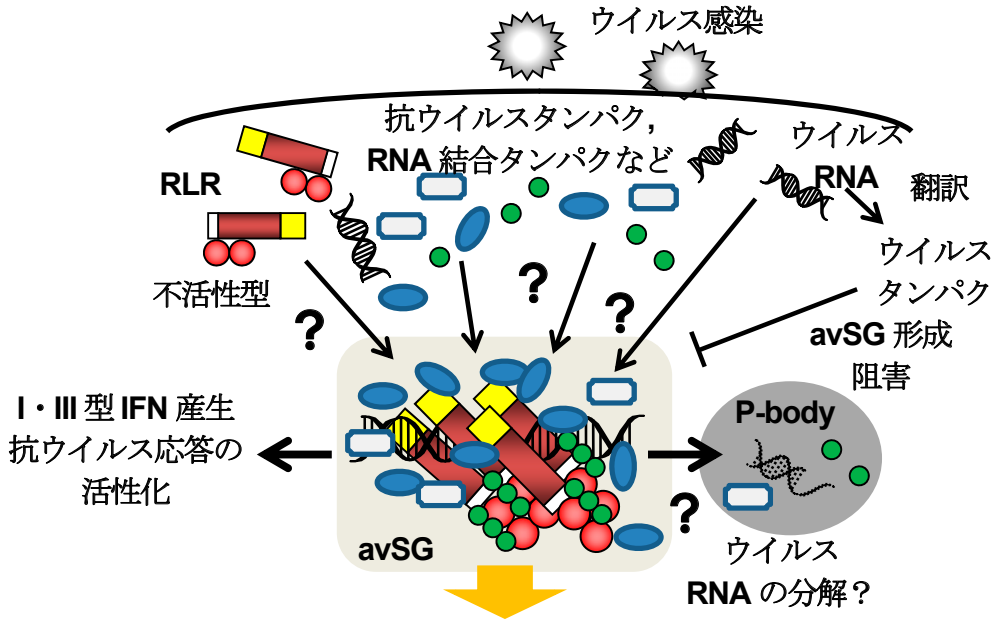
123　抗ウイルス自然免疫応答におけるavSGの機能解析	尾野本　浩司

【目的】細胞質内ウイルス RNA センサーである RIG-I-like receptor（RLR）は、I･III 型 Interferon（IFN）を中心とした抗ウイルス自然免疫応答を発動するための必須な分子群である。一方で、RLR が細胞質内のどこでウイルス RNA を感知しているかについては不明な点が多く残されている。我々はこれまでに、抗ウイルスストレス顆粒（antiviral-stress granule: avSG）と呼ばれる細胞内凝集体が RLR のウイルス RNA 検知とシグナル伝達に重要であることを明らかにしてきた。しかし、avSG の形成メカニズムやその構成因子については殆ど明らかとなっていない。そこで本研究では、avSG 形成制御及び局在する分子を同定し、抗ウイルス自然免疫応答における avSG の機能を解明することを目的に解析を行った。

【方法】ウイルス感染細胞から avSG を単離・抽出し RIG-I と会合する新規タンパク質の探索を行った。また並行して siRNA ライブラリーを用いて IFN シグナルに関与する分子のスクリーニングを行った。上記方法によって得られた標的候補分子群の機能解析を行った。

【結果】ウイルス感染特異的に RIG-I と結合する複数の分子を同定した。また siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングから avSG に局在し IFN 産生制御に関与する新規分子を得ることが出来た。

avSG を介したシグナル伝達モデル図



avSG 形成及び RLR シグナルに関与する新規分子の同定

123. 抗ウイルス自然免疫応答における avSG の機能解析

尾野本　浩司

千葉大学 真菌医学研究センター 感染免疫分野

Key words：ウイルス感染，自然免疫，RLR，ストレス応答

緒　言

温暖化による生態系の変化や交通手段の発達により、これまで風土病と考えられていたジカウイルス、エボラウイルス、デングウイルスなどによるウイルス感染症が急速に世界中に広まりつつある。これらウイルス感染症に対する第一の防御機構である抗ウイルス自然免疫応答はパターン認識受容体（pattern recognition receptors：PRRs）と呼ばれる感染センサーによるウイルス検知によって発動し、I 及び III 型 Interferon（IFN）を中心としたサイトカインの産生を誘導する。我々の研究グループは PRR の 1 つとして細胞質内でウイルス RNA を検知する retinoic acid inducible gene-I（RIG-I）、melanoma differentiation-associated gene 5（MDA5）、laboratory of genetics and physiology 2（LGP2）の 3 つからなる RIG-I-like receptor（RLR）を同定し、そのドメイン構造やシグナル伝達機構を明らかにしてきた［1，2］。しかしその一方で、ウイルス感染時における RLR の局在についてはミトコンドリアに局在する下流のアダプター分子と結合してシグナルを伝達していること以外の詳しいことは明らかにされていない。そこで我々は、RLR がウイルス RNA を感知する『場』に着目し解析を行い、これまでに通常細胞質内に分散して局在している RLR が、ウイルス感染時に一過的にウイルス RNA 及び抗ウイルスタンパク質と共にストレス顆粒（Stress Granule：SG）に局在することを明らかにした。さらに SG 形成を阻害すると、RLR を介した I 型 IFN 産生を含む抗ウイルス応答が著しく抑制されたことなどから、SG が RLR によるウイルス RNA 検知とシグナル伝達に重要な役割を担うことが明らかとなり、これを antiviral SG（avSG）と命名した［3，4］。しかし、個々のウイルスにおける avSG 形成メカニズム及びその構成因子に関しては、殆ど明らかになっていない。そこで本研究計画では、avSG 形成に関与する分子の同定及び avSG 形成メカニズムの時空間的解析により、抗ウイルス自然免疫における avSG の機能を解明することで、新規抗ウイルス治療薬や予防薬への開発につながる知見を見出すことを目的とし研究を行った。

方法および結果

まず外来遺伝子を 1 コピーのみゲノムに挿入できる Flp-in システムとテトラサイクリン誘導性プロモーターを組み合わせた発現系により RIG-I の発現量を一定化した細胞株を樹立し、この細胞株を用いて RIG-I 発現誘導時に RIG-I によって認識されるウイルスである NS1 タンパク質を欠損したインフルエンザウイルス（IAVΔNS1）またはニューカッスル病ウイルス（NDV）を感染させ、感染細胞から avSG を単離・抽出し、抗タグ抗体を用いた免疫沈降法により RIG-I と結合するタンパク質群をウイルスタンパク質（nucleocapsid protein:NP）との結合を指標に精製した（図 1）。精製したこれら標的候補分子群を質量分析により解析した結果、ウイルス感染特異的に RIG-I と結合する分子を 62 個同定することができた。これら標的分子群の中には既知の SG 構成分子の他に RNA helicase など複数の RNA 結合タンパク質が含まれていた。

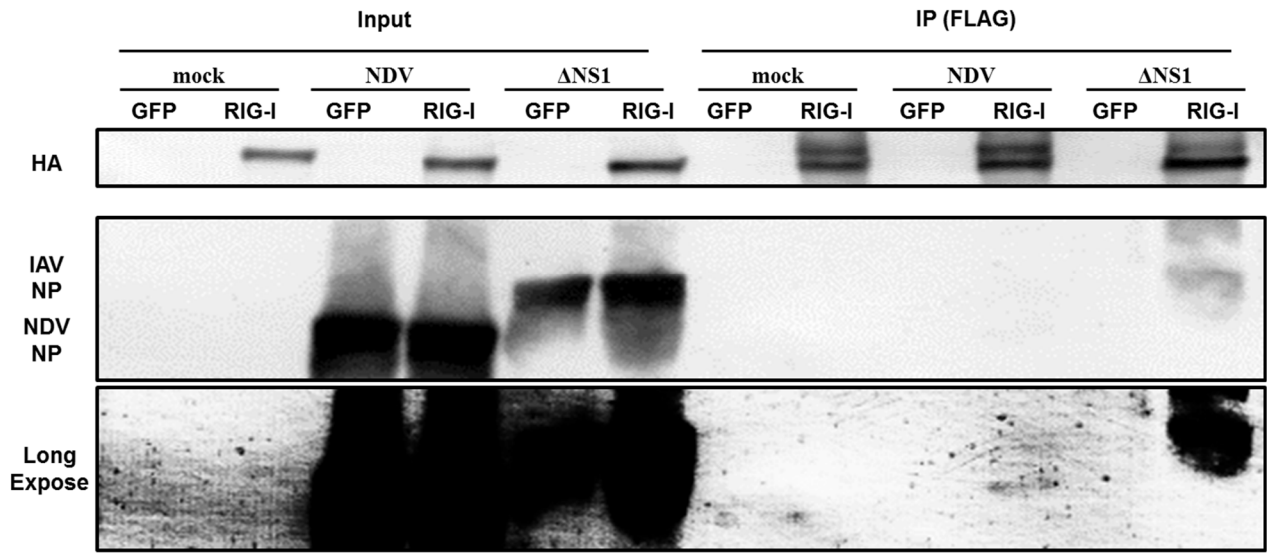


図 1. RIG-I と相互作用する分子の探索

GFP（negative control）または FLAG-HA-SBP タグを付加した RIG-I を安定的に発現する 293 flp-in-T-Rex 細胞に NDV または IAV ΔNS1 を 10 時間感染させた。細胞溶解液に対して抗 FLAG 抗体（M2）アガロースビーズを用いて免疫沈降を行い、HA、IAV NP 及び NDV NP 抗体を用いて Western blotting により検出した。

また抗ウイルス応答への関与が報告されていない既知の SG 関連タンパク質及び RNA 結合タンパク質に対する siRNA ライブラリーなどを用いて IFN シグナルに関与する分子のスクリーニングを行った。その結果、RLR を介した IFN 産生シグナルへの関与を示唆する標的候補分子 X（未発表データ）を得た。そこでまず、ウイルス感染時における標的候補分子の局在を免疫染色により解析した（図 2）。その結果、IAV ΔNS1 感染細胞において X が細胞質に顆粒状に集積し、SG マーカータンパク質である G3BP1 と共局在を示したことから、avSG に局在する分子であることが明らかとなった。

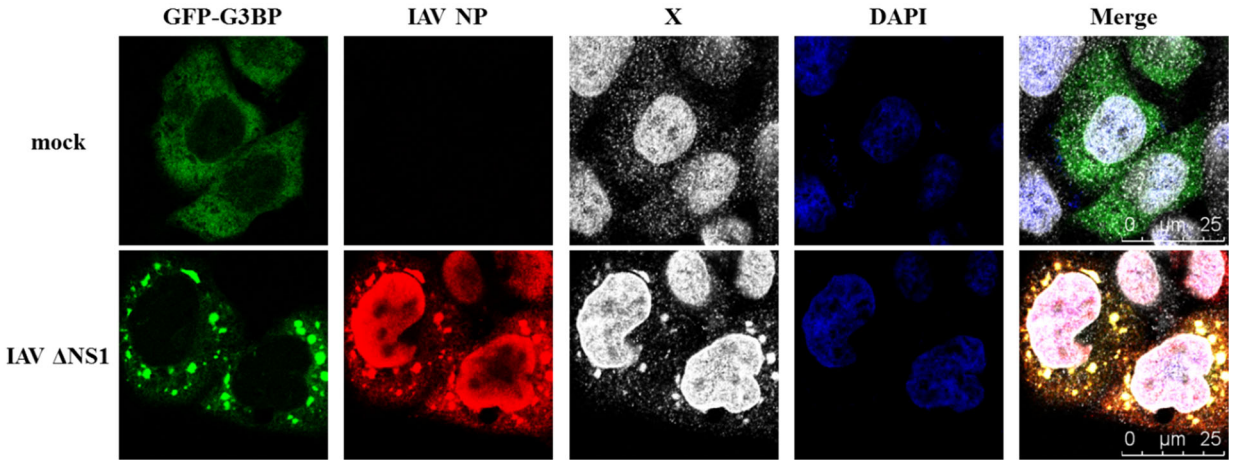


図 2. ウイルス感染時の細胞内局在

HeLa GFP-G3BP1 細胞に IAV ΔNS1 を 9 時間感染させた後、IAV NP 及び X 抗体を用いてそれぞれの局在を解析した。核は DAPI を用いて染色した。スケールバー ＝ 25 μm

次に、標的候補分子の発現ベクターを作製し、IFN シグナルへの影響を IFN-β のレポータープラスミド (p-125Luc) を用いて解析した（図 3 a)。その結果、過剰発現により NDV 及び IAVΔNS1 感染時の IFN-β のレポーター活性が増加した。IFN-β 遺伝子の転写は、転写因子である IFN regulatory factor（IRF）-3/7 及び nuclear factor-κB（NF-κB）によって制御されていることから、IRF および NF-κB それぞれのレポータープラスミド (p-55C1BLuc, p-55A2Luc) を用いて同様にレポーター活性を測定した（図 3 b,c)。

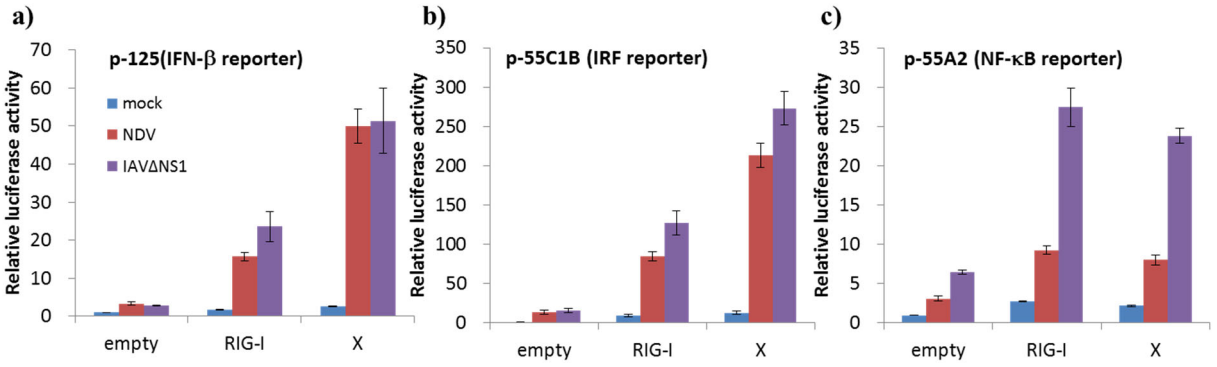


図 3. ウイルス感染時における Reporter 活性の測定

L929 細胞に p-125Luc (a)、p-55C1B (b) または p-55A2Luc (c) と共に empty（negative control)、RIG-I（positive control) または遺伝子 X の発現プラスミドを transfection し、ウイルス感染 12 時間後の各レポーター活性を測定した。

最後に標的候補分子 X の I 型 IFN 発現誘導における機能を詳細に解析するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて KO 細胞株（2 株 KO1、KO2）を樹立し、NDV 及び IAV ΔNS1 感染時の IFN-β mRNA 量を Real Time PCR を用いて測定した (図 4)。その結果、KO 細胞では WT 細胞と比較してウイルス感染時の IFN-β mRNA 発現量が減弱した。以上より標的候補分子 X は RLR を介した IFN 産生を正に制御する分子であることが明らかとなった。

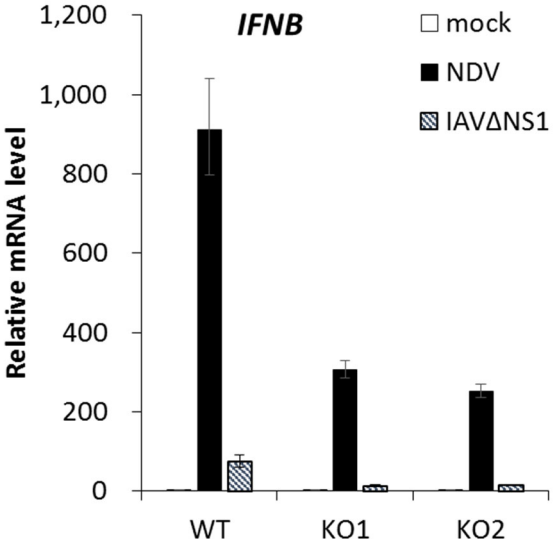


図 4. ウイルス感染時の IFN-β mRNA 発現量の解析

HeLa WT または KO 細胞（KO1、KO2）に NDV または IAV ΔNS1 を 9 時間感染させた際の *IFNB* mRNA 量を Real Time PCR により測定した。

考　察

avSG は SG 同様に mRNA や様々な RNA 結合タンパク質などが凝集した膜を持たない構造体であり、その詳しい形成メカニズムや構成分子については明らかとなっていない。今回我々は、ウイルス感染細胞から avSG を単離・抽出し、RIG-I と会合する新規タンパク質を生化学的に解析し、ウイルス感染特異的に RIG-I と結合する既知の SG 構成分子や複数の RNA 結合タンパク質を同定することに成功した。さらに並行して行った標的候補分子のスクリーニングからウイルス感染時に avSG に局在し RLR シグナルを正に制御する分子を同定した。今後は、本標的候補分子の様々な変異体作製し IFN シグナルに重要なドメインの同定やその詳細な分子メカニズムを明らかにしていく。また生体内における機能の解明を目指しノックアウトマウスの作製を進めていく予定である。これまで SG の翻訳制御以外の詳細な生理機能については殆ど明らかとなっておらず、本研究により avSG の抗ウイルス免疫応答制御に果たす役割を解明できればウイルス学・免疫学全体の飛躍につながると期待できる。さらに avSG 形成メカニズムが解明できれば、将来的に avSG 形成を誘導する薬剤などにより新規抗ウイルス治療薬及び診断薬への開発につながる可能性がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、千葉大学真菌医学研究センター感染免疫分野の米山光俊教授である。最後に、本研究のご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1） Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. Nat Immunol. 2004 Jul;5(7):730-7. Epub 2004 Jun 20. PMID: 15208624 DOI: 10.1038/ni1087

2） Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M Jr, Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. J Immunol. 2005 Sep 1;175(5):2851-8. PMID: 16116171 DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.2851

3） 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. Epub 2012 Aug 13. PMID: 22912779 PMCID: PMC3418241 DOI: 10.1371/journal.pone.0043031

4） Onomoto K, Yoneyama M, Fung G, Kato H, Fujita T. Antiviral innate immunity and stress granule responses. Trends Immunol. 2014 Sep;35(9):420-8. Epub 2014 Aug 19. PMID: 25153707 DOI: 10.1016/j.it.2014.07.006