウイルスセンサーの解明が中心であった。一方で、細胞核においては、DNA ウイルスであるヘルペスウイルスを認識する分子が、唯一同定されているだけである。インフルエンザウイルスやポルナウイルスなど、細胞核で増殖する RNA ウイルスがどのように核内で認識され、細胞の防御反応が惹起されるのかを明らかにすることで、RNA ウイルスに対する新しい抗ウイルス戦略の構築に貢献できると考えられた。2 年間の研究期間で、IFI16 の作用機構の解明と核内 RNA ウイルスの増殖制御技術を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、BDV ならびにインフルエンザウイルス感染細胞における IFI16 とウイルス RNP との相互作用を明らかにするとともに、IFI16 の欠損によるウイルス増殖への影響を明らかにすることを目的に行われた。本研究に用いられた主な方法を以下に簡潔に列記する。

(1) 使用した細胞

ヒト由来オリゴデンドログリア (OL) 細胞、ヒト肺基底上皮腺癌 (A549) 細胞、ならびに BDV 持続感染 OL (OL/BDV) 細胞をダルベッコメディウムを用いて培養し、実験に使用した。

(2) siRNA 解析

IFI16, RIG-I そして PARP-1 に対する siRNA (siIFI16, RIG-I and PARP-1) を購入し、それぞれの分子のノックダウンに用いた。siRNA を導入した細胞はそのノックダウン効率を、リアルタイム RT-PCR 法で定量した。

(3) HMGB1/BDV RNP 複合体の単離

OL/BDV 細胞に GFP と融合させた組換え HMGB1 を導入した 48 時間後に、細胞核画分を抽出した。そしてこの抽出画分を用いて、抗 GFP 抗体にて免疫沈降を行い、SDS-PAGE で HMGB1 複合体の分離をした。分離されたタンパク質バンドは、質量分析解析で同定を行なった。

(4) 免疫沈降法

OL/BDV 細胞の核画分を用いて、抗 IFI16 抗体で免疫沈降を行った。免疫沈降物はウェスタンブロット法に供したほか、BDV の RNA ゲノムの量を測るために、RT-PCR を行った。

(5) ウェスタンブロット法

細胞溶解液は SDS-PAGE で分画した後に、PVDF 膜に転写した。その後、膜を抗 BDV N 抗体、抗 GFP 抗体、抗 IFI16 抗体などと反応させた。メンブランは洗浄後、HRP 標識二次抗体と反応させた。反応は ECL Plus Western Blot Detection Reagents を用いて検出した。

(6) 間接免疫蛍光法

ガラスプレートに播種した細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定した後に、0.25% Triton X-100 を含む PBS で 10 分間、透過処理を行った。その後、適切な一次、二次抗体との反応を行なった。核染色には DAPI を用いた。染色細胞は、コンフォーカルレーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

(7) 近接ライゲーション解析法

Duolink Detection kit を用いて近接ライゲーション解析を行った。細胞は固定後、抗 HMGB1 抗体、抗 BDV N あるいは抗 BDV P 抗体と抗 IFI16 抗体の混合液を反応させた。その後、PLA Plus と PLA Minus プローブと混ぜた抗マウス IgG 抗体と反応させ、顕微鏡観察を行った。

(8) IFI16 ノックアウト OL 細胞の樹立

hCas9 と sgRNA をコードしている pX330 プラスミドは Addgene から購入した。IFI16 遺伝子を標的にするガイド RNA は Bbs I 酵素を用いて pX330 に挿入した (pX330-IFI16)。OL 細胞に Lipofectamine 2000 を用いて pX330-IFI16 を導入した。その後、目的遺伝子の欠損と目的タンパク質の発現をシーケンス解析ならびにウェスタンブロット法で確認を行い、IFI16 ノックアウト OL 細胞を樹立した。

(9) ウイルス感染

組換え BDV を OL と OL-IFI16KO 細胞に multiplicity of infection (MOI) 0.01 で 37°C、1 時間吸着させた。その後、細胞を PBS で洗浄し 3 日毎に継代を行った。ウイルスの細胞での増殖は間接免疫蛍光法により観察した。siIFI16 で処理を行った OL もしくは A549 細胞にインフルエンザウイルスの A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) 株と NS2-欠損 A/WSN/1933 (dNS2) 株を MOI 0.1 と 0.01 で感染させた。

(10) RT-PCR 解析

BDV もしくはインフルエンザウイルスが感染した細胞より TRIzol 試薬を用いてトータル RNA を抽出した。その後、オリゴ dT

もしくはウイルス特異的プライマーを用いて Verso cDNA Synthesis Kit にて cDNA を合成した。リアルタイム RT-PCR は、Thunderbird SYBR qPCR Mix もしくは Probe qPCR Mix を用いた LightCycler システムにて行った。

4. 研究成果

ウイルスに対する自然免疫応答は、宿主細胞に感染したウイルスを細胞内のセンサー分子により認識することで開始される。これまでに、宿主細胞に侵入したウイルス由来核酸を感知するセンサー分子が数多く同定され、その特異性も明らかにされてきた。しかしながら、そのほとんどはエンドゾームを含む細胞質に存在する分子であり、核内に存在するウイルス核酸に対しては機能しないことが示されている。一方で、インフルエンザウイルスやボルナウイルスなど、細胞核で増殖する RNA ウイルスがどのように核内で認識され、宿主細胞の防御反応が惹起されるのかについては全く明らかになっていない。これまでに私たちは、BDV の P タンパク質が宿主因子である HMGB1 と直接結合することを報告するとともに、BDV RNP と HMGB1 の複合体に、ヘルペスウイルスに対する核内ウイルスセンサーである IFI16 が相互作用していることを明らかにしている。

そこで本研究課題では、IFI16 が核内で増殖する RNA ウイルスであるボルナウイルスならびにインフルエンザウイルスの感染を認識できるのかについて検討を行った。IFI16 は PYHIN ファミリーに属する自然免疫応答性の AIM2-like receptor である⁹⁾。解析の結果、IFI16 は BDV が持続感染した OL 細胞核内で発現が確認された。また、免疫沈降法により、HMGB1-BDV RNP 複合体へ結合も検出された。さらに BDV の N タンパク質とゲノム RNA も抗 IFI16 抗体により免疫沈降され、IFI16 が BDV 感染細胞内でウイルス RNP と相互作用していることが証明された。さらに私たちは、間接免疫蛍光法や近接ライゲーション解析法を用いて、OL/BDV 細胞において、IFI16 が HMGB1 と共局在するとともに、IFI16 と BDV の N タンパク質の核内での共局在も明らかにした。

引き続き、IFI16 がインフルエンザウイルスの RNP も感染細胞の核内で認識できるのかについて解析を行った。先にも述べたが、これまでの解析でインフルエンザウイルスの NP タンパク質が HMGB1 と相互作用していることが以前の研究で示されていた。そこで、まず近接ライゲーション解析法を用いて IFI16 とインフルエンザウイルスの NP タンパク質の共局在について検討を行った。感染 4 時間後の OL 細胞ならびに A549 細胞を観

察した結果、インフルエンザウイルスの NP タンパク質と IFI16 が核内において共同在していることが示された。この結果は、IFI16 が細胞核内において、インフルエンザウイルスの RNP を認識している可能性を強く示唆していた。

次に、IFI16 が RNA ウイルスの RNP を感染細胞核内で認識する意義を明らかにするために、siRNA を用いて IFI16 のノックダウンを行った。その結果、IFI16 のノックダウンにより、BDV の複製効率が顕著に増加することが確認された。一方、陰性コントロールとして用いた RIG-I もしくは PARP-1 に対する siRNA は、BDV 複製に影響は見られなかった。さらに私たちは、CRISPR/Cas システムを用いて IFI16 のノックアウト OL 細胞の作製を行った。3 株のノックアウト OL 細胞を用いて BDV の感染実験を行った結果、ノックアウト細胞においては親株の OL 細胞と比較して、顕著に BDV の増殖能が上昇していることが明らかとなった。

次に、IFI16 のインフルエンザウイルス感染に関する役割の検討を行った。野生型のインフルエンザウイルスを用いた解析において、IFI16 のノックダウンにより、若干のウイルス増殖効率の上昇が確認された。これまでの研究から、インフルエンザウイルスの RNP は核内での複製後、迅速にウイルスの NS2 タンパク質によって細胞質へと運ばれることが知られている。細胞質に運ばれたウイルス RNP は細胞質の RNA ウイルスセンサーである RIG-I によって認識されると考えられる。よって、インフルエンザウイルス感染に対する IFI16 の核内での機能を正確に把握するためには、細胞質での RIG-I による認識の影響を除外する必要がある。そこで、私たちは、NS2 が欠損した組み換えインフルエンザウイルス、 Δ NS2 IAV、を用いて実験を行った。 Δ NS2 IAV はウイルス RNP の核外輸送能力が欠損しているため、核内のみでの宿主のウイルス認識について検討を行うことができる。解析の結果、 Δ NS2 ウイルスの複製は、siRNA により IFI16 をノックダウンさせた A549 細胞において、顕著に上昇することが示された。これらの結果は、IFI16 が細胞核内で RNA ウイルスの RNP を認識して抗ウイルス応答を誘導していることを強く示すものである。

以上のように、本研究課題において、IFI16 が BDV ならびにインフルエンザウイルスの RNP を核内で認識して、宿主に免疫応答を引き起こしている可能性が明らかになった。当初の研究計画では、核内における IFI16 以外の RNA ウイルス認識経路の解析や IFI16 を利用したウイルス抑制技術の構築も研究期

間内に進める予定であった。IFI16 以外の認識分子に関しては、現在、すでに候補分子を同定しており、解析を行っている最中であるが、その詳細に関しては本研究成果報告書では記載を控える。一方、IFI16 を利用したウイルス増殖抑制技術は、現在構築を進めている。具体的には、IFI16 により誘導される抗ウイルス応答の分子機序を応用することで、核内の RNA ウイルス複製の抑制を試みている。

本研究課題の遂行により、核内における RNA ウイルスの認識機構の一端が明らかになるとともに、IFI16 を利用した新しい抗ウイルス戦略の構築に貢献できたと考えられる。

参考文献

- 1). Kumar H et al., *Int Rev Immunol.* 30:16-34 (2011).
- 2). Kerur N et al., *Cell Host Microbe.* 9:363-75 (2011).
- 3). Horie et al., *Nature* 463:84-7 (2010).
- 4). Matsumoto et al., *Cell Host Microbe.* 11:492-503 (2012).
- 5). Kamitani et al., *J Virol.* 75:8742-51 (2001).
- 6). Zhang et al., *J Virol.* 77:12243-51 (2003).
- 7). Yanai et al., *Nature* 462:99-103. (2009).
- 8). Moisy et al., *J Virol.* 86:9122-33. (2012).
- 9). Ludlow et al., *Exp Cell Res.* 308:1-17 (2005).

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 8 件)

Fujino K, Horie M, Honda T, Merriman DK and Tomonaga K. Inhibition of Borna disease virus replication by an endogenous bornavirus-like element in the ground squirrel genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111:13175-13180 (2014). 10.1073/pnas.1407046111

Suzuki Y, Kobayashi Y, Horie M and Tomonaga K. Origin of endogenous bornavirus-like nucleoprotein elements in thirteen-lined ground squirrels. *Genes Genet. Syst.* 89:143-148 (2014). PMID: 25475938

Kojima S, Honda T, Matsumoto Y and Tomonaga K. Heat stress is a potent stimulus for enhancing rescue efficiency of recombinant Borna disease virus. *Microbiol. Immunol.* 58:636-642 (2014). doi:

10.1111/1348-0421.12193.

Makino A, Fujino K, Honda T, Parrish NF and Tomonaga K. Borna disease virus possesses an NF- B inhibitory sequence in the nucleoprotein gene. *Sci. Rep.* 5:8696 (2015). doi: 10.1038/srep08696.

Parrish NF, Fujino K, Shiromoto Y, Iwasaki YW, Ha H, Xing J, Makino A, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Siomi H, Honda T and Tomonaga K. piRNA derived from ancient viral processed pseudogenes as transgenerational sequence-specific immune memory in mammals. *RNA* 21:1691-1703 (2015). doi: 10.1261/rna.052092.115.

Sofuku K, Parrish NF, Honda T and Tomonaga K. Transcription profiling demonstrates epigenetic control of non-retroviral RNA virus-derived elements in the human genome. *Cell Rep.* 12:1548-1554 (2015). doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.007.

Hirai Y, Honda T, Makino A, Watanabe Y and Tomonaga K. X-linked RNA-binding motif protein (RBMX) is required for the maintenance of Borna disease virus nuclear viral factories. *J. Gen. Virol.* 96:3198-3203 (2015). doi: 10.1099/jgv.0.000273.

Nakamura S, Horie M, Daidoji T, Honda T, Yasugi M, Kuno A, Komori T, Okuzaki D, Narimatsu H, Nakaya T and Tomonaga K. Influenza A virus-induced expression of a GalNAc transferase, GALNT3, via miRNAs is required for enhanced viral replication. *J. Virol.* 90:1788-1801 (2016). doi: 10.1128/JVI.02246-15.

〔学会発表〕(計 10件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/tomonaga-hp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝長 啓造 (TOMONAGA, Keizo)
京都大学・ウイルス研究所・教授
研究者番号: 10301920

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者