

DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY
LABORATORY OF MOLECULAR GENETICS

- 1) Viral and therapeutic control of IFN- β promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection: LOO, Y-M., OWEN, D.M., LI, K., ERICKSON, A.K., JOHNSON, C.L., FISH, P.M., CARNEY, D.S., WANG, T., ISHIDA, H., YONEYAMA, M., FUJITA T., SAITO, T., LEE, W.M., HAGEDORN, C.H., LAU, D.T., WEINMAN, S.A., LEMON, S.M. and GALE JR. M.**

Viral signaling through retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) and its adaptor protein, IFN promoter-stimulator 1 (IPS-1), activates IFN regulatory factor-3 (IRF-3) and the host IFN-alpha/beta response that limits virus infection. The hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease cleaves IPS-1 to block RIG-I signaling, but how this regulation controls the host response to HCV is not known. Moreover, endogenous IPS-1 cleavage has not been demonstrated in the context of HCV infection in vitro or in vivo. Here, we show that HCV infection transiently induces RIG-I- and IPS-1-dependent IRF-3 activation. This host response limits HCV production and constrains cellular permissiveness to infection. However, HCV disrupts this response early in infection by NS3/4A cleavage of IPS-1 at C508, releasing IPS-1 from the mitochondrial membrane. Cleavage results in subcellular redistribution of IPS-1 and loss of interaction with RIG-I, thereby preventing downstream activation of IRF-3 and IFN-beta induction. Liver tissues from chronically infected patients similarly demonstrate subcellular redistribution of IPS-1 in infected hepatocytes and IPS-1 cleavage associated with a lack of ISG15 expression and conjugation of target proteins in vivo. Importantly, small-molecule inhibitors of NS3/4A prevent cleavage and restore RIG-I signaling of IFN-beta induction. Our results suggest a dynamic model in which early activation of IRF-3 and induction of antiviral genes are reversed by IPS-1 proteolysis and abrogation of RIG-I signaling as NS3/4A accumulates in newly infected cells. HCV protease inhibitors effectively prevent IPS-1 proteolysis, suggesting they may be capable of restoring this innate host response in clinical practice.

- 2) Role of alpha/beta interferon response in the acquisition of poliovirus susceptibility of kidney cells in culture: YOSHIKAWA T., IWASAKI T., IDA-HOSONUMA M., YONEYAMA M., FUJITA T., HORIE H., MIYAZAWA M., ABE S., SIMIZU B., and KOIKE S.**

Replication of poliovirus (PV) is restricted to a few sites, including the brain and spinal cord. However, this neurotropism is not conserved in cultured cells. Monkey kidney cells become susceptible to PV infection after cultivation in vitro, and cell lines of monolayer cultures from

almost any tissue of primates are susceptible to PV infection. These observations suggest that cellular changes during cultivation are required for acquisition of susceptibility. The molecular basis for the cellular changes during this process is not known. We investigated the relationship between PV susceptibility and interferon (IFN) response in primary cultured kidney and liver cells derived from transgenic mice expressing human PV receptor and in several primate cell lines. Both kidneys and liver in vivo showed rapid IFN response within 6 h postinfection. However, monkey and mouse kidney cells in culture and primate cell lines, which were susceptible to PV, did not show such rapid response or showed no response at all. On the other hand, primary cultured liver cells, which were partially resistant to infection, showed rapid IFN induction. The loss of IFN inducibility in kidney cells was associated with a decrease in expression of IFN-stimulated genes involved in IFN response. Mouse kidney cells pretreated with a small dose of IFN, in turn, restored IFN inducibility and resistance to PV. These results strongly suggest that the cells in culture acquire PV susceptibility during the process of cultivation by losing rapid IFN response that has been normally maintained in extraneural tissues in vivo.

3) Differential role of MDA5 and RIG-I in the recognition of RNA viruses: KATO, H., TAKEUCHI, O., SATO, S., YONEYAMA, M., YAMAMOTO, M., MATSUI, K., UEMATSU, S., JUNG, A., KAWAI, T., ISHII, K. J., YAMAGUCHI, O., OTSU, K., TSUJIMURA, T., KOH, C-S., REIS E SOUSA, C., MATSUURA, Y., FUJITA, T. AND AKIRA, S.

The innate immune system senses viral infection by recognizing a variety of viral components (including double-stranded (ds)RNA) and triggers antiviral responses. The cytoplasmic helicase proteins RIG-I (retinoic-acid-inducible protein I, also known as Ddx58) and MDA5 (melanoma-differentiation-associated gene 5, also known as Ifih1 or Helicard) have been implicated in viral dsRNA recognition. In vitro studies suggest that both RIG-I and MDA5 detect RNA viruses and polyinosine-polycytidylic acid (poly(I:C)), a synthetic dsRNA analogue. Although a critical role for RIG-I in the recognition of several RNA viruses has been clarified, the functional role of MDA5 and the relationship between these dsRNA detectors in vivo are yet to be determined. Here we use mice deficient in MDA5 (MDA5^{-/-}) to show that MDA5 and RIG-I recognize different types of dsRNAs: MDA5 recognizes poly(I:C), and RIG-I detects in vitro transcribed dsRNAs. RNA viruses are also differentially recognized by RIG-I and MDA5. We find that RIG-I is essential for the production of interferons in response to RNA viruses including paramyxoviruses, influenza virus and Japanese encephalitis virus, whereas MDA5 is critical for picornavirus detection. Furthermore, RIG-I^{-/-} and MDA5^{-/-} mice are highly susceptible to infection with these respective RNA viruses compared to control mice. Together, our data show that RIG-I and MDA5 distinguish different RNA viruses and are critical for host antiviral responses.

4) Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2: SAITO, T., HIRAI, R., LOO., YUEH-MING., D, OWEN., C, L. JOHNSON., S., C. SHINHA., AKIRA, S., FUJITA T. and GALE JR., M.

RIG-I is an RNA helicase containing caspase activation and recruitment domains (CARDs). RNA binding and signaling by RIG-I are implicated in pathogen recognition and triggering of IFN-alpha/beta immune defenses that impact cell permissiveness for hepatitis C virus (HCV). Here we evaluated the processes that control RIG-I signaling. RNA binding studies and analysis of cells lacking RIG-I, or the related MDA5 protein, demonstrated that RIG-I, but not MDA5, efficiently binds to secondary structured HCV RNA to confer induction of IFN-beta expression. We also found that LGP2, a helicase related to RIG-I and MDA5 but lacking CARDs and functioning as a negative regulator of host defense, binds HCV RNA. In resting cells, RIG-I is maintained as a monomer in an autoinhibited state, but during virus infection and RNA binding it undergoes a conformation shift that promotes self-association and CARD interactions with the IPS-1 adaptor protein to signal IFN regulatory factor 3- and NF-kappaB-responsive genes. This reaction is governed by an internal repressor domain (RD) that controls RIG-I multimerization and IPS-1 interaction. Deletion of the RIG-I RD resulted in constitutive signaling to the IFN-beta promoter, whereas RD expression alone prevented signaling and increased cellular permissiveness to HCV. We identified an analogous RD within LGP2 that interacts in trans with RIG-I to ablate self-association and signaling. Thus, RIG-I is a cytoplasmic sensor of HCV and is governed by RD interactions that are shared with LGP2 as an on/off switch controlling innate defenses. Modulation of RIG-I/LGP2 interaction dynamics may have therapeutic implications for immune regulation.

5) Viral Infections Activate Types I and III Interferon Genes through a Common Mechanism: ONOBUCHI, K., YONEYAMA, M., TAKEMURA, A., AKIRA, S., TANIGUCHI, T., NAMIKI, H., AND FUJITA, T.

Viral infections trigger innate immune responses including production of type I interferons (IFN- α , - β) and other proinflammatory cytokines. Novel antiviral cytokines, IFN- λ (IFN-1, IFN-2, and IFN-3) are classified as type III IFN, and have evolved independently of type I IFN. Type III IFN genes are regulated at the level of transcription and induced by viral infection. Although regulatory mechanisms of type I IFNs is well elucidated, the expression mechanism of IFN- λ is not well understood. Here, we analyzed the mechanism by which IFN- λ gene expression is induced by viral infections. Loss and gain of function experiments revealed the involvement of RIG-I, IPS-1, TBK-1 and IRF-3, key regulators of the virus-induced activation of type I IFN genes. Consistent with this, a search for the cis-regulatory element of human IFN-1 gene revealed a cluster of IRF binding sites and a NF- κ B binding site. Functional analysis demonstrated that all of these are

essential for gene activation by the virus. These results strongly suggest that type I and III IFN genes are regulated by a common mechanism.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Genetics And Molecular Biology

Laboratory of Molecular Genetics

- Loo, Y-M., Owen, D.M., Li, K., Erickson, A.K., Johnson, C.L., Fish, P.M., Carney, D.S., Wang, T., Ishida, H., Yoneyama, M., Fujita T., Saito, T., Lee, W.M., Hagedorn, C.H., Lau, D.T., Weinman, S.A., Lemon, S.M., Gale Jr. M.: Viral and therapeutic control of IFN- β promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 6001-6 (2006)
- Yoshikawa T., Iwasaki T., Ida-Hosonuma M., Yoneyama M., Fujita T., Horie H., Miyazawa M., Abe S., Simizu B., and Koike S.: Role of alpha/beta interferon response in the acquisition of poliovirus susceptibility of kidney cells in culture. *J. Virology* 80, 4313-25 (2006)
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C-S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T. and Akira, S.: Differential role of MDA5 and RIG-I in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441, 101-105 (2006)
- Marques J.T., Devosse T., Wang D., Zamanian-Daryoush M., Serbinowski P., Hartmann R., Fujita T., Behlke M.A. and Williams B.R.: A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nature Biotechnology* 24, 559-565 (2006)
- Sasai, M., Shingai, M., Funami, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Matsumoto, M., and Seya, T.: NAP1 (NAK-associated protein 1) participates in both the TLR3 and the cytoplasmic pathways in type I interferon induction. *J. Immunology*, 177, 8676-83 (2006)
- Guo, Z., Chen, L.M., Zeng, H., Gomez, J.A., Plowden, J., Fujita, T., Katz, J.M., Donis, R.O. and Sambhara, S.: NS1 Protein of Influenza A Virus Inhibits the Function of Intracytoplasmic Pathogen Sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol*, in press, 2006
- Saito, T., Hirai, R., Loo., Yueh-Ming., D, Owen., C, L. Johnson., S., C. Shinha., Akira, S., Fujita T. and Gale Jr., M. : Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 582-7 (2007)
- Onoguchi, K., Yoneyama, M., Takemura, A., Akira, S., Taniguchi, T., Namiki, H., and Fujita, T. : Viral Infections Activate Types I and III Interferon Genes through a Common Mechanism. *J. Biol. Chem*, in press, 2007
- Fujita, T. ; Sensing Viral RNA Amid Your Own. *SCIENCE* 10 November 2006, 314(935-936), 2006

Fujita, T., Onoguchi, K., Onomoto, K., Hirai, R. and Yoneyama, M.: Triggering antiviral response by RIG-I-related RNA helicases. *Biochimie*, in press

渡辺伸昌、藤田尚志：ウイルス感染を検知する細胞内受容体 RIG-I 免疫 2006 中山書店 42 212-221 : 2006

米山光俊、藤田尚志：ウイルス感染に応答した自然免疫誘導のメカニズム *Annual Review 免疫* 2006 中外医学社 182-189 : 2006

尾野本浩司、米山光俊、藤田尚志：ウイルス感染認識と I 型 IFN 発現誘導機構 *日本臨床* 64(7): 1236-1243: 2006

小野口和英、藤田尚志：インターフェロンレセプター *臨床免疫* 45(4):381-385:2006

Onoguchi, K., Yoneyama, M., Akira, S., Taniguchi, T. and Fujita, T.: IRF-3 regulates interferon lambda expression in epithelial cells. "COE Formation in Frontier Life Sciences by Unifying Interactions" The 4th International Student Seminar 2006. 3. 7 Kyoto

Fujita, T.: Triggering Antiviral Responses by the Cytoplasmic RNA Helicase RIG-I. *Recent Advances in Pattern Recognition – TOLL* 2006 2006.3.4～2006.3.7 Salvador, BRAZIL (招待講演)

藤田尚志：ウイルスの複製を感知する CARD ヘリカーゼ、RIG-i ファミリー 第 2 回肝免疫・ウイルス・フロンティア 2006.4.15 名古屋 (招待講演)

藤田尚志：ウイルス感染症と RIG-I ファイミリーによる防御反応 代 71 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2006.7.8 西宮 (シンポジウム)

尾野本浩司、米山光俊、藤田尚志：RIG-I CARD のオリゴマー形成によるシグナル伝達誘導の解析 第 71 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2006.7.7～2006.7.8 西宮

成田亮、平井玲子、米山光俊、藤田尚志：RIG-I ヘリカーゼの酵素活性の解析 代 71 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2006.7.7～2006.7.8 西宮

Fujita, T. : Triggering Antiviral Responses and host growth regulation by the Cytoplasmic RNA Helicase RIG-I. The 13th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research 2006.7.17-19

Fujita, T. : Triggering Antiviral Responses and host growth regulation by the Cytoplasmic RNA Helicase RIG-I. *Innate Immunity in Cancer and Infectious Diseases*. 2006.7.21. Sapporo (招待講演)

Fujita, T. : Triggering Antiviral Responses and host regulation by the Cytoplasmic RNA Helicase RIG-I. *Cytokines* 2006, 2006.8.28, Vienna, Austria (招待講演)

Fujita, T. : Triggering antiviral responses and host regulation by the cytoplasmic RNA helicase RIG-I. *Kyoto COE Colloquium, Immunology*, 2006. 11.4 (招待講演)

Fujita, T. : Sensors for replicating viruses and innate immunity. The 10th Meeting Hirosaki International Forum of Medical Science, 2006.11.21 (招待講演)

藤田尚志：抗ウイルス自然免疫：RIG-like receptor によるウイルス RNA と自己 RNA の識別 第9回リサーチフォーラム『ウイルスとヒト』 2006.12.2 京都（招待講演）

尾野本浩司、米山光俊、藤田尚志：RIG-I CARD のオリゴマー形成によるシグナル伝達とその生理機能 日本分子生物学会 2006 フォーラム 2006.12.6 名古屋

小野口和英、米山光俊、竹村明澄、審良静男、谷口維紹、藤田尚志：Ⅲ型インターフェロンはⅠ型インターフェロンと同じ転写制御を受ける 日本分子生物学会 2006 フォーラム 2006.12.6～2006.12.8 名古屋

2006年度は、4月に米山光俊が助教授として、平井玲子が研究員として共に東京都臨床医学総合研究所より赴任した。また、成田亮（生命科学研究科修士課程1年）が4月に、稲垣篤志（技術職員）が8月に、さらにポーランドからの留学生 Anna Wrabel（生命科学研究科博士後期課程）が10月に加わり、昨年度からのメンバーである藤田尚志（教授）、尾野本浩二、小野口和英（共に早稲田大学理工学研究科博士後期課程2年；生命科学研究科特別研究学生）、竹村明澄（技術職員）、森田裕弥（秘書）と共に総勢10名で研究を進めている。

我々は、ウイルス感染に応答した自然免疫誘導特にI型インターフェロン（IFN）の発現誘導のメカニズムの解明を中心として研究を行ってきた。近年は、ウイルス感染を細胞内で感染を検知する“ウイルスセンサー”である retinoic acid inducible gene (RIG)-I とそのファミリー分子に焦点をあて、それらを介したシグナル伝達機構の分子レベルでの解析、生体防御における生理的な機能、さらにはそれをターゲットにした新たな抗ウイルス、抗腫瘍薬剤の開発を視野に入れた解析を行っている。なお、RIG-I に関する最近の成果から、藤田は2006年度 International Society for Interferon and Cytokine Research (ISICR) Milstein Award を受賞した。

1) RIG-I による RNA 認識と活性化機構の解析（平井、成田、米山、藤田）

RIG-I は、二重鎖 RNA (dsRNA) 刺激による IFN 遺伝子の活性化に関与する分子として発現クローニング法によって同定された RNA ヘリカーゼ分子であり、C 末側にヘリカーゼドメインを持つが、さらに N 末に二つの caspase recruitment domain (CARD) を持つのが特徴である。通常 RIG-I は不活性型として細胞質に局在しているが、ウイルス由来 RNA をヘリカーゼドメインで認識することで活性化され、その ATPase 活性を介した分子内の構造変化により、通常は隠れて機能していない CARD を露出させることにより下流のシグナル分子と会合することができるようになると考えられている。この RIG-I 活性化の分子メカニズムをさらに詳細に解析するために、*in vitro* の実験系を確立し、解析を行った。バキュロウイルスを用いて大量に発現させた RIG-I 蛋白質を部分精製し、様々な核酸存在下における RIG-I による核酸の認識、ATPase およびヘリカーゼの活性化などについて解析し、IFN 誘導シグナル伝達能との関連について検討した。これまでの解析から、*in vitro* においても dsRNA 依存的に RIG-I の ATPase が活性化され、さらに二重鎖構造をほどくヘリカーゼ活性を検出することに成功している。しかし一方で、RIG-I のヘリカーゼの活性化とシグナル伝達能とは必ずしも相関しないことが明らかになりつつあり、今後さらに詳細に解析することにより、RIG-I によるシグナル活性化の分子メカニズムを明らかにしてゆきたい。また、RIG-I のファミリー分子である MDA5、LGP2 についてもそれらの基質特異性なども

含めて *in vitro* 実験系を構築し解析を進めてゆく。さらに将来的には、*in vitro* 実験系を用いることで、RIG-I シグナル活性化をターゲットとした抗ウイルス、抗腫瘍作用を持つ新規薬剤の開発を目指したスクリーニングへとつなげてゆきたいと考えている。

2) RIG-I シグナルを人為的に誘導する実験系を用いた解析 (尾野本、小野口、米山、藤田)

これまでの解析から、RIG-I ファミリーを介したシグナルが、抗ウイルス自然免疫誘導において必須な役割を担っていることが明らかになっている。しかし一方で、ウイルスはこのシグナル経路を遮断することにより、その増殖を有利にするための様々な手段を持つことも明らかになっている。RIG-I を介したシグナル伝達をより詳細に理解する上で、このウイルスによる抑制作用は解析を困難にすると共に、結果の解釈を複雑にしている。そこでこの数年、薬剤を用いることで、ウイルス感染なしに RIG-I シグナルを導入する実験系を構築し、それを用いた解析を進めてきた。本年度は、培養細胞を用いた解析により、RIG-I を介したシグナルが細胞増殖抑制を引き起こすことを明らかにし、その分子メカニズムについて現在解析を行っている。また、この実験系を導入したトランスジェニックマウスの作製を進行させており、それを用いた解析を開始する予定である。それにより、RIG-I シグナルの生理的な機能について、さらに理解が深まることが期待される。

3) RIG-I ファミリー分子のノックアウトマウスの解析 (米山、藤田)

昨年度、RIG-I 遺伝子のノックアウトマウスの解析を報告し、自然免疫誘導における必須な役割について明らかにした。本年度は、大阪大学微生物研究所の審良静男教授のグループとの共同研究で、MDA5 遺伝子のノックアウトマウスの解析について報告した。興味深いことに、MDA5 と RIG-I は異なる基質特異性を持って IFN 誘導に関与していることが明らかになった。すなわち、RIG-I は多くのウイルス感染や *in vitro* 合成された RNA を認識して活性化されるのに対して、MDA5 はピコルナウイルスおよび合成 dsRNA である polyI:C を特異的に認識していることが明らかになった。このことは、両者が異なった機能を持つことを明確に示しており、さらに解析を行うと共に、上記した *in vitro* 実験系を用いた解析と共に理解を深めることで、抗ウイルス薬開発などに対して重要な知見をもたらすことが期待される。さらに現在、もうひとつのファミリー分子である LGP2 についても、ノックアウトマウスの作製と解析を進行させている。

4) IFN-I の発現制御機構の解析 (小野口、米山、藤田)

最近、新たに抗ウイルス活性をもつサイトカインとして IFN-I (IL-28a, -28b, -29) が同定された。IFN-I 遺伝子は、I 型 IFN と同様にウイルス感染によって誘導されることから、その発現制御について解析した。その結果、IFN-I 遺伝子も RIG-I を介したシグナル経路によって活性化されることが明らかになった。このことは、RIG-I シグナルの生体防御における重要性を強く示唆するものである。

5) マウス発生における RIG-I の機能の解析 (Wrabel、尾野本、米山、藤田)

RIG-I ノックアウトマウスは、肝臓の異常によって高率で胎児期に死亡することが明らかになっている。このことは、RIG-I が自然免疫を誘導すること以外にも生理的な機能を持つことを示唆している。このことについて検討するため、マウス発生時における RIG-I や IFN 系の挙動についての解析を進行させている。

