

## 論文の内容の要旨

### Elucidation of mechanism regulating gene expression profiles via an interaction between a virus sensor, LGP2, and an RNA silencing enhancer, TRBP

(ウイルスセンサーLGP2がRNAサイレンシング促進因子TRBPと相互作用して遺伝子発現を制御する機構の解明)

氏名 中野悠子

#### 【序論】

ヒトの細胞に RNA ウイルスが感染すると、細胞外では Toll-like receptor 3 (TLR3)、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サータンパク質がウイルス RNA を感知し、インターフェロン (IFN)の誘導を伴う抗ウイルス応答が誘導される (図 1)。一方、ヒトには内在性ノンコーディング RNA の一種である microRNA (miRNA)による RNA サイレncingと呼ばれる遺伝子発現制御機構が存在しており、広く多様な生命現象が制御されている。RLRs ウイルスセンサーを介した抗ウイルス応答も RNA サイレncingも、ともに細胞質において二本鎖 RNA により誘導される機構であるにも関わらず、これまで独立した経路であると考えられてきた。RLRs には、RIG-I、Melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)、Laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2)という 3 つの因子が含まれるが、それらのうち、私は RLRs の一つであるとされながらもこれ

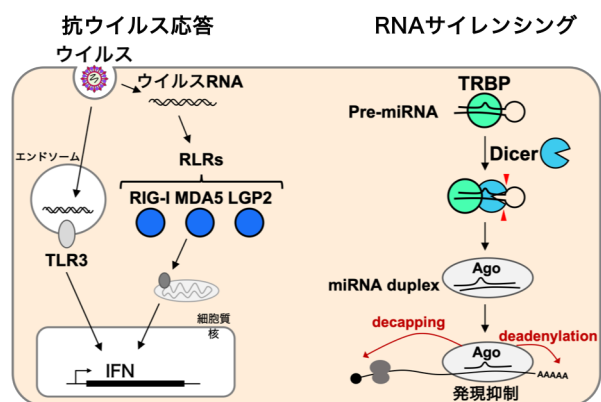


図1. 抗ウイルス応答とRNAサイレンシング

(左)ウイルスが細胞に感染すると、ウイルスRNAはTLR3またはRLRsに認識され、それぞれ別のシグナル経路によりIFNの産生を誘導し、細胞に抗ウイルス活性をもたらす。(右)RNAサイレンシングは、miRNAによる遺伝子発現制御機構である。miRNAの前駆体は、TRBPによってリクルートされるRNA切断酵素Dicerにより成熟miRNAとなり、塩基配列相補的に対合するmRNAの翻訳を抑制する。

まで機能が不明であった LGP2 が、RNA サイレンシングの促進因子である TAR-RNA binding protein (TRBP)と相互作用することで RNA サイレンシングを制御するという、抗ウイルス応答と RNA サイレンシングのクロストークの機構を見出した。さらに、このクロストークによる遺伝子ネットワークの詳細を解析した結果、RLRs を介した抗ウイルス応答では、既知のとおり IFN の誘導を伴う生体防御機構が働いていた。一方で、RNA サイレンシングとのクロストークにより、miRNA を介してアポトーシス誘導によるウイルス感染細胞を排除するといったヒトの新しい生体防御機構が働いていると考えられる結果が得られた。

## 【方法と結果】

### 1. ウイルスセンサーLGP2とRNAサイレンシング促進因子TRBPの相互作用の同定

TRBPは二本鎖RNA結合タンパク質であるが、RNAサイレンシングにおいては、miRNA 前駆体 (precursor-miRNA, pre-miRNA)の二本鎖領域に結合し、Dicerという二本鎖RNA切断酵素をリクルートして、pre-miRNAの一本鎖領域を切り離すことでmiRNAの成熟化を促進する重要な役割をもつ。TRBPは3つの二本鎖RNA結合ドメイン (double-stranded

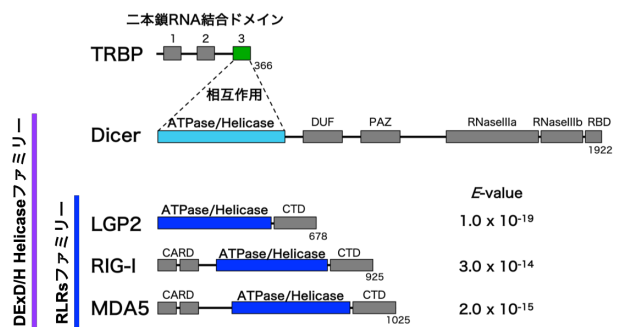


図2. TRBP, DicerとRLRsのドメイン構造

TRBPは二本鎖RNA結合ドメインを3つもち、3番目のドメインを介してDicerのATPase/Helicaseドメインと相互作用する。RLRsは、Dicerと同じDEXD/H Helicaseファミリーに属す。Protein-BLASTにより算出されたE-valueは、DicerのATPase/Helicaseドメインとの類似度を示しており、LGP2が最も類似していた。

RNA binding domain, dsRBD)をもち、dsRBD1とdsRBD2を介してmiRNAと、dsRBD3を介してDicerのATPase/Helicaseドメインと相互作用する (図2)。当研究室におけるTRBPの *in vitro*におけるsiRNA結合実験と、*in vivo*におけるRNAサイレンシング活性の測定実験の結果から、TRBPにはDicer以外にも相互作用する因子が存在し、RNAサイレンシング活性を制御していることが示唆されていた。そこでまずProtein-BLASTでDicerにおけるTRBPとの相互作用領域であるATPase/Helicaseドメインと似たタンパク質を検索したところ、RLRsであるLGP2、RIG-I、MDA5のATPase/Helicaseドメインが最も類似性が高いことが明らかとなった。中でもLGP2が特に類似していた。そこでヒト培養細胞を用いて免疫沈降実験を行った結果、LGP2とTRBPが相互作用することを見出した。一方、RIG-IとMDA5はTRBPとの相互作用が認められなかった(図3)。

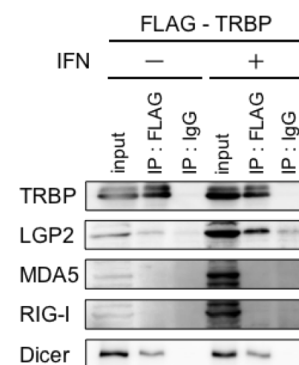


図3. TRBPとRLRsの免疫沈降による相互作用解析

FLAGタグを融合したTRBPタンパク質をHeLa細胞で発現させ、抗FLAG抗体で免疫沈降した結果、TRBPはDicerだけでなく、LGP2とも相互作用していた。

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

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を解析するために、ゲノム編集ツールであるCRISPR/Casシステムを用いてヒトHeLa LGP2<sup>-/-</sup>細胞とTRBP<sup>-/-</sup>細胞を樹立した。これらを用いて、TRBPとpre-miRNAの結合および成熟化におけるLGP2とTRBPの相互作用の影響をノザンプロットで解析したところ、LGP2はTRBPと相互作用することで、TRBPのpre-miRNAへの結合を阻害し、成熟化を抑制すると考えられる結果が得られた。さらにRNAサイレンシング活性における影響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結果、pre-miRNAの成熟化が抑制されるとRNAサイレンシング活性が抑制されると考えられる結果が得られた。

## 3. RNAシーケンス解析によるTRBPが結合しやすいmiRNAの同定とその標的遺伝子の発現変動

TRBPは二本鎖RNA結合タンパク質であり、二本鎖RNAには結合するが一本鎖RNAやDNAには結合しない。さらに、結合する二本鎖RNAの配列上の特徴は知られていない。そこで、どのようなmiRNAに結合するのかを明らかにするために、FLAGタグを融合したTRBPを発現誘導できるFlp-In293細胞株を樹立し、TRBPと相互作用するpre-miRNAを抗FLAG抗体で免疫沈降することで回収し、RNAシーケンス解析により網羅的に同定した (図4左)。その結果、TRBPが結合しやすいpre-miRNAはステム領域の塩基対合確率 (Base-pairing probability)が高いという二次構造的な特徴をもつことを見出した (図4右)。一方で、TRBPが結合しにくいpre-miRNAはステム領域の塩基対合確率が低いことがわかった。また、定量RT-PCRにより、成熟型miRNAとその標的遺伝子の発現変動を定量した結果、TRBPが結合しやすいmiRNAの成熟

化はTRBPがLGP2と相互作用することによって阻害され、その結果、標的遺伝子の発現量が増加すると考えられる結果が得られた。

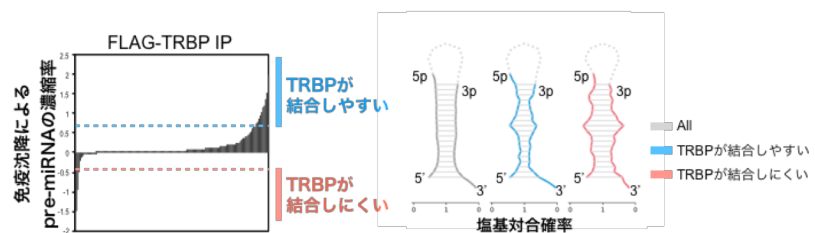


図4. TRBPが結合するmiRNAの同定とその二次構造的な特徴

(左) シーケンス解析によるTRBPが結合しやすいpre-miRNAと結合しにくいpre-miRNAの同定。縦軸に免疫沈降による濃縮率を示した。上位40個をTRBPが結合しやすいpre-miRNA、下位10個をTRBPが結合しにくいpre-miRNAと定義した。(右) TRBPが結合しやすいpre-miRNAと結合しにくいpre-miRNAの二次構造的な特徴。TRBPが結合しやすいpre-miRNAと結合しにくいpre-miRNAの塩基対合確率に基づく、予想されるpre-miRNAの二次構造。TRBPが結合しやすいmiRNAはステム領域の塩基対合確率が高く、TRBPが結合しにくいmiRNAは塩基対合確率が低い。

## 4. 抗ウイルス状態の細胞においてTRBPを介して制御されるmiRNA群とその標的遺伝子群の機能解明

ウイルスが感染した時に、宿主細胞では TRBP を介してどのような遺伝子ネットワークが制御されているかを明らかにするため、ウイルス RNA と同様の免疫応答を誘導することが

知られている人工核酸 poly(I:C)を用いた。ウイルスは宿主細胞に感染することで、ウイルスゲノム由来のさまざまな因子をコードして、多様な影響を宿主細胞に与えるが、poly(I:C)はウイルス由来の因子の作用を考えずに、宿主細胞における核酸の侵入による影響のみを調べることができると考えられる。そのため、野生型と TRBP<sup>-/-</sup> HeLa 細胞に poly(I:C)を導入し、時間を追って回収した細胞を用いて RNA シークエンス解析を行った。その結果、TRBP と LGP2 の相互作用を介して、poly(I:C)処理後の時間によって異なる特定の miRNA の成熟化が抑制されることが考えられる結果が得られた。それらの miRNA の標的遺伝子を推定し Gene Ontology 解析を行うと、アポトーシスや転写関連遺伝子であることが明らかとなった。さらに、これらの転写因子はアポトーシス関連遺伝子を発現誘導していると考えられる結果が得られた。

### 【考察と展望】

本研究により、これまでウイルスセンサーでありながら、その機能が明確でなかったLGP2が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によりRNAサイレンシングを抑制する機能をもつことを見出した。この抑制作用は、もともとTRBPが結合していた特定のmiRNAが、TRBPがLGP2と相互作用することで解離されるために成熟型になることができず、その標的遺伝子群の抑制が阻害されることで起こると思われた。さらに、標的遺伝子群にはアポトーシス関連因子と転写因子が多く含まれていたが、転写因子の標的遺伝子はやはりアポトーシス関連因子であった。したがって、TRBPとLGP2の相互作用は、直接的あるいは転写因子を介して間接的にアポトーシスを制御していると思われた。RIG-IやMDA5はCaspase recruitment domain (CARD)と呼ばれるドメイン (図2) を介して下流のタンパク質におけるシグナル経路を制御するウイルスセンサーとして働くが、LGP2はCARDを持たないため下流のシグナル経路を制御しない。本研究の結果は、LGP2がTRBPとの相互作用を介してmiRNAによるRNAサイレンシングという一括して遺伝子発現を制御するという、RIG-IやMDA5とは全く異なる機構によってウイルスセンサーとして働く因子であることを示している。

ウイルスが細胞に感染すると、IFN によってウイルス複製を抑制して細胞のウイルス抵抗性を上昇させる機構と、細胞死によりウイルスの感染拡大を防ぐ機構が働くと考えられているが、後者の分子メカニズムは不明であった。本研究により、これまで別々の経路であると考えられてきた RNA サイレncing と抗ウイルス応答が、LGP2 と TRBP の相互作用を介してクロストークし、ウイルス感染細胞において miRNA を介したアポトーシスによる細胞死を制御するという新たな分子メカニズムが存在することが示唆された。