

学位論文題名

E4orf6 exports an AU-rich element containing mRNA
to the cytoplasm in adenovirus-infected cells

(アデノウイルス感染時における
AU-rich element 含有 mRNA の核外輸送)

学位論文内容の要旨

アデノウイルスの E4orf6 は、ウイルスゲノムの E4 領域に存在する多くの open reading frame の一つにコードされているタンパクで、N 末側には Nuclear Export Signal (NES) やシステインに富む領域 (CCR)、そして C 末には Helix 構造を持つ、分子量約 34kDa のタンパクである。これまでに E4orf6 にはいくつかの機能があることが知られている。一つ目は、ウイルスの複製に必須であることである。E4orf6 を欠いたアデノウイルスはその産生効率が著しく低下する。二つ目は、発がん活性があることである。E4orf6 を発現しているがん細胞は、従来から知られているアデノウイルスの E1A, E1B 両遺伝子でがん化された細胞よりトランスフォーム活性が上がり、またげっ歯類の細胞でもまたヒトの細胞でさえも E4orf6 を発現していれば、ヌードマウスにはほぼ 100% の割合で腫瘍を形成する。三つ目は、ウイルス感染時に宿主やウイルスの mRNA の輸送に関わっていることである。アデノウイルスを感染させた細胞では、E4orf6 の働きにより大部分の宿主細胞の mRNA が核内に閉じ込められ、ウイルスの mRNA が選択的に核内から細胞質側に輸送され、ウイルス増殖が促進される事が知られている。

東野らは、E4orf6 に結合するタンパクの解析を行い、がん細胞中で pp32 が E4orf6 に結合することを突き止め、さらに ARE-mRNA に結合する HuR とも結合することを見出した。ARE は AU rich element のことで、*c-fos*, *c-myc*, などの oncogene や *IL-3* のような cytokine など、細胞の増殖に関する遺伝子の mRNA に存在し、ARE-mRNA は合成後すぐに分解されるというサイクルを通常繰り返しているが、細胞に血清や Heat shock などの刺激が加わると ARE に HuR が特異的に結合し、さらに HuR に核外輸送タンパク CRM1 を伴って pp32 が結合し、CRM1 依存的に ARE-mRNA とタンパク複合体は核外に輸送され、一時的にそれら ARE-mRNA が安定化され、細胞が増殖の方向に向かうことが知られている。E4orf6 を発現した細胞では、E4orf6 が pp32 や HuR タンパクと相互作用することにより、*c-fos*, *c-myc*, COX-2 といった ARE-mRNA を CRM1 非依存的に強制的かつ恒常的に核外輸送することが報告された (Higashino et al., 2005)。現在、E4orf6 でがん化した細胞で見られた CRM1 非依存的な ARE-mRNA の核外輸送がアデノウイルスにとってどういう効果を持つかに興味を持たれてお

り、本研究では、アデノウイルス感染細胞で、E4orf6によりARE-mRNAが核外輸送されるか検討した。

まず、アデノウイルスを感染させた細胞でもE4orf6とpp32、E4orf6とHuRが結合するか検討した。Hela細胞に50 PFU/cellでWild-typeのアデノウイルス(d1309)を感染させ、感染24時間後にHuR抗体もしくはpp32抗体にて免疫沈降を行い、HuRタンパクと結合しているE4orf6タンパクならびに、pp32タンパクと結合しているE4orf6タンパクをWestern法で確認した。その結果、d1309を感染させた細胞ではE4orf6とpp32、E4orf6とHuRが共沈してくることが分かり、アデノウイルスを感染させたとき、ARE-mRNAの輸送に関わるタンパクHuR、pp32は共にE4orf6と結合することが確認できた。

次にアデノウイルスを感染させた細胞でARE-mRNAが核外輸送されているかどうかを検討した。d1309と、E4orf6を欠失したmutant(d1355)を50 PFU/cellで感染させたHela細胞を核と細胞質に分画し、細胞質側のARE-mRNAをreal-timePCR法で定量した。その結果、d1355を感染させた細胞に対し、E4orf6を有するd1309を感染させた細胞では、細胞質側の*c-fos*、*c-myc*、COX-2のmRNAが多いことが分かり、それに対しコントロールのGAPDH mRNAではそのようなことは認められず、ウイルスを感染させた細胞でも細胞質側にARE-mRNAが蓄積されていることが分かった。

次にARE-mRNA(*c-fos*)の局在を*in situ hybridization*法で調べた。その結果、E4orf6を欠失したd1355を感染させたHela細胞では*c-fos*のmRNAは核内に限局しているのに対し、E4orf6をもつd1309を感染させたHela細胞では*c-fos*のmRNAが細胞質側に広く存在していることが分かった。以上の結果より、アデノウイルスを感染させた細胞では大部分の宿主のmRNAは核の中に閉じ込められるが、ARE-mRNAは例外的に核外輸送されていることがわかった。

ARE-mRNAが核外輸送されているということは、それに結合するHuRタンパクも核外に輸送されると考え、ウイルスを感染させた細胞のHuRタンパクの局在を蛍光免疫染色法で調べた。その結果、E4orf6をもつd1309を感染させた細胞ではHuRが細胞質側に輸送されていることが分かった。このことよりアデノウイルスが感染した細胞ではARE-mRNAがその結合タンパクとともに核外に輸送されていることが分かった。

次に、AREに直接結合しているのはHuRのみなので、もし本研究で見られたARE-mRNAの核外輸送がHuRと関連しているのならば、HuRをノックダウンするとアデノウイルスを感染してもARE-mRNAは核外輸送されなくなるはずである。この事を確認するために、HuRのsiRNAをHeLa細胞に導入することによりHuRをノックダウンし、その細胞にd1309とd1355を感染させ、核と細胞質に分画し、細胞質側のARE-mRNAをreal-timePCR法にて定量しARE-mRNAの核外輸送を検討した。その結果、HuRノックダウンした細胞ではd1309を感染させても、コントロールの細胞より細胞質側の*c-fos*のmRNA量が少ないことが分かり、たとえ細胞にE4orf6が存在してもHuRをノックダウンするとARE-mRNAが核外輸送されない事が分かった。以上の結果より、HuRはアデノウイルス感染時のARE-mRNAの核外輸送に必須であることが明らかになった。

以上の結果より、アデノウイルス感染細胞では、宿主細胞の大部分のmRNAが核内に閉じ

込められているにも関わらず、E4orf6により ARE-mRNA が HuR と共に核外輸送され、HuR はこの輸送に重要な働きをしていることが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 田 順一郎
副 査 教 授 進 藤 正 信
副 査 教 授 柴 田 健一郎

学 位 論 文 題 名

E4orf6 exports an AU-rich element containing mRNA to the cytoplasm in adenovirus-infected cells

(アデノウイルス感染時における
AU-rich element 含有 mRNA の核外輸送)

審査は、審査員全員が出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。

最初に、申請者により学位論文に関する以下の説明がなされた。

アデノウイルスの E4orf6 は、ウイルスゲノムの E4 領域に存在する多くの open reading frame の一つにコードされているタンパクで、N 末側には Nuclear Export Signal (NES) やシステインに富む領域 (CCR)、そして C 末には Helix 構造を持つ、分子量約 34kDa のタンパクで、これまでに E4orf6 は 1) ウイルスの複製に必須であること、2) 発がん活性があること、3) ウイルス感染時に宿主やウイルスの mRNA の輸送に関わっていることなどが報告されている。アデノウイルスを感染させた細胞では、E4orf6 の働きにより大部分の宿主細胞の mRNA が核内に閉じ込められ、ウイルスの mRNA が選択的に核内から細胞質側に輸送され、ウイルス増殖が促進される事が知られている。

ARE (AU rich element) は、*c-fos*, *c-myc*, などの oncogene や *IL-3* のような cytokine など、細胞の増殖に関する遺伝子の mRNA の非翻訳領域に存在し、ARE-mRNA は合成後すぐに分解されるというサイクルを通常繰り返しているが、細胞に刺激が加わると ARE に HuR、pp32 のタンパクおよび核外輸送タンパク CRM1 が結合し、CRM1 依存的に ARE-mRNA とタンパク複合体は核外に輸送され、細胞が増殖の方向に向かうことが知られている。E4orf6 を発現した細胞では、ARE-mRNA を CRM1 非依存的に強制的かつ恒常的に核外輸送することが報告され、細胞癌化との関連性が検索されている。本研究では、アデノウイルス感染細胞で、

E4orf6 により ARE-mRNA が核外輸送されるか検討した。

HeLa 細胞に 50 PFU/cell で Wild-type のアデノウイルス (dl309) を感染させ、感染 24 時間後に HuR 抗体もしくは pp32 抗体にて免疫沈降を行ったところ、dl309 感染細胞では HuR、pp32 は共に E4orf6 と結合した。dl309 と、E4orf6 を欠失した mutant (dl355) を 50 PFU/cell で感染させた HeLa 細胞を核と細胞質に分画し、細胞質側の ARE-mRNA を real-timePCR 法で定量した。その結果、E4orf6 を有する dl309 を感染させた細胞では、細胞質側に ARE-mRNA が蓄積されていた。*in situ hybridization* 法で ARE-mRNA (*c-fos*) の局在を調べたところ、アデノウイルスを感染させた細胞では大部分の宿主の mRNA は核の中に閉じ込められるが、ARE-mRNA は例外的に核外輸送されていることがわかった。この際、HuR タンパクも同時に核外輸送されていた。HuR の siRNA を HeLa 細胞に導入することにより HuR をノックダウンし、細胞質側の ARE-mRNA を real-timePCR 法にて定量し ARE-mRNA の核外輸送を検討した。その結果、HuR ノックダウンした細胞では dl309 を感染させても、コントロールの細胞より細胞質側の *c-fos* の mRNA 量が少ないことが分かり、たとえ細胞に E4orf6 が存在しても HuR をノックダウンすると ARE-mRNA が核外輸送されない事が分かった。

以上の結果より、アデノウイルス感染細胞では、宿主細胞の大部分の mRNA が核内に閉じ込められているにも関わらず、E4orf6 により ARE-mRNA が HuR と共に核外輸送され、HuR はこの輸送に重要な働きをしていることが明らかになった。

引き続き、審査担当者からの質問が行われた。主な質問項目は、

1. E4orf6 と E4orf6/7 の違いについて
2. 核から細胞質への輸送機構について
3. AREmRNA の核外輸送はウイルスの複製にも必要なのか
4. AREmRNA のタンパクへの翻訳は細胞のどこで行われるのか
5. AREmRNA の細胞質と核との分離方法について
6. pp32 のノックダウンでは核外への輸送は起こらないのか
等であった。

本研究はアデノウイルスが増殖する機構の一端を明確に説明したものであり、今後のウイルス感染の予防対策にも結びつく価値ある結果を得たものと高く評価できる。加えて、いずれの質問に対しても、申請者から明確な回答を得られ、さらに関連分野に対する幅広い知識を有していることが示され、学位授与に値するものと考えられた。