



Title	アデノウイルス感染によるRNA結合タンパクHuRの制御
Author(s)	黒嶋, 雄志
Citation	北海道歯学雑誌, 33(1), 3-9
Issue Date	2012-09
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/52154">http://hdl.handle.net/2115/52154</a>
Type	article
File Information	01-kuroshima.pdf



[Instructions for use](#)

## 原 著

## アデノウイルス感染によるRNA結合タンパクHuRの制御

黒 嶋 雄 志

抄 録：ウイルスは自らの遺伝子産物によって宿主細胞の機能を制御し、自身の増殖に有利な環境をつくる。アデノウイルス感染後期では、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翻訳される。しかしAU-rich element (ARE)を持つmRNAは、宿主のmRNAであるにも関わらず核外輸送され安定化される。RNA結合タンパクHuRは、AREに特異的に結合し、ARE-mRNAを安定化する。本研究では、未だ解明されていないアデノウイルス感染細胞でのHuRの挙動を明らかにし、その生物学的意義について考察した。

HeLa細胞に5型アデノウイルス (Ad5) 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感染細胞では細胞質のHuR量が増加し、HuRの核外輸送が示唆された。

このHuRの変化をもたらすウイルスの原因遺伝子を解明するため、様々な変異型Ad5を感染させ、HuRの局在を検討した。その結果、E1Aを欠失した変異型Ad5 (dl312)感染細胞ではHuRの局在変化は見られなかった。さらに、E1Aを強制発現させた細胞では、感染時と同様のHuRの局在変化が再現できた。従って、Ad5感染細胞のHuRの変化は、E1Aによってもたらされることが明らかになった。

HuRは細胞質顆粒構造体のStress granules (SG) への局在が報告されているので、ウイルス感染時のSGを免疫染色法で検討した。その結果、通常ヒ素刺激下で出現するSGが、Ad5感染細胞では形成されないことがわかり、これにはE1AによるHuRの局在変化が必要なことも解明された。

以上の結果は、アデノウイルスはE1A遺伝子産物を利用して、宿主細胞のHuRの核外輸送やSGの抑制をもたらし、自己の増殖を制御していることを示唆している。

キーワード：Adenovirus, E1A, Stress granule, HuR, ARE-mRNA

## 緒 言

アデノウイルスは二本鎖の直鎖DNAをそのゲノムに持ち、齧歯類の細胞をがん化 (トランスフォーム) できるDNA型がんウイルスで、古くから細胞がん化のモデルとして研究されてきた<sup>1)</sup>。また、このウイルスと宿主細胞との相互作用の研究からは、mRNAのスプライシング現象が発見されたり、p53やpRBなど細胞にとって重要な分子の機能が明らかになったため、アデノウイルスは細胞が持っている機能を引き出すプローブであると言われていた。また近年では、遺伝子治療用のベクターとしても知られており、様々な遺伝子がアデノウイルスベクターに組み込まれ、利用されている。

アデノウイルス感染細胞では、宿主細胞内で発現されるウイルス遺伝子は制御されており、感染後12時間までの初期では、初期遺伝子 (E1~E4) が発現され、アポトーシ

スを抑制するなど、ウイルス感染に抵抗しようとする宿主細胞の機能を抑制し、ウイルス増殖に必要な環境を細胞内に作り出す。感染後12時間以降の後期に入ると、ウイルス粒子の構成成分のタンパクをコードしている後期遺伝子 (L1~L5) の発現が始まり、大部分の宿主mRNAの核外輸送及び翻訳は停止し、かわりにウイルスの後期mRNAが選択的に核外輸送・翻訳され、ウイルスの増殖に寄与することが知られている。この宿主細胞mRNA及びウイルスmRNAの選択的輸送に関しては、アデノウイルス初期遺伝子産物E1B55kやE4orf6が重要で、両タンパクが有するユビキチンリガーゼ活性が必要であることなどは明らかにされたが<sup>2,3)</sup>、詳細なメカニズムに関しては今だに不明である。

アデノウイルスE4orf6は宿主細胞やウイルスのmRNAの輸送を制御することによりウイルスの増殖を調節することが知られており、発がん活性も持つウイルス初期遺伝子

産物である<sup>4)</sup>。我々はE4orf6が、がん細胞でAU-rich element (ARE) を持つmRNA (ARE-mRNA) の核外輸送に関わるHuRやpp32と結合し、本来ならCRM1依存的に輸送される宿主のARE-mRNAをCRM1非依存的に、強制的かつ恒常的に核外輸送・安定化し、細胞がん化に寄与することを解明した<sup>5)</sup>。また、ARE-mRNAの輸送・安定化はアデノウイルス感染細胞でも、感染後24時間の後期で見られることが明らかになった。従って、アデノウイルス感染後期では前述のように大部分の宿主細胞mRNAの核外輸送は阻害されるのに、ARE-mRNAの核外輸送は例外で、ウイルス後期mRNAと同様に核外輸送され安定化されることが明らかになった<sup>5)</sup>。

一方、HuRは、mRNAの運命を左右する細胞質顆粒構造体のStress Granule (SG) の構成タンパクでもある。SGは真核細胞が種々のストレスに暴露された時、細胞質に形成されるmRNP顆粒で、ストレスが緩和されるまでmRNAを一時保管する場となり<sup>6)</sup>、ARE-mRNAが局在することも報告されている<sup>7)</sup>。またいくつかのレトロウイルス感染細胞ではSGが制御されており、感染によりSGを出現させるウイルスと、逆に消失させるウイルスが報告されている<sup>8)</sup>。

本研究は、アデノウイルス感染細胞でHuRやSGがどのような挙動を示すかを理解することを目的に、5型アデノウイルスを感染させたHeLa細胞で、それらを観察した。その結果、アデノウイルス感染細胞ではHuRが核外輸送され、その輸送にはアデノウイルスの初期遺伝子産物E1Aが必須で、さらにHuRが核外輸送されている細胞ではSGが形成されないことが明らかになった。

これらの結果は、アデノウイルスがE1Aを使ってSGを制御することにより、ウイルス増殖を調節している可能性を示している。

## 材料及び方法

### 1) 細胞培養、細胞分画およびプラスミド

HeLa (ヒト子宮頸がん) 細胞を用いた。細胞は、37°C、5% CO<sub>2</sub>下で、7.5%血清 (FBS) 含有DMEMを用いて培養した。

細胞分画は、以前から我々が用いている方法に従った<sup>5)</sup>。細胞をFractionating buffer (10mM Tris-HCl, pH 7.6/150mM NaCl/1.5mM MgCl<sub>2</sub>/0.5% Nonidet P-40/protease inhibitor cocktail) で氷上静置後、激しく振とうおよび、遠心分離し、上清を細胞質分画とした。

E1A 13Sの強制発現は、pCMV neo-E1A 13Sを使用し、Hilymax (同仁化学研究所) を用いて細胞にtransfectionした。

### 2) ウイルスおよび感染

本研究では、5型アデノウイルス (Ad5) の野生型

(wt300), E4orf6を欠失した変異型Ad5 (dl355), E1B55kを欠失した変異型Ad5 (dl1520), E1Aを欠失した変異型Ad5 (dl312), E4領域全体を欠失した変異型Ad5 (dl366) を用いた。アデノウイルスの感染は、24時間培養した細胞の培地を1.0%血清 (FBS) 含有DMEMに交換し、これにmultiplicity of infectivity (MOI) を50または20 pfu/cellとしてウイルス液を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub>下で1時間インキュベート後、14%血清 (FBS) 含有DMEMを等量加えた。

### 3) 免疫蛍光染色

細胞を4.0% PFA (MERCK) で固定し、0.1% Triton X-100でpermeabilized後、抗HuR抗体 (Santa Cruz) および抗E1A抗体 (M73 clone) でインキュベートし、次いで、FITCおよびRhodaminが結合した2次抗体 (Molecular probes) で検出後、OLYMPUS IX71蛍光顕微鏡またはOLYMPUS FV10i共焦点レーザー走査型顕微鏡で細胞を観察した。

### 4) ウェスタン法

ウェスタン法は、以前から我々が用いている方法に従った<sup>5)</sup>。タンパクをSDS-PAGEで分離後、PVDF膜 (polyvinylidene difluoride membranes; Millipore Billerica) に転写し、HuR (Santa Cruz),  $\beta$ -Tubulin (Santa Cruz), lamin A/C (Santa Cruz),  $\beta$ -actin (Sigma) の抗体でインキュベート後、HRP (Horseradish peroxidase) が結合した2次抗体 (Molecular probes) で処理し、Western Lightning<sup>TM</sup> Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer) を用いて発光させた。

### 5) RNA解析

定量性リアルタイムRT-PCR法は、以前から我々が用いている方法に従った<sup>5)</sup>。PCR増幅は、SYBR Green PCR master mix (SsoFast EvaGreen supermix, BIO RAD) を用いて行い、DNA Engine Opticon 3 (MJ Research) を用いて解析した。

## 結 果

### 1) アデノウイルス感染により宿主細胞のHuRの局在が変化する

Ad5 wt300感染細胞のHuRの細胞内局在変化を確かめるために、免疫蛍光染色法を用いてHeLa細胞のHuRタンパクを観察した。Ad5 wt300を感染させていないHeLa細胞では、細胞質よりも核が優位にHuR抗体によって染色された (図1a)。これに対しAd5 wt300を感染させて24時間後のHeLa細胞では、細胞質でのHuR量が増加し、それに対して核のHuR量が低下し、細胞質と核がHuR抗体によって同程度に染色された (図1a)。この結果は、Ad5 wt300を

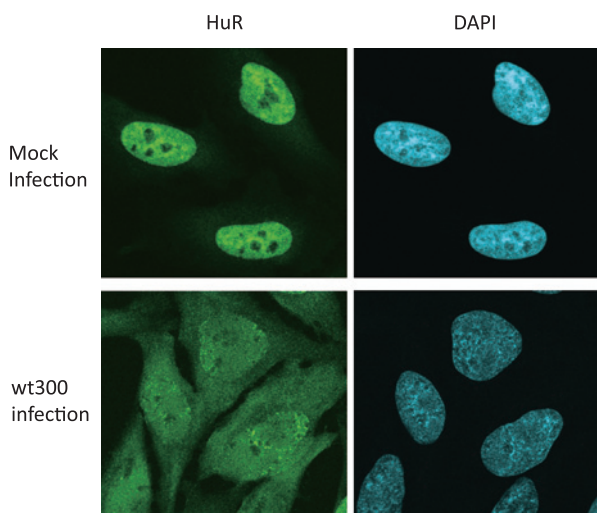


図1a 野生型5型アデノウイルス感染細胞におけるHuRの局在

野生型5型アデノウイルス (Ad5 wt300) をMOI : 50でHeLa細胞に感染させ、感染24時間後 (24hpi) でHuRの免疫蛍光染色を行い、その局在を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。核はDAPIを用いて染色した。

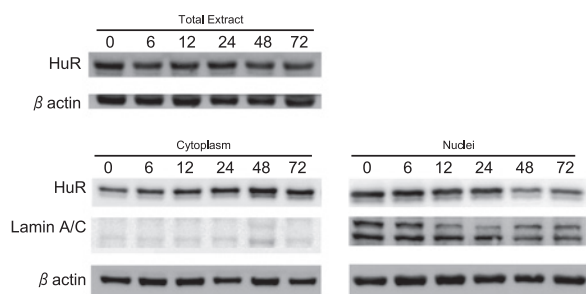


図1b Ad5 wt300感染細胞におけるHuRの核外輸送

Ad5 wt300をMOI : 20でHeLa細胞に感染させ、細胞全体・核分画・細胞質分画における経時的なHuRタンパク量の変化をウエスタン法にて検討した。βactinを内部コントロールとした。核タンパクLamin A/Cを用いて、細胞質および核分画への分離の証明とした。

感染させたHeLa細胞では、細胞質のHuRが増加することを示している。

さらに、ウエスタン法を用いてHuRの局在を確認した。Ad5 wt300を感染後一定時間ごとに細胞を回収し、HeLa細胞の総タンパク (Total extract) と、核 (Nucleus) と細胞質 (Cytoplasm) に分画して得られたタンパクをサンプルとし、それぞれのHuRタンパク量を比較した。総タンパク中のHuR量は感染後一貫して同程度であったが、細胞質のHuRタンパク量は経時的に増加し、それに対し核のHuRタンパク量は経時的に減少した (図1b)。

以上の結果は、Ad5 wt300を感染させた細胞ではHuRの局在が変化することを示しており、アデノウイルス感染によって宿主細胞のHuRが核から細胞質へ輸送されることを

示唆している。

2) E1A変異型Ad5の感染は宿主細胞のHuR局在変化を起さない

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、ウイルスの各遺伝子を欠失した変異型Ad5をHeLa細胞に感染させ、24時間後に免疫蛍光染色でHuRタンパクの局在を観察した。その結果、HuRと複合体を形成するE4orf6を欠失した変異型Ad5 (dl355)、E4orf6と複合体を形成するE1B55kを欠失した変異型Ad5 (dl1520) およびE4領域全体を欠失した変異型Ad5 (dl366) の感染細胞では、wt300感染時と同様のHuRの局在変化が認められたが、E1Aを欠失した変異型Ad5 (dl312) 感染細胞ではHuRの局在変化は認められなかった (図2a)。

dl312を感染させたHeLa細胞のHuRの局在変化をウエスタン法でも確認した。総タンパクで比較すると、非感染時、Ad5 wt300感染後48時間、dl312感染後48時間のHuRタンパク量はいずれも同程度であった。しかし、細胞を核と細胞

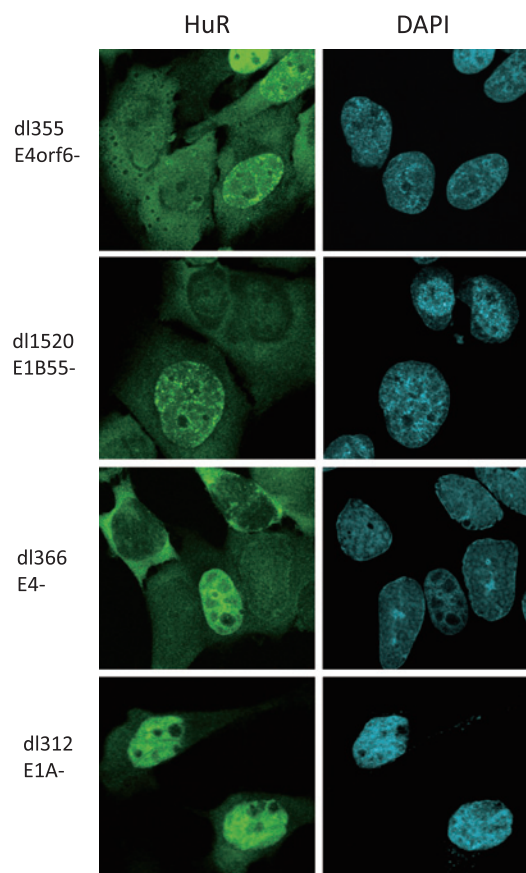


図2a 変異型5型アデノウイルス感染細胞におけるHuRの局在

E4orf6変異型Ad5 (dl355)、E1B55k変異型Ad5 (dl1520)、E4変異型Ad5 (dl366)、E1A変異型Ad5 (dl312) をMOI : 50でHeLa細胞に感染させ、24hpiでHuRの免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。核はDAPIを用いて染色した。

胞質に分離してHuR量を検討すると、非感染時と比較するとwt300感染細胞の核HuRタンパク量は減少し、細胞質HuR量は増加しているが、dl312感染細胞ではこのHuRの変化は認められなかった(図2b)。

以上の結果から、E1Aの変異型Ad5 (dl312)の感染では宿主細胞のHuRの局在変化が認められないことが明らかとなり、HuRの局在変化をもたらすウイルスの原因遺伝子がE1Aであることがわかった。

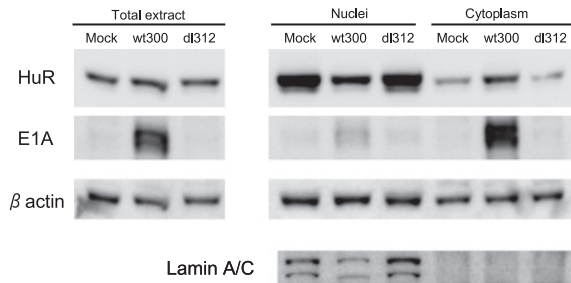


図2b Ad5 dl312感染細胞におけるHuRの核外輸送

Ad5 wt300, Ad5 dl312をMOI:50でHeLa細胞に感染させ、48hpiでの細胞全体・核分画・細胞質分画におけるHuRタンパク量の変化をウエスタン法にて検討した。Ad5 E1Aタンパクは、Ad5 wt300感染細胞でのみ発現していることを確認した。βactinを内部コントロールとした。またLamin A/Cは核タンパクであるため、これが核のみに存在していることを、細胞質分画と核分画への分離の証明とした。

3) E1Aを強制発現させた細胞ではHuRの局在が変化する

E1AによるHuRの局在変化をさらに検証するため、HeLa細胞にE1Aを強制発現させて免疫蛍光染色でHuRの局在変化を観察した。強制発現させたE1Aは、核優位もしくは核と細胞質の両方に同程度に認められるいずれかのパターンで染色された(図3)。E1Aが核優位に認められている細胞ではHuRがこれと共局在してより強く染色され、さらにE1Aが細胞質にも認められている細胞では、HuRもまた細胞質で強く染色されることが観察された(図3)。この結果より、HuRの局在変化がE1Aによってもたらされることを、さらに裏付けられた。

4) E1AによりHuRの局在が変化した細胞では、Stress granulesの形成が抑制される

mRNA-RNA結合タンパク質複合体が顕微鏡下で確認可能なまでに凝集した細胞質顆粒構造のひとつであるSGは、細胞がストレスに曝された際に出現する。RNA結合タンパクのHuRはこのSGの構成タンパクとして知られており、亜硝酸ナトリウム(以下、ヒ素と記す)をOxidative stressとして添加すると、細胞質にHuRタンパクが染色される顆粒構造がSGとして認められる(図4a)。Ad5 wt300が感染した際、前述のごとくHuRの局在が変化することが

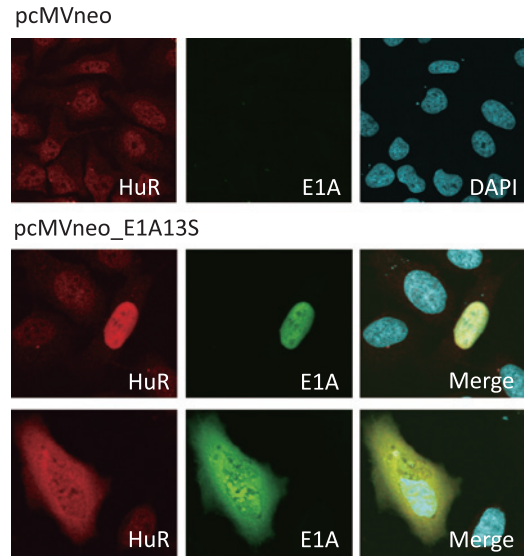


図3 E1A強制発現細胞におけるHuRの局在  
pcMV neoおよびpcMV neo\_E1A13SをHeLa細胞にtransfectionし、48時間後にE1AおよびHuRの免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。核はDAPIを用いて染色した。

明らかになったが、それに伴い宿主細胞のSGの挙動が変化するか検討するため、Ad5 wt300を感染させたHeLa細胞にヒ素を添加し、HuRを免疫蛍光染色で観察した。

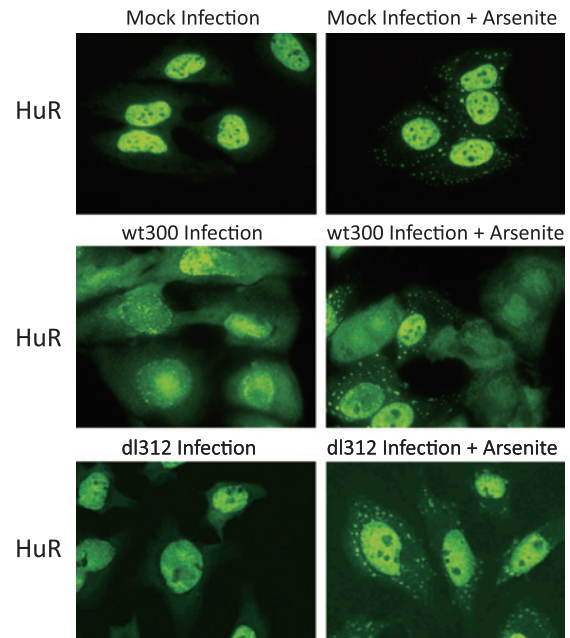


図4a Ad wt300感染細胞およびAd dl312感染細胞でのStress granule

Ad5 wt300とAd5 dl312をMOI:50でHeLa細胞に感染させ、24hpiで亜硝酸ナトリウム(図中にArseniteと記載)を500ug/mlで30分間、培地に添加した後、HuRの免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。HuRはStress granuleの構成タンパクであることから、これによりStress granuleが観察できる。

通常の培養下では、ヒ素の添加によりほぼ全ての細胞にSGの形成が認められた。一方、Ad5 wt300を感染させHuRの局在変化が認められている細胞では、ヒ素を添加してもSGが形成されなかった。これに対しdl312を感染させた細胞では非感染細胞と同様にHuRの局在変化が認められず、ヒ素の添加によるSGの形成が認められた(図4a)。

また、E1Aを強制発現させたHeLa細胞にヒ素を添加して免疫蛍光染色にてHuRを観察したところ、核優位にE1AおよびHuRが共局在する細胞ではSGの形成が認められたが、細胞質にも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(図4b)。この結果は、Ad5 wt300の感染細胞で観察されたHuRの局在変化に伴うSG形成の抑制と同様の結果であり、E1AがSGの形成を抑制することを示している。

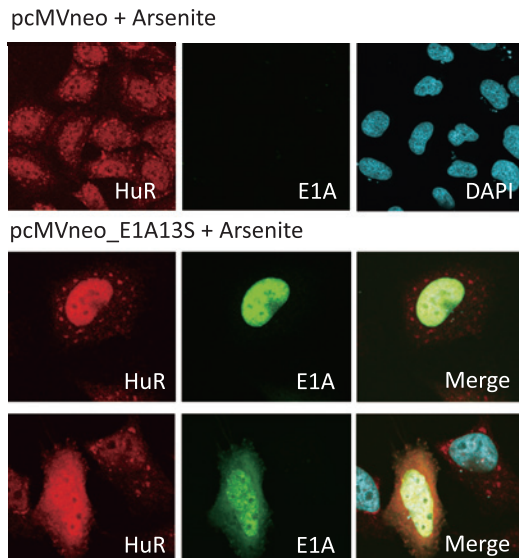


図4b E1A強制発現細胞におけるStress granule  
pcMV neoおよびpcMV neo\_E1A13SをHeLa細胞にtransfectionし、48時間後に亜ヒ酸ナトリウムを500ug/mlで30分間、培地に添加した後、E1AおよびHuRの免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。核はDAPIを用いて染色した。

## 考 察

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おり、またE1Aはアデノウイルスの複製に最も重要な役割を果たすウイルス遺伝子産物なので、HuRの核外輸送はアデノウイルスの複製にとっても重要で

あることを示唆している。

ウイルス感染後期では、ARE-mRNAが核外輸送されており、同時期にはウイルス後期mRNAも細胞質に局在し、さらに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ても不思議ではないと考察できる。もしこの考えが正しければ、HuRの発現が抑制された細胞では、ウイルス後期mRNAの核外輸送も抑制され、その結果ウイルスの生産効率も低くなるはずである。この点について今後検証していく必要がある。

HuRはSGの主要構成タンパクの一つで、SG形成に重要な働きを果たしている<sup>8)</sup>。本研究では、ウイルス感染後期にはHuRが細胞質に散在し、同時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、リボソームが多く存在するポリソームで翻訳されるべきmRNAを一時的に貯蔵する細胞質顆粒構造体であり<sup>9)</sup>、ARE-mRNAもSGに局在することが示されている。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、翻訳のためにポリソームに到達できないことが予想できる。E1Aはこのことを防ぐために、HuRが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。

本研究では、E1Aを強制発現させた細胞では、E1Aが細胞質に存在している細胞でHuRの局在も細胞質に変化し(Fig. 3A)、さらに細胞質にE1Aが存在しているときにのみ、SG形成が阻害されることが明らかになった(Fig. 4B)。このことはアデノウイルスを感染した細胞でも(Fig. 4A)同様で、たとえウイルスを感染させてもE1AとともにHuRが細胞質に局在しない限り、SG形成が阻害されないことがわかった。これらの結果は、E1AとHuRが直接的あるいは間接的に結合することを強く示唆している。これまでE1Aには様々な宿主細胞のタンパクが結合することが報告されているので<sup>10)</sup>、HuRもそれらのうちの一つかもしれない。今後E1AとHuRとの結合を検討する必要があると思われる。

これまでRNAをゲノムに持つRNAウイルス(レトロウイルス)がSGを消失させたり<sup>11)</sup>、逆に出現させたりして<sup>12)</sup>、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。さらに、細胞質にはSG以外にもProcessing bodies (P bodies) と呼ばれる細胞質顆粒構造体が存在する。P bodiesは主にmRNAの分解に関わることが知られており、ウイルス感染細胞でもP bodiesが消失し、そのことがウイルスの複製に関与するという報告がある<sup>13)</sup>。アデノウイルス感染細胞でも、P bodiesの形成とウイルスの増殖との関係に興味を持たれる。

### 結 論

本研究より、アデノウイルスが感染すると宿主細胞のRNA結合タンパク質HuRが核外輸送され、Stress granuleの形成が抑制されることが明らかになった。またこの変化はアデノウイルス初期遺伝子産物E1Aによってもたらされていることを解明した。

### 謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に数々のご援助、ご協力を頂きました北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座口腔診断内科学教室ならびに口腔病理病態学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

### 文 献

1. Thomas E. Shenk. Adenoviridae: The Viruses and Their Replication. David M. Knipe and Peter M. Howley, FUNDAMENTAL VIROLOGY, 1053-1088. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2001.
2. Paola Blanchette, Kathrin Kindsmüller, Peter Groitl, Frédéric Dallaire, Thomas Speiseder, Philip E. Branton, and Thomas Dobner : Control of mRNA Export by Adenovirus E4orf6 and E1B55K Proteins during Productive Infection Requires E4orf6 Ubiquitin Ligase Activity. *J. Virol.* 82 : 2642-2651, 2008.
3. Jennifer L. Woo and Arnold J. Berk.: Adenovirus Ubiquitin-Protein Ligase Stimulates Viral Late mRNA Nuclear Export. *J. Virol.* 81 : 575-587, 2007.
4. Moore M, Horikoshi N, Shenk T.: Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93, 11295-301, 1996.
5. Higashino F, Aoyagi M, Takahashi A, Ishino M, Taoka M, Isobe T, Kobayashi M, Totsuka Y, Kohgo T, Shindoh M.: Adenovirus E4orf6 targets pp32/LANP to control the fate of ARE-containing mRNAs by perturbing the CRM1-dependent mechanism. *J cell Biol.* 170, 15-20, 2005.
6. Kedersha N, Anderson P.: Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans.* 30, 963-969, 2002.
7. Mazroui R, Di Marco S, Kaufman RJ, Gallouzi IE.: Inhibition of the ubiquitin-proteasome system induces stress granule formation. *Mol Biol Cell.* 18, 2603-18, 2007.
8. Buchan JR, Parker R.: Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell.* 36, 932-941, 2009.
9. Anderson P, Kedersha N.: Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci.* 33, 141-50, 2008.
10. 東野史裕, 安田元昭, 進藤正信 : アデノウイルスと細胞のクロストーク. *蛋白質核酸酵素.* 45, 1350-1357, 2000.
11. Emara MM, Brinton MA.: Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proc Natl Acad Sci USA,* 104, 9041-9046, 2007.
12. Piotrowska J, Hansen SJ, Park N, Jamka K, Sarnow P, Gustin KE.: Stable formation of compositionally unique stress granules in virus-infected cells. *J Virol.* 84, 3654-65, 2010.
13. Emara MM, Brinton MA.: Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104, 9041-9046, 2007.

**ORIGINAL**

## Regulation of RNA binding protein HuR in adenovirus infected cells.

Takeshi Kuroshima

**ABSTRACT** : In cells infected with viruses, the viral gene products commonly change the environment within the host cells to maximize the production of the virions they carry. Adenovirus infection promotes the nuclear export of viral late mRNA and inhibits the bulk of cellular mRNA export during the late phase of virus infection. However, AU-rich element containing mRNA (ARE-mRNA) is exported to the cytoplasm, even though it is cellular mRNA. The RNA binding protein HuR can bind to ARE specifically and has the potential to stabilize ARE-mRNA. Although ARE-mRNA is exported and stabilized in adenovirus infected cells, HuR localization in virus infected cells has not been established. This study examined the localization of HuR and the mechanism of HuR behavior in adenovirus infected cells, and the biological significance of HuR for the virus propagation is discussed.

In adenovirus type 5 infected HeLa cells, the expression of HuR in the cytoplasm was augmented 24 hours after the infection suggesting that HuR is exported to the cytoplasm. To understand which gene of the adenovirus is required for the change of HuR localization, HuR was observed in cells infected with mutant adenoviruses. The behavior of HuR in cells infected with dl312, which has deletions in the E1A gene, was not changed. Further, similar changes of HuR were also observed in cells overexpressed with the E1A gene. These data indicate that adenovirus exports HuR through E1A in the late phase of a virus infection.

HuR is known to be in Stress granules (SG) in the cytoplasm, and the SG formation in adenovirus infected cells was observed. SG was not produced when HuR is exported to the cytoplasm in cells infected with adenovirus type 5, even when the cells are treated with SG inducer arsenate. The data indicates that the existence of HuR in the cytoplasm prevents the formation of SG.

This finding supports the hypothesis that adenovirus changes the localization of HuR to the cytoplasm in order to export viral and cellular mRNAs and to inhibit the formation of SG by utilizing E1A. The E1A gene is the most important protein for reproducing adenovirus, this new function of E1A is thought to be required for the virus propagation.

**Key Words** : Adenovirus, E1A, Stress granules, HuR, ARE-mRNA