

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02660

研究課題名(和文)細胞内ウイルス検知とストレス応答に共通する分子制御基盤の解析

研究課題名(英文)Molecular interaction between intracellular detection of viral RNAs and stress responses

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内ウイルス感染センサーRIG-I-like receptor (RLR)によるウイルスRNA認識を介した自然免疫応答と、感染をストレスとして感知して形成される抗ウイルスストレス顆粒(avSG)によるストレス応答との機能的な相互関係について明らかにすることを目的とした。両者に共通して関与するRNA結合タンパク質(RBP)に注目して解析した結果、ウイルス感染に応答してavSGに局在し、生体防御制御に正および負に関与するRBPを見出し、その機能を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ウイルス感染に応答した抗ウイルス自然免疫応答と、翻訳抑制へとつながるストレス応答に共通する制御機構を解析し、そこに関与するRBPの同定とそれによる生体防御の制御機構を明らかにした。ここから得られた知見は、2つのストレス応答による細胞の恒常性維持機構の分子メカニズムの理解につながるだけでなく、ウイルス感染症やストレス関連疾患に対する新たな治療戦略につながる知見へとつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to understand the relationship between the innate immune responses triggered by the intracellular viral infection sensors, RIG-I-like receptors (RLRs), and the stress responses regulated by the antiviral stress granules (avSG), which are formed by sensing infection as stresses. We focused on the RNA-binding proteins (RBPs) that are commonly involved in these two responses. We identified RBPs localized in avSG in response to viral infection and involved in positive and negative regulation of antiviral defenses.

研究分野：分子生物学

キーワード：ウイルス 自然免疫 ストレス応答 RNA結合タンパク質 RNA

### 1. 研究開始当初の背景

(1)ヒトを含めた多くの生物は、自らの生存と繁栄のために個体内の恒常性を維持する機構を進化させている。その一方で、常に様々な外的要因すなわち「ストレス」や「感染生物」などに曝されており、それらによる恒常性の擾乱に対抗する手段を発達させている。例えば、高等脊椎動物においては、熱ストレス、酸化ストレス、放射線、薬剤など様々なストレスに対してストレス応答を発動し、特異的な遺伝子発現誘導などを介してそれらのストレスを巧みに回避すると考えられている。一方で、ウイルスや細菌などの外来病原体に対しては、自然免疫と獲得免疫という2つの高度に制御された免疫システムにより病原体の排除がなされることが知られる。これら細胞の恒常性を脅かす「外的なストレス」に対する恒常性維持機構は、それぞれが細胞内外や組織間で密接に連携していることが予想されるものの、その関連についての分子メカニズムの理解についてはいまだに多くの不明な点が残されている。

(2)RNA ウイルス感染に応答した生体防御は、ウイルス由来 RNA を非自己 RNA センサー分子が検知することで発動する。研究代表者らはこれまでの解析から、細胞内ウイルス RNA センサーとして RIG-I-like receptor (RLR)を同定し、その生理機能とシグナル誘導機構を明らかにしてきた。RNA 結合タンパク質 (RNA-binding protein: RBP) である RLR は、ウイルス感染によって細胞質に出現するウイルス RNA に特徴的な二本鎖 RNA (dsRNA) 構造などを特異的に認識することで活性化し、ミトコンドリア外膜に発現する IPS-1/MAVS と呼ばれるアダプター分子との会合を介して転写因子 IFN regulatory factor (IRF)-3/7 及び NF- $\kappa$ B を活性化し、I 型インターフェロン (IFN) 遺伝子や炎症性サイトカインなどの転写を誘導する。一方、インフルエンザ A ウイルス (IAV) 感染に応答した RLR の細胞内局在変化の解析から、RLR がストレス顆粒 (stress granule: SG) に類似した RNA/タンパク質からなる凝集体に集積し、この SG 様凝集体が RLR によるウイルス RNA 認識のプラットフォームであること、また RLR 以外の RBP がこの SG 様凝集体とシグナル制御に重要な役割を担うことを明らかにした (PLoS One, 2012; PLoS Pathog, 2014, 2016)。また、ウイルス感染に応答して形成される SG には、多くの宿主 RBP と自己 RNA に加えウイルス RNA も共に集積していることから、そこには厳密な応答制御機構があることを報告した。しかし、その分子機構は十分に理解できておらず、その理解は、ウイルス感染検知を介した抗ウイルス免疫応答と細胞ストレス応答という異なる細胞恒常性維持機構に共通する分子メカニズムの理解につながるだけでなく、ウイルス感染症やストレス関連疾患の治療対策につながる新たな知見へとつながる可能性が期待された。

### 2. 研究の目的

(1)本研究では、RNA 認識を共通項とする外的ストレスに対する生体防御機構である抗ウイルス自然免疫と SG 形成ストレス応答の間に共通して存在する分子制御基盤を明らかにすることを目的とした。SG は、種々のストレス環境に曝された細胞が、内在性 mRNA とそこに結合する RBP を凝集させてタンパク質合成を停止し、mRNA をストレスから回避させる機能を持つと考えられており、我々が注目するウイルス感染に応答して形成される SG (以下、antiviral SG(avSG)と呼ぶ)は、ウイルス感染というストレス環境下において、RLR による非自己 RNA の検知と自己 mRNA の安定性制御すなわち細胞の恒常性維持機構が、SG という凝集体で共通して制御されている可能性を示唆している。

(2)申請者が明らかにした細胞内構造体 avSG を介したウイルス RNA 検知の制御機構は明らかに新規のものであり、これまでにその抗ウイルス応答への関与を示唆する報告が蓄積している。細胞が様々なストレスに応答して SG を形成し、細胞の恒常性維持機構を働かせていることが明らかになっており、両者に共通して存在する分子メカニズムを明らかにすることは、新たに独創的な分子制御機構の理解へとつながる可能性がある。一方でこれまでの解析から、avSG 形成を誘導しないウイルスや、avSG 形成を強く抑制することで抗ウイルス応答を阻害しているウイルスも明らかになっており、その制御機構と機能はウイルス種によって多様である可能性が示唆されている。従って、得られた成果は、個々のウイルス感染に応答した宿主細胞の感受性や抵抗性の理解へとつながることが予想され、またウイルスがコードするタンパク質による抗ウイルス活性阻害の理解へもつながる可能性があり、将来的に異なる研究分野との融合を介して、ウイルス感染症発症のメカニズムの理解、さらには新規抗ウイルス治療あるいは予防戦略の開発へとつながることが期待される。

### 3. 研究の方法

(1)これまでに、ウイルス感染に応答した IFN 産生に関与する宿主 RBP およびウイルス感染で形成される avSG に局在する宿主 RBP の同定を進めており、いくつかの候補となる RBP を見出してきた。本研究では、候補となる RBP のひとつとして、mRNA と会合し翻訳制御に関与することが知られる RBP (以下 RBP1 と呼ぶ) を同定しており、当該分子に注目し、詳細な検討を実施した。

CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウトマウスを用いることで、その生理機能解析を実施した。また、RBP1 がどのように抗ウイルス応答に関与するかについて、その機能制御機構を解析した。具体的には、ウイルス感染及び各種ストレスに応答した発現様式と avSG などの細胞内挙動変化、刺激に応答して相互作用するタンパク質及び RNA についての解析などを行うことで、当該分子の抗ウイルス免疫応答における生理的な機能を明確にすると共に、RBP の相互作用を介した細胞機能制御の分子機構を明らかにする。

(2)既に同定している RBP 以外に、ウイルス感染応答と SG 形成に重要な役割を担う分子について、その同定と機能解析を実施した。特に本研究では、Trans-activation response-RNA binding protein (TRBP) に注目した解析を実施した。TRBP は、宿主の RNA サイレncing (RNA interference: RNAi) において、Dicer による microRNA(miRNA) の成熟に関与する RBP として知られるが、RLR の一つである LGP2 や SG 形成に関与する二本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼ (PKR) などの RBP と会合するため、抗ウイルス応答に関与する可能性が予想された。本研究では、これらの分子間相互作用が RNA サイレncing や抗ウイルス応答にどのように関与するかについて、主に培養細胞レベルでの解析を実施した。

(3)本研究期間中に、SARS-CoV-2 ウイルスによる新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) のパンデミックが発生した。真菌医学研究センター内に設置されている BSL3 施設を改修し、SARS-CoV-2 ウイルスの感染実験が可能な設備を導入し、SRAS-CoV-2 感染に応答した抗ウイルス自然免疫応答と avSG 形成に関する解析を実施した。

#### 4. 研究成果

(1) 研究代表者は、IFN 誘導に関与する可能性がある宿主 RBP として、RBP1 を同定した。RBP1 の発現プラスミドを IFN レポーター遺伝子と共にマウス繊維芽細胞である L929 細胞に強制発現し、ニューカッスル病ウイルス (NDV) および非構造タンパク質 NS1 を欠く IAV (IAV $\Delta$ NS1) を感染させた時のレポーター活性を測定したところ、RIG-I の強制発現と同様に、RBP1 の発現は強力にレポーター遺伝子を誘導したことから、RBP1 が抗ウイルスシグナルの正の制御因子であることが示唆された (図 1)。またこの時、RBP1 は avSG に共局在していることも観察されたことから、RBP1 が avSG 形成を介して IFN 誘導シグナルを制御している可能性が考えられた。

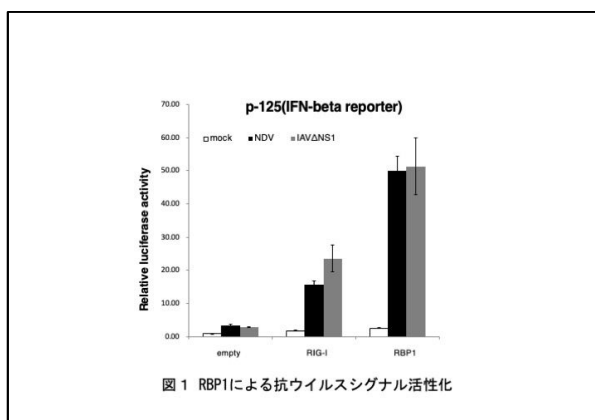


図 1 RBP1 による抗ウイルスシグナル活性化

(2)次に、RBP1 の各種変異体を作成し、その IFN 誘導への関与について検討したところ、RNA 結合ドメイン (RNA recognition motif: RRM) がその活性に必須であることが示唆された。一方で、RRM を欠失させた変異型 RBD1 タンパク質も avSG に局在することから、RBD1 の avSG への局在が必須ではなく、RRM を持つ RBD1 タンパク質の avSG への局在が必要であることが示唆された。この RRM に依存しない avSG の局在は、他の宿主因子との会合によるものであることが予想された。さらに、免疫沈降法による解析から、RBD1 は RLR ファミリー分子と相互作用していることが示されたことから、その RRM による RNA 結合活性を通じて、avSG 内で RLR と協調的にウイルス RNA 認識に関与している可能性が強く示唆された。

(3)RBP1 の生理機能を明らかにするために、ゲノム編集を用いた遺伝子破壊 (KO) マウスを作成し、ウイルス感染に対する感受性を検討した。モデル感染系として、IAV の軽微感染実験系を用いた解析を行なった。その結果、野生型 (+/+) マウスに比較して、KO マウス (-/-) では明らかに個体の生存率が低下しており (図 2)、RBP1 が呼吸器系の IAV 感染に対する生体防御に重要な役割を担っていることが示唆された。

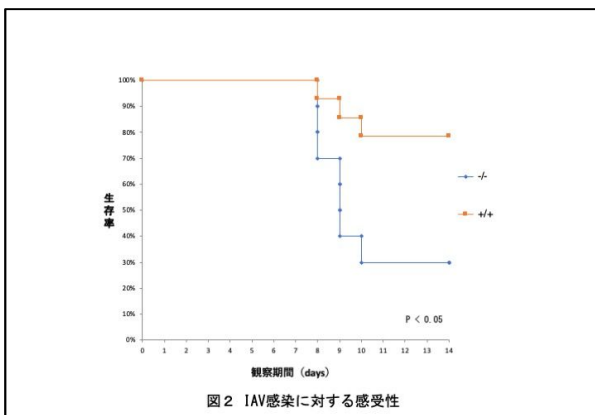


図 2 IAV 感染に対する感受性

(4)もう一つの宿主因子として、TRBP に注目した解析を行なった。TRBP は様々な宿主因子と会合することが報告されているが、その一つである PKR は、宿主翻訳抑制を介して抗ウイルス活性に重要な役割を担うことが知られる。また、PKR が avSG 形成に重要であることも知られていたことから、TRBP が PKR-SG 形成を

介して抗ウイルスシグナルの制御に関与する可能性が予想された。実際に、TRBP の強制発現は強く avSG 形成を抑制すると同時に、IFN 誘導も阻害したことから、TRBP が avSG 形成阻害を介して抗ウイルス自然免疫誘導の負の調節因子として機能することが示唆された。一方で、TRBP は Dicer と会合して miRNA の生成に関与すること、また LGP2 と特異的に会合することも明らかになっており、ウイルス感染に応答した IFN シグナルによって誘導される LGP2 が、TRBP との会合を通じて miRNA サイレンシングの制御にも関与する可能性が考えられた。実際、LGP2 と TRBP の会合は、TRBP に特異的な miRNA 合成を阻害し、その miRNA が本来制御する宿主遺伝子の発現を増強することで、新たな抗ウイルス活性に関与することについて、共同研究を通じて明らかにした (Takahashi et al., 2018, 2020)。

(5) COVID-19 の重篤化には、SARS-CoV-2 感染初期の IFN 誘導の減弱に関与することが明らかになっている。研究代表者らは、令和 2 年度後半に SARS-CoV-2 の感染実験系を構築し、SARS-CoV-2 感染に応答した IFN 誘導および avSG 形成が強力に抑制されていることを確認し、そこに関与するウイルス因子の関与について解析を実施した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Onomoto K, Onoguchi K, Yoneyama M	4. 巻 18
2. 論文標題 Regulation of RIG-I-like receptor-mediated signaling: Interaction between host and viral factors.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 539-555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41423-020-00602-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Yoneyama M, Ui-Tei K	4. 巻 48
2. 論文標題 LGP2 virus sensor enhances apoptosis by upregulating apoptosis regulatory genes through TRBP-bound miRNAs during viral infection.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res	6. 最初と最後の頁 1494-1507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz1143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi K, Onomoto K, Horiuchi M, Kato H, Fujita T, Yoneyama M	4. 巻 517
2. 論文標題 Identification of a new autoinhibitory domain of interferon-beta promoter stimulator-1 (IPS-1) for the tight regulation of oligomerization-driven signal activation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 662-669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.07.099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Murakami F, Komori C, Suzuki Y, Yoneyama M, Ui-Tei K	4. 巻 46
2. 論文標題 LGP2 virus sensor regulates gene expression network mediated by TRBP-bound microRNAs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 9134 ~ 9147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gky575	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Yoneyama M, Ui-Tei Kumiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Virus Sensor RIG-I Represses RNA Interference by Interacting with TRBP through LGP2 in Mammalian Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 E511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes9100511	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Onomoto K, Watanabe M, Takahashi T, Nakano Y, Ui-Tei K, Yoneyama M
2. 発表標題 Functional analysis of TRBP in RLR-mediated antiviral innate immune signal.
3. 学会等名 The 8th Global Network Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Yoneyama M, Ui-Tei K
2. 発表標題 Crosstalk between RNA silencing and the IFN response as an antiviral defense system in mammalian cells
3. 学会等名 The 25 th annual meeting of the RNA society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野口 和英、望月 幸村、米山 光俊
2. 発表標題 ストレス応答性サイトカインによる抗ウイルス自然免疫機構の制御
3. 学会等名 第84回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahashi T, Yoneyama M, Ui-Tei K
2. 発表標題 LGP2 enhances apoptosis mediated by TRBP-bound miRNAs during Sndai virus infection
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋朋子、中野悠子、尾野本浩司、米山光俊、程久美子
2. 発表標題 細胞内ウイルスセンサーLGP2はTRBPとの相互作用を介してRNAサイレンシングを制御する
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 筒場千穂、尾野本浩司、伴万里江、米山光俊
2. 発表標題 RLRシグナル伝達経路に關与するRNA結合タンパク質の新規同定
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾野本浩司、高橋朋子、中野悠子、程久美子、米山光俊
2. 発表標題 avSGを介した抗ウイルス自然免疫の機能解析
3. 学会等名 第83回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野悠子、高橋朋子、尾野本浩司、村上文則、鈴木穰、米山光俊、程久美子
2. 発表標題 LGP2-TRBP相互作用により制御されるmicroRNAの同定と、そのターゲット遺伝子の網羅的発現解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋朋子、中野悠子、尾野本浩司、米山光俊、程久美子
2. 発表標題 ウイルス感染により細胞内ウイルスセンサーLGP2はRNAサイレンシングを介して遺伝子発現ネットワークを制御する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾野本浩司、高橋朋子、中野悠子、程久美子、米山光俊
2. 発表標題 RLRを介した抗ウイルス自然免疫応答におけるTRBPの機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学真菌医学研究センター感染応答プロジェクトホームページ <a href="http://www.pf.chiba-u.ac.jp/project_immuneresponses/">http://www.pf.chiba-u.ac.jp/project_immuneresponses/</a> 千葉大学真菌医学研究センターホームページ <a href="http://www.pf.chiba-u.ac.jp/index.html">http://www.pf.chiba-u.ac.jp/index.html</a>
--



6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	尾野本 浩司  (Onomoto Koji)  (10612202)	千葉大学・真菌医学研究センター・助教     (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関