

学 位 論 文 題 名

Effect of Human CRM1 on HIV-1 Production in both Nucleus and Cytoplasm of Rat Cells

(ラット細胞の核分画と細胞質分画でのHIV-1産生における
ヒトCRM1の効果に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスである HIV (ヒト免疫不全ウイルス) は、複雑なゲノム構造を持つレトロウイルスで、1983 年に発見された HIV-1 と 1986 年に発見された HIV-2 の 2 種類が知られている。HIV-2 は西アフリカなど一部の地域にしか感染が認められないのに対し、HIV-1 は世界中に蔓延し、人類の脅威となっている。しかし、HIV-1 に対するワクチンや根治治療法は見つかっていない。それらの開発における困難の一つは有効性・安全性の評価系としての簡便な感染動物モデルが存在しないことである。従って、HIV-1 感染小動物の樹立はワクチンと抗ウイルス治療の開発に必要である。げっ歯類には HIV-1 複製を抑制する宿主因子が存在しており、ラット細胞でも HIV-1 の増殖は非常に効率が悪い。にもかかわらず、ラットは感染モデル動物に改良できる可能性を持っている。受容体であるヒトの CD4 や CCR5 を発現させると HIV-1 の増殖が、わずかではあるが起こることが報告されているからである。ラット細胞中で HIV-1 を効率よく増殖できるようにするためには、複製抑制の原因になっている宿主因子を同定する必要がある。

以前に、当研究室ではラットの輸送因子 CRM1 (rCRM1) がヒト白血病ウイルス (HTLV-1) の輸送因子 Rex の多量体化を促さないために、ウイルス mRNA を核から細胞質に効率よく輸送しないことを報告した。また最近、当研究室でラットのマクロファージに RNA 輸送因子である hCRM1 (ヒト CRM1) を導入することにより Gag タンパク質の産生量が増加することを報告した。

そこで、HIV-1 の複製における hCRM1 の分子機構をラット細胞で検討し、ラット感染モデル作成へ資する事を目的とした。

【材料と方法】 はじめに、rCRM1 および hCRM1 と pCMV ΔR8.2 (HIV-1 molecular clone) をラット細胞にトランスフェクション法を用いて導入し、培養上清中の Gag タンパク質量を p24 ELISA 法を用いて検討した。また、Real-time PCR 法, in situ hybridization 法, Polyribosome assay, pulse chase 法と western blotting 法を用いて、gag mRNA の輸送効率と gag mRNA の局在、翻訳、Gag タンパク質の安定性、プロセッシングを調べた。また Gag タンパク質産生の増強に重要である hCRM1 の部位を調べるため、N 末端側半分を rCRM1 に代えた rhCRM1 と C 末端側を rCRM1 に代えた hrCRM1 を作製し検討した。

【結果】 はじめに、rCRM1 および hCRM1 をラット細胞にトランスフェクション法を用いて導入し、Gag タンパク質の産生を ELISA 法を用いて検討した。その結果、rCRM1 の導入では変化が見られなかったのに対し、hCRM1 導入により Gag タンパク質の産生亢進が確認された。次に、定量 PCR、および in situ hybridization assay で gag mRNA の局在を検討した。定量 PCR 法において hCRM1 の

導入によって gag mRNA の核外輸送が促進されたが、tat, β -gal mRNA の核外輸送効率は変わらなかった。このことから hCRM1 は特異的に gag mRNA の核外輸送を増強していることが分かった。またこの核外輸送効率における増強は rCRM1 を導入したときには見られなかった。In situ hybridization 法において、細胞内での gag mRNA の局在を共焦点顕微鏡を用いて観察した。ラット細胞内において hCRM1 と rCRM1 のどちらを導入したときにおいても gag mRNA のシグナルが細胞全体に見られる細胞と核内にとどまっている細胞の2種類見られた。またシグナルが細胞内全体に見られるときも、核内にとどまっているときにおいても細胞質、核内での分布の仕方に違いは見られなかった。しかし、hCRM1 を導入したときに gag mRNA が細胞質まで運ばれている細胞の数が増加したのに対して、rCRM1 を導入したときにはこのような増加は少なく、gag mRNA が核内にとどまっている細胞が多く見られた。これらのことから hCRM1 はラット細胞において、特異的に gag mRNA の核外輸送を増強することが分かった。しかし、タンパクの増強が約 20 倍であるのに対して、mRNA の核外輸送効率の増強が 2-3 倍程度しかみられないことから、hCRM1 が mRNA の核外輸送以外にも影響を与えていることが示唆された。そこで pulse-chase assay 法、polyribosome assay を用いて Gag タンパク質の安定性と翻訳効率への hCRM1 の効果を検討した。その結果、hCRM1 は Gag タンパク質の安定性、翻訳開始効率に関与していないことが分かった。最後に前駆体 Gag タンパク質 (p55) のプロセッシングとウイルス粒子の放出への効果をウエスタンブロッティング法を用いて検討した。p55 がプロセッシングを受けた結果生じる p24 Gag は hCRM1 を導入したときに、細胞内と細胞外粒子分画の両方で 10 倍以上増加した。しかし rCRM1 を導入したときには増加は見られなかった。これに対して p55 Gag は hCRM1 を導入したときに 2-3 倍程度の増加しか見られなかった。これは定量 PCR 法で得られた gag mRNA の増加量に一致していた。このことから hCRM1 は Gag タンパク質のプロセッシングに関与していることが示唆された。また、さらに hCRM1 の budding への影響を調べるために、プロセッシングマイナスの reporter である pNLmyr(+)pro(-)Flag を用いて調べた。細胞外粒子分画の p55Gag は hCRM1 を導入したときに約 20 の増加が見られたのに対して、細胞内の p55Gag は約 2-3 倍の増加しかみられなかった。このことから hCRM1 は単に Gag のプロセッシングではなくウイルス粒子形成過程全体の効率化に影響を与えることが示唆された。また、Gag タンパク質産生の増強に重要である hCRM1 の部位を調べるため、N 末端側半分を rCRM1 に代えた rhCRM1 と C 末端側を rCRM1 に代えた hrCRM1 を作製し検討した。rhCRM1 を導入したものは増強がほとんど見られなかったのに対して、hrCRM1 を導入したものでは増強が見られた。このことから hCRM1 の N 末端側が Gag タンパク質の生産の増強に重要であることが分かった。

【考察】 CRM1 は、従来から報告されている mRNA 輸送因子としての機能だけではなく、ウイルス粒子形成の効率化にも関係していることが示唆された。このことは mRNA の輸送様式がタンパク質のその後の運命に影響する事を示唆している。

【結論】 ラット細胞において hCRM1 を導入することにより HIV-1 複製能の増加が確認された。その要因として hCRM1 が gag mRNA の輸送だけではなく、ウイルス粒子形成の効率化にも影響を及ぼしていることが示唆された。私の得た結果は HIV-1 感染小動物モデルの構築の一助となる。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	高 田 賢 藏
副 査	准教授	丸 尾 聖 爾
副 査	教 授	佐 邊 壽 孝
副 査	教 授	志 田 壽 利
副 査	准教授	濱 田 淳 一

学 位 論 文 題 名

Effect of Human CRM1 on HIV-1 Production in both Nucleus and Cytoplasm of Rat Cells

(ラット細胞の核分画と細胞質分画でのHIV-1産生における
ヒトCRM1の効果に関する研究)

HIV-1 感染の蔓延は世界的な問題であり、新規治療法の開発は重要な課題である。開発のために HIV-1 感染小動物モデルが有用である。これまでの研究からラットにヒトの受容体である CD4、CCR5 を発現させることにより感染が成立することが報告されているので、有力な HIV-1 感染小動物モデル候補である。しかし HIV-1 複製はヒトに比べて著しく低いという問題点もある。これは侵入以降の過程においてウイルス複製を制御する様々な宿主因子が存在するからであると考えられる。申請者はこの宿主因子の中でウイルス RNA の核外輸送因子である CRM1 に着目し、ラット細胞での HIV-1 複製における CRM1 の分子機構を検証した。

まず、申請者は以前に報告されたラットのマクロファージにおけるヒト CRM1 (hCRM1) の効果を確認するため、ラットの上皮系培養細胞に hCRM1 を導入し Gag タンパク質の合成の増強を追認した。この hCRM1 導入による Gag タンパク質の増強の理由として、gag mRNA の輸送効率が増強することであることをリアルタイム PCR 法と *in situ* hybridization 法を用いて確認した。しかし、Gag タンパク質の増強が約 20 倍あるのに対して gag mRNA の輸送効率の増強が約 2 倍程度であることから hCRM1 が核外輸送以降の過程にも影響を及ぼしていることが示唆された。そこで翻訳過程、Gag タンパク質の安定性とプロセッシング、ウイルス粒子の放出過程をポリゾーム分析、パルスチェイス法、ウェスタンブロッティング法を用いて調べた。この結果 hCRM1 が Gag のプロセッシングとウイルス粒子放出にも影響を及ぼすことが示唆された。また、hCRM1 の中の HIV-1 複製増強に重要な 4 つのアミノ酸を同定した。この 4 つのアミノ酸は HTLV-1 Rex の多量体化の誘導に重要なアミノ酸と一致していた。HIV-1 の Gag には核内移行シグナルと核外移行シグナルが存在するので、このことは hCRM1 による Gag タンパク質の多量体化の誘導の可能性を示唆する。さらに、鶏のレトロウイルスである RSV の場合細胞質で合成された Gag が核内に移行し、ウイルス RNA と複合体を作ることがウイルス粒子形成に重要であるという報告を加味して、申請者は HIV-1 のウイルス粒子形成過程についての仮説を提唱した。すなわち、細胞質で合成された Gag タンパク質が核内に移行し、ウイルス RNA 上で hCRM1 の助けを借りて多量体化する。この Gag-ウイルス RNA-CRM1 複合体こそが粒子形成の第一歩ある。続いて核外に輸送され、細胞質で

hCRM1 が外れた後、さらに細胞膜に運搬されてウイルスとして放出されるという仮説である。これらの結果から、申請者は hCRM1 がラット細胞において HIV-1 複製に重要な因子であること、またラット細胞における hCRM1 の HIV 産生亢進メカニズムには、これまでに報告されている核外輸送機能以外の新しい機能があることを示唆した。また、hCRM1 を発現するトランスジェニックラットがより良い HIV-1 感染モデルとなりうることを示唆した。

丸尾准教授から、「ウイルス粒子形成の仮説において、CRM1 が核内で Gag タンパク質-ウイルス RNA と複合体を作り核外に輸送すると説明があったが、この CRM1 による輸送と CRM1 による mRNA 核外輸送は同じ経路なのかまたは別の経路と考えるのか?」、またこの仮説はウイルス複製過程のなかでどこに位置するのかについて質問があった。濱田准教授からは HIV-1 感染ラットはどの程度完成に近づいたのか、また実際の hCRM1 導入ラットに HIV-1 は感染するのかについて、佐邊教授からは本研究の目的は hCRM1 の効果を検討したのか、分子機構を検討したのかとの質問があった。また学位論文の緒言についての書き方の指摘があった。申請者は関連論文による知識などを引用しておおむね正確に回答した。

この論文は、HIV-1 感染ラットモデルの開発のための基礎データとして高く評価され、今後の HIV-1 感染ラットモデルの開発が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。