

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249023

研究課題名(和文) ウイルスによるRNAファクトリーの形成誘導と自然免疫応答

研究課題名(英文) Viral RNA factory formation and activation of antiviral innate immunity

研究代表者

藤田 尚志 (Fujita, Takashi)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：10156870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,100,000円、(間接経費) 11,430,000円

研究成果の概要(和文)：宿主に侵入したウイルスRNAは細胞質でRIG-I like receptor (RLR) によって感知され、抗ウイルス自然免疫応答が誘導されるしかし、RLRがどこでウイルスを感知するかは不明であった。本研究ではウイルス感染がウイルスRNA/蛋白質凝集体を誘導しその中でRLRが感染を感知することを見出し、この凝集体をantiviral stress granule (avSG)と命名した。一方ウイルスはavSG形成を阻害して免疫応答から逃れていることを発見した。多くのウイルス感染では宿主の二重鎖RNAセンサーであるPKRならびにDHX36がavSG形成誘導に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Invading viral RNA is sensed by RIG-I-like receptor (RLR) in the cytoplasm and antiviral innate immunity, including production of interferon, is induced. It was unclear where RLR senses viral RNA. We found that viral infection induces RNA-protein aggregates, in which RLR is recruited and acts as a platform for viral RNA sensing. We termed this aggregate as antiviral stress granule (avSG). We also found that several viruses actively inhibit avSG to facilitate their replication. Our findings also include that the double-stranded RNA sensors, PKR and DHX36 play critical roles in the formation of avSG.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ストレス 感染症 免疫学 ウイルス インターフェロン 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

2004年に我々が RIG-I とそのファミリー (MDA5 および LGP2 : RIG-I like receptor, RLR と総称される) が細胞質のウイルス RNA センサーとして機能していることを発表して以来、RLR は世界的に注目され、多くのウイルス学者、免疫学者によって研究が行われた。多くのウイルスが作り出す RNA 分子が RLR によって認識され、インターフェロン (IFN) 産生をはじめとする抗ウイルス自然免疫応答が引き起こされることが明らかになっている。すなわち RLR はウイルス RNA に特徴的な構造 (宿主の細胞質に存在する RNA にはない特徴、例えば二重鎖構造や 5'-ppp 構造、非自己 RNA と呼ばれる) を認識して一連のシグナルを伝達するセンサーであることが明らかとなった。ウイルスの種類によって産生される非自己 RNA の構造は必ずしも同一ではなく、複数の構造パターンが認識されていると考えられている。また RLR のファミリーが異なるパターンの認識に関与することも明らかとなっている。RLR のシグナルに関しては IPS-1 をはじめとして多くのシグナルアダプターが機能していることが明らかになった。しかしながら複製しているウイルスをどのようにして RLR が感知するかについては不明な点が多い。特にウイルスは細胞のオルガネラを乗っ取ることによって特定の場所で複製を行うことが知られているが、RLR がどのようにしてその「場」へたどり着き、認識を行うのかは全くの謎であった。

2. 研究の目的

感染したウイルスが複製する細胞内の「場」と自然免疫の RNA センサーがウイルス RNA を捉える「場」の関係を明らかにすること、またその結果誘導される抗ウイルス応答がどのようにウイルス増殖を制御しているかを明らかにすることを目的とした。

更にウイルスは免疫応答を阻害することによって自らの増殖を保証している。ウイルスのどのような機構が細胞の免疫カスケードのどこを阻害するのかを解明することを目的とした

3. 研究の方法

RLR を特異的に認識する抗体を作成し、細胞内局在、免疫沈降法に用いて解析を行なった。また市販の抗体のうち特異的にストレス顆粒構成成分を認識する抗体を購入して解析を行なった。免疫応答で機能する各種制御蛋白質をプラスミドを用いた過剰発現、あるいは siRNA を用いたノックダウン、ノックアウトによってその機能を解析した。ストレス顆粒の生細胞での動態は蛍光蛋白質とストレス顆粒マーカー蛋白質の融合蛋白質を作製し、ウイルス感染後の動態を高解像度顕微鏡によって解析した。

4. 研究成果

RLR と PKR は抗ウイルスストレス顆粒 (avSG) に共局在し、ウイルス感知と自然免疫誘導に重要な機能を果たしている。

RLR に対する特異抗体を用いて細胞内局在を解析した所、RLR は通常細胞質全体に分布しているがウイルス感染細胞では顆粒状の凝集体に局在することが明らかとなった。子の下流を更に分析した所、多くのストレス顆粒マーカー、抗ウイルス蛋白質 (PKR, OAS, RNaseL など) ウイルス RNA が共に凝集していた。このことからウイルスによって形成されるこの下流を antiviral stress granule (avSG) と名付けた。非構造蛋白質 1 (NS1) を欠くインフルエンザウイルス A (IAV) は効率良く IFN 産生、avSG 誘導を引き起こしたが、NS1 を発現するウイルスはいずれの応答も強く減弱していた。ストレス顆粒形成に重要な分子である G3BP1 や PKR をノックダウン

すると avSG 形成および IFN 産生が強く阻害されウイルス増殖が促進された。さらに二重鎖 RNA をトランスフェクションで細胞内に導入して IFN 誘導を行なう系で検討したところ、avSG 誘導は効率的な IFN 産生に必要であることが明らかとなった。これらのことより avSG は RLR がウイルス RNA を非自己と認識する場であることが強く示唆された。

脳心筋炎ウイルス (EMCV)

avSGは前述の様にRLRがウイルスRNAを感知する場として重要と考えられる。IAVのNS1はavSGの形成を強く阻害してウイルスの増殖を促進している。蛍光蛋白質で標識したavSGマーカーであるG3BP1を安定に発現する細胞株を作製し、各種ウイルス感染に対するavSG形成応答を検討した。その結果ウイルスによって次の4つの結果が観察された。1) 形成されない、2) 安定的な形成、3) 一過性の形成、4) 形成消失を繰り返す。そのうち、一過性のavSG形成を示すEMCVについて詳しく解析を行なった。その結果、EMCVは感染後期(>8 h)にG3BP1を切断することによってavSGの形成を阻害していることが明らかとなった。変異を導入し切断抵抗性になったG3BP1を安定に発現した細胞を樹立し、EMCV感染した所、avSGは恒常的に形成され、同時にIFN産生も特に感染後期で増加していた。さらにG3BP1をノックダウンすると、IFN産生が低下し、ウイルスの増殖が増加することが明らかとなった。以上の結果よりavSGは抗ウイルス自然免疫の要であることを示している。また各種のウイルスは宿主のストレス応答並びに自然免疫応答を阻害する術を獲得することによりその増殖を保証していると考えられた。

抗ウイルス自然免疫におけるDHX36の新たな機能

RLRはDEXD/H-box RNAヘリカーゼスーパーファミリーに属する。このスーパーファミリーに属する別の蛋白質であるDHX36に注目して解析を行なった。その結果、DHX36はウイルス感染時にavSGを誘導するPKRの制御に関わっていることが判明した。

二重鎖RNA存在下でDHX36とPKRは複合体を形成する。この複合体形成の結果、PKRの二重鎖RNAへの結合ならびに燐酸化が強く促進された。またこの促進にはDHX36の触媒活性(ATPase/helicase activity)が必要であることが強く示唆された。DHX36のノックアウト細胞はIFN産生が著しく低下するとともにRNAウイルスに対する抵抗性も低下しており、生理的に重要な機能を果たしていると考えられた。以上より、DHX36の新たな機能、すなわち、ウイルス感染細胞でPKRを活性化することによってavSGを形成し、RLRによるウイルスRNAの感知を促進することが明らかとなった。

抗ウイルスシグナルアダプタ分子IPS-1の活性制御機構

RLRsは下流のアダプター分子であるInterferon- β promoter stimulator-1 (IPS-1、別名MAVS、VISA、Cardif)を通じて転写因子であるIRF3やNF- κ Bなどを活性化し、I型インターフェロン(IFN)や炎症性サイトカインの産生を介して抗ウイルス自然免疫応答を惹起する。IPS-1は膜貫通(transmembrane: TM)ドメインによってミトコンドリアに局在しており、ウイルスを認識し活性型となったRLRとそれぞれのcaspase activation and recruitment domain (CARD)を通じて結合したのち多量体化し、相互作用分子と複合体を

形成して転写因子の活性化を誘導していると考えられているが、そのシグナル伝達機構の詳細は議論の余地が多く残されていた。そこで、IPS-1のシグナル伝達機構の詳細を明らかにするため、IPS-1の多量体形成を薬剤を用いて誘導する実験系を確立した。これを用いた解析により、IPS-1の薬剤依存的な多量体化によって抗ウイルス応答を誘導できることを示した。さらにIPS-1のシグナル伝達に必要な最小領域については多くの報告がなされているが、統一した見解に至っておらず、この実験系を用いてその解明を試みた。その結果、CARDおよびTMドメインを欠損した変異体IPS-1、すなわち細胞質に存在しミトコンドリア膜上の蛋白質との相互作用のない状態においても、強制的な多量体形成下では抗ウイルス応答誘導能を持つことを明らかにした。そこで、下流へのシグナル伝達に必要な領域を特定するため、CARDおよびTMドメイン以外の領域の欠損変異体を同様に解析した。その結果、TMを含まないC端側領域(400~465アミノ酸)をもつような変異体では多量体化依存的にIFN- β 及びIL-6の発現が誘導され、この領域に存在するTRAF6の結合モチーフに点変異を導入するとIFN- β およびIL-6の発現が消失することを見出した。このことは、C端側領域のTRAF6結合モチーフがIPS-1の下流へのシグナル伝達に必要な最小限の領域であることを示唆している。以上の結果から、IPS-1の多量体化の重要性が確認され、そのシグナル伝達機序が明らかとなった。

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8件)

Ouda, R., Onomoto, K., Takahasi, K., Edwards, M.R., Kato, H., Yoneyama, M. and Fujita, T.: Retinoic Acid-inducible Gene I-inducible

miR-23b Inhibits Infections by Minor Group Rhinoviruses through Downregulation of the Very Low Density Lipoprotein Receptor. *J. Biol. Chem.* 286, 26210-219 (2011) 査読有り

Kato, H., Takahasi, K. and Fujita, T.: RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunological Reviews* 243, 91-98 (2011) 査読有り

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.* 2012;7(8):e43031. doi: 10.1371/journal.pone.0043031 査読有り

Ng C-S., Kato H. and Fujita T.: Recognition of viruses in the cytoplasm by RLRs and other helicases-how conformational changes, mitochondrial dynamics and ubiquitination control innate immune responses. *International Immunology* 24, 739-749 (2012) 査読有り

Takamatsu S, Onoguchi K, Onomoto K, Narita R, Takahasi 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.* 2013;8(1):e53578. doi: 10.1371/journal.pone.0053578. Epub 2013 Jan 7. 査読有り

Ng C-S, Jogi M, Yoo J-S, Onomoto K, Koike S, Iwasaki T, Yoneyama M, Kato H., Fujita T.: Encephalomyocarditis Virus Disrupts Stress Granules, the Critical Platform for Triggering

Antiviral Innate Immune Responses. Journal of Virology 87, 9511-9522 (2013) 査読有り

Fung G, Ng C-S, Zhang J, Shi J, Wong J, Piesik P, Han L, Chu F, Jagdeo J, Jan E, Fujita T, Luo H: Production of a Dominant-Negative Fragment Due to G3BP1 Cleavage Contributes to the Disruption of Mitochondria-Associated Protective Stress Granules during CVB3 Infection . PLoS ONE 8(11): e79546.

doi:10.1371/journal.pone.0079546 (2013) 査読有り

Yoo, J-S., Takahasi, K., Ng, CS., Ouda, R., Onomoto, K., Yoneyama, M., Lai, J-C., Lattmann, S., Nagamine, Y., Matsui, T., Iwabuchi, K., Kato, H. Fujita, T. (2014) DHX36 Enhances RIG-I Signaling by Facilitating PKR-Mediated Antiviral Stress Granule Formation. PLoS Pathog 10(3): e1004012. doi:10.1371/journal.ppat.1004012 査読有り

〔学会発表〕(計18件)

Fujita T.: Antiviral Innate Immunity Induced by RIG-I-Like Receptors. Inter-University Biochemistry Postgraduate Symposium in Hong Kong June 11, 2011 Hong Kong

Fujita T.: Non-self RNA Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. CSH Asia Conferences Infection and Immunity September 8-12, 2011 Suzhou, China

Fujita T.: Viral replication and its detection by RIG-I-Like Receptors: Formation of RIG-I granules and signal transduction through mitochondrion. International Union of Microbiological Societies Congresses 2011 September 13, 2011 Sapporo, Japan

Fujita, T.: Viral replication and its detection by RIG-I-Like Receptors: Formation of RIG-I granules and signal transduction through mitochondrion. 2011 International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction November 19-20, 2011 Tainan, Taiwan

Watanabe T, Miyata N, Kato H, Fujita T.: Recognition of Green Pepper dsRNA by Viral RNA Sensor. 10th NTU-KU Joint Symposium on Molecular and Cell Biology 1. 5-9 2012 Taipei, Taiwan

Fujita, T.: Sensing Viral RNA in Cytoplasm and Activation of Antiviral Innate Immunity. Innate Immunity: Sensing the Microbes and Damage Signals, Keystone Symposia, March 5, 2012 Keystone Colorado, USA

Fujita, T: Antiviral Innate Immunity: Control of Interferon Production. NF-kappaB Signaling and Biology: From Bench to Bedside, Keystone Symposia, March 20, 2012 Whistler, British Columbia, Canada

Fujita, T: Sensing viral RNA in cytoplasm and activation of the interferon system: April 3-5 ICGEB Workshop "Human RNA Viruses" Buenos Aires, Argentina

Yoo J-S, Kato H, Nagamine Y, Fujita T.: DHX36 regulates innate immunity by mediating of PKR-RIG-I axis signaling pathway. 6.21 2012 第77回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会

高松詩穂里、尾野本浩司、小野口和英、米山光俊、加藤博己、藤田尚志：抗ウイルス自然免疫応答におけるアダプター分子IPS-1のシグナル伝達機構の解析 2012 6.21 第77回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会

呉成旭、尾野本浩司、高橋清大、石館文善、加藤博己、藤田尚志：ウイルスNPによる顆粒形成の機構と生理的機能の解析 2012 6.21 第77回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会

Fujita T.: Cytoplasmic sensing of viral RNA by RIG-I-like receptors. August 27-Sept 1 2012 Non-self RNA sensing in virus infected cells and activation of antiviral immunity. Les Treilles, France

Go S, Onomoto K, Ishidate F, Kato H, Fujita T.: Mechanism and Physiological Role of Granules Formed by Viral Nucleocapsid Protein. 9. 11-14 2012 The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji

Vo DN, Kato H, Fujita T.: The anti-tumor agent DMXAA induces IFN- β response via STING. 9. 11-14 2012 The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji

Ng C-S, Kato H, Fujita T.: Inhibition of virus-induced interferon gene activation through modulation of cytoplasmic stress granules by a viral protease. 10. 16-19 2012 The 34th Naito Conference on Infection, Immunity and their Control for Health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine, Sapporo

Fujita T.: Detection of cytoplasmic non-self RNA and activation of antiviral innate immunity.

October 23-26 2012 International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting 2012, Tokyo

Fujita T.: Size-dependent sensing of viral RNA during antiviral responses. Positive strand RNA Viruses Keystone Symposia, April 28-May 3, 2013, Boston USA

Fujita T.: Regulation of antiviral innate immunity by RIG-I-like receptors. The NF- κ B system in health and disease, Keystone Symposia, February 23-28, 2014, Keystone USA

〔図書〕(計1件)

Seiji P. Yamamoto, Ryo Narita, Seigyoku Go, Kiyohiro Takahashi, Hiroki Kato and Takashi Fujita: Intracellular Viral RNA Sensors: RIG-I Like Receptors in Nucleic Acid Sensors and Antiviral Immunity, Ed. Suryaprakash Sambhara and Takashi Fujita (2011)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
なし

取得状況(計0件)
なし

〔その他〕

ホームページ
<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/bunshiden2012/Japanese/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 尚志 (FUJITA Takashi)
京都大学・ウイルス研究所・教授
研究者番号：10156870

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

加藤 博己 (KATO Hiroki)
京都大学・ウイルス研究所・准教授
研究者番号：10597173

高橋 清大 (TAKAHASHI Kiyohiro)
京都大学・ウイルス研究所・助教
研究者番号：90399965