

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19121

研究課題名(和文) 1型インターフェロンの抗ウイルス効果に関わる lncRNA の同定とその機能解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of long non-coding RNA regulated by type I interferon

研究代表者

西辻 裕紀 (Nishitsuji, Hironori)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・上級研究員

研究者番号：20573661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円

研究成果の概要(和文)：長鎖非コードRNA(lncRNA)は様々な生命活動に役割を果たしていることが知られているが、抗ウイルス応答に関与する lncRNA はあまり知られていない。本研究では1型IFNシグナルに関与する lncRNA#32 を同定した。lncRNA#32 をノックダウンすると、1型IFNで誘導される遺伝子群の発現が顕著に減少し、HBVおよびHCV感染が著しく増加した。またlncRNA#32を強制発現させると、これらのウイルス複製を抑制した。lncRNA#32はATF2と結合し、1型IFNで誘導される遺伝子群の発現を調節していることが示唆された。lncRNA#32は抗ウイルス応答に関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Despite the breadth of knowledge that exists regarding the function of long noncoding RNAs (lncRNAs) in biological phenomena, the role of lncRNAs in host antiviral responses is poorly understood. Here, we report that lncRNA#32 is associated with type I IFN signaling. The silencing of lncRNA#32 dramatically reduced the level of IFN-stimulated gene (ISG) expression, resulting in sensitivity to hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) infection. In contrast, the ectopic expression of lncRNA#32 significantly suppressed HBV and HCV replication, suggesting that lncRNA#32 positively regulates the host antiviral response. lncRNA#32 bound to activating transcription factor 2 (ATF2) and regulated ISG expression. Our results reveal a role for lncRNA#32 in host antiviral responses.

研究分野：ウイルス学

キーワード：Interferon long non coding RNA innate immunity

### 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス (HCV)の治療には、一般的に1型インターフェロンが多く用いられており、一部の患者では完全にウイルスを排除できるようになったが、1型インターフェロン治療に全く効果を示さない患者が存在するため、治療法の改善が望まれている。

最近の研究で、1型インターフェロン治療が有効な患者と効果を示さない患者のゲノムを比較解析した結果、IFN-lambda 周辺に存在する一塩基多型がその原因だということが示された。また、1型インターフェロン治療に効果を示さない患者は、効果を示す患者に比べて、IFN-lambda の発現が低いことが分かってきた。しかし、1型インターフェロンは、JAK/STAT を活性化し、多数の Interferon-stimulated gene (ISG)を誘導し、強い抗ウイルス効果を発揮することが知られているが、種々の ISG の発現量は、1型インターフェロン治療に効果を示さない患者の方が高いことが報告され、既存の ISG だけでは1型インターフェロンの抗ウイルス効果を説明できない。

### 2. 研究の目的

- (1) 1型インターフェロンで誘導される長鎖非コード RNA (lncRNA)を同定する。
- (2) 同定した lncRNA の抗ウイルス効果の評価を行う。
- (3) 抗ウイルスに関する lncRNA の機能評価を行う。
- (4) 抗ウイルスに関する lncRNA の結合タンパク質の同定を行う。

### 3. 研究の方法

- (1) ウイルス感染などでインターフェロンが発現するときは転写因子 IRF3 を活性化し、その発現を誘導する。そこで肝臓細胞株の IRF3 を CRISPR-Cas9 システムを用いて、ノックアウトした。
- (2) IRF3 ノックアウト細胞に PolyI:C を処理し、IRF3 依存的に発現調節される lncRNA をマイクロアレイを用いて同定した。
- (3) 同定した lncRNA を siRNA を用いて、ノックダウンし、1型インターフェロンによる抗ウイルス効果に重要な lncRNA の同定を行った。
- (4) 1型インターフェロンによる抗ウイルス効果に重要な lncRNA に結合するタンパク質の同定を行った。lncRNA を T7 polymerase で in vitro transcription し、合成した RNA をビオチン化ラベルした。Biotin 化した RNA を1型インターフェロンで処理した細胞溶解液と混合し、streptavidin-beads で沈降し、沈降物を SDS-PAGE で分離、染色し、lncRNA 特異的に結合するタンパク質を質量分析によって同定した。

### 4. 研究成果

(1) 肝臓細胞株および IRF3 ノックアウト細胞株に PolyI:C 処理をし、IRF3 依存的に発現が制御される lncRNA をマイクロアレイによって解析した結果、60種類の lncRNA が同定できた。さらに RT-PCR 法によって詳細に解析した結果、7種類の lncRNA が polyI:C によって発現変動した。そこでこれら7種類の lncRNA を siRNA によって個々にノックダウンし、PolyI:C 存在下で脳心筋炎ウイルス (EMCV)を感染させた。コントロール細胞に、EMCV を感染させると、細胞死が起こり、あらかじめ polyIC を処理した細胞に EMCV を感染させると、EMCV 依存的細胞死が抑えられた。しかし、lncRNA#32 をノックダウンした細胞では、polyIC 処理による細胞死の抑制は観察されなかった(図1)。

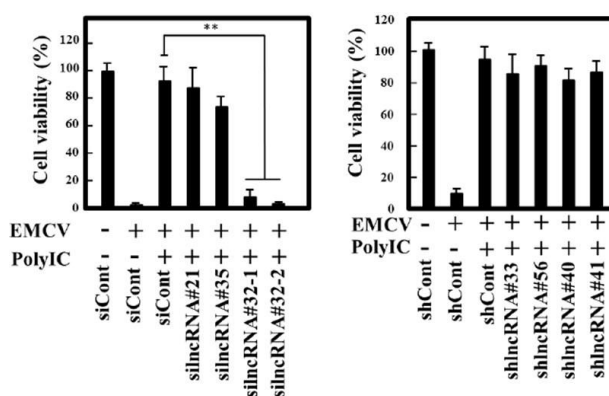


図1 インターフェロンの抗ウイルス効果に  
関与する lncRNA。

また lncRNA#32 を強制発現させ、EMCV を感染させた結果、polyIC 処理なしで EMCV 依存的細胞死の抑制が観察された(図2)。この結果、lncRNA#32 は抗ウイルス効果をもつ lncRNA だということが示唆された。

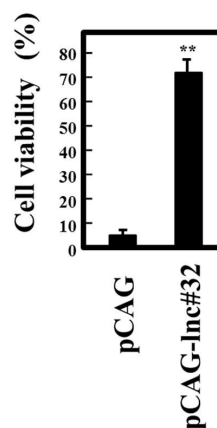


図2 lncRNA#32 強制発現による、EMCV 依  
存的細胞死の抑制

(2) 次に lncRNA#32 がどのような遺伝子群の発現に影響しているかを評価するため、lncRNA#32 を siRNA でノックダウンし、マイクロアレイを行った。その結果、lncRNA#32 は、様々な Interferon stimulated gene (ISG) を制御していた (図 3)。さらに lncRNA#32 を強制発現させた結果、様々な ISG の発現が上昇した。

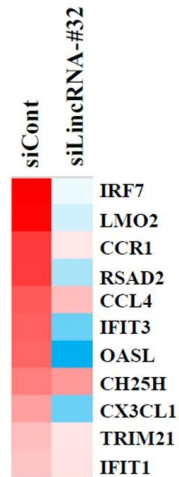


図 3 1 型 IFN 処理後、lncRNA#32 ノックダウンによって影響を受ける ISG 群。

(3) 多くの lncRNA は、細胞内タンパク質と結合し、その機能を発揮していることが報告されている。そこで、lncRNA#32 と結合するタンパク質の同定を行った。ビオチン化した lncRNA#32 を作製し、細胞溶解液と混合し、ストレプトアビジンビーズで lncRNA#32 と結合するタンパク質を質量分析解析した結果、hnRNPU および ATF2 が同定できた (図 4)。

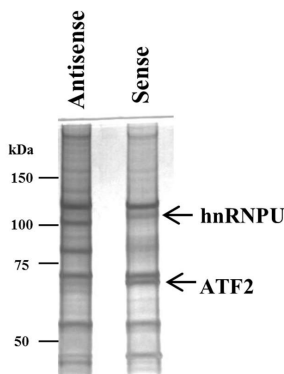


図 4 lncRNA#32 と結合するタンパク質の同定。

(4) hnRNPU は様々なサイトカインやケモカインの mRNA の安定性に関与していることが報告されている。そこで、hnRNPU が lncRNA#32 の安定性に関与しているかの検討を行うため siRNA で hnRNPU をノックダウンし、lncRNA#32 の細胞内安定性を評価した。その結果、コントロール細胞と比較して、hnRNPU ノックダウン細胞では、著しく lncRNA#32 の安定性が減少した (図 5)。さらに、hnRNPU ノックダウン細胞では、1 型 IFN

の抗ウイルス効果も著しく減少した。

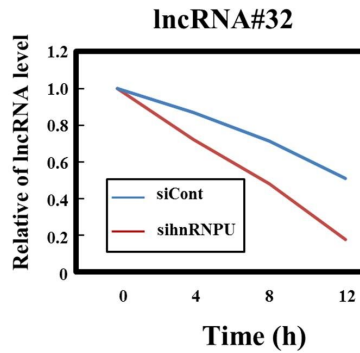


図 5 hnRNPU ノックダウン細胞による lncRNA#32 の安定性

(5) ATF2 は転写因子として知られており、最近では、炎症疾患などにも関与していることが報告されている。そこで、lncRNA#32 の ISG 制御に ATF2 がどのような役割をするか検討した。初めに、ATF2 ノックダウン細胞に lncRNA#32 を強制発現させ、EMCV を感染させた。コントロール細胞では、lncRNA#32 を強制発現させると、EMCV のウイルス力価の低下が観察されたが、ATF2 ノックダウン細胞では、lncRNA#32 を強制発現させても、EMCV のウイルス力価の低下は全く観察されなかった (図 6)。

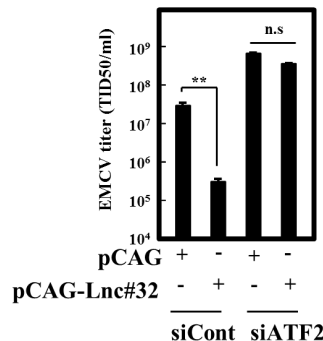


図 6 lncRNA#32 の抗ウイルス効果は ATF2 依存的である。

これらの結果から、lncRNA#32 の抗ウイルス効果には ATF2 が必須であることが示唆された。次に lncRNA#32 と ATF2 が種々の ISG 発現にどのように関与しているかを検討した。図 3 より、lncRNA#32 は IRF7 の発現を制御していることが観察された。そこで、IRF7 のプロモーター領域近傍に ATF2 結合サイト (TGACGT(A/C)(A/G)) があるかどうかを検討した結果、IRF7 のイントロン 1 に ATF2 結合サイトを同定した (図 7)。

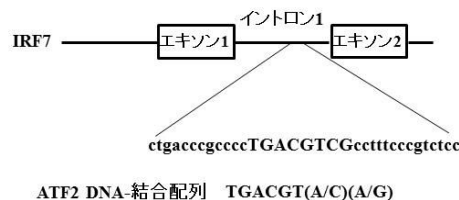


図 7 IRF7 領域の ATF2 結合サイト。

そこで ATF2 がこのサイトに結合するかどうかをクロマチン免疫沈降で確認した。コントロール IgG を陰性コントロールとした時、抗 ATF2 抗体でクロマチン免疫沈降をした結果、ATF2 が IRF7 のイントロン 1 に結合することが観察された (図 8)。

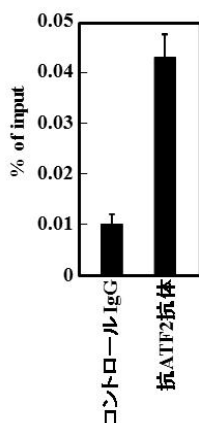


図 8 ATF2 は IRF7 のイントロン 1 と結合する。

さらに lncRNA#32 ノックダウンで IRF7 と ATF2 の結合が低下するかを検討した結果、コントロール細胞と比べて、lncRNA#32 ノックダウンでは、ATF2 の IRF7 結合の低下が観察された (図 9)。

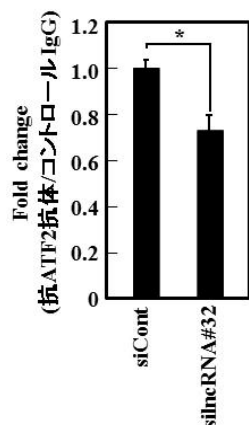


図 9 lncRNA#32 ノックダウンにより、ATF2 の IRF7 結合が低下する。

(6) 最後に lncRNA#32 が肝炎ウイルス防御に参与しているか検討した。肝臓細胞株の lncRNA#32 をノックダウンし、1 型インターフェロン存在下で B 型肝炎ウイルス (HBV) を感染させた。その結果、lncRNA#32 をノックダウンさせると、1 型インターフェロンの抗 HBV 効果が低下した (図 10)。また、HBV 感染と同様に HCV 感染でも lncRNA#32 ノックダウンで 1 型インターフェロンの抗 HBV 効果が減少した。

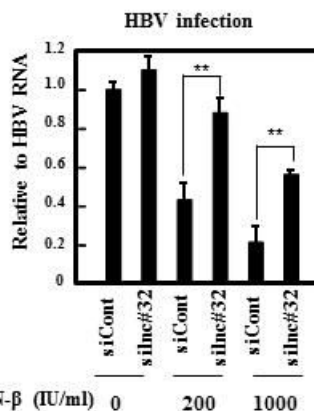


図 10 lncRNA#32 ノックダウンによる HBV に対する 1 型インターフェロンの効果。

以上の結果をまとめると、lncRNA#32 は、hnRNPU によって安定化され、さらに ATF2 と結合することによって、ATF2 が ISG プロモーター領域にできるようになり、結果として、抗ウイルス効果を示す様々な ISG を誘導し、HBV や HCV 感染を抑制することが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

西辻 裕紀、宇治野 真之、由雄 祥代、杉山 真也、溝上 雅史、考藤 達哉、下遠野 邦忠、Long noncoding RNA #32 contributes to antiviral responses by controlling interferon-stimulated gene expression. 査読有、Proc Natl Acad Sci USA. Vol. 113, No. 37, 2016, pp. 10388-10393  
doi: 10.1073/pnas.1525022113

〔学会発表〕(計 1 件)

西辻 裕紀、宇治野 真之、下遠野 邦忠、Long non-coding RNA #32 confers to antiviral responses by controlling. 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2016.10.13、京都 (日本)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

西辻 裕紀 (Nishitsuji Hironori)

国立国際医療研究センター・肝炎・免疫研究センター・研究員

研究者番号：20573661