

アデノウイルス感染による RNA 結合タンパク HuR の制御

学位論文内容の要旨

ウイルスは細胞に感染すると、自らの遺伝子産物によって宿主細胞の様々な機能を制御し、自身の増殖に有利な環境をつくりだす。アデノウイルス感染細胞では、感染後 12 時間以降の後期になると、大部分の宿主細胞の mRNA の核外輸送は停止し、ウイルス粒子の構成タンパクをコードする後期 mRNA が優先的に核外輸送されて翻訳される。しかし AU-rich element (ARE) を持つ mRNA は例外で、宿主の mRNA であるにも関わらず感染後期に核外輸送され安定化される。RNA 結合タンパク HuR は、この ARE に特異的に結合し、ARE-mRNA を安定化する役割を果たしているが、アデノウイルス感染細胞での HuR の働きは、未だ明らかにされていない。HuR はまた、細胞質顆粒構造体の Stress granule (SG) の構成タンパクであることが知られている。SG は、真核細胞がストレスに暴露された時、細胞質内に形成される 2 種類の細胞質顆粒構造体の一つで、mRNA と RNA 結合タンパクが集合しているため mRNP granules と呼ばれている。ストレスが緩和されるまで mRNA を一時保管する場となるのが SG であり、mRNA を分解する場となるのがもう一方の mRNP granules の P-bodies である。つまり mRNA の運命は、この 2 つの mRNP granules により左右されることになる。ウイルスが感染した際、ウイルスの増殖にそれらの mRNP granules が必要であることがいくつかのウイルスで知られているが、一方では逆に、mRNP granules が宿主のウイルス防御反応の一旦を担っていると報告もある。しかし現在まで、アデノウイルス感染における mRNP granules についての報告はなされていない。

本研究は、アデノウイルス感染細胞における HuR および SG の挙動を明らかにし、これらのもつ生物学的意義を解明することを目的とした。

HeLa 細胞に野生型 5 型アデノウイルス (Ad5 wt300) を感染させ、24 時間後の HuR の局在変化を免疫染色法とウエスタン法で検討した。その結果、Ad5 wt300 感染細胞では細胞全体の HuR タンパク量は感染後一貫して一定であるが、核内の HuR 量は感染後経時的に減少し、細胞質の HuR 量は増加することがわ

かった。このことは、Ad5 wt300 感染細胞では感染後期に HuR が核外輸送されることを示唆している。

次に、このHuRの局在変化をもたらすウイルスの原因遺伝子を解明するため、様々な遺伝子を欠失した変異型Ad5を感染させ、24時間後のHuRの局在変化を免疫染色法で検討した。その結果、E1Aを欠失した変異型Ad5 (dl312) 感染細胞のみでHuRの局在変化が認められなかった。さらにAd5 dl312感染細胞でのHuRの局在をウエスタン法で検討したところ、Ad5 d312感染細胞ではAd5 wt300で認められる変化は見られなかった。よって、HuRの局在変化をもたらすウイルスの原因遺伝子の少なくとも一つはE1Aであることが示された。

E1Aの影響をさらに検討するため、HeLa細胞にE1Aを強制発現させ、HuRの局在を免疫蛍光染色法で観察した。するとE1Aが細胞質に発現した細胞では、感染時と類似したHuRの局在変化を再現することができた。この結果は、Ad5 wt300感染細胞でのHuRの局在変化が、E1Aによってもたらされる可能性を強く示唆している。

HuRは先述のようにSGの構成タンパクとして機能しているため、次にアデノウイルス感染細胞のSGの挙動についても検討を進めた。SGは細胞がストレスに曝された際に細胞質内に出現するため、Oxidative stressである亜ヒ酸ナトリウム（以下、ヒ素と記す）を細胞に添加することでSGを形成させ、HuRを免疫蛍光染色することによりSGを観察した。通常の培養下では、ヒ素の添加によりほぼ全ての細胞でSGの形成が認められた。一方、Ad5 wt300感染細胞ではHuRの局在変化が認められ、さらにヒ素を添加してもSGが形成されなかった。これに対し、E1Aを欠失したAd5 dl312感染細胞ではHuRの局在変化が認められず、さらにヒ素の添加によりほぼすべての細胞でSGの形成が認められた。また、E1Aを強制発現させたHeLa細胞にヒ素を添加し、免疫蛍光染色にてHuRを観察したところ、細胞質にE1AとHuRがともに多く存在する細胞ではSGの形成は認められなかった。以上の結果から、E1Aが宿主細胞のSG形成を抑制することが明らかとなった。

本研究では、ARE-mRNAの輸送・安定化に関連するRNA結合タンパクHuRが、アデノウイルス感染後期の24時間後には細胞質でその発現が高くなり、HuRが核外輸送されていることが示唆された。また、HuRの核外輸送に必要なウイルス遺伝子産物はE1Aであることが、ウイルス変異株を感染させた実験系でも、E1Aを強制発現させた実験系でも確認できた。これらの結果は、HuRを核外輸送することが、これまで知られていなかったE1Aの新たな機能であることを示している。さらにE1Aはアデノウイルスの複製に際して必要なウイルス遺伝子産物であることから、HuRの核外輸送もまたアデノウイルスの複製において重要である可能性が考えられる。

ウイルス感染後期ではARE-mRNAならびにウイルス後期mRNAは優先的に核外輸送され、また本研究で明らかになったようにHuRも細胞質にその局在を移すことから、HuRはARE-mRNAの核外輸送のみならず、ウイルス後期のmRNAの核外輸送にも関連している可能性がある。ウイルス感染後期には、宿主細胞の大部分のmRNAは核外輸送が停止するため、ARE-mRNAやウイルス後期mRNAはそれらとは異なる核外輸送経路を利用しているはずである。従って、ARE-mRNAとウイルス後期mRNA がHuRを介した輸送機構を共有している

も全く不思議ではなく大変興味深い。

本研究では、ウイルス感染後期にヒ素の刺激を細胞に加えてもSGの形成は観察できなかった。本来、SGは細胞がストレスにさらされたときに、ポリソームで翻訳されるべきmRNAを一時的に貯蔵するmRNP granuleであり、ARE-mRNAもSGに局在することが知られている。従って、もしSGがウイルス感染後期に存在すると、ウイルス後期mRNAもSGの中に蓄積され、効率の良い翻訳が妨げられると予想できる。E1Aはこのことを防ぐために、SGを形成することを抑制し、ウイルス後期mRNAやARE-mRNAの翻訳が効率よく行われるようにしていると考えられる。

これまでRNAウイルスがSGを消失させたり、逆に出現させたりして自身の生産を促進するという報告はあるが、DNAウイルスでSGの挙動が明らかになったのは本研究が最初である。現時点ではSGを消失させることがアデノウイルスの生産効率にどのような影響を与えるかは明らかではないが、今後このことに答えを出す必要があると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 川 善 政
副 査 教 授 進 藤 正 信
副 査 教 授 柴 田 健 一 郎

学 位 論 文 題 名

アデノウイルス感染による RNA 結合タンパク HuR の制御

審査は、上記担当者が申請者に対して提出論文と関連事項について口頭試問を行い進められた。審査論文の概要は以下の通りである。

アデノウイルス感染細胞では、感染後 12 時間以降の後期になると、大部分の宿主細胞の mRNA の核外輸送は停止し、ウイルスの後期 mRNA が優先的に核外輸送されて翻訳される。しかし宿主細胞の AU-rich element (ARE) を持つ mRNA は例外的に感染後期に核外輸送され安定化される。RNA 結合タンパク HuR は、ARE に結合し、ARE-mRNA を安定化する役割を果たしているが、アデノウイルス感染細胞における働きは未だ解明されていない。HuR はまた、Stress granule (SG) の構成タンパクとして機能している。SG は、細胞がストレスに暴露された時に細胞質内に形成される mRNP granule という細胞質顆粒構造体の一つであり、ストレスが緩和されるまで mRNA を一時保管する場となっている。ウイルス感染とこの mRNP granules との関連性がいくつか報告されているが、現在までアデノウイルス感染における mRNP granules についての報告はなされていない。

本研究は、アデノウイルス感染細胞における HuR および SG の挙動を明らかにし、これらのもつ生物学的意義を解明することを目的とした。

HeLa 細胞に野生型 5 型アデノウイルス (Ad5 wt300) を感染させ、HuR の局在変化を免疫染色法とウエスタン法で検討した。その結果、Ad5 wt300 感染細胞では感染後期に HuR が核外輸送されることが示唆された。

次に、この HuR の局在変化をもたらすウイルスの原因遺伝子を解明するため、様々な遺伝子を欠失した変異型 Ad5 を感染させ、検討を行った。その結果、E1A を欠失した変異型 Ad5 (dl312) 感染細胞では HuR の局在変化が認められないことがわかり、ウイルスの原因遺伝子の少なくとも一つは E1A であることが示された。

E1A の影響をさらに検討するため、HeLa 細胞に E1A を強制発現させ、HuR の局在を免疫蛍光染色法で観察した。すると E1A が細胞質に発現した細胞では、感染時と類似した

HuRの局在変化を再現することができた。これは、HuRの局在変化がE1Aによってもたらされる可能性を、強く裏付けている。

次にアデノウイルス感染細胞でのSGの挙動について検討した。Oxidative stressである亜ヒ酸ナトリウム（以下、ヒ素と記す）を細胞に添加してSGを形成させ、HuRを免疫蛍光染色することによりSGを観察した。通常の培養下では、ヒ素の添加によりほぼ全ての細胞でSGの形成が認められた。一方、Ad5 wt300感染細胞ではHuRの局在変化が認められ、さらにヒ素を添加してもSGが形成されなかった。これに対し、Ad5 dl312感染細胞ではHuRの局在変化が認められず、ヒ素の添加ではほぼすべての細胞でSGの形成が認められた。また、E1Aを強制発現させたHeLa細胞にヒ素を添加すると、細胞質にE1AとHuRがともに多く存在する細胞ではSGの形成は認められなかった。以上の結果から、E1Aが宿主細胞のSG形成を抑制することが明らかとなった。

ウイルス感染後期ではARE-mRNA、ウイルス後期mRNA、また本研究で明らかになったようにHuRも細胞質にその局在を移すことから、HuRはARE-mRNAおよびウイルス後期mRNAの核外輸送に関連している可能性が示され、このためにE1Aの働きが必要であると考えられた。

また、ウイルス感染後期の細胞にヒ素を加えてもSGは形成されなかった。本来SGは、mRNAを一時保管する働きがあり、ARE-mRNAもSGに局在することが知られている。従って、もしSGがウイルス感染後期に存在すると、ウイルス後期mRNAもSGの中に蓄積され、効率の良い翻訳が妨げられると予想できる。E1Aはこれを防ぐためにSGの形成を抑制し、結果として効率の良いウイルス後期mRNAとARE-mRNAの翻訳に寄与していると考えられる。

申請者による上記論文内容の説明後、本研究および関連事項についての口頭試問を行った。1)各ウイルス遺伝子産物の役割、2)炎症関連のARE-mRNAの例、3)HuRの機能、4)mRNP granuleの種類と機能、5)E1A強制発現での局在パターンについて等に対する質問に、申請者から適切な回答が得られ、研究の計画および遂行において適切な知識と技能を有すると判断した。

申請者は本論文をさらに発展させた研究を継続しており、本論文およびこれらの研究はウイルス学的・細胞生物学的に高く評価され得る研究と考えられ、博士（歯学）の学位に値するものと認められた。