

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390108

研究課題名(和文) 感染センサーによるウイルスリボ核タンパク質複合体(RNP)認識機構の解析

研究課題名(英文) Molecular machinery for recognition of viral ribonucleoprotein complex (RNP) by host innate immune receptors

研究代表者

米山 光俊 (Yoneyama, Mitsutoshi)

千葉大学・真菌医学研究センター・教授

研究者番号：40260335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウイルス感染に応答した自然免疫誘導において、細胞内ウイルスRNAセンサーであるRIG-I-like receptor (RLR)によるウイルスリボ核タンパク質複合体(RNP)の認識機構をin vitroの再構成系を用いて明らかにすることを目的とした。インフルエンザウイルス(IAV)をモデルウイルスとしてRIG-IによるRNP認識を検討した結果、人工的な基質である5'三リン酸RNAと同様に、IAV RNPがRIG-Iを介したシグナルを誘導し得ることを初めて明らかにした。今後、ウイルスRNAセンサーによるウイルス感染検知の分子機構がさらに明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we tried to reveal how viral RNA sensors, RIG-I-like receptors (RLRs), recognize replication-competent viral ribonucleoprotein complexes (RNPs) that are formed in virus-infected cells. We established in vitro reconstitution assay system to detect activation of RIG-I-mediated signaling in response to substrate RNAs, such as 5'-triphosphate-containing synthetic RNAs. As a result of investigations using viral RNPs of influenza A virus (IAV) as substrates, we clearly observed activation of RIG-I-mediated signaling by IAV RNPs in vitro. These results could help us to understand how anti-viral innate immune responses are initiated in virus-infected cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：ウイルス 自然免疫 RNA

1. 研究開始当初の背景

(1) ウイルス感染に対する感染初期の生体防御機構である自然免疫は、感染センサーによるウイルス由来の非自己核酸の侵入の検知と、それによって発現誘導される I 型インターフェロン (IFN) などのサイトカインの作用によってもたらされる。研究代表者らは、2004 年に細胞内ウイルス RNA センサー分子として RIG-I-like receptor (RLR) を同定し、その生理機能を明らかにした。さらに、その後の 10 年間で 3 種のヒト RLR (RIG-I, MDA5, LGP2) の機能解析が進み、RLR を介した自然免疫誘導の分子機構の理解が進んできた。しかし一方で、研究代表者を含めた多くの研究者による解析は、主にウイルス RNA を模倣した人工的な RNA を用いたものであったことから、実際にウイルス感染細胞内でどのようにウイルス RNA が RLR によって認識されるのかについては、明確になっていなかった。

(2) 個々のウイルスはそれぞれが独自の増殖様式を持ち、固有のリポ核蛋白質複合体 (RNP) として感染細胞内の異なる領域に存在し増殖するが、遺伝子破壊マウスを用いた生理的な解析からは、わずか 3 種の RLR によってこれらほとんどのウイルス感染応答が検知・制御されていることを示していたことから、そこにはウイルス種に依存しない普遍的な外来ウイルス RNP 検知の分子機構が存在することが予想された。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ウイルス感染細胞内における RLR によるウイルス RNP 認識の分子機構を明らかにすることを目的とした。モデルウイルスとして、RIG-I によって認識されることが知られるインフルエンザウイルス (IAV) に焦点をあて、RIG-I がどのように IAV RNP にアクセスし、基質であるウイルス RNA を認識しているのかについて、*in vitro* の再構成系を用いることにより明らかにすることを旨とすることとした。

(2) *in vitro* での生化学的な解析を通じて、RIG-I によるウイルス RNP 認識の分子機構を明確にし、必要に応じて、そこに関わる制御因子の同定とその機能解析を行うことで、将来的にウイルス認識の普遍的な分子機構を明らかにすることが可能になると考えた。また、別の実験において、ウイルス感染で細胞質に出現するストレス顆粒様の凝集体に RLR が集積し、その凝集が自然免疫誘導に関与していることを見出しており、本研究と連携することで、細胞内における空間的なウイルス RNP 検知の分子機構についても理解を深めることが可能になると考えられた。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* での RIG-I シグナル再構成実験系を確立し、基質 RNA に対するシグナル活性

化応答を生化学的に検討した。実験系は既に他のグループによって報告されており、それを踏襲することとした。リコンビナント RIG-I タンパク質はバキュロウイルスによる *in vitro* 合成系を用いて調整した。この不活性型 RIG-I を基質と反応させた後、ヒト 293T 細胞抽出液から調整したミトコンドリア画分と可溶性画分、³⁵S-メチオニンで標識した IFN 誘導に必須な転写因子 IFN regulatory factor (IRF)-3 のリコンビナントタンパク質 (不活性型) を混合し、IRF-3 の活性化二量体形成を指標として RIG-I シグナルの活性化の有無を検出した (図 1)。

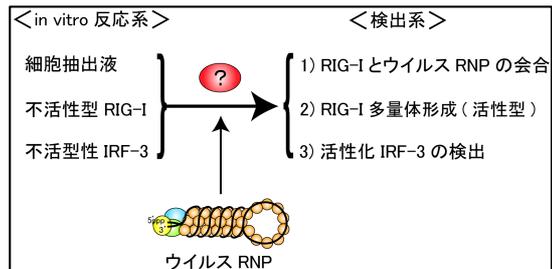


図 1 : *in vitro* 再構成系

(2) モデル RNP として、293T 細胞に IAV 由来 RNA、His-tagged nucleocapsid (NP) タンパク質、RNA 依存性 RNA polymerase の 3 つのサブユニット (PA, PB1, Flag-tagged PB2) を同時に発現させ、細胞内で形成される RNP を Tag を指標に精製して実験に供した。

(3) モデル RNP によるシグナル活性化を、上記 *in vitro* 再構成実験系で評価すると共に、RIG-I と RNP の会合や活性化 RIG-I の多量体形成を指標とした解析を行った。さらに、RNP と RIG-I の直接の相互作用を検出するために原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope; AFM) により可視化することも検討した。以上の解析から、RIG-I による RNP 検知が RIG-I 単独によるのか、あるいはそこに関与する制御因子があるのかについて考察した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* の実験系の構築を目指し、上記した方法での解析を行った。既に RIG-I に認識されることが明らかな 5'三リン酸をもつ合成 RNA (5'ppp RNA) を基質として用い、様々な条件での RIG-I 活性化について検討を行った。その結果、効率よく *in vitro* で RIG-I の活性化を検出する条件を決定することに成功した。特に、5'ppp 一本鎖 RNA (ssRNA) と二本鎖 RNA (dsRNA) 及びリジン 63-linked Ubiquitin 鎖 (Ubs) の添加が IRF-3 の活性化には必須であることが確認された (図 2)。

(2) 次に、モデルウイルス RNP として IAV RNP の調整を行った。必要な因子を発現させた 293 細胞抽出液から、NP と PB2 に結合した Tag を指標にしてアフィニティ精製を行ったが、NP に結合した His-tag による精製に困難があ

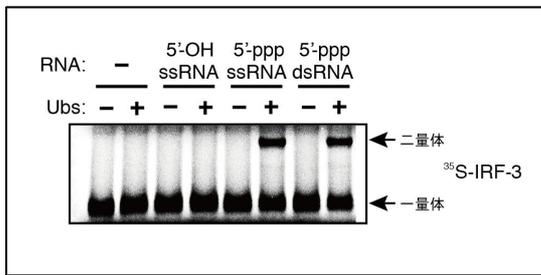


図2 : *in vitro*でのRIG-Iシグナル活性化

り、研究計画に遅延が生じたため、当初の計画から約半年間研究期間を延長した。そのために、以下の研究実施が平成26年度にずれこんだ。しかし最終的に、IAV RNPの精製に成功した。機能的なRNPであることは、*in vitro*でのゲノム複製を検討することにより確認した。

(3) 調整したIAV RNPを(1)で確立した*in vitro*の再構成系に導入し、ウイルスRNPによるRIG-Iの活性化を検討した。その結果、若干の効率低下はあるものの、ウイルスRNPによってもRIG-Iを介したシグナルの活性化が検出された(図3)。

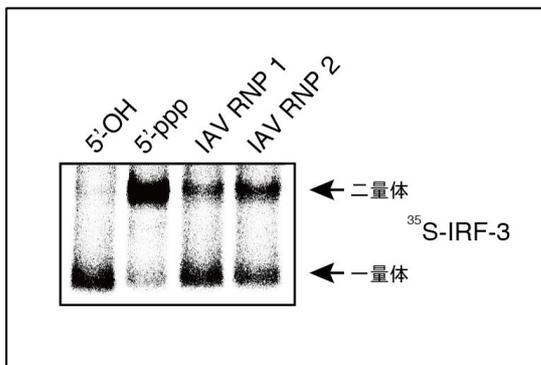


図3 : IAV RNPによるRIG-Iシグナル活性化

(4)以上の結果から、RIG-Iを介したシグナルが、ウイルス由来RNPによっても活性化されることが初めて明らかになった。しかし、RIG-Iが単独でRNPにアクセスし得るかどうか、あるいはそこに何らかの制御因子が必須なのかについては、さらに詳細な生化学的な検討が必要であることが考えられた。AFMを用いた一分子での可視化を目指した解析では、精製したIAV RNPを検出することは可能だったが、RIG-IとRNPとの会合は可視化できておらず、今後の検討が必要であると考えられた。なお、AFMを用いた解析を含んだ解析については、平成26年度採択の基盤研究(B)(課題番号:26293101)において、解析を行ってゆく計画である。

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11件)

Onomoto K, Yoneyama M, Fung G, Kato H, Fujita T. Antiviral innate immunity and stress granule responses. *Trends Immunol*, 35, 420-428, 2014. 査読有 doi: 10.1016/j.it.2014.07.006.

Narita R, Takahashi K, Murakami E, Hirano E, Yamamoto SP, Yoneyama M, Kato H, Fujita T. A novel function of human Pumi1 proteins in cytoplasmic sensing of viral infection. *PLoS Pathog*, in press, 2014. (査読有) doi: 10.1371/journal.ppat.1004417.

Yoo JS, Takahashi K, Ng CS, Ouda R, Onomoto K, Yoneyama M, Lai JC, Lattmann S, Nagamine Y, Matsui T, Iwabuchi K, Kato H, Fujita T. DHX36 Enhances RIG-I Signaling by Facilitating PKR-Mediated Antiviral Stress Granule Formation. *PLoS Pathog*, 10, e1004012, 2014. 査読有 doi: 10.1371/journal.ppat.1004012.

Ng CS, Jogi M, Yoo JS, Onomoto K, Koike S, Iwasaki T, Yoneyama M, Kato H, Fujita T. EMCV disrupts stress granules, the critical platform for triggering antiviral innate immune responses. *J Virol*, 87, 9511-22, 2013. 査読有 doi: 10.1128/JVI.03248-12.

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, e53578, 2013. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0053578.

Onomoto K, Jogi M, Yoo JS, 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, e43031, 2012. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0043031.

Ouda R, Onomoto K, Takahashi K, Edwards MR, Kato H, Yoneyama M, Fujita T.

Retinoic Acid-inducible Gene 1-inducible miR-23b Inhibits Infections by Minor Group Rhinoviruses through Down-regulation of the Very Low Density Lipoprotein Receptor. *J Biol Chem*, 286, 26210-26219, 2011. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M111.229856.

〔学会発表〕(計14件)

Yoneyama M. 「Regulation of anti-viral innate responses by host RNA binding

proteins.」 The International Symposium 'Molecular basis of host cell competency in virus infection'. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 11.8-9.2014.

米山光俊、「宿主 RNA 結合タンパク質によるウイルス感染応答制御」、第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、シンポジウム、北海道大学 (北海道札幌市) 6.19-20, 2014.

Yoneyama M. 「Stress granule-like aggregates play a critical role in anti-viral innate immunity」The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市) 9.12, 2012.

Yoneyama M. 「Viral non-self RNA in detected by RIG-I-like receptors in cytoplasmic granules.」、第 40 回日本免疫学会学術集会 Symposium "Molecular mechanisms leashing pathogen sensors". 幕張メッセ (千葉県千葉市) 11.27, 2011.

Yoneyama, M. 「Molecular machinery for detection of viral RNA in innate immune responses.」、Singapore-Japan Joint Forum Emerging Concepts in Microbiology. シンガポール 11.15-16, 2011.

〔図書〕(計 2 件)

米山光俊「ウイルス感染のセンサーとインターフェロン」新編ウイルスの今日的意味、医薬ジャーナル社、52-59, 2012.
査読無

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 感染・共生・生体防御システム、羊土社、30, 3180-3187, 2012.

〔その他〕

ホームページ等

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://www.pf.chiba-u.ac.jp/bunya_kanse_nmeneki/

千葉大学真菌医学研究センターホームページ

<http://www.pf.chiba-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米山 光俊 (YONEYAMA, Mitsutoshi)

千葉大学・真菌医学研究センター・

教授

研究者番号：4 0 2 6 0 3 3 5