

## アデノウイルス初期遺伝子の発現を抑制する microRNA

### 学位論文内容の要旨

#### [本研究の意義、目的および方法]

アデノウイルスは正 20 面体構造を有する直鎖状の二本鎖 DNA ウイルスで、齧歯類細胞を腫瘍化することからがん化のモデルとして研究されてきた。アデノウイルスはヒト細胞においては細胞をがん化することなく細胞融解性にはたらし、急性気道疾患や流行性角結膜炎などの感染症を起こすことが知られている。アデノウイルス初期転写遺伝子の一つである *E1A* は感染細胞の転写因子により活性化され、感染一時間以内に発現し、他の初期遺伝子の転写を誘導し、ウイルスの感染・複製にもっとも重要な役割を演じている。

microRNA (miRNA) は真核生物で遺伝子の発現を制御するノンコーディング RNA の一種であり、遺伝子発現調節において重要な役割を演じていることが近年明らかになってきた。動物の miRNA はそのターゲット mRNA に結合し、ターゲット mRNA の分解や翻訳抑制によりタンパク合成を阻害することが知られており、個体の発生、細胞の増殖、分化、アポトーシスなど多岐にわたる現象に関与することが明らかになってきている。

近年、ウイルスの感染に関わる miRNA についての関心が高まっており、2004 年にはウイルスにコードされた miRNA が Epstein-Barr virus に感染した細胞で同定され、ウイルス自身の miRNA がウイルスの mRNA をターゲットにして働き、自らの複製を制御している可能性が示された。また、retrovirus primate foamy virus の複製を阻害するヒトの miRNA が人工的な系で同定されており、宿主側の miRNA がウイルスの mRNA をターゲットにする可能性が示された。肝臓に多く存在するヒト miRNA (miR-122) を発現する肝細胞では RNA ウイルスである C 型肝炎ウイルス (HCV) のゲノム RNA の複製がみられないことが示されており、ウイルスのゲノム RNA をターゲットにする細胞側の miRNA の存在が示唆されている。それに加えて、ウイルスにコードされた miRNA が宿主細胞側の因子を抑制することが示唆されているが、まだ宿主細胞側のターゲットは同定されていない。以上のようにウイルスの感染に miRNA が関与している可能性は示唆されているが、ヒトに感染するウイルスの遺伝子をターゲットにするヒトの miRNA の存在はまだ明らかではない。そこで本研究では、ヒトアデノウイルス 5 型 (hAd5) *E1A* の mRNA をターゲットにするヒト miRNA を検索し、その miRNA による hAd5 *E1A* の発現の制御について検討した。

ヒト癌細胞株 (Saos-2, HeLa) にアデノウイルスを感染させ、TCID<sub>50</sub> 法により感染効率を測定した。hAd5 の初期遺伝子 *E1A* の 3'UTR を標的とするヒト miRNA を miRNA 検索アルゴリズム

MicroInspector により *in silico* 検索した。その後、Saos-2、HeLa における候補 miRNA の発現レベルをノーザンブロットングにより検索した。pCMVGL に hAd5 *E1A* 3'UTR を組み込んだレポータープラスミド (pCMVGL-hAd5 *E1A* 3'UTR) を作製し、さらに、miRNA と相補的な配列をもつ 2'-O-メチル化オリゴヌクレオチド (2'-O-Me-anti-miR214) を合成した。作製したレポータープラスミドを単独あるいは 2'-O-メチル化オリゴヌクレオチドとともに Saos-2、HeLa に導入し、デュアルルシフェラーゼアッセイをおこなった。

#### [結果および考察]

HeLa と Saos-2 における hAd5 の感染効率を比較したところ、Saos-2 におけるアデノウイルスの感染効率は HeLa と比較して低かった。この感染効率の差異が特定の miRNA によるものなのかどうかについて検索した。hAd5 *E1A* 3'UTR を標的とするヒト miRNA の *in silico* 検索により、候補 miRNA が 4 種類 (hsa-miR-15b、hsa-miR-16、hsa-miR-214、hsa-miR-487) 存在することが示された。MicroInspector により検出された miRNA のうち、hsa-miR-487 と hsa-miR-214 のシードシーケンスが hAd5 *E1A* 3'UTR と完全に相補的であることから、他の候補よりもこれら二つの miRNA が hAd5 *E1A* 3'UTR をターゲットにする可能性が高いことが予測された。miRNA と完全に相補的なオリゴヌクレオチドプローブを用いたノーザンブロットングにより、hsa-miR-214 は Saos-2 で高発現していることが示されたが、HeLa 細胞では発現はほとんど認められなかった。また、hsa-miR-487 は HeLa および Saos-2 細胞で発現は認められなかった。

pCMVGL-hAd5 *E1A* 3'UTR を導入した Saos-2 では、コントロールと比較してルシフェラーゼ活性の低下がみられたが、HeLa ではルシフェラーゼ活性の低下は認められなかったことから内在性の hsa-miR-214 が *E1A* 3'UTR と結合してルシフェラーゼ遺伝子の転写活性を抑制することが示唆された。

2'-O-Me-anti-miR-214 を pCMVGL-hAd5 *E1A* 3'UTR とともに Saos-2 に導入すると、2'-O-Me-anti-miR-214 を導入しない場合と比較してルシフェラーゼ活性が上昇した。このことは 2'-O-Me-anti-miR-214 が内在性の hsa-miR-214 と結合して hsa-miR-214 の活性を抑制したことにより、ルシフェラーゼ遺伝子の転写が抑制されなかったことを示している。HeLa では 2'-O-Me-anti-miR-214 を pCMVGL-hAd5 *E1A* 3'UTR とともに導入すると、2'-O-Me-anti-miR-214 を導入しない場合と比較してルシフェラーゼ活性の上昇は認められなかった。以上の結果より hsa-miR-214 が hAd5 *E1A* 3'UTR をターゲットにすることが裏付けられた。

以上より、hsa-miR-214 は hAd5 *E1A* 3'UTR をターゲットにし、hAd5 *E1A* を介して hAd5 の複製を抑制することが示された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 山 敦 郎  
副 査 教 授 進 藤 正 信  
副 査 教 授 柴 田 健 一 郎

学 位 論 文 題 名

## アデノウイルス初期遺伝子の発現を抑制する microRNA

審査はまず論文提出者に対して提出論文の内容の要旨を説明させ、次いで論文の内容について審査委員の口頭試問を行った。以下に提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

### 論文要旨

microRNA (miRNA)は真核生物で遺伝子の発現を制御するノンコーディング RNA の一種であり、遺伝子発現調節において重要な役割を演じていることが、近年明らかになってきた。本研究では、動物細胞における miRNA の抗ウイルス作用について検討した。

ヒト癌細胞株 (Saos-2、HeLa) にアデノウイルスを感染させ、感染効率を TCID<sub>50</sub> 法により測定した。ヒトアデノウイルス 5 型 (hAd5) の初期遺伝子 *E1A* の 3'UTR を標的とするヒト miRNA を miRNA 検索アルゴリズムである MicroInspector により *in silico* 検索した。その後、Saos-2、HeLa における候補 miRNA の発現レベルをノーザンブロットィングにより確認した。pCMVGL に hAd5 *E1A* 3'UTR を組み込んだレポータープラスミド (pCMVGL hAd5 *E1A* 3'UTR) を作製し、さらに、miRNA と相補的な配列をもつ 2'-O-メチル化オリゴリボヌクレオチドを合成した。作製したレポータープラスミドを単独あるいは 2'-O-メチル化オリゴリボヌクレオチドとともにヒト癌細胞株に遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイをおこなった。

Saos-2におけるアデノウイルスの感染効率はHeLaと比較して低かった。hAd5 *E1A*の3'UTRを標的とするヒトmiRNAの*in silico*検索により、候補miRNAが4種類 (hsa-mir-15b、hsa-mir-16、hsa-mir-214、hsa-mir-487) 存在することが示された。ノーザンブロットィングにより、hsa-mir-214はSaos-2で高発現していることが示された。hAd5*E1A*3'UTRを組み込んだプラスミドを導入したSaos-2では、ルシフェラーゼ活性の低下がみられた。hsa-mir-214を阻害する2'-O-メチル化オリゴリボヌクレオチドを導入すると、Saos-2でのルシフェラーゼ活性の低下はみられなかった。以上の結果より、hsa-mir-214が*E1A*依存的に感染効率の抑制に関与している可能性が示唆された。

### 審査の内容

### 1. Saos-2 のアデノウイルスの感染効率が HeLa よりも低い原因について

アデノウイルスの感染はファイバー蛋白質が細胞表面のレセプターに結合するところから始まる。アデノウイルスのレセプターとして CAR (coxsackie and adenovirus receptor) が知られており、CAR の細胞表面における発現量がアデノウイルスの感染効率に影響を与えることが報告されている。本研究は CAR 以外のアデノウイルスの感染効率に関与する因子としてアデノウイルスの発現を抑制する hsa-mir-214 の存在を予測した。hsa-mir-214 がアデノウイルスの感染を抑制するため、hsa-mir-214 の発現が認められなかった HeLa よりも hsa-mir-214 の発現が認められた Saos-2 のほうがアデノウイルスの感染効率が低くなるのではないかと考察した。

### 2. pCMVGL-hAd5 *E1A* 3'UTR を Saos-2 に導入するとルシフェラーゼ活性が抑制される理由について

レポータープラスミドのルシフェラーゼ遺伝子の下流に miRNA のターゲット遺伝子を導入すると、目的の miRNA によりルシフェラーゼ活性が抑制されるという報告があるが、ルシフェラーゼ活性が抑制される理由については明確な理由は示されていない。本研究では pCMVGL-hAd5 *E1A* 3'UTR の hAd5 *E1A* 3'UTR に hsa-mir-214 が結合することにより翻訳が抑制され、ルシフェラーゼ活性が抑制されるのではないかと考察した。

### 3. 2'-O-メチル化オリゴを使用した理由について

2'-O-メチル基で修飾することで RNA の非特異的な分解が抑制されるため、miRNA のアンチセンスの配列を 2'-O-メチル化修飾した。レポーターアッセイの結果を裏付ける方法として、被験配列に変異を導入する方法と miRNA の機能をアンチセンスで阻害する方法が報告されており、本研究ではアンチセンス 2'-O-メチル化オリゴリボヌクレオチドを用いた。

### 4. アデノウイルスの遺伝子の発現を抑制する miRNA の新規性について

ヒトを宿主とする DNA ウイルスの遺伝子発現を抑制するヒト miRNA の存在は現在まで報告されておらず、本研究のアデノウイルスの遺伝子の発現を抑制する miRNA についての報告は新規性があると考えられる。

本研究において hsa-mir-214 がアデノウイルスの初期遺伝子 *E1A* の発現を抑制することが示され、ウイルスの感染を抑制することが示唆された。これはウイルスの感染抑制に miRNA を利用できることを示唆するものである。本研究は今後さらなる研究を進めることで臨床に反映しうると考えられ、将来性の点においても高く評価されるものであった。よって学位申請者は博士(歯学)の学位授与にふさわしいものと認められる。