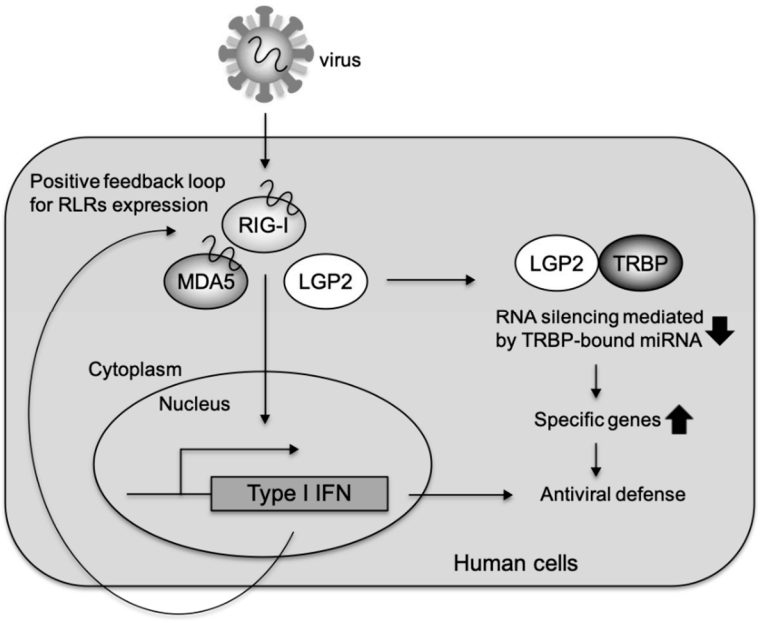
158　遺伝子発現制御を介したヒトの生体防御機構の解明	高橋　朋子

【目的】細菌やウイルスが感染すると、生体は免疫応答という生体防御機構を引き起こす。免疫応答には、自然免疫応答と獲得免疫応答があるが、自然免疫応答は免疫応答の初動で重要な役割を果たす即時対応型のシステムであり、サイトカインの誘導を伴う。哺乳類細胞にウイルスが感染すると、細胞外では Toll like receptors（TLRs）、細胞内では Retinoic acid-inducible gene I（RIG-I）like receptors（RLRs）といったウイルスセンタータンパク質がウイルス特有の構成成分を認識し、I 型インターフェロン（IFN）を誘導する。RLRs として RIG-I、Melanoma differentiation-associated protein 5（MDA5）、Laboratory of genetics and physiology 2（LGP2）が知られるが、RIG-I と MDA5 はそれぞれ異なる特徴を持つウイルス性 RNA を認識し IFN を誘導するのに対し、LGP2 はこれまでその機能が明確ではなかった。我々はこれまでの研究により、LGP2 が、RNA サイレンシングの主要因子である TAR-RNA binding protein（TRBP）と相互作用することを見出した。本研究では、LGP2 と TRBP の相互作用を介した、自然免疫応答と RNA サイレンシングのクロストーク機構の分子メカニズムの解明を目指した。

【方法】まずヒト培養細胞を用いた免疫沈降法により、LGP2 と TRBP の細胞内における相互作用を同定した。次にゲノム編集ツールである CRISPR/Cas9 システムにより、ヒト LGP2$^{-/-}$細胞と TRBP$^{-/-}$細胞を樹立し、それらを用いて RNA サイレンシング活性を測定した。さらにノザンブロットまたは定量 RT-PCR により成熟 miRNA 量を定量した。最後に、RNA シークエンス解析により、TRBP が結合しやすい miRNA の同定とその二次構造的特徴の同定、マイクロアレイ解析によるそれらの標的遺伝子群の発現変動を定量的に解析した。

【結果】これまでウイルスセンサーであるとされながらも機能が不明であった LGP2 が、RNA サイレンシングの主要因子である TRBP との相互作用を介して、microRNA（miRNA）による遺伝子発現ネットワークを制御することを見出した。IFN により発現量が増加した LGP2 は TRBP との相互作用を介して、TRBP が結合する特定の miRNA の成熟化を抑制し、その標的遺伝子群を発現上昇させた。LGP2 と TRBP の相互作用を介した特定の miRNA とその遺伝子群の発現制御は、ウイルス感染細胞において生体防御機構として機能していると考えられる。

LGP2 による RNA サイレンシングを介した遺伝子発現制御



158. 遺伝子発現制御を介したヒトの生体防御機構の解明

高橋　朋子

東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻

Key words：ウイルスセンサー，RNA サイレンシング，マイクロ RNA，LGP2，TRBP

緒　言

細菌やウイルスが感染すると、生体は免疫応答という生体防御機構を引き起こす。免疫応答には、自然免疫応答と獲得免疫応答があるが、自然免疫応答は免疫応答の初動で重要な役割を果たす即時対応型のシステムであり、サイトカインの誘導を伴う。哺乳類細胞にウイルスが感染すると、細胞外では Toll like receptors（TLRs）、細胞内では Retinoic acid-inducible gene I（RIG-I）like receptors（RLRs）といったウイルスセンタータンパク質がウイルス特有の構成成分を認識し、I 型インターフェロン（IFN）を誘導する。RLRs として RIG-I、Melanoma differentiation-associated protein 5（MDA5）、Laboratory of genetics and physiology 2（LGP2）が知られるが、RIG-I と MDA5 はそれぞれ異なる特徴を持つウイルス性 RNA を認識し IFN を誘導するのに対し、LGP2 はこれまでその機能が明確ではなかった。我々はこれまでの研究により、LGP2 が、RNA サイレンシングの主要因子である TAR-RNA binding protein（TRBP）と相互作用することを見出した。本研究では、LGP2 と TRBP の相互作用を介した、自然免疫応答と RNA サイレンシングのクロストーク機構の分子メカニズムの解明を目指した。その結果、これまでウイルスセンサーであるとされながらも機能が不明であった LGP2 が、RNA サイレンシングの主要因子である TRBP との相互作用を介して、microRNA（miRNA）による遺伝子発現ネットワークを制御することを見出した。IFN により発現量が増加した LGP2 は TRBP との相互作用を介して、TRBP が結合する特定の miRNA の成熟化を抑制し、その標的遺伝子群を発現上昇させた。LGP2 と TRBP の相互作用を介した特定の miRNA とその遺伝子群の発現制御は、ウイルス感染細胞において生体防御機構として機能していると考えられる［1，2］。

方　法

1.　細胞内ウイルスセンサーLGP2 と RNA サイレンシング促進因子 TRBP の免疫沈降法による相互作用の解析

TRBP は RNA サイレンシングにおいて、Dicer という RNA 切断酵素と相互作用し、miRNA の成熟化を促進する。これまでの我々の研究により、Dicer 以外に TRBP と相互作用し、RNA サイレンシング活性を制御する未知の因子の存在が示唆されていた［3］。そこで Dicer における TRBP との相互作用領域（ATPase/Helicase ドメイン）を Protein-BLAST で検索したところ、RLRs の ATPase/Helicase ドメインが良く似ていた。さらに RLRs の中でも LGP2 が最も Dicer とよく似ていた。そこでヒト培養細胞に FLAG タグを融合した TRBP 発現プラスミド（FLAG-TRBP）を導入し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、TRBP は Dicer だけでなく、LGP2 とも相互作用することが明らかとなった（図 1）。さらに、LGP2 は IFN 誘導遺伝子群（IFN-stimulated genes、ISGs）の 1 つであり、IFN により発現量が増加すると TRBP と相互作用する量も増加していた。一方、RIG-I と MDA5 は TRBP と相互作用しなかった。

2. LGP2 と TRBP の相互作用が RNA サイレンシング活性に与える影響の解析

TRBP は RNA サイレンシングにおいて、miRNA 前駆体（pre-miRNA）に結合し、そこに Dicer をリクルートすることで miRNA の成熟化を促進する。LGP2 と TRBP の相互作用は、TRBP と pre-miRNA の結合に影響を与えるのかを、ヒト培養細胞に FLAG-TRBP 発現プラスミドを導入し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った後、TRBP に結合していた RNA を回収し、ノザンブロットすることで調べた。その結果、FLAG-TRBP のみを発現させた時には、TRBP と pre-miRNA の結合が検出されたが、LGP2 も共発現させた場合には TRBP と pre-miRNA の結合は検出されなかった。

次に、ゲノム編集ツールである CRISPR/Cas9 システムにより LGP2$^{-/-}$細胞と TRBP$^{-/-}$細胞を樹立した。これらの細胞株における成熟 miRNA 量をノザンブロットまたは定量 RT-PCR で測定したところ、TRBP$^{-/-}$細胞では、成熟 miRNA 量が減少したのに対し、LGP2$^{-/-}$細胞では成熟 miRNA 量が増加していた。さらにこの条件での RNA サイレンシング活性をルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーターアッセイ系により測定したところ、成熟 miRNA 量と一致して、TRBP$^{-/-}$細胞では RNA サイレンシング活性は減少しており、LGP2$^{-/-}$細胞では増加していた。以上より、LGP2 は TRBP と相互作用することで、TRBP と pre-miRNA の結合を阻害し、その miRNA の成熟化と RNA サイレンシングを抑制することを見出した。

3. TRBP が結合しやすい pre-miRNA の RNA シークエンスによる同定とその二次構造的特徴の抽出

これまで TRBP はヒト細胞で発現するすべての pre-miRNA に結合するのか、もしくは特定の特徴を持つ pre-miRNA に結合するのかは明らかではなかった。そこでまずドキシサイクリンにより発現誘導可能な Flp-In 293 FLAG-TRBP 発現細胞株を樹立し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った後、TRBP に結合していた RNA を回収し、RNA シークエンス解析を行った。その結果、TRBP には結合しやすい pre-miRNA と結合しにくい pre-miRNA があることが明らかとなり、我々は今回の解析で、TRBP が結合しやすい 40 種の pre-miRNA と TRBP が結合しにくい 10 種の pre-miRNA を同定した。また、これらの TRBP と結合しやすい miRNA の標的遺伝子群が LGP2 と TRBP の相互作用を介して制御されていると推定された。

さらにこれまでの我々の生化学的な解析では、TRBP は二本鎖 RNA に結合し、一本鎖 RNA や DNA には結合しないこと、また、結合する二本鎖 RNA の塩基配列に特異性はないことが明らかになっていた［4］。そこで、TRBP が結合しやすい pre-miRNA と TRBP が結合しにくい pre-miRNA の二次構造について解析するために、CentroidFold を用いて塩基対合確率 （Base-paring probability、BPP）を計算したところ、TRBP が結合しやすい pre-miRNA はそのステム領域の塩基対合確率が高いという二次構造的特徴をもつことが明らかとなった。

4. LGP2$^{-/-}$細胞における TRBP が結合しやすい miRNA の標的遺伝子群の発現変動

TRBP が結合しやすい miRNA の標的遺伝子群が LGP2 により発現を制御されているのかを解析するために、野生型細胞と LGP2$^{-/-}$細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、TRBP が結合しやすい miRNA の標的遺伝子群は LGP2$^{-/-}$細胞において有意に発現量が減少していたのに対し、TRBP が結合しにくい miRNA の標的遺伝子群は発現が減少していなかった。

考　察

本研究により明らかとなった LGP2 と TRBP による RNA サイレンシングを介した特定の遺伝子の発現制御は、ウイルス感染細胞において生体防御機構として機能していると考えられる（図 2）。さらにウイルスなどの外来核酸により誘導される免疫応答と、miRNA といった内在核酸により誘導される RNA サイレンシングはこれまで独立した経路であると考えられてきたが、本研究により、これらは独立した経路ではなく、相互に制御する関係にあることを見出した。本研究の成果は、抗ウイルス治療や、近年臨床応用への期待が非常に高い核酸医薬開発への応用が期待される。

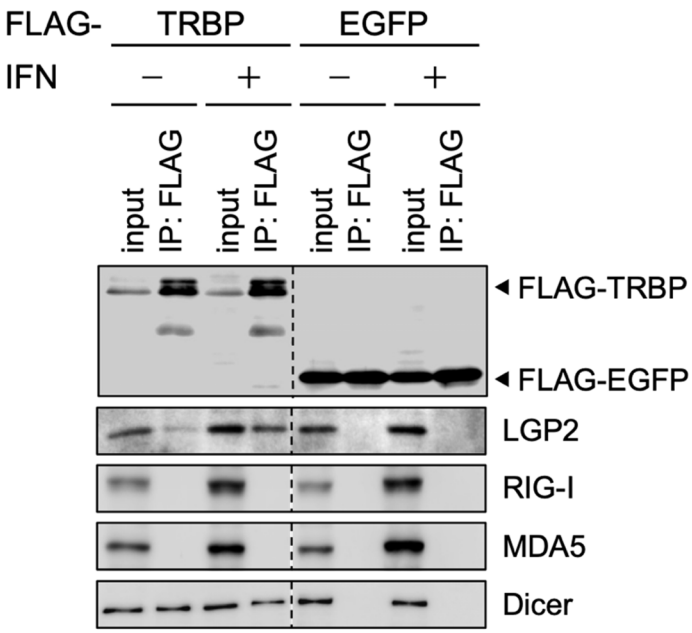


図 1. 免疫沈降法による LGP2 と TRBP の相互作用の解析

ヒト培養細胞に FLAG-TRBP 発現プラスミドを導入し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った後、ウエスタンブロットによりそれぞれのタンパク質を検出した。

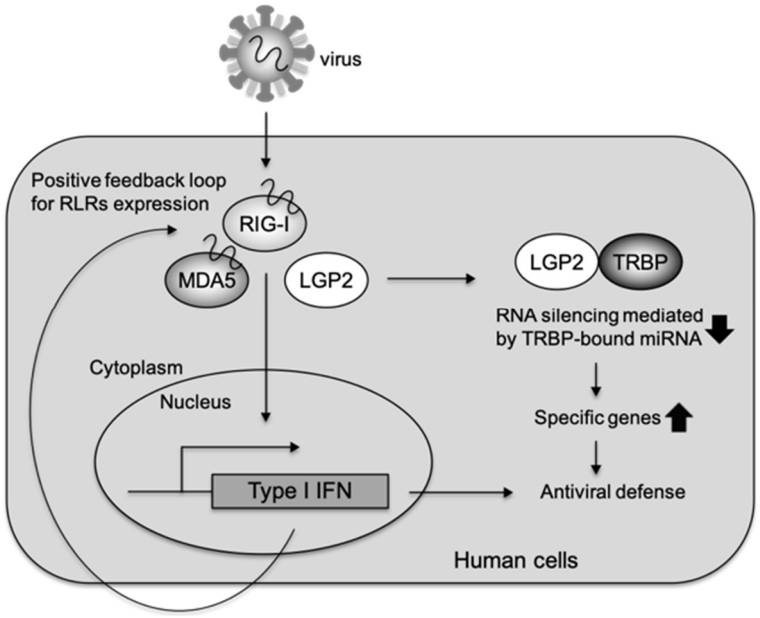


図 2. LGP2 による RNA サイレンシングを介した遺伝子発現制御

細胞にウイルスが感染すると、ウイルスセンサータンパク質によりウイルスの侵入が感知され、IFN が産出される。IFN により発現誘導された LGP2 は、RNA サイレンシングの促進因子である TRBP と相互作用することでその機能を阻害し、TRBP が結合する miRNA の成熟化と RNA サイレンシングを阻害する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻の程久美子准教授、中野悠子氏、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、尾野本浩司助教である。

文　献

1) 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 miRNAs. Nucleic Acids Res. 2018 Sep 28;46(17):9134-9147. Epub 2018 Jun 25. PMID: 29939295 DOI: 10.1093/nar/gky575

2) Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Yoneyama M, Ui-Tei. Virus sensor RIG-I represses RNA interference by interacting with TRBP through LGP2 in mammalian cells. Genes 2018 Oct 19;9(10):511. PMID: 30347765 DOI:10.3390/genes9100511

3) Takahashi T, Zenno S, Ishibashi O, Takizawa T, Saigo K, Ui-Tei K. Interactions between the non-seed region of siRNA and RNA-binding RLC/RISC proteins, Ago and TRBP, in mammalian cells. Nucleic Acids Res. 2014 Apr 1;42(8):5256-5269.Epub 2014 Feb 20. PMID:24561616 DOI:10.1093/nar/gku153

4) Takahashi T, Miyakawa T, Zenno S, Nishi K, Tanokura M, Ui-Tei K. Distinguishable in vitro binding mode of monomeric TRBP and dimeric PACT with siRNA. PLoS One 2013 May 2;8(5):e63434. PMID:23658827 DOI:10.1371/journal.pone.0063434