

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25253030

研究課題名(和文) 抗ウイルス状態の誘導を増強する新たな転写後制御メカニズム

研究課題名(英文) The novel post-transcriptional regulation mechanism of antiviral host defense

研究代表者

高岡 晃教 (Takaoka, Akinori)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：30323611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス感染は、歴史的にもこれまで我々人類に対して大きな問題であり、ウイルス感染に対して生体がどのように生体防御機構を発揮するかについて解明することは、感染症制御という観点から重要な課題である。本研究では、PARP13のshort isoformであるZAPSがIFNによって誘導される遺伝子群(ISGs)として知られているRSAD2 mRNAの安定性に寄与することを見いだした。これはこれまで知られていたmRNAの転写によって発揮される抗ウイルス応答とは異なった、RNA転写後によって制御される新しい抗ウイルス応答であることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Viral infection is one of the most critical problems for our health. Elucidation of host immune response against invading viruses is crucial for better understanding of the pathological processes and viral elimination to control viral infection. In this study, we reveal that PARP-13 shorter isoform (ZAPS) is involved in the post-transcriptional regulation of RSAD2 mRNA, one of the interferon-stimulated genes, which provide a novel host defense mechanism for elimination of viruses.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 ウイルス感染 抗ウイルス効果 RNA転写後制御

1. 研究開始当初の背景

感染は、歴史的にもこれまで我々人類に対して大きな問題として捉えることができる。なかでもウイルス感染は、近年のインフルエンザウイルスの流行をはじめ、麻疹・風疹ウイルス、新興ウイルスの問題など、その影響力は甚大であり、ウイルス感染のコントロールに対する社会的な要求性も高い。ウイルス感染は、耐性出現の問題など、有効な抗ウイルス薬の開発には大きな問題も多い。このような背景の中で、研究代表者はこれまでの自然免疫研究の成果を生かし、感染防御機構の分子メカニズムを明らかにすることで、ウイルス感染のコントロールにつながる新しい切り口を見出したいと考えている。

これまで研究代表者は、とくに I 型インターフェロン (IFN) に着目して研究を進めて参りました (Takaoka, A. et al., Science, 288, 2357-60, 2000 ; Takaoka, A. et al., Nature, 424, 516-26, 2003 ; Takaoka, A. et al., Nature, 434, 243-9, 2005 ; Takaoka, A. et al., Nature, 488, 501-505, 2007) . また、ポリ (ADP-ribose) ポリメラーゼスーパーファミリー (Schreiber, V. et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 7, 517-528, 2006) に属する PARP-13 の short isoform が、ウイルス認識に關与する重要な細胞質 RNA センサーである RIG-I と会合することを見出し、新たに「ZAPS (ZAP, short form) 」という形で報告しました (Hayakawa, S., et al. Nat. Immunol., 12, 37-44, 2011) . ZAPS は RIG-I 及び下流のシグナル経路の活性化を強力に誘導する正の制御因子であることを明らかにしました。一方、さらに解析を進めていく過程で、ZAPS は、RIG-I シグナルでの役割以外に、自然免疫系におけるウイルス防御での新たな役割が見えてきました。とくに ZAPS は miRNA 活性を誘導させるための Argonaute (AGO) 分子と会合していることを見出しており、RNA サイレンシングの制御を介した抗ウイルス状態の誘導に關わる ZAPS のユニークな作用メカニズムを明らかにし、これまでとは異なった視点から抗ウイルス応答を誘導し、ウイルス感染制御につながるアプローチを提案したいと考えた。

2. 研究の目的

研究代表者が独自に報告したポリ (ADP-ribose) ポリメラーゼスーパーファミリーメンバーである ZAPS 分子の新たな役割として RNA サイレンシングの制御因子として機能する可能性が示唆された。ZAPS に着目して更に解析を進め、ウイルス感染防御の今までに無いメカニズムとして、RNA サイレンシングの脱制御による“antiviral transcriptome”の活性化という新たな概念を提示したい。更に感染以外のストレス刺激に対する細胞応答時に作動する RNA サイレンシング制御因子を ZAPS 以外にも探索し、様々な“sub-transcriptome”の存在を追求した

い。ひいては、細胞応答時のタンパク質発現誘導の基盤的な機序として知られている転写因子による制御とは別に、特定のサブセットのタンパク質誘導をもたらす新しい転写後制御機構の存在を示すことを目指した。

3. 研究の方法

ZAPS の RNA との会合性についての解析：ここでは 2 つの方法で確認する。1 つは、ZAPS を免疫沈降して RNA を抽出する RIP (RNA-IP) アッセイを行う。もう 1 つは、RNA をビオチン化させ、アビジンビーズを用いて RNA で pull down させることで RNA に ZAPS タンパク質が結合する pull down assay を行うことで ZAPS と RNA との会合性を確認する。

ZAPS と会合する宿主由来の mRNA サブセットの網羅的同定：HITS-CLIP (high-throughput RNA sequencing of cross-linked immunoprecipitation) のアプローチを用いて、ZAPS に結合・制御されていると考えられる mRNA を網羅的に解析する。

同定された mRNA 群と ZAPS との会合特性についての解析：得られた同定された mRNA 群と ZAPS との会合について、まず、各 mRNA 側のどの領域を介して結合するののかについて調べる。一方で、RNA との会合に必要な ZAPS 側の領域についても各種 deletion mutants を作製し、免疫沈降などの解析を行って決定する。

4. 研究成果

まずはじめに ZAPS と RNA 結合性について、検証した。HEK293T 細胞に、HA タグを融合した ZAPS を過剰発現した lysate を用いて RIP assay を行った。HA 抗体で免疫沈降し、免疫沈降したサンプルより RNA 抽出を行ったところ、コントロールにおいては、ほとんど RNA が認められなかったが、ZAPS を HA 抗体で免疫沈降したサンプルは多くの RNA 量が得られた。一方で、細胞の total RNA をビオチン標識し、アビジンビーズを用いた RNA pull down を行った。コントロール (ビーズのみ) においては ZAPS の結合は認められなかったが、total RNA に対しては ZAPS の結合が認められた。以上の結果から、ZAPS は細胞内の RNA が結合することが示唆された。

次に、ZAPS のどのドメインが RNA 結合性に關与するののかについて ZAPS の各種 deletion mutant を用いて同様に検証したところ、ZAPS の N 末端側にある Zinc finger domain を含む領域で RNA と会合することが示された。

ZAPS は IFN によって誘導される遺伝子であることから、IFN 誘導遺伝子 (interferon stimulated genes; ISGs) が ZAPS に結合することが予想された。そこで、RIP assay にて精製した RNA 中に ISGs が含まれるのかについて定量的 RT-PCR 方にて解析を行った。

その結果、ZAPS は、IFN- 処理 8 時間後に、RSAD2, PKR, IFIT1, IFIH1 といった複数の ISG mRNA との結合性が増強することが観察さ

れた。

ZAPSを過剰発現したHEK293T細胞を用いたマイクロアレイ解析の結果から、*RSAD2*の発現が顕著に上昇していたことから、本研究では*RSAD2* mRNAに着目し、ZAPSが*RSAD2* mRNAの安定性に寄与する可能性を考えた。

はじめに、ZAPSが*RSAD2* mRNAのどの領域に結合するかについてRIP assayを用いて検証したところ、*RSAD2* mRNAの3' UTRの3'側の境域側であることが示唆された。

次に、ZAPSが*RSAD2* mRNAの安定性に関与するかを検証するために、siRNAを用いてZAPSをノックダウンしIFN- α によって誘導される*RSAD2* mRNAがどのように変化するかを定量的RT-PCR法を用いて検証した。その結果、ZAPSのノックダウンによってIFN処理8時間後*RSAD2* mRNAの発現が約半分に低下することが分かった。またこれに相関してIFN処理24時間後のタンパク量が減ることが見出された。一方で、*RSAD2* promoter領域(-1597から+136まで)をcloningして、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、IFN処理によって活性化される*RSAD2* promoter活性は、ZAPSのノックダウンによって変化しなかった。

以上のことから、ZAPSは、*RSAD2*の3' UTRに結合することで発現を制御していることが示唆された。

さらに詳細な発現調節機構を解析するために、アクチノマイシンDを用いて*RSAD2* mRNAの安定性を検証したところ、ZAPSのノックダウンによって*RSAD2* mRNAの安定性が低下することが観察された。一方で、*RSAD2* mRNAの前駆体であるpre-mRNAを測定したところ、ZAPSのノックダウンで、pre-mRNAの発現量に顕著な差がなかったことから、pre-mRNA下流でZAPSは作用していることが示唆された。一方で、細胞を細胞質と核に分画し、それぞれの分画中に含まれる*RSAD2*を含むISGs mRNAsの量を定量したところ、ZAPSのノックダウンにより大きな変化が認められなかったことから、ZAPSはmRNAの核外輸送に制御する可能性は低いと考えられた。

そこで、ZAPSが*RSAD2* mRNAの3' UTR領域を介してmRNAの安定性に寄与するのかを調べる目的で、*RSAD2* mRNAの3' UTR領域をレポーター遺伝子下流につなぐことで、どの領域を介してZAPSが制御しているかについて検証したところ、ZAPSは、3' UTRの3'側の境域を介してmRNAの安定性に寄与していることが考えられた。

またこれまでZAPSのノックダウンの実験系で検証してきたが、より詳細な解析を行うために、A549細胞を用いてCrispr/Cas9システムで細胞内RNA認識経路のアダプター分子であるMAVSをノックアウトした細胞(KO細胞)を作製した。さらにこのKO細胞からZAP/ZAPSをノックアウトしたダブルノックアウト細胞(DKO細胞)を樹立した。これらの細胞を用いてIFN- α 処理によって誘導され

るISG mRNAの誘導について比較検証している。

さらに本研究ではZAPSに結合するRNAがどのような種類のRNAなのかを網羅的に同定するために、HITS-CLIP assayを用いてZAPSに結合するRNAを次世代シーケンサーを用いて同定することを試みた。ZAPSを過剰発現したHEK293T細胞にUVクロスリンカーを用いてUV照射を行い、ZAPSとそこに結合するRNAをクロスリンクした。その後、免疫沈降法にてZAPSを精製した。このZAPSに結合したRNAをRIを用いてラベリングを行い精製し、5'と3'側にアダプターをligationした。このRNAを逆転写し、PCRにて増幅しCLIP-tagをPAGE精製した。精製したCLIP-tagはillumina HiSeq 2500を用いてsequence解析を行った。現在このdataを用いてシーケンスの詳細を解析しているところである。

これらの成果を現在まとめつつ論文の投稿にむけて準備を進めているところである。

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6件)

Kumari P, Saha I, Narayanan A, Narayanan S, Takaoka A, Kumar NS, Tailor P, Kumar H: Essential role of HCMV deubiquitinase in promoting oncogenesis by targeting anti-viral innate immune signaling pathways. Cell Death Dis. 査読有, 8, e3078, 2017 DOI:10.1038/cddos.2017.461

Li MM, Lau Z, Cheung P, Aguilar EG, Schneider WM, Bozzacco L, Molina H, Buehler E, Takaoka A, Rice CM, Felsenfeld DP, MacDonald MR: TRIM25 Enhances the Antiviral Action of Zinc-Finger Antiviral Protein (ZAP). PLoS Pathog. 査読有, 173, e1006145, 2017 DOI:10.1371/journal.ppat.1006145

Yamada T, Horimoto H, Kameyama T, Hayakawa S, Yamato H, Dazai M, Takada A, Kida H, Bott D, Zhou AC, Hutin D, Watts TH, Asaka M, Matthews J, Takaoka A: Constitutive aryl hydrocarbon receptor signaling constrains type I interferon-mediated antiviral innate defense. Nat Immunol. 査読有, 17, 687-694, 2016. DOI:10.1038/ni.3422

Bhattacharya A, Hegazy AN, Deigendesch N, Kosack L, Cupovic J, Kandasamy RK, Hildebrandt A, Merkler D, Kühl AA, Vilagos B, Schliehe C, Panse I, Khamina K, Baazim H, Arnold I, Flatz L, Xu HC, Lang PA, Aderem A,

Takaoka A, Superti-Furga G, Colinge J, Ludewig B, Löhning M, Bergthaler A: Superoxide dismutase 1 protects hepatocytes from type I interferon-driven oxidative damage. *Immunity*. 査読有, 43, 974-986, 2015. DOI:10.1016/j.immuni.2015.10.013
Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K, Tsutsumi S, Sato Y, Akita H, Wakita T, Rice CM, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y, Takaoka A: The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity*. 査読有, 42, 123-132, 2015. DOI:10.1016/j.immuni.2014.12.016
Ito K, Morimoto J, Kihara A, Matsui Y, Kurotaki D, Kanayama M, Simmons S, Ishii M, Sheppard D, Takaoka A, Uede T: Integrin $\alpha 9$ on lymphatic endothelial cells regulates lymphocyte egress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 査読有, 111, 3080-3085, 2014. DOI:10.1073/pnas.1311022111

〔学会発表〕(計 11 件)

Takaoka A: Regulatory mechanisms of virus-activated nucleic acid sensor signalings. KAI International Meeting 2017.11.8-10, Korea. (招待講演)
Takaoka A: Innate sensor-mediated signaling for interferon induction during viral infection. 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society 2017.10.29-11.2, 金沢. (招待講演)
Takaoka A: Regulation of nucleic acid sensing pathway for antiviral defense. CSI Congress on Immunology 2016.11.4-7, China. (招待講演)
Takaoka A: Constitutive AHR signalling modulates antiviral IFN response via TIPARP ADP-ribosyltransferase. EMBO/EMBL Symposium Innate Immunity in Host-Pathogen Interactions 2016.6.26-29, Heidelberg, Germany. (招待講演)
Takaoka A: RIG-I-mediated response against HBV infection. 4th TAIWAN-KOREA-JAPAN Research Symposium on Hepatitis B Virus, 2016.4.9-10, Taiwan. (招待講演)
Takaoka A: Innate sensor-mediated IFN antiviral response and its regulatory mechanism. Einladung zum gemeinsamen COLLOQUIUM (Invited Speaker Seminar) 2016.2.25, Vienna. (招待講演)

Takaoka A: Tumor suppressive effect driven by cytoplasmic RNA-mediated innate signaling. 8th Euro Global Summit on Cancer Therapy. 2015.11.3-5, Valencia, Spain. (招待講演)

Takaoka A: Dual function of RIG-I RNA helicase as an innate sensor and as a direct antiviral effector during hepatitis B virus infection. 15th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases. 2015.6.26-28, Berlin, Germany. (招待講演)

Takaoka A: Cytoplasmic RNA sensor RIG-I dually mediates antiviral activities during HBV infection. 2nd World Conference on Targeting Liver Diseases, 2015.6.25-26, St Julian's, Malta. (招待講演)

Takaoka A: Direct and indirect roles of RIG-I for antiviral defense against hepatitis B virus in human hepatocytes. International Conference on Antimicrobial Research, 2014.10.1-3, Madrid-Spain. (招待講演)

Takaoka A. Innate immune signaling networks during host-microbe interaction. CeMM Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences. 2013.7.1, CeMM Vienna, Austria. (招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.igm.hokudai.ac.jp/sci/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高岡 晃教 (TAKAOKA, Akinori)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：30323611

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()