

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293101

研究課題名(和文) RIG-I-like受容体によるウイルスRNP認識の分子機構と生理機能

研究課題名(英文) Molecular mechanism of viral RNP recognition by RIG-I-like receptors

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) 12,400,000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であるRIG-I-like receptor (RLR)によるウイルスリボ核蛋白質複合体(RNP)の認識機構について、主にRIG-Iに注目してin vitroの再構成系を用いて解析することで、宿主によるウイルス感染検知の分子機構を詳細に明らかにすることを目的とした。人工A型インフルエンザウイルス(IAV)RNPをモデルとし、RIG-Iによる認識について検討した結果、IAV RNPがRIG-Iを活性化し得ることが明らかになった。一方で、宿主因子の関与を示唆する結果も得られており、その同定と機能解析が重要な課題であることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：In order to understand how viral RNA sensors, RIG-I-like receptors (RLRs), recognize viral ribonucleoprotein complexes (RNPs) in virus-infected cells, we assessed activation of RIG-I-mediated signaling by viral RNPs using in vitro reconstitution assay system. As a model RNPs, we prepared artificial RNPs of influenza A virus (IAV). In vitro assay indicated that RIG-I-mediated signaling is activated by IAV RNPs, however the data also suggest that host factor(s) is required for full-activation of the signal. The observations would help us to reveal a molecular machinery of activation of anti-viral innate immune responses.

研究分野：分子生物学

キーワード：ウイルス 免疫学 核酸 RNA結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) ウイルス感染症は、ウイルス増殖と宿主の生体防御を介したウイルス増殖抑制の平衡の破綻によるものと理解できる。従って、多くのウイルス感染症に対する治療法や予防法を開発するためには、個々のウイルスの生活環や病原性を理解すると同時に、感染によって惹起される生体防御機構およびウイルスと宿主との相互関係を明らかにすることが必須である。感染初期に発動する自然免疫システムは、感染を速やかに検知してウイルス排除を行うという点で重要であると同時に、その後に誘導されてくる獲得免疫システムの制御にも深く関わっているため、その解析は広く“生体防御”を理解するうえで必須である。近年、細胞内外で働く種々の自然免疫系感染パターン認識受容体分子 (Pattern recognition receptor: PRR) が同定され、それらによる感染検知の分子機構、シグナル制御、免疫制御における生理機能などが明らかにされてきた。ウイルス感染の場合、感染は主にウイルス由来の核酸がパターンとして認識され、I型インターフェロン (IFN) などのサイトカインの発現誘導を介して、ウイルスの排除および免疫制御が行われることが明らかになっている。

(2) 申請者はこれまでに、ウイルス感染にตอบสนองした自然免疫誘導に必須な役割を担っている PRR として、非自己 RNA センサーである RIG-I-like 受容体 (RLR) を同定し、その生理機能を明らかにしてきた (Yoneyama et al., *Nat. Immunol.*, 2004)。DEXD/H 型 RNA ヘリカーゼである RLR は、ウイルス感染によって細胞質に出現する非自己 RNA として特徴的な二重鎖 RNA 構造を認識し、ATP 依存的な分子内構造変化を介して活性化状態へ移行し、ミトコンドリア外膜に発現するアダプター分子である IPS-1 との会合を介して、核内へシグナルを伝達する。また三種の RLR (RIG-I, MDA5, LGP2) のうち、RIG-I と MDA5 はそれぞれが異なった基質特異性を持ち、異なったウイルス種を検知することを明らかにしてきた (Yoneyama et al., *J. Immunol.*, 2005; Kato et al., *Immunity*, 2005; Kato et al., *Nature*, 2006)。一方で、我々を含めた解析の多くは、主に合成 RNA やウイルス感染細胞由来の RNA といった精製した RNA を基質として用いたものであり、実際にウイルス感染細胞内でどのようにウイルス RNA が検知されているのかについては未だ不明な点が多い。特に、RNA ウイルスはそれぞれが多様な増殖様式を持ち、感染細胞内では固有の RNA-タンパク質複合体 (RNP) として異なる場所に存在すると考えられ、それらがわずかに三種の RLR によって認識されているという事実は、そこにウイルス種に依存しない普遍的な外来性ウイルス RNP 検知の分子機構が存在することが想像される。

(3) 申請者らは、基盤研究 (B) (2011~2014) 「感染センサーによるウイルスリボ核タンパク質複合体 (RNP) 認識機構の解析 (23390108)」において、RIG-I によるウイルス RNP 認識機構を明らかにする目的で、*in vitro* での再構成実験系を構築し、そこに A 型インフルエンザウイルス (IAV) のモデルウイルス RNP を導入することにより、RIG-I シグナルの活性化を検出することができることを明らかにし、本研究の基礎となる報告を行っている。

2. 研究の目的

本研究計画では、ウイルス感染細胞内における RLR によるウイルス RNP 認識の分子機構をさらに解析し、そこに存在する分子機構を明らかにすることを目的とする。特に、複数の *in vitro* 実験系を用いた解析により、IAV RNP をモデルとして、RIG-I によるウイルス RNP 認識を再構成すると共に、そこに関与する可能性のある宿主タンパク質の同定と機能解析へつながる知見を得ることにより、ウイルス RNP 認識を標的とした新たな創薬開発へつながる知見を得ることを目指す (図 1)。

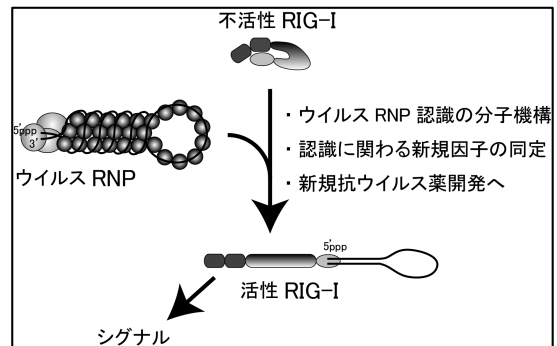


図 1: 研究目的

3. 研究の方法

(1) モデル RNP を作成するため、IAV のゲノム RNA 及び RNP 構成タンパク質 (NP, PA, PB1, PB2) をコードする発現プラスミドを HEK293T 細胞に導入し、細胞内で形成されるウイルス RNP を PB2 タンパク質に付加したエピトープタグを利用して精製した。精製した RNP は、原子間力顕微鏡 (AFM) により可視化を実施した。

(2) RIG-I 活性化の *in vitro* 再構成系として、以前に報告されている方法 (Zeng et al., *Cell*, 2010) を改変して用いた。リコンビナント RIG-I を基質 RNA と混合して活性化した後、細胞抽出液とミトコンドリア画分、³⁵S ラベルした下流転写因子である IRF-3 を混合した後、Native-PAGE 電気泳動で活性化 IRF-3 の二量体を検出することにより、RIG-I の活性化を評価した。基質として、合成 RNA に加えて (1) で作成した IAV RNP を用いることで、ウイルス RNP による RIG-I 活性化について検討した。

(3) RIG-I 活性化を検出するための代替法として、RNA ヘリカーゼである RIG-I が基質 RNA と会合することで活性化される ATPase 活性を測定する方法を検討した。また、RIG-I が基質 RNA と会合し活性化して形成される安定な RNP 構造を、トリプシン抵抗性を指標として検出する方法 (Takahasi and Yoneyama et al., *Mol Cell*, 2008) で検討することにより、RIG-I 活性化についてさらに検討を加えた。

4. 研究成果

(1) モデルウイルス RNP としての IAV RNP の調整は、基盤研究 (B) (2011~2014) 「感染センサーによるウイルスリボ核タンパク質複合体 (RNP) 認識機構の解析 (23390108)」において、必要な因子を発現させた HEK293T 細胞抽出液からのアフィニティ精製に遅延が生じたため、本研究計画と半年間平行した研究遂行となった。結果として得られた RNP は、AFM によってその構造を確認した。過去の報告と同様に、IAV RNP は馬蹄形の構造として検出された (図 2)。

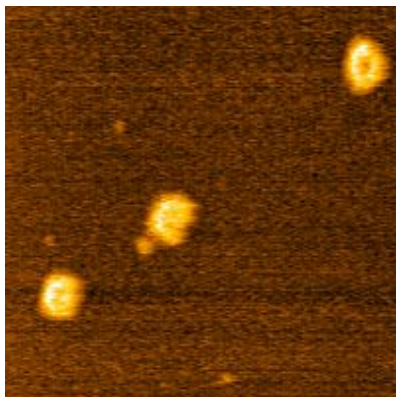


図 2 : AFM によるモデル IAV RNP の観察

(2) 調整した IAV RNP を用い、研究の方法(2)で樹立した *in vitro* の再構成系に導入し、ウイルス RNP による RIG-I の活性化を検討した。その結果、5'三リン酸の RNA と同様に、ウイルス RNP によっても RIG-I を介したシグナルの活性化が検出された (図 3)。

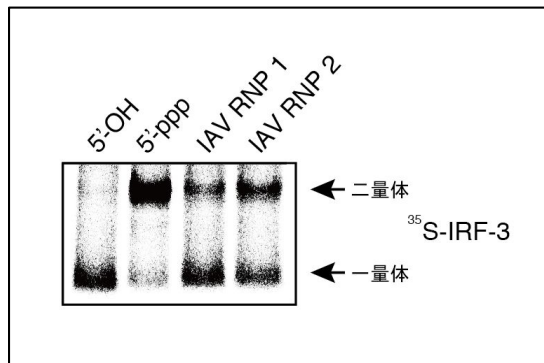


図 3 : IAV RNP による RIG-I シグナル活性化

この結果は、ウイルス由来 RNP によっても

RIG-I が活性化され得ることを強く示唆している。しかし、この実験方法では、細胞抽出液とミトコンドリア画分を反応に加えていることから、RIG-I が単独で RNP を認識し活性化しているかどうかは明らかではない。

(3) そこで次に、細胞抽出液を添加しないで RIG-I 活性化を *in vitro* で検出する方法として、研究の方法 (3) で示した複数の方法により、IAV RNP による RIG-I 活性化を検討した。その結果、精製した RNP による RIG-I ATPase の活性化及びトリプシン抵抗性の指標は、いずれも検出することができなかった。このことは、RIG-I 単独では IAV RNP に直接アクセスすることが困難であることを強く示唆している。従って、細胞抽出液などに含まれる内在性の因子が RNP 認識に関与することが予想される。

(4) 本研究では、*in vitro* で RIG-I 活性化を検出する実験系を確立し、ウイルス RNP が RIG-I を活性化することを検出することに成功した。さらに、この RIG-I によるウイルス RNP 認識には補助的に働く因子の介在が必要である可能性が示唆された。平行して実施している研究成果から、ウイルス感染検知には細胞の翻訳抑制とリンクしたストレス応答が重要な役割を担っていること、またそこには複数の宿主 RNA 結合タンパク質が関与していることを報告しており、本研究で得られた知見は、抗ウイルス自然免疫誘導に関与する新たな宿主因子の同定へつながる可能性があり、また細胞内での自己-非自己 RNA 認識の分子基盤のさらなる理解の進展、さらにはこれらのウイルス認識機構や細胞機能制御を利用した新たな抗ウイルス薬の開発へとつながる可能性が期待される。

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)

Oh SW, Onomoto K, Wakimoto M, Onoguchi K, Ishidate F, Fujiwara T, Yoneyama M, Kato H, Fujita T. Leader-containing uncapped viral transcript activates RIG-I in antiviral stress granules. *PLoS Pathog*, 12, e1005444, 2016. 査読有 doi: 10.1371/journal.ppat.1005444

Yoneyama M, Jogi M, Onomoto K. Regulation of antiviral innate immune signaling by stress-induced RNA granules. *J Biochem*, 159, 279-286, 2016. 査読無 doi: 10.1093/jb/mvv122

Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr Opin*

Immunol, 32: 48-53, 2015. 査読有
doi: 10.1016/j.coi.2014.12.012
Narita R, Takahasi K, Murakami E,
Hirano E, Yamamoto SP, Yoneyama M, Kato
H, Fujita T. A novel function of human
Pumilio proteins in cytoplasmic
sensing of viral infection. *PLoS
Pathog*, 10, e1004417, 2014. 査読有
doi: 10.1371/journal.ppat.1004417
Onomoto K, Yoneyama M, Fung G, Kato H,
Fujita T. Antiviral innate immunity
and stress granule responses. *Trends
Immunol*, 35, 420-428, 2014. 査読有
doi: 10.1016/j.it.2014.07.006
Yoo JS, Takahasi K, Ng CS, Ouda R,
Onomoto K, Yoneyama M, Lai JC, Lattmann
S, Nagamine Y, Matsui T, Iwabuchi K,
Kato H, Fujita T. DHX36 Enhances RIG-I
Signaling by Facilitating
PKR-Mediated Antiviral Stress Granule
Formation. *PLoS Pathog*, 10, e1004012,
2014. 査読有 doi:
10.1371/journal.ppat.1004012

〔学会発表〕(計8件)

Yoneyama M. Viral infection and
anti-viral innate immune responses in
animal cells. 第58回日本植物生理学会
年会 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)
3.16-18, 2017.

Ban M, Onomoto K, Yoneyama M.
Identification of a novel RNA binding
proteins that is involved in
RLR-mediated signaling. The 15th Awaji
International Forum on Infection and
Immunity 淡路夢舞台国際会議場(兵庫
県・淡路市) 9.6-9, 2016.

米山光俊、ウイルス感染に应答したスゴ
レス顆粒形成と抗ウイルス生体防御、
BMB2015、神戸ポートアイランド(兵庫
県・神戸市) 12.1-4, 2015.

Yoneyama M. Regulation of anti-viral
innate immunity by host RNA-binding
proteins. 第63回日本ウイルス学会学
術集会、福岡国際会議場(福岡県・福岡
市) 11.22-24, 2015.

Yoneyama M. Molecular machinery of
viral RNA recognition by RIG-I-like
receptors. 13th IGAKUKEN International
Symposium on "Molecular Basis of
Viral Disease" 東京都医学研(東京
都・世田谷区) 11.20, 2015.

Yoneyama M. Regulation of antiviral
innate immunity by the host RNA binding
proteins. The International Symposium
"Molecular basis of host cell
competency in virus infection" 2014.
パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
11.8-9, 2014.

米山光俊、宿主 RNA 結合タンパク質によ
るウイルス感染応答制御、第79回日本イ
ンターフェロン・サイトカイン学会学術
集会、北海道大学(北海道・札幌市)
6.19-20, 2014.

米山光俊、細胞内ウイルス RNA センサー
による感染検知の分子機構、第15回
Pharmaco-Hematology シンポジウム、名
古屋市立大学(愛知県・名古屋市)
5-23-24, 2014.

〔その他〕

ホームページ等

千葉大学真菌医学研究センター感染免疫分
野ホームページ

http://www.pf.chiba-u.ac.jp/bunya_kanse_nneneki/

千葉大学真菌医学研究センターホームペ
ージ

<http://www.pf.chiba-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

西城 忍 (SAIJO, Shinobu)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号: 60396877

(3)連携研究者

尾野本 浩司 (ONOMOTO, Koji)

千葉大学・真菌医学研究センター・助教

研究者番号: 10612202

(4)研究協力者

常喜 儒彦 (JOGI, Michihiko)