

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19124

研究課題名(和文) 哺乳類特異的な、RNAサイレンシングと抗ウイルス反応のクロストーク機構の解析

研究課題名(英文) Crosstalk between RNA silencing and antiviral response in mammalian cells

研究代表者

高橋 朋子 (Takahashi, Tomoko)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：00738792

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)：生体内には内在的にsiRNAやmiRNAなどの小分子ノンコーディングRNAが存在し、RNAサイレンシング機構により塩基配列特異的に広く多様な遺伝子発現ネットワークを制御している。一方、ウイルスなどの外来性RNAはウイルスセンサータンパク質によって感知され、I型インターフェロンの誘導を伴った抗ウイルス反応を誘導する。これらの経路はこれまで独立した別々の経路であると考えられてきたが、2つの経路がクロストークすることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The siRNAs and miRNAs are small non-coding RNAs that mediate mRNA cleavage, degradation, and/or translational repression by a mechanism known as RNA silencing. RNA viruses infected into human cells are recognized by virus sensor proteins to activate interferon expression as an antiviral defense system. Here, we revealed that RNA silencing and antiviral defense system are mutually regulated by their components.

研究分野：免疫学

キーワード：RNAサイレンシング 抗ウイルス反応

### 1. 研究開始当初の背景

生物の細胞内では、ゲノム DNA から mRNA が転写され、mRNA からタンパク質がコードされることによって、DNA のもつ遺伝情報の機能が発揮される。しかしながら、近年ゲノムからはタンパク質をコードする mRNA だけでなく、タンパク質をコードしないノンコーディング RNA が多く転写され、タンパク質を作らずに RNA のままで機能を発揮することが明らかになってきている。このようなノンコーディング RNA の中でも small interfering RNA (siRNA)、microRNA (miRNA)、PIWI-interacting RNA (piRNA) といった内在性の小分子二本鎖 RNA は、RNA サイレンシングという塩基配列特異的な遺伝子抑制機構によって、広く多様な遺伝子機能を制御している。ハエや線虫では長い二本鎖 RNA を細胞外から導入すると、Dicer と呼ばれる二本鎖 RNA 切断酵素により 21-23 塩基の小さな siRNA が作られるが、哺乳類細胞では長い二本鎖 RNA は抗ウイルス反応の一種であるインターフェロン応答によってアポトーシスが誘導されるという大きな相違が見られる。インターフェロン応答は脊椎動物以上で保存された進化した生体防御機構であり、ウイルスの感染などによって長い二本鎖 RNA が細胞内に侵入すると誘導される。RNA サイレンシング機構とこのような外来核酸による抗ウイルス反応は、両者の間にクロストークがあると想定されたが、その分子機構については明らかではなかった。

### 2. 研究の目的

生体内には内在的に siRNA や miRNA などの小分子ノンコーディング RNA が存在し、RNA サイレンシング機構により塩基配列特異的に広く多様な遺伝子発現ネットワークを制御している。一方、ウイルスなどの外来性 RNA はウイルスセンサータンパク質によって感知され、I 型インターフェロンの誘導を伴った抗ウイルス反応を誘導する。これらの経路はこれまで独立した別々の経路であると考えられてきたが、2 つの経路がクロストークすることを見出したため、本研究でそのクロストークの機構を生化学・細胞生物学的アプローチにより明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

ヒト培養細胞 (HeLa 細胞、HEK293T 細胞) とマウス培養細胞 (MEF) を用いて以下の解

析を行った。

(1) ルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーターアッセイ系による RNA サイレンシング活性の定量的測定

(2) 免疫沈降法によるタンパク質間相互作用の検出

(3) 近年開発されたゲノム編集ツールである CRISPR/Cas9 システムを用いたヒト細胞における特定の遺伝子のノックアウト細胞株の樹立と解析

### 4. 研究成果

RNA サイレンシングにおける重要な因子と抗ウイルス反応における因子の相互作用を明らかにした。また、そのタンパク質間の相互作用領域の同定も行った。同定した因子を siRNA を用いてノックダウンまたは CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトしたヒト培養細胞において RNAi 活性を測定し、抗ウイルス応答に関わる重要な因子が RNAi 活性を制御することを明らかにした。

本研究は、ヒトを初めとする哺乳類において進化した 2 つの主要な生命現象のクロストークを明らかにすることで、miRNA が制御する新しい生体防御機構の解明に結びつく期待できる。さらに現在臨床応用に大きな期待が寄せられている核酸医薬や、ウイルス感染または自己免疫疾患などに対する医薬品開発にも大きく貢献できると期待できる。

### 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 2 件)

①Kamola PJ, Nakano Y, Takahashi T, Wilson PA, Ui-Tei K. The siRNA non-seed region and its target sequences are auxiliary determinants of off-target effects. *PLoS Comput. Biol.* 11, e1004656, 2015, doi:10.1371/journal.pcbi.1004656. 査読有

②Nishi K, Takahashi T, Suzawa M, Miyakawa T, Nagasawa T, Ming Y, Tanokura M, Ui-Tei K. Control of the localization and function of a miRNA silencing component TNRC6A by Argonaute protein. *Nucleic Acids Res.* 43, 9856-9873, 2015, doi:10.1093/nar/gkv1026. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

①中野悠子、高橋朋子、村上文則、程久美子「TRBP と相互作用する miRNA の網羅的解析」

生物科学専攻リトリート 2017、2017年3月6日、水上温泉 松ノ井 (群馬県利根郡)

② Nakano Y, Takahashi T, Murakami F, Ui-Tei K 「Identification of interacting RNAs with an RNA silencing enhancer TRBP.」新学術領域研究 先進ゲノム支援 国際シンポジウム “The Start of New Genomics” 2017年1月10日、東京大学伊藤学術研究センター伊藤謝恩ホール (東京都文京区)

③ 小森千晶、高橋朋子、程久美子  
「二本鎖 RNA 結合タンパク質 TRBP と HIV-1 TAR RNA の相互作用に Dicer が与える影響」第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

④ 中野悠子、高橋朋子、村上文則、程久美子  
「二本鎖 RNA 結合タンパク質 TRBP と相互作用する RNA の網羅的解析による TRBP の新規機能の解明」第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

⑤ 高橋朋子、中野悠子、尾野本浩司、米山光俊、程久美子「ヒト細胞における、RNA サイレンシングと抗ウイルス反応のクロストーク」第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 優秀ポスター受賞

⑥ Ui-Tei K, Kamola PJ, Hibio N, Takahashi T, Nakano Y 「Thermodynamic regulation of the efficiency of RNA silencing and its evolutionary perspective.」Cell Symposium Functional RNAs, 2016 年 11 月 6-8 日、Langham Place Hotel (中国広州)

⑦ Nakano Y, Takahashi T, Murakami F, Ui-Tei K 「Global analysis of interacting and/or regulating RNAs of a double-stranded RNA binding protein, TRBP, and its associated proteins to define the not-well-determined function.」Cell Symposium Functional RNAs, 2016 年 11 月 6-8 日、Langham Place Hotel (中国広州)

⑧ Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Komori C, Yoneyama M, Ui-Tei K 「Mutual regulation between RNA silencing and anti-virus defense system.」Cell Symposium Functional RNAs, 2016 年 11 月 6-8 日、Langham Place

Hotel (中国広州)

⑨ Ming Y, Nishi K, Takahashi T, Suzawa M, Ui-Tei K 「Nuclear transport of TNRC6A protein is regulated by the amount of Argonaute protein in the cytoplasm.」第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

⑩ 小森千晶、高橋朋子、村上文則、程久美子  
「二本鎖 RNA 結合タンパク質 TRBP と HIV-1 TAR RNA および microRNA との相互作用」第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

⑪ 中野悠子、高橋朋子、尾野本浩司、米山光俊、程久美子  
「RNA サイレンシングと抗ウイルス応答のクロストーク機構の解析」第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

⑫ 高橋朋子、宮川拓也、善野修平、田之倉優、程久美子  
「哺乳類細胞における、アポトーシス誘導による RNA サイレンシング調節因子 TRBP の機能変換」第 38 回日本分子生物学会年会 ワークショップ RNA 機能を制御する酵素・複合体再考、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

⑬ 村上文則、高橋朋子、程久美子  
「RNA サイレンシングに関わる二本鎖 RNA 結合タンパク質 TRBP が結合する microRNA の網羅的解析」新学術領域研究 ゲノム支援 2015 年度拡大班会議、2015 年 8 月 27 日、国立京都国際会館アネックスホール (京都府京都市)

⑭ 中野悠子、高橋朋子、程久美子  
「RNA サイレンシング機構における二本鎖 RNA 結合タンパク質の機能解析」第 15 回東京大学生命科学シンポジウム、2015 年 6 月 27 日、東京大学武田先端知ビル (東京都文京区)

⑮ Ui-Tei K, Iribe H, Leo J, Takahashi T  
「Establishment of a target gene-specific and off-target-reduced RNAi system using chemical modifications affecting thermodynamics.」新学術領域研究 天然物ケミカルバイオロジー：分子標的と活性制御 第 8 回公開シンポジウム、2015 年 6 月 8 日、

東北大学片平さくらホール（宮城県仙台市）

〔図書〕（計 3 件）

①中野悠子、高橋朋子、程久美子

「siRNA の利点と技術開発・安全性評価」次世代を担う、核酸医薬、免疫療法、遺伝子治療、細胞医薬品の課題と各疾患治療への横断的展開、技術情報協会、印刷中

②高橋朋子、程久美子

「核酸医薬と small RNA」非コード RNA、化学同人、354 (148-155)、2016

③程久美子、高橋朋子

「ノンコーディング RNA の生体機能と医薬応用の現状」核酸医薬の創製と応用展開、シーエムシー出版、278 (13-20)、2015

〔その他〕

ホームページ等

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻  
程研究室ホームページ

<http://ui-tei.rnai.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 朋子 (TAKAHASHI, Tomoko)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：00738792