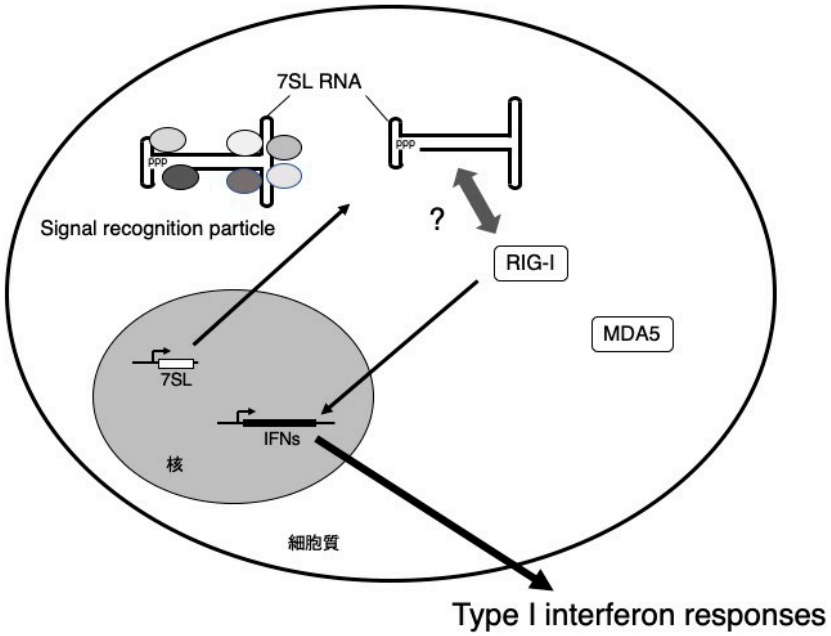
72　RNA結合タンパク質による抗ウイルス自然免疫制御	米山　光俊

【目的】抗ウイルス自然免疫誘導に必須な役割を担う感染センサーである retinoic acid inducible gene（RIG）-I-like receptor（RLR）は、RNA 結合タンパク質（RNA-binding protein : RBP）であり、ウイルス感染によって細胞質に出現するウイルスに特徴的な非自己 RNA 構造を認識することで活性化する。最近の解析から、RLR がストレス顆粒（stress granule : SG）と呼ばれる自己 mRNA の機能制御に関わる凝集体に集積して機能していることや、内在性 mRNA を介した遺伝子発現調節に関与する RNA サイレンシングの制御に RLR が関与することなどが明らかになってきた。本研究では、非自己 RNA を認識する RLR が、どのような内在性 RNA と相互作用し得るのかを解析し、それによって抗ウイルス自然免疫応答が誘導されるのかどうかを検討すること目的とした。

【方法】本解析では RLR のうち RIG-I に注目した解析を実施した。初めに、RIG-I の基質である 5'三リン酸構造を持つ内在性 RNA を［α-^{32}P］GTP 存在下での 5'キャッピング反応により検出した。次に、得られた RNA が RIG-I と会合し得るかどうかを、細胞に RIG-I を発現させた後に精製し、そこに結合している RNA を RT-pPCR により検出することによって検討した。さらに、RIG-I と結合することが検出された内在性 RNA が RIG-I を介した抗ウイルス自然免疫シグナルを誘導し得るかどうかを、培養細胞を用いたレポーターアッセイにより解析した。

【結果】5'キャッピング反応により、RNA polymeraseⅢにより転写される 7SL RNA や 5S rRNA など複数の内在性 RNA が検出された。また RIG-I との結合実験から、これらの RNA が実際に細胞内で RIG-I と結合し得る可能性が示唆された。これらの RNA を合成し IFN 誘導シグナル能を検討したところ、7SL RNA の細胞内への導入によってレポーター遺伝子の活性上昇が検出されたことから、7SL RNA が RIG-I による認識を介して、細胞内へシグナルを伝達することが可能であることが示唆された。しかし、7SL RNA は通常 Signal recognition particle として RNA-タンパク質複合体として翻訳制御に必須であることから、生理的にどのような局面でこのような内在性 RNA による抗ウイルスシグナルの活性化が起き得るのかの理解に対しては、今後の解析が必要であると考えられた。

RIG-I による内在性 RNA の認識とシグナル活性化



72. RNA 結合タンパク質による抗ウイルス自然免疫制御

米山　光俊

千葉大学 真菌医学研究センター 感染免疫分野

Key words：ウイルスセンサー，自然免疫，RNA，RNA 結合タンパク質

緒　言

高等脊椎動物におけるウイルス感染に対する生体防御は、自然免疫と獲得免疫という 2 つの高度に制御された免疫システムにより行なわれる。これら免疫システムのうち、自然免疫は感染初期のウイルス排除に必須な役割を担っており、またその後の獲得免疫制御にも重要であることが知られる。従って、今なお大きな社会問題になっているウイルス感染症克服のためには、個々のウイルス増殖と病原性の解析と平行して、宿主細胞における抗ウイルス免疫制御を理解することが必要不可欠である。我々はこれまで、自然免疫誘導に必須な役割を担う感染センサー分子として retinoic acid inducible gene（RIG）-I-like receptor（RLR）を同定し、その生理機能を明らかにしてきた［1，2］。RNA 結合タンパク質（RNA-binding protein: RBP）である RLR は、ウイルス感染によって細胞質に出現するウイルスに特徴的な非自己 RNA（二本鎖 RNA など）を認識することで活性化し、ミトコンドリア外膜に発現するアダプター分子である Interferon（IFN）promoter stimulator-1（IPS-1/MAVS）との会合を介して一連のシグナルカスケードを活性化し、抗ウイルスサイトカインである I 型 IFN 遺伝子などの転写を誘導する。また三種の RLR（RIG-I、MDA5、LGP2）のうち、RIG-I と MDA5 はそれぞれが異なる基質特異性を持ち、異なるウイルス種を検知することが知られる［2］。一方で我々は、RLR がストレス顆粒（stress granule：SG）と呼ばれる RNA／タンパク質凝集体に集積し機能していること、また RLR 以外の様々な RBP がこの SG 様凝集体とシグナル制御に重要な役割を担うことを明らかにしてきた［3］。SG は、様々なストレスに曝された細胞が、内在性 mRNA とそこに結合する RBP を凝集させてタンパク質合成を停止すると同時に、ストレス応答タンパク質を誘導することで「ストレス回避」を行う機能を持つと考えられていることから、ウイルス感染というストレス環境下において、RLR による非自己 RNA の検知とストレス応答及び自己 mRNA の安定性制御すなわち細胞の恒常性維持機構が、共通して制御されていることを示している。また最近、様々な内在性の遺伝子発現調節に関与することが知られる RNA サイレンシングの制御に、RLR が関与することを報告した［4］。脊椎動物以外の多くの生物では RNA サイレンシングが抗ウイルス生体防御に必須であることはよく知られており、高等脊椎動物でも両者が関連していることは進化的にも興味深い知見である。しかし、ウイルス由来の外来 RNA 検知と内在 RNA の機能制御がどのように相互作用しているのかは、未だその多くが明らかになっていない。

そこで本研究では、RLR を含む宿主 RBP に注目し、外来 RNA センサーである RLR と内在性 RNA の細胞機能制御の相互作用を明らかにし、抗ウイルス自然免疫と内在性 RNA による細胞内での細胞機能制御機構を明らかにすることを目指した解析を行うことを目的とした。今年度の解析では、非自己 RNA を認識する RBP である RLR が、内在性 RNA である 7SL RNA との会合を介して抗ウイルス自然免疫誘導シグナルを誘導する可能性を明らかにし、その相互作用の分子機構の解析の端緒を開く知見を得た。これらの知見は、抗ウイルス自然免疫における感染検知の分子機構と新たな創薬ターゲットを明らかにするだけでなく、内在性 RNA を介した細胞制御の分子機構の理解が進み、新たな研究領域の創生へと繋がることが期待される。

方法および結果

1. RIG-I と内在性 RNA との会合

RLR と内在性 RNA との会合について検討するために、本解析では RLR のうち RIG-I に注目した解析を実施した。これまでに、RIG-I は 5'末端に三リン酸を保持するウイルス由来の非自己 RNA を認識することが明らかになっている。そこで初めに、同様の構造を持つ RNA が内在性にも発現しているかを検討した。マウスおよびヒトの各種培養細胞から total RNA を回収し、[α-^{32}P]GTP 存在下で 5'キャッピング酵素で処理した後、12%尿素変性アクリルアミドゲル電気泳動によって分離したところ、約 300 塩基および 120 塩基の長さの位置に 5'末が三リン酸を持つ内在性 RNA の存在が確認された。 さらに、これらの RNA を同定するために、5'末に三リン酸構造を持つ可能性が予想される RNA polymerase Ⅲ転写産物からいくつかの候補を選択し、それぞれに相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドと二本鎖を形成させ、DNA-RNA 二本鎖を特異的に分解する RNase H に対する感受性を検出することで、これらの 5'三リン酸構造を持つ RNA を同定した。その結果、300 塩基および 120 塩基のバンドはそれぞれ、7SL RNA と 5S ribosomal RNA（rRNA）であることが明らかになった。

そこで次に、これらの RNA が RIG-I と会合し得るかどうかを検討した。Flp-In T-REx 293 細胞（ThermoFisher）に、対照である green fluorescent protein（GFP）、Flag-HA-streptavidin-binding peptide（SBP）の tag を付加した野生型 RIG-I（RIG-I WT）および RNA との結合能を失う 4 点変異を導入した変異体 RIG-I（RIG-I 4M）を導入した 3 種の細胞を準備し、それらを 1 g/ml Doxycycline 存在下で 24 時間培養してそれぞれのタンパク質の発現を誘導した後、細胞から細胞抽出液を調整した。それぞれのタンパク質を、抗 FLAG 抗体（M2 : SIGMA）および Streptavidin-Mag Sepharose（GE Healthcare）で 2 ステップ精製し、共沈してくる RNA を回収した。そこに含まれる RNA を特異的なプライマーセットを用いた RT-qPCR によって検出した。その結果、7SL RNA、5S rRNA が RIG-I WT と共沈してくること、またそれ以外にも *Alu* RNA や U6 small nuclear（sn）RNA といった RNA ポリメラーゼⅢによって転写される内在性 RNA も RIG-I に結合し得ることが示された（図 1）。また、GFP および RIG-I 4M では結合が全く検出されなかったことから、これらの RNA がこれまで知られている RIG-I の RNA 結合ドメインによって認識されていることが示唆された。

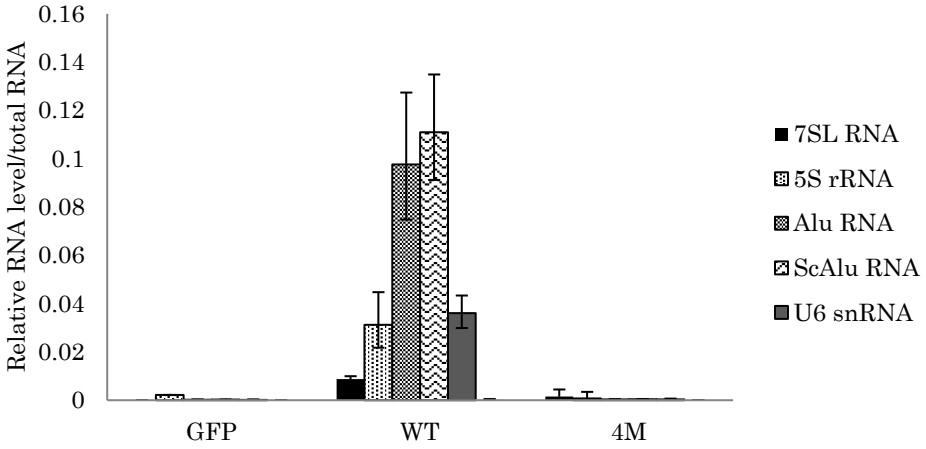


図 1. 内在性 RNA は RIG-I と会合する

RNA 免疫沈降／RT-qPCR により RIG-I と共沈する RNA を検出した。GFP、Flag-HA- SBP-WT RIG-I（WT）、RIG-I 変異体（4M）を一定量発現する 293 細胞から、FLAG および streptavidin-Sepharose でそれぞれのタンパク質を精製し、そこに含まれる RNA を特異的 primer で検出した。いずれも 3 回の実験結果の平均を示している。

2. 7SL RNA は RIG-I を介した抗ウイルスシグナルを誘導する

（1）次に、上記の解析により RIG-I と結合することが検出された内在性 RNA のうち、7SL RNA と 5S rRNA に注目し、これらが RIG-I を介したシグナル伝達を誘導し得るかを検討した。マウス繊維芽細胞 L929 細胞に、RIG-I の下流で活性化される転写因子 IFN regulatory factor（IRF）-3/7 の結合配列で制御されたホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子を、空プラスミドあるいは RIG-I の発現ベクターと共に導入し、*in vitro* で合成した内在性 RNA をトランスフェクトして刺激した後、レポーター活性を検出することでシグナル誘導を検出した。positive control として合成二本鎖 RNA である poly（I：C）を用いた。その結果、7SL RNA と 5S rRNA の刺激によって RIG-I の存在下で、IRF レポーター活性の上昇が検出された（図 2a）。 またこの時、*in vitro* で合成した RNA を脱リン酸化酵素（Calf intestine Alkaline Phosphatase: CIAP）処理によって末端の 5’三リン酸を除いた場合にレポーター活性が減少したことから、RIG-I によるこれらの RNA の認識には 5’末端構造が 重要であることが示唆された（図 2b）。

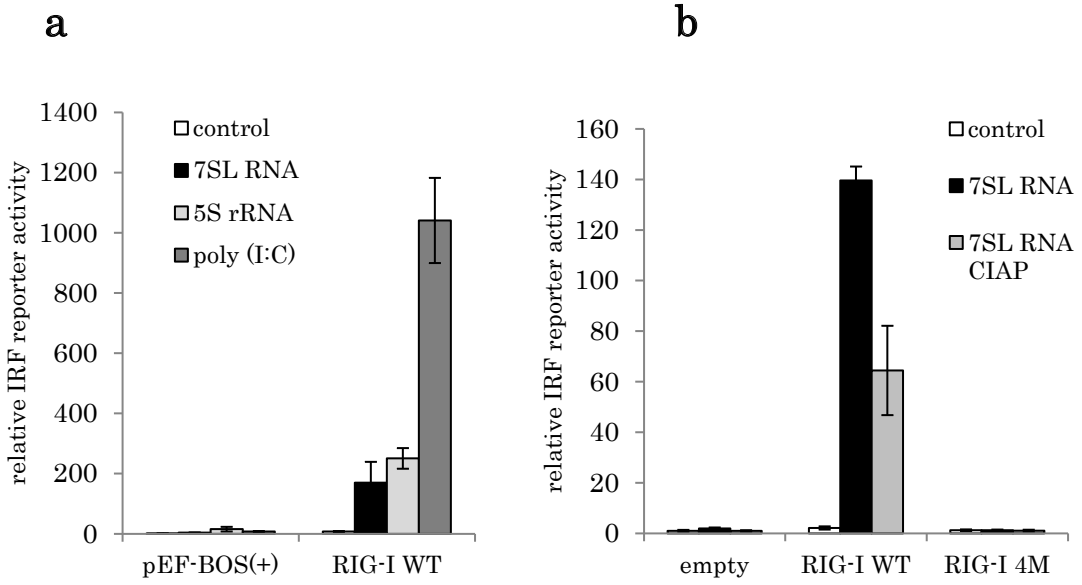


図 2. 内在性 RNA による RIG-I シグナルの活性化

L929 細胞に空ベクター（pEF-BOS（+））あるいは RIG-I、RIG-I 4M 発現ベクターを IRF 配列で制御されたレポータープラスミドと共に導入後、各種 RNA で刺激した後、レポーター由来のホタルルシフェラーゼ活性を検出した。いずれも 3 回の実験結果の平均を示している。

a）RNA なしを control とし、各 RNA で刺激して 12 時間後の細胞抽出液を解析した。

b）a と同様に、示した RNA で刺激した場合の結果を示している。

（2）次に、*in vitro* 合成した内在性 RNA を導入する代わりに、細胞内で RNA ポリメラーゼⅢによって RNA を強発現させた場合にも、同様のシグナル増強が観察されるかどうかを検討した。ヒト HEK293T 細胞に、（1）と同様にレポータープラスミドおよび RIG-I 発現プラスミドを導入する際に、同時に U6 プロモーターの下流に内在性 RNA の cDNA を連結したプラスミドを導入し、その後のレポーター活性を検出することで、内在性 RNA の導入によるシグナル誘導を検討した。なお、各 RNA 発現ベクターによる内在性 RNA 発現量の増加は RT-qPCR によって確認した。 また、既に RIG-I を活性化することが知られている short hairpin RNA（sh MOLF 4L1）を positive control として使用した。その結果、7SL RNA を発現させた場合、有意に IRF レポーター活性が上昇していることが確認されたが、5S rRNA では増強傾向は観察されたものの、有意な増強と判定できなかった（図 3）。以上の結果から、5’三リン酸構造を持つ内在性 RNA、特に 7SL RNA が、RIG-I に認識されることにより、IFN 誘導シグナルを活性化し得ることが示唆された。

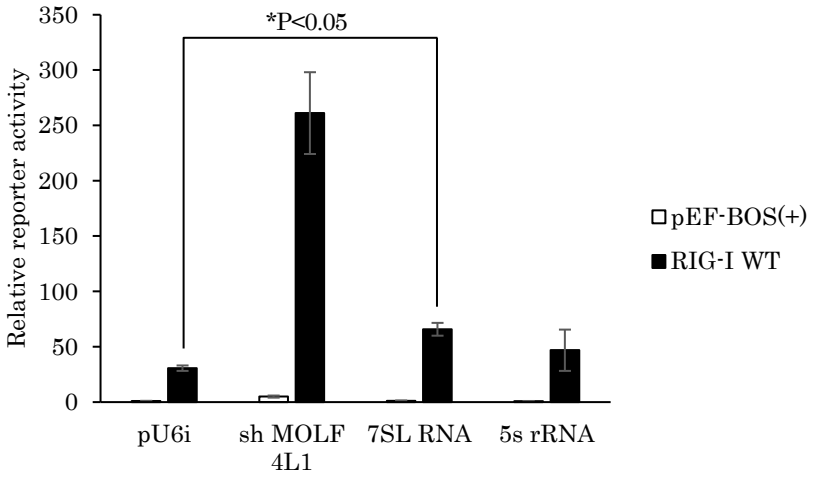


図 3. 内在性 RNA の強発現による RIG-I シグナルの増強

HEK293T 細胞に、図 2 と同様にレポータープラスミドと empty あるいは RIG-I 発現プラスミドを、下部に示した各種 RNA の発現プラスミドと同時に導入した後、48 時間後のレポーター由来ホタルルシフェラーゼ活性を検出した。いずれも 3 回の実験結果の平均を示している。

考　察

本研究では，内在性の RNA が非自己 RNA センサーRBP である RIG-I を介して抗ウイルス自然免疫シグナルを活性化する可能性を検討した。5'三リン酸を持つ内在性 RNA を検討したところ、RNA ポリメラーゼⅢで転写される 7SL RNA や 5S rRNA が検出された。また、培養細胞内に RIG-I を強制発現させた場合、免疫沈降によって精製した RIG-I とそれらの内在性 RNA が会合していることが示唆された。さらに、それらのうち 7SL RNA が RIG-I を介したシグナルを活性化する能力を持つことが明らかになった。従って、人工的な実験系を用いた場合、内在性 RNA が RIG-I を活性化する可能性が示唆された。7S RNA は、signal recognition particle（SRP）の構成 RNA として機能することが知られている。7SL RNA は高度な二次構造をとり、哺乳類では 6 つのタンパク質 (SRP54、SRP19、SRP68、SRP72、SRP14、SRP9）と複合体を形成し、翻訳中の分泌タンパク質や膜タンパク質などのシグナルペプチドと結合し，リボソームと共に小胞体膜上の SRP レセプターへリクルートすることで、それらのタンパク質の翻訳調節に関与する。従って、定常状態では SRP という RNA-タンパク質複合体として存在するため、RIG-I には認識されにくいことが予想される。実際に、SRP の構成タンパク質の発現を減弱させた場合に IFN 応答シグナルの増強が観察されたことから、この複合体形成が自己 RNA として検知されない分子基盤になっていることが考えられた。興味深いことに、最近の報告では、乳癌細胞が周囲の細胞に Notch シグナルを介して 7SL RNA のエキソソームによる分泌を誘導し、それらエキソソームを取り込んだ乳癌細胞内での RIG-I を介した遺伝子発現が、腫瘍増悪に関与するという報告がなされている［5］。この報告でも、SRP 複合体からの 7SL RNA の露出が RIG-I による認識に繋がることが議論されており、7SL RNA と RIG-I の相互作用が、生体機能の制御あるいは破綻に関与する可能性が十分に考えられる。

近年、RLR や関連する IFN 誘導遺伝子の変異による IFN 系の異常な活性化が、自己炎症などの免疫性疾患の原因になることが明らかになっている。また最近の報告では、遺伝子内に挿入された *Alu* 配列由来の RNA が MDA5 の基質として認識されること、また adenosine deaminase である ADAR1 の変異によるそれら RNA の修飾の欠如が MDA5 による異常な認識を増強し、疾患につながることなどが示されている。一方で、抗腫瘍薬剤の刺激などにより活性化された内在性レトロウイルス由来の RNA が IFN 誘導を引き起こすことも明らかになっており、内在性 RNA を介した IFN 誘導についての知見が蓄積しつつある。SRP タンパク質の発現異常と疾患の関係の報告もあり、7SL RNA と IFN も含めてさらなる解析が必要であり、今後の解析結果に興味が持たれる。

共同研究者・謝辞

本研究は、千葉大学大学院医学研究院修士課程の佐久間千愛および真菌医学研究センター感染免疫分野技術職員の常喜儒彦により実施された。

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, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. Curr Opin Immunol. 2015 Feb;32:48-53. Epub 2015 Jan 14. PMID: 25594890 DOI: 10.1016/j.coi.2014.12.012

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 DOI: 10.1371/journal.pone.0043031

4) Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Murakami F, Komori C, Suzuki Y, Yoneyama M, Ui-Tei K. LGP2 virus sensor regulates gene expression network mediated by TRBP-bound microRNAs. Nucleic Acids Res. 2018 Sep 28;46(17):9134-9147. PMID: 29939295 DOI: 10.1093/nar/gky575

5) Nabet BY, Qiu Y, Shabason JE, Wu TJ, Yoon T, Kim BC, Benci JL, DeMichele AM, Tchou J, Marcotrigiano J, Minn AJ. Exosome RNA Unshielding Couples Stromal Activation to Pattern Recognition Receptor Signaling in Cancer. Cell. 2017 Jul 13;170(2):352-366.e13. PMID: 28709002 DOI: 10.1016/j.cell.2017.06.031