

研 究 報 告 書(公開)

「細胞内ウイルスセンサーによる非自己 RNA 認識様式の解明」

研究期間：平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

研究者：米山 光俊

1. 研究のねらい

ヒトを含めた高等脊椎動物の生体機能維持における RNA 分子の役割を理解する上で、ウイルス由来非自己 RNA と宿主免疫系との関係を明らかにすることは、非常に重要なテーマであると考えられる。それは、RNA 機能の多様性を明らかにするだけでなく、今なお大きな社会問題になっているウイルス感染症対策を考える上でも必要不可欠である。本研究者らはこれまで、細胞がいかにしてウイルス感染を検知し、それに対する生体防御機構を働かせているのかについて解析を続けてきた。2004 年には、ウイルス感染すなわち非自己 RNA の侵入を細胞質内で検知するセンサー分子として、retinoic acid inducible gene I (RIG-I)-like receptor (RLR)を世界に先駆けて同定し、それらの抗ウイルス生体防御における必須な役割を明らかにした。本研究では、ヒトゲノムに存在する三種の RLR が、どのように自己と非自己の RNA を識別して生体防御系を発動しているのか、そこにはどのような分子機構が働いているのか、さらにどのような生理機能を担っているのかについての基礎研究を通じて、RNA と RLR との相互作用に基づいた新たな抗ウイルス薬剤の開発を目指した検討を行うことを目的とする。

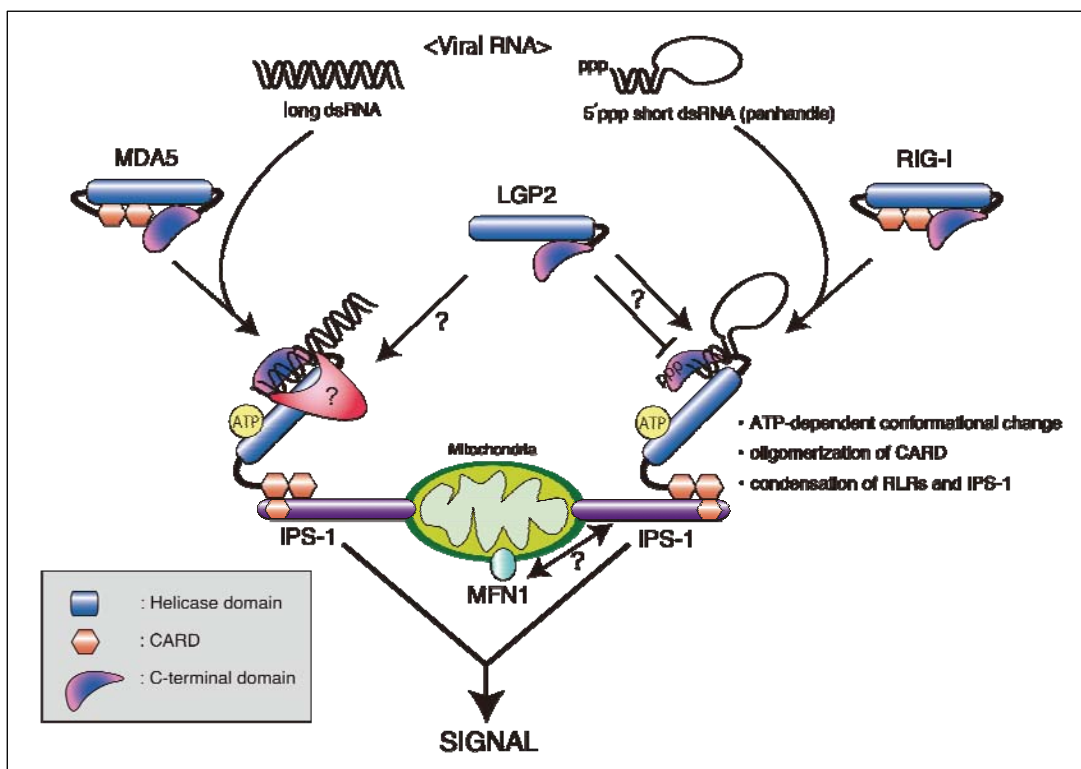
2. 研究成果

(1) RLRによる外来性RNA認識の分子機構および認識ドメインの同定とその構造解析

これまでに、ヒトゲノムには三種の RLR が存在し、それぞれが異なったウイルス RNA を認識して機能していることを報告してきた(*Nat. Immunol.*, 2004; *J. Immunol.*, 2005; *Immunity*, 2005; *Nature*, 2006)。そのうち、RIG-I と MDA5 (melanoma differentiation associated gene 5) はいずれも N 末端に caspase recruitment domain (CARD)を持ち、抗ウイルス自然免疫における正のシグナル因子として、特に抗ウイルスサイトカインである I 型インターフェロン(IFN) 遺伝子の発現誘導に必須な役割を担っている。本研究の開始時点で、RIG-I と MDA5 によって認識される基質 RNA の構造として、それぞれ 5' 末端に三リン酸を持つ一本鎖 RNA (ssRNA)と長鎖二本鎖 RNA(dsRNA)が明らかにされていたが、本研究では特に RIG-I について、バキュロウイルスシステムを用いて調整したリコンビナント RIG-I タンパク質を用いた生化学的な解析を行うことにより、RIG-I による基質 RNA 認識の分子機構をさらに詳細に検討した。その結果、RIG-I は、RNA の 5' 三リン酸構造に強い親和性を持つものの、一リン酸のみを持つ短鎖 dsRNA も基質として認識し得ることを明らかにした。その後、複数のグループによって、RIG-I が最も好む基質は 5' 三リン酸短鎖 dsRNA (パンハンドル構造、図)であることが報告された。一方で、RLR はいずれも RNA ヘリカーゼドメインを持つ分子群であり、すでにヘリカーゼドメインへの ATP 結合がシグナル伝達に必須であることを明らかにしていたことから(*Nat. Immunol.*, 2004; *J. Immunol.*, 2005)、この RIG-I のヘリカーゼドメインの意義について、種々の構造の RNA 分子を基質として用いた生化学的な検討を行った。その結果、3' 側に一本鎖領域を持つような特殊な構造の dsRNA が RIG-I のヘリカーゼ活性によってほどかれる得ることが明らかになった。しかし興味深いことに、このほどかれるような dsRNA は RIG-I を活性化することができず、むしろほどかれない dsRNA が RIG-I を介してシグナルを誘導できたことから、RIG-I のヘリカーゼ活性はそのウイルスセンサーとしての機能には必要ではないことが示された。この知見は、RIG-I が基質 RNA と比較的安定な複合体を形成することで、ATP 依存的に分子内構造変化を起こすことでシグナルを伝達することを強く示唆している(図:論文1)。

これらの知見をもとに、さらに RIG-I が基質 RNA を認識するドメインを詳細に検討した。その結果、RIG-I の C 末端の約 130 アミノ酸からなる領域 (C-terminal domain: CTD) が RNA 認識に関与することが明らかになった。さらにその領域の三次元立体構造を解明し (北海道大学・稲垣冬彦教授らとの共同研究)、CTD が既知の dsRNA 認識ドメインとは異なった構造をとっており、その塩基性アミノ酸に富んだ溝状構造へ dsRNA が入りこむことによって、基質 RNA を認識していることを明らかにした (論文 1)。

さらに、三種の RLR の CTD の構造解析を行った結果、いずれの CTD も非常に類似した構造をとっていることが示された。しかし、MDA5 の CTD は、RIG-I やもうひとつの RLR である LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2) の CTD に比較して開いた構造を取っており、dsRNA との認識が困難であることが予想された。実際、生化学的な解析および培養細胞を用いた *in vitro* の解析から、MDA5 単独では生理的な基質である長鎖 dsRNA に対して非常に弱い親和性しか持たないことが示された。このことは、MDA5 によるウイルス RNA 認識には、未知の分子機構 (他の分子の介在など) が関与していることを示唆している (論文 2)。



(2) RLRを介したシグナルの生理機能解析

RIG-Iを介したシグナルは、外来性 RNA を認識し活性化された RIG-I の N 末端に存在する CARD が多量体形成をすることによって誘導されることが予想されていた。これを検証するために、薬剤を使って CARD を強制的に多量体形成させる実験系を構築した。この実験系を培養細胞に導入した結果、人為的な RIG-I CARD の多量体形成により、ウイルス感染非依存的に、RIG-I の下流で機能する転写因子 IRF-3 の活性化および内在性 IFN 遺伝子の発現誘導が観察され、CARD の多量体形成のみによって抗ウイルスシグナルが誘導され得ることが明らかになった。さらに DNA マイクロアレイを用いた解析から、通常のウイルス感染によって誘導される遺伝子群が、この実験系によっても同様に誘導されたことから、ウイルス感染の場合と等価のシグナルが伝達されていることが確認された。これまでに、多くのウイルスが RLR の機能を阻害するタンパク質を持つことが報告されているが、この実験系を用いることにより、それら抑制的に働くウイルスタンパク質の影響を排除した環境での RLR シグナルの生理機能を解析することが可能になった (論文投稿準備中)。

(3) ヒトRLR遺伝子多型とその機能解析

RIG-I と MDA5 の生理機能を検討することを目的として、ヒトゲノムに存在する遺伝子多型に注目した検討を行った。特にタンパク質のアミノ酸置換を起こす遺伝子多型を公開データベースから抽出し、それらの発現コンストラクトを作製し、RIG-IあるいはMDA5 遺伝子破壊マウス由来の胎児繊維芽細胞へ導入することにより、それら変異体のウイルス感染に対する応答を評価した。その結果、RIG-I では 183 番目のセリン残基がイソロイシンへ置換した変異体が、IFN 誘導シグナル能を著しく欠損していることが明らかになった。このアミノ酸は N 末の CARD 内に存在することから、CARD と下流シグナル分子との相互作用に異常があることが予想された。一方 MDA5 では、673 番目に翻訳停止コドンが入った短い変異体と、923 番目のイソロイシンがバリンに置換した変異体の2つが、同様にシグナル伝達能を失っていることが明らかになった。前者は C 末側を大きく欠損している変異体であり、RNA 結合能を失っていることが確認された。一方後者は、RIG-I の RNA 結合ドメインである CTD に相当する領域内への変異であったが、基質 RNA との結合能は野生型と同様であったことから、何らかの未知の分子機構によってシグナル伝達能が失われていることが示唆された。興味深いことに、他のグループによる統計的な解析から、これら MDA5 に見られる遺伝子多型が、I 型糖尿病発症の抵抗性に関与することが報告され、MDA5 の機能と自己免疫疾患発症との関連が強く示唆された(論文3)。

(4) ウイルス感染に応答したRLRの細胞内局在変化の解析

RIG-I によるウイルス RNA 検知が細胞内でどのように行われているのかを検討する目的で、RIG-I の CTD 近傍を認識する抗 RIG-I 抗体を新たに作製した上で、RIG-I の細胞内局在についての解析を行った。その結果、種々のウイルス感染によって、RIG-I が細胞質内で凝集体を形成して機能することが明らかになった。中でも興味深いのは、インフルエンザウイルス (IAV) 感染の場合、この凝集体形成は IFN 系を強力に阻害することが知られるウイルスタンパク質 NS1 (non-structural protein 1) の発現によって負に制御されており、NS1 欠失 IAV (Δ NS1) では凝集体が形成されるものの、野生型 IAV ではその形成が見られなかったことから、NS1 タンパク質によるこの凝集体形成の抑制が、IAV NS1 による抗 IFN 作用機序のひとつであることが示唆された(図: 論文投稿中)。

(5) ウイルス感染によるミトコンドリアダイナミクスを介したシグナル制御機構の解析

RLR を介したシグナルは、ミトコンドリア外膜上に局在するアダプター分子 IPS-1 (IFN-promoter stimulator 1) を介して伝達されることが報告されている。その機能を明らかにするために、培養細胞に IPS-1 を強制発現させ、その細胞内局在変化を検討した。その結果、ウイルス感染に応答して、IPS-1 が核周辺の一部のミトコンドリア上に集積することが明らかになった。さらに、この IPS-1 に富むミトコンドリアは、(4) で明らかにした RIG-I の凝集体の周囲に集まっていることも観察された。逆に核から離れたミトコンドリアでは IPS-1 の発現が減弱していたことから、ウイルス感染刺激によってミトコンドリア上で何らかの IPS-1 分別の分子機構が働き、効率よくシグナル伝達を行うメカニズムが存在することが示唆された。さらに、ここに関する分子として、同じくミトコンドリア上に発現してその融合の制御に関与することが知られている MFN1 (mitofusin1) を同定し、その機能解析を行った。MFN1 の発現抑制実験では、ウイルス感染に応答した IPS-1 のミトコンドリア上での分配が抑制され、同時に IFN の誘導も顕著に低下していたことから、MFN1 がこの現象に重要な役割を担っていることが示唆された(図: 論文5)。

3. 今後の展開

本研究によって、RIG-I によるウイルス由来非自己 RNA の認識機構の分子基盤については一定の成果が得られた。しかし、MDA5 がどのように長鎖 dsRNA を認識しているのか、共

同研究によって明らかになった LGP2 のウイルスセンサーとしての機能(論文4)がどのような RNA 認識機構によって発揮されているのか、基質 RNA を認識した RIG-I および MDA5 がどのように ATP 依存的に活性化状態へ移行するのかなど、未だ不明な点が多く残されている。今後はそれらを明らかにすることにより、総合的に RLR による非自己 RNA 検知機構を理解し、ウイルス感染症に対する治療あるいは予防薬開発へとつなげる知見を蓄積してゆく必要がある。一方で、研究期間後半で発見した RLR が形成する凝集体形成とそこへ集積するミトコンドリア上への IPS-1 の分配などについても、さらに詳細に解析することにより、より空間的かつ普遍的なウイルス検知の分子機構が明らかになることが期待されることから、これらの現象について分子レベルで明らかにすることを目指したい。また、新たに開発したウイルス感染なしに RLR シグナルを誘導する実験系を、培養細胞だけでなくマウス個体などに導入することにより、RLR を介したシグナルの生理機能をさらに明らかにすることが可能であると考えている。

4. 自己評価

当初の研究計画では、RLR を標的とした抗ウイルス薬剤の開発へつなげることを最終目標としていたが、RIG-I によるウイルス由来非自己 RNA の認識機構の分子基盤については一定の成果が得られたものの、実際に薬剤開発へとつなげるには不十分と言わざるを得ない。また、本研究で行った生化学的な解析は、主にリコンビナントタンパク質や合成 RNA を用いた人為的な *in vitro* モデル系によって得られた成果であり、実際にウイルス感染細胞内で複雑な RNA-タンパク質複合体がどのように検知されているのかといった、より生理的なレベルの解析にまで及んでおらず、反省すべき点であると考えている。そのような解析は、RLR によるウイルス検知の普遍的な分子機構を明らかにし、本研究の目標を達成するためには必須であり、より計画的な研究遂行が必要であったであろう。一方で、本領域の RNA 研究を専門とするアドバイザーおよび研究員との交流を通じて、研究計画に一定の進展があったことは非常に有意義であり、今後の研究に活かしていきたいと考えている。研究途上の成果については、早急に解析を進め、論文として発表していく予定である。

5. 研究総括の見解

RNA ウイルス感染、すなわち非自己 RNA の細胞内への侵入を検知する細胞質内 RNA センサー分子(RLR)である RIG-I を発見し、そのファミリー分子である MDA5 や LGP2 をも対象とした RNA の認識機構、およびそのシグナル伝達機構の研究である。IFN 誘導機構に留まらず、細胞増殖機構に至るまでを視野に入れた広範且つ質の高い研究結果である。達成された研究成果はウイルスが如何に RLR を介して、細胞の代謝を変化させるか、また細胞はいかにウイルス感染に対応して応答しているかを紐解くための多くの鍵を与えている。今後の研究の展開方針も含め、高く評価できる研究結果である。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Takahasi K, Yoneyama M (equal contribution), Nishihori T, Hirai R, Kumeta H, Narita R, Gale M Jr, Inagaki F, Fujita T: Non-self RNA-Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. <i>Mol. Cell</i> , 29, 428-440, 2008
2. Takahasi K, Kumeta H, Tsuduki N, Narita R, Hirai R, Yoneyama M, Horiuchi M, Ogura K, Fujita T, Inagaki F: Solution structures of cytosolic RNA sensor MDA5 and LGP2 C-terminal domain: identification of the RNA recognition loop in RIG-I-like receptors. <i>J. Biol. Chem.</i> , 284, 17465-74, 2009
3. Shigemoto T, Kageyama M, Hirai R, Zheng J, Yoneyama M, Fujita T: Identification of loss of

	function mutations in human genes encoding RIG-I and MDA5: implications for resistance to type I diabetes. J. Biol. Chem., 284, 13348-54, 2009
	4. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, <u>Yoneyama M</u> , Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O: LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 107, 1512-7, 2010
	5. Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, Julkunen I, Namiki H, <u>Yoneyama M</u> , Fujita T: Virus-Infection or 5' ppp-RNA Activates Antiviral Signal through Redistribution of IPS-1 Mediated by MFN1. PLoS Pathog., 6, e1001012, 2010

(2)特許出願
なし

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. Yoneyama M: Non-self RNA sensing mechanism of RIG-I-like RNA helicases, The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sep. 10, 2008, Awaji (招待講演)
2. 米山光俊: RIG-IファミリーによるウイルスRNA認識機構, 第82回日本生化学会大会, 2009年10月21-24日, 神戸(招待講演)
3. Yoneyama M, Fujita T: RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. Immunol. Rev., 227, 54-65, 2009 (総説)
4. Yoneyama M, Fujita T: Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. Rev. Med. Virol., 20, 4-22, 2010 (総説)