

奨励金No.1510

抗ウイルス RNA サイレンシングの活性向上メソッド構築

高橋 朋子

埼玉大学 大学院理工学研究科生命科学部門分子生物学領域 助教

Improvement of antiviral RNA silencing activity directed by small RNA

Tomoko Takahashi,

Department of biochemistry and molecular biology, Graduate school of science and engineering, Saitama University, Assistant professor



我々にとっての喫緊の課題は、次なる新興感染症がパンデミックを誘発した際に、得られた知識を迅速に応用できる多様な抗ウイルス技術の開発である。本研究では、small interfering RNA (siRNA) や microRNA (miRNA) などの小分子ノンコーディング RNA による抗ウイルス小分子 RNA サイレンシングの活性向上メソッドを構築するために、その分子メカニズムの包括的理解を目指した。

An urgent task for us is to develop diverse antiviral technologies that will allow us to rapidly apply the knowledge gained when the next emerging infectious disease triggers a pandemic. In this study, we aimed to understand molecular mechanisms comprehensively to develop methods to enhance the activity of antiviral RNA silencing directed by small noncoding RNAs such as small interfering RNA (siRNA) and microRNA (miRNA).

1. 研究内容

【背景と目的】

我々にとっての喫緊の課題は、次なる新興感染症がパンデミックを誘発した際に、得られた知識を迅速に応用できる多様な抗ウイルス技術の開発である。本研究では、small interfering RNA (siRNA) や microRNA (miRNA) などの、20 数塩基の小分子ノンコーディング RNA を生体外から導入することで、ウイルスを生体から排除する抗ウイルス小分子 RNA サイレンシングの活性向上メソッド構築を目指した。小分子 RNA は細胞外から導入すると、相補的な塩基配列をもつ RNA に結合し、RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体の中で、その RNA の分解または翻訳抑制を行う。この分子機構は RNA サイレンシングと呼ばれ、大きく分けて2つの作用機序 (siRNA 型、miRNA 型) により、抗ウイルス免疫技術とし

て応用することができる。しかしながら、実際に予防・治療する RNA 技術としての応用のためには、いくつかの乗り越えるべき課題がある。本研究では、多様なウイルス vs 多様なヒトにおいて効果を発揮する抗ウイルス小分子 RNA サイレンシング活性向上メソッド構築のため、その分子メカニズムの包括的理解と課題解決を目指した。

【結果】

ウイルス感染は多様な免疫応答を誘導する。例えば、RNA ウイルスであるパラインフルエンザウイルスが細胞に感染すると、抗ウイルス性サイトカインである I 型インターフェロン (IFN) 産出や細胞死が誘導される。しかし、ボルナ病ウイルスが感染しても、*in vitro* では一般的に I 型 IFN 産出や細胞死は誘導されない。また、ヒト個人において遺伝的背景の違いにより同じウイルスの感染

に対して異なる免疫応答が誘導されることが明らかとなっている。したがって、我々はまず異なる免疫応答を誘導する複数のウイルス感染細胞モデルを構築し、これらを用いてその分子メカニズムを理解することを目指した。

miRNAはヒトゲノムに約2,000種類コードされており、内在miRNAによるRNAサイレンシングはウイルス感染の有無に関わらず、転写後遺伝子発現制御機構として重要な機能をもつ。我々はこれまでに、パラインフルエンザウイルスに対し、生物種を超えて保存された抗ウイルスmiRNA及びヒトで進化した抗ウイルスmiRNAがどのような抗ウイルス機能をもつのかを解析した。その結果、内在miRNAがウイルスRNAにトラップされることで特定の転写関連遺伝子が発現上昇する可能性が示唆された(Shibamoto et al. in revision)。特定の転写関連遺伝子の発現上昇を介して、その下流でどのような遺伝子が発現変動するのかは現在解析中である(Kitsu et al. in preparation)。また、miRNAが生体内でいつ・どこで・どのように抗ウイルス活性をもつのかを解明するために、自然免疫及び獲得免疫で機能する抗ウイルス性サイトカインが制御するmiRNAの機能解明を行っている。

小分子RNAは標的の塩基配列情報さえあれば、外来／内在に関わらず、多様な核酸を標的とすることができる(塩基配列を“デザイン”することができる)。そのため、不測の事態において得られた知識を、“実際に予防・治療する”RNA技術として迅速に応用することが可能である。また、小分子RNAには医薬品開発におけるシーズとして、低分子医薬や抗体医薬、遺伝子治療が持たない、以下のような優れた特徴がある：

- ・動物への免疫や複雑な製造工程を必要とせず、化学合成が可能である
- ・配列改変や標的RNAとの塩基対合力の人工的な制御が可能であり、副作用を回避できる
- ・導入後、生体内に残留せず分解されるため、ヒ

ト個人における想定外の副作用に対処しやすい
しかしながら、ウイルス感染により分泌されたI型IFNが、細胞に導入した小分子RNAのRNAサイレンシング活性を阻害することが示されていた。(Takahashi et al. 2018 NAR, van der Veen et al. 2018 EMBO J, Takahashi et al. 2018 Genes, Takahashi et al. 2020 NAR, Takahashi et al. 2020 IJMS)。すなわち、人工的にデザインした小分子RNAをウイルス感染細胞に導入した場合、I型IFNによりその活性が阻害される可能性があった。本研究課題では、miRNAの成熟化を促進する二本鎖RNA結合タンパク質であるTRBPが、ウイルス感染細胞において小胞体ストレス応答を誘導し、且つI型IFN産出を抑制することを明らかにした。本研究は、RNAサイレンシングとIFN応答の相互制御を示した研究成果であり、核酸医薬の開発に大きく貢献できると考えられる(Shibata and Moriizumi et al. submitted)。

【考察】

本研究は、新興感染症に打ち勝つための基盤技術構築としての一面だけでなく、学術的にも哺乳類において保存された、内在／外来RNAが制御する抗ウイルス免疫応答の分子メカニズムの解明に繋がると考えられる。ヒト細胞において、ウイルスなどの外来RNAと、内在RNAの経路はこれまで想定されてきたよりも、相互に制御されるクロストークの分子機構が保存されていると考えられる。ウイルスが感染していない細胞において内在RNA経路として機能するRNAサイレンシングと、ウイルス感染により発動するI型IFNシステムのクロストーク機構を解明することで、哺乳類における内在／外来RNAが制御する分子機構の、生命基本原理の解明にも繋がると考えられる。

2. 発表(研究成果の発表)

1. Takahashi T, Heaton SM, Parrish NF. Mammalian antiviral systems directed by small

RNA. PLoS Pathogens 17, e1010091 (2021) 責任著者

2. Kaneko Y, Naito Y, Koide R, Parrish NF, Takahashi T. The regulation of persistent Borna disease virus infection by RNA silencing factors in human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 658, 122-127 (2023) 責任著者
3. 高橋朋子 ヒトでも RNA による RNA を標的とした免疫は機能するのか？第45回日本分子生物学会年会（221130-1202）幕張メッセ ワークショップ 3AW-18 「ノンコーディング核酸配列情報が教える分子相互作用と細胞状態・その変容」第18会場
4. 柴田恵子、高橋朋子 ウイルス感染による RNA サイレンシング促進因子 TRBP の機能変換 ウイルス学若手研究集会 2022（230109）オンライン
5. 森泉陽音、高橋朋子 ウイルス感染による TRBP の相互作用タンパク質の変換 ウイルス学若手研究集会 2022（230109）オンライン