

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16695

研究課題名(和文) ウイルスに対する自然免疫応答におけるノンコーディングRNAと新規因子の機能解析

研究課題名(英文) The role of small peptide derived from lncRNA on innate immune response.

研究代表者

幸脇 貴久(kouwaki, takahisa)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：90780784

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)：自然免疫はウイルス感染症の最前線で働く。自然免疫センサーがウイルスを認識するとインターフェロン・サイトカインが産生される。ウイルスセンサーにはRIG-I様受容体、Toll様受容体、cGASが存在するが、それらのシグナルはTank binding kinase 1に集約される。まさに、TBK1は自然免疫応答において要の分子であると言える。筆者らは、TBK1と相互作用する新規分子としてlong non-coding RNAから翻訳される低分子ペプチドを同定した。この低分子蛋白質はTBK1を介して自然免疫応答を制御していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルスの世界的大流行など、ウイルス感染症の脅威は人類の社会生活に暗い影を落としている。ウイルスに対する自然免疫応答の制御機構の解明は新たな治療法の開発に有益な知見となる。本研究では、自然免疫シグナル伝達分子であるTBK1について研究を行い、TBK1の働きを制御する新規蛋白質として、long non-coding RNAから翻訳された低分子ペプチドを同定した。低分子ペプチドはウイルス感染に応答して翻訳されTBK1を介してインターフェロンの産生を促進していることが明らかとなった。TBK1の未解明の抗ウイルス機構の一端が解明され今後の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Innate immunity is the first line of defense against viral pathogens. Upon innate immune sensors recognize viruses, interferons and cytokines are elaborate to eliminate the viruses. RIG-I like receptors, cGAS and Toll like receptors detects the viral nucleotides and activate downstream signal cascade. These signals join to the TANK binding kinase 1 (TBK1) and induce Type I interferons. Precisely, TBK1 is essential factor for innate immune responses. Elucidation of the mechanisms of innate immune systems is beneficial to establish newly therapeutic applications. In this study, we identified the small peptide derived from long non-coding RNA (lncRNA) as a binding partner with TBK1. We found that small peptide was generated upon viral infection. Small peptide bound to TBK1. Small peptide stimulates type I interferon promoter activity via TBK1 dependent pathway. Our finding suggest that small peptide derived from lncRNA acts as a type I interferon stimulator along with TBK1 signaling.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 long non-coding RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自然免疫応答は微生物感染に対する防衛の最前線として働く。病原微生物に感染すると、病原体に保存されている固有の分子パターン (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) が宿主の pattern recognition receptors: PRRs によって認識される。PRRs の下流のタンパク質群が自然免疫応答や炎症応答を惹起し病原体の複製を抑制し、病原体の排除を促進する。さらに、自然免疫応答は、感染した病原体に対する宿主の獲得免疫を誘導する。

ウイルス核酸は主要な PAMPs として知られており、感染後に宿主に感知される。細胞外ウイルス RNA は Toll-like receptor 3 (TLR3) によって認識される。その一方で、細胞に侵入したウイルス RNA は RIG-I や MDA5 からなる RIG-I like receptors (RLRs) によって認識される。また、細胞に侵入したウイルス DNA は cGAS によって認識される。これらは TBK1 と呼ばれるリン酸化酵素の活性化を介して、強い抗ウイルス作用を示す I 型インターフェロンの産生を誘導する。つまり、TBK1 は自然免疫では、ウイルス認識シグナルを集約する重要な分子である。申請者は、TBK1 と相互作用する新規分子群を同定する為に酵母 two-hybrid 法を用いたスクリーニングを行い、複数の long non-coding RNA (lncRNA) を単離した。ncRNA は最近の研究からスモールペプチドを産生することが示されている。

2. 研究の目的

我々はこれまで、ウイルス感染に対する自然免疫応答の研究に取り組んできた。今回、lncRNA から、ウイルス感染時特異的にスモールペプチドが産生され、これが、I 型インターフェロン産生を制御する TBK1 分子に作用し、その機能に影響を与えることを発見した。本研究では、「lncRNA 由来のスモールペプチドが TBK1 分子の制御を介したウイルス抑制」という新たな現象のメカニズムと重要性を解明するべく研究を行った。

3. 研究の方法

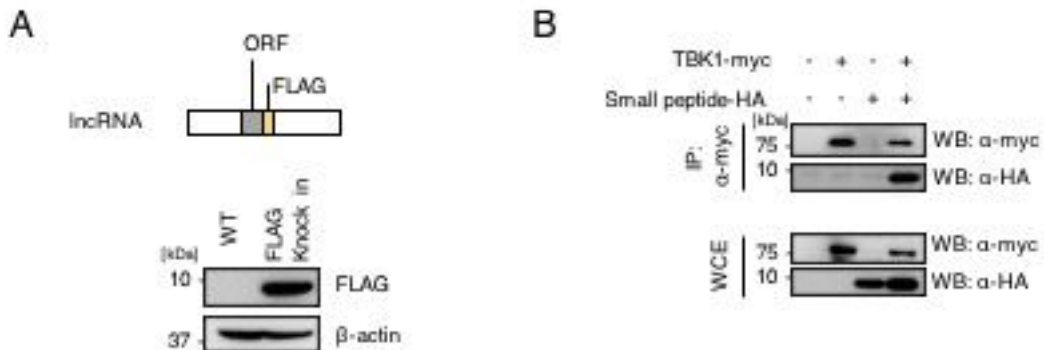
我々が発見した ncRNA から産生されるスモールペプチドが TBK1 の機能を制御し I 型インターフェロン産生を制御する分子メカニズムを解明する為に下記の実験を実施した。

- ・培養細胞において、ノンコーディング RNA からスモールペプチドが翻訳されていることの証明：ノンコーディング RNA 領域において、ORF と予想される領域の 3'末端に FLAG-Tag をノックインし、タンパク質が翻訳されていることをウエスタンブロッティングで確認した。
- ・TBK1 との相互作用の確認：スモールペプチドと TBK1 の結合を免疫沈降で確認した。
- ・ウイルス感染におけるスモールペプチドの発現状態の確認：培養細胞にウイルスを感染させ、経時的にスモールペプチドの mRNA を定量する。
- ・TBK1 を介したインターフェロン産生に及ぼす影響の検討：インターフェロン遺伝子のレポーター遺伝子法を用いて、スモールペプチドの発現が TBK1 を介したインターフェロン誘導に及ぼす影響を調べた。

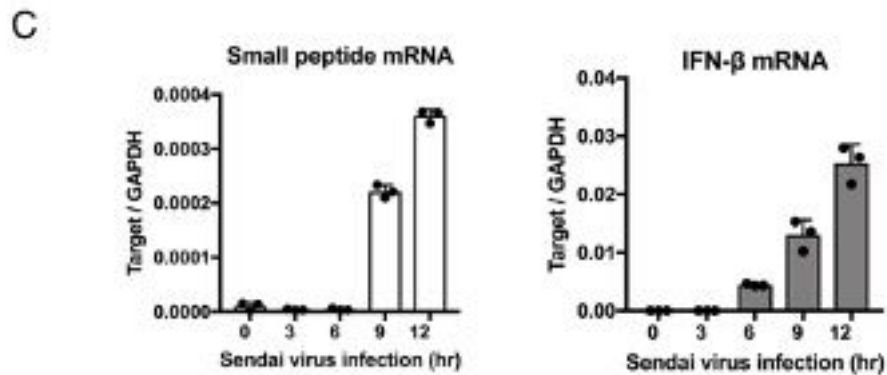
4. 研究成果

本研究で、TBK1 と相互作用する新規分子群を酵母 two-hybrid 法を用いて探索した結果、ノンコーディング RNA から翻訳されたスモールペプチドを同定した。このスモールペプチドが培養細胞で産生されていることを確認するために、lncRNA の ORF と予想される領域の C 末端に

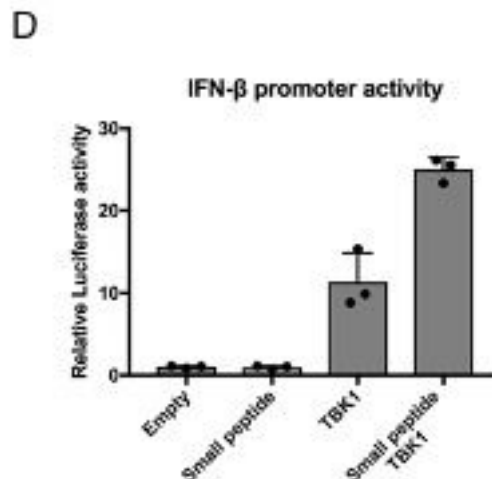
FLAG-Tag をノックインし、lncRNA を培養細胞に発現させた。スモールペプチドの発現をウエスタンブロットングで確認したところ、発現を確認することができた(図 A)。さらに、lncRNA の ORF をクローニングし、スモールペプチドと TBK1 との結合を免疫沈降で確認したところ、両者は相互作用することが分かった(図 B)。



次に、スモールペプチドが TBK1 と相互作用する意義を解明するために、ウイルス感染に対するスモールペプチドの発現状態を検討した。培養細胞にセンダイウイルスを感染させ、スモールペプチドの mRNA を定量した結果、ウイルス感染にตอบสนองして、発現量が上昇していることが分かった(図 C)。



さらに、TBK1 を介したインターフェロン応答におけるスモールペプチドの影響を調べるために、インターフェロンレポーター遺伝子法を行った。TBK1 とスモールペプチドの共発現ではインターフェロン β のプロモーター活性が上昇することが分かった(図 D)。



以上の結果から、ウイルス感染にตอบสนองしてスモールペプチドが産生され、それによって TBK1 を介したインターフェロンシグナルが増強されることが分かった。また、図 C に示したように、

ウイルス感染初期のインターフェロン産生から遅れてスモールペプチドが産生されていることが示唆されていることから、スモールペプチドはインターフェロン刺激に応答して産生されている可能性があることが示唆された。今後は、スモールペプチドによる TBK1 の自己リン酸化や他の分子に与える影響について詳細に解析していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------