

DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY
LABORATORY OF MOLECULAR GENETICS

- 1) 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 interferon α/β (IFN) 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- β 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 was 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 IRF-3 and NF- κ B-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- β 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.

- 2) Viral Infections Activate Types I and III Interferon Genes through a Common Mechanism: Onoguchi, 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 s (IFN- λ 1, IFN- λ 2, and IFN- λ 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 s 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- λ 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.

3) Takahasi K, Yoneyama M., Nishihori T., Hirai R., Kumeta H., Narita, R., Gale Jr. M., Inagaki F. and Fujita T.: Non-self RNA-Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses.

A DExD/H protein, RIG-I, plays a critical role in the initiation of innate antiviral responses by sensing viral RNA. RIG-I binds to two distinct viral RNA patterns: double-stranded (ds) and 5'ppp-single-stranded (ss) RNA. We found that RIG-I exhibits dsRNA unwinding activity, which requires >15 nt 3' overhang at the substrate end. Transfection of a series of dsRNA with different end structures revealed that susceptibility to helicase activity is reversibly correlated to its potential to activate antiviral signaling and presence of 5'- or 3'-monophosphate is another requirement. Thus, two structurally distinct viral RNA patterns are functional ligands for RIG-I. Binding of RIG-I with dsRNA or 5'ppp-ssRNA in the presence of ATP, conforms a common structure as suggested by the generation of trypsin-resistant complex. Further analyses demonstrated that the two RNA patterns are recognized by C-terminal domain of RIG-I (CTD). Structural analysis of CTD by NMR and its titration by the RIG-I ligands in conjunction with mutagenesis revealed that a basic surface of CTD with characteristic cleft interacts with the RIG-I ligands. CTD coincides with previously

identified repression domain, which is responsible for interaction with helicase linker region, thereby causing auto-repression. Our results suggest that bipartite structure of CTD critically regulates in both auto-repression and de-repression upon encounter with viral RNA patterns.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Genetics And Molecular Biology

Laboratory of Molecular Genetics

- 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*, 282, 7576-7581 (2007)
- Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, Fujita T, Meurs E, Chignard M, Si-Tahar M.: Influenza A Virus Activates TLR3-Dependent Inflammatory and RIG-I-Dependent Antiviral Responses in Human Lung Epithelial Cells. *J Immunol*. 178, 3368-72 (2007)
- 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*, 36, 263-9, 2007
- Arimoto K., Takahashi H., Hishiki T., Konishi H., Fujita T., Shimotohno K.: Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104, 7500-5 (2007)
- Tasaka, M., Sakamoto, N., Itakura, Y., Nakagawa, M., Itsui, Y., Sekine-Osajima, Y., Nishimura-Sakurai, Y., Chen, C.H., Yoneyama, M., Fujita, T., Wakita, T., Maekawa, S., Enomoto, N. and Watanabe, M.: Hepatitis C virus non-structural proteins responsible for suppression of the RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J. Gen Virol*. 88, 3323-3333 (2007),
- Takahasi K, Yoneyama M., Nishihori T., Hirai R., Kumeta H., Narita, R., Gale Jr. M., Inagaki F. and Fujita T.: Non-self RNA-Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. *Molecular Cell* (2007) in press

- Cui, S., Eisenächer, K., Kirchhofer, A., Brzozka, K., Lammens, A., Lammens, K., Fujita, T., Conzelmann, K-K., Krug, A. and Hopfner, K-P.: The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Molecular Cell* (2007) in press
- Fujita, T., Onoguchi, K., Onomoto, K., Hirai, R. and Yoneyama, M.: Triggering antiviral response by RIG-I-related RNA helicases. *Biochimie* 89, 754-60 (2007)
- Yoneyama, M. and Fujita T.: Function of RIG-I-Like receptors in antiviral innate immunity. *J. Biol. Chem.* 282, 15315-8 (2007)
- Yoneyama, M. and Fujita, T.: RIG-I family RNA helicases: Cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18, 545-51 (2007)
- Yoneyama, M. and Fujita, T.: Cytoplasmic double-stranded DNA sensor. *Nature Immunology* 8, 907-908 (2007)
- Onomoto, K., Yoneyama, M. and Fujita, T.: Regulation of Antiviral Innate Immune Responses by RIG-I Family of RNA Helicases. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 316, 193-205 (2007)

- 小野口和英、米山光俊、藤田尚志：細胞内ウイルスセンサーによるインターフェロン誘導機構 炎症と免疫 15(2): 167-172: 2007
- 成田亮、米山光俊、藤田尚志：ウイルス感染に対するインターフェロン応答機構 蛋白質 核酸 酵素 増刊 52(10): 1187-1193: 2007
- 尾野本浩司、米山光俊、藤田尚志：ウイルス感染における細胞内センシング機構 13-22 免疫応答と免疫病態の総合的分子理解 谷口維紹、山本一彦 編 南山堂

-
- Fujita, T.: Signal Transduction by Cytoplasmic Virus Receptors. *Keystone Symposia: Jaks, Stats and Immunity 2007.* 1.9 Steamboat Springs, CO USA
- Fujita, T.: Triggering Antiviral responses and Cell Regulation by the Cytoplasmic RNA Helicase RIG-I. *Keystone Symposia: Intracellular and Intercellular Signaling in Dendritic Cell Function 2007.* 2. 26 Keystone, CO USA
- Fujita, T.: Sensing viruses and antiviral response. *Gordon Research Conferences: Viruses and Cells 2007.* 6. 5 Tilton School, Tilton NH USA
- Fujita, T.: RIG-I family helicases: Cytoplasmic sensor for non-self RNA. *Viral Immunology Symposium 2007.* 7.23 Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, MD USA
- Fujita, T.: Non-self RNA Sensing Mechanism of RIG-I Helicase and Activation of Antiviral Immune Responses. *3rd Annual Meeting of the Oligonucleotide*

Therapeutic Society 2007. 10.5 Langenbeck-Virchow Auditorium, Berlin, Germany

藤田尚志：ウイルス感染を感知するセンサー分子、RIG-I、と抗ウイルス自然免疫機構 彩都バイオサイエンスセミナー 2007. 1.31

彩都バイオヒルズセンター、大阪

藤田尚志：抗ウイルス自然免疫機構制御するウイルスセンサー、RIG-I like receptor. 第13回広島肝臓研究会 2007. 5.17 広島

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3回神戸膠原病研究会 2007. 5. 25 神戸

小野口和英、米山光俊、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 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2007. 7. 5-6 京都

米山光俊、平井玲子、成田亮、藤田尚志：細胞内ウイルス感染センサーRIG-Iによる非自己RNA認識のメカニズム 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2007. 7. 5-6 京都

尾野本浩司、米山光俊、大島宏之、藤田尚志：RIG-I CARDのオリゴマー形成に夜シグナル伝達機構と生理的機能の解析 第72回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2007. 7. 5-6 京都

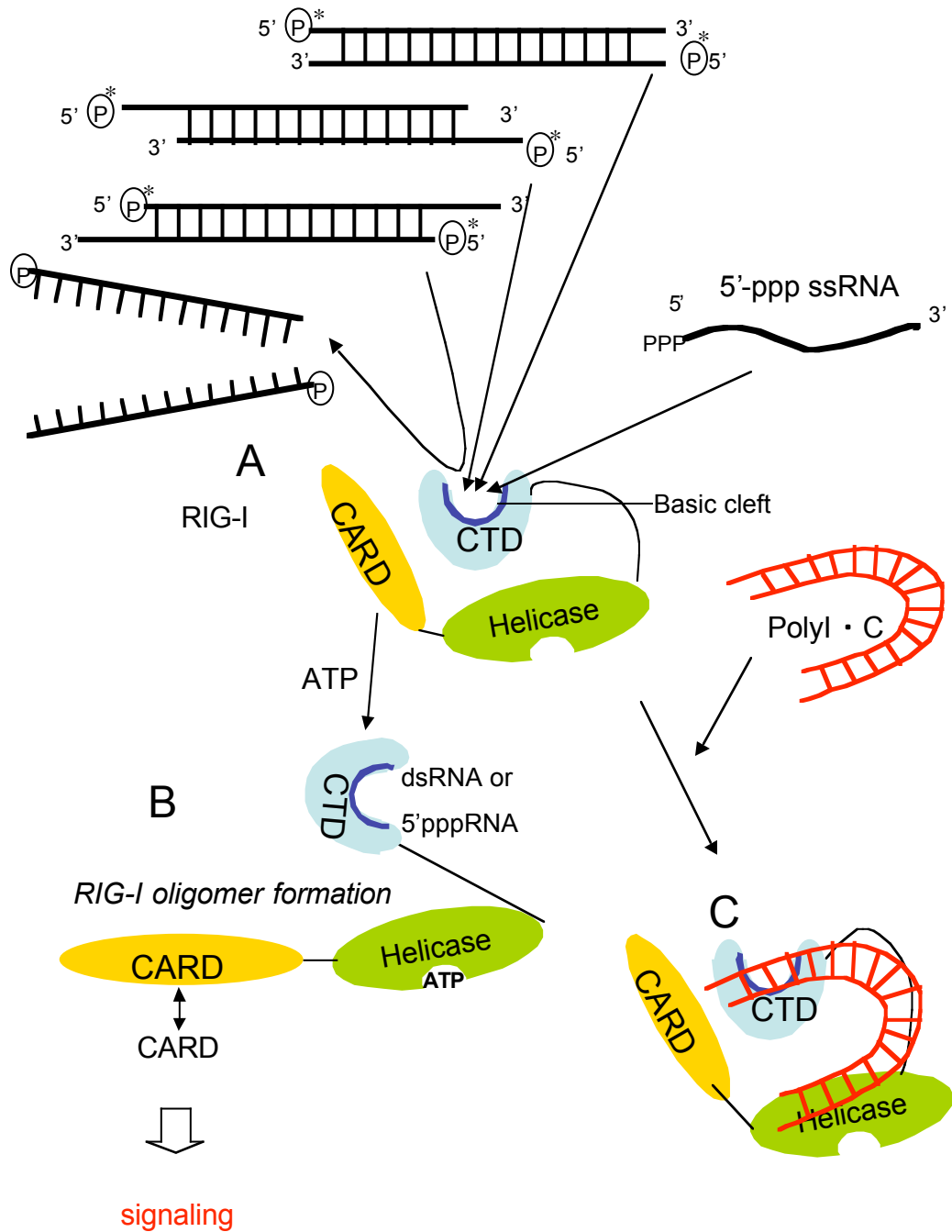
藤田尚志：抗ウイルス生体防御のセンサー、RIG-I like receptors. 第31回阿蘇シンポジウム 2007.7.27 阿蘇

2007年度のメンバーは、藤田尚志（教授）、米山光俊（準教授）、平井玲子（研究員）、尾野本浩司、小野口和英（早稲田大学大学院生命理工研究科博士後期課程3年、生命科学研究科特別研究学生）、Anna Wrabel（生命科学研究科博士課程1年）、成田亮（生命科学研究科修士課程2年）、影山麻衣子、繁本妙子、柗茜（生命科学研究科修士課程1年）、丁維俊（研修員、成都薬医大学、中華人民共和国）、竹村明澄、中原志保（技術職員）、森田裕弥（秘書）の14名であった。

当研究分野ではウイルス感染に応答して引き起こされるI型インターフェロンの発現誘導などの、自然免疫反応のメカニズムを研究している。この一連の反応は細胞がウイルスの感染を感知することから開始される。この反応をつかさどるセンサー分子がRNAヘリカーゼの一つである、retinoic acid-inducible gene-1, (RIG-I)であることを2004年に発表した。RIG-Iに類似したMDA5、LGP2という分子も存在しており、これらを総称してRIG-I like receptor (RLR)と呼ぶ。RIG-Iがウイルス核酸を認識する機構を図に示す。

図-1 RIG-Iによる二重鎖RNA (dsRNA) と5'三リン酸一本鎖RNA (5' ppp ssRNA)の認識と抗ウイルスシグナル伝達。(A) dsRNAや5' ppp ssRNAはRIG-Iのカルボキシル末端ドメイン(CTD)に結合する。dsRNAのうち、3'突出を持つものはRIG-Iのヘリカーゼ活性により解かれ、RIG-I分子から解離するためにシグナルを伝えることが出来ない。(B) しかしそれ以外のはRIG-Iと安定な複合体を形成し、そのコンホメーションを変化させる。この立体構造の変化はATPの存在下で誘導され、その結果、CARDドメインが露出される。CARDドメインはオリゴマー化し、下流のシグナルアダプターであるIPS-1のCARDと相互作用することによってシグナルが伝達される。人工二重鎖RNAポリI:CはRIG-Iと結合するが、異なった構造変化を誘導するため、シグナルを活性化することが出来ない。

[*end phosphate is necessary for intracellular stability]



研究プロジェクト

- 1) RIG-I の生化学的解析と立体構造の決定 (平井、成田、柊、米山、藤田)
- 2) RIG-I の活性化によって誘導される遺伝子群の解析 (尾野本、丁、竹村、米山、藤田)
- 3) RIG-I による細胞周期制御 (尾野本、中原、米山、藤田)

- 4) RLR の遺伝子破壊マウスの解析 (米山、尾野本、中原、Wrabel、藤田)
- 5) RLR の多型の解析 (繁本、米山、藤田)
- 6) 二重鎖 RNA で活性化される蛋白室キナーゼの機能解析 (影山、米山、藤田)
- 7) III 型インターフェロン遺伝子のウイルスによる活性化機構の解析 (小野口、竹村、藤田)
- 8) 発現スクリーニングによる RIG-I シグナルの負の制御因子の探索 (小野口、竹村、藤田)

共同研究

北大 稲垣冬彦 教授 (RLR の構造生物学)

阪大 審良静男 教授 (RLR の機能解析)

Univ. Washington Prof. M. Gale (RLR による HCV 増殖制御)

CDC Dr. S. Suryaprakash (RLR によるインフルエンザウイルスの増殖制御)

University of Freiburg Dr. Friedemann Weber (RLR によるウイルス核酸の認識機構)