



Title	アデノウイルスの増殖にはARE-mRNAの安定化システムが必要である
Author(s)	鄭, 朱蒙 パトリック
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第12163号
Issue Date	2016-03-24
DOI	10.14943/doctoral.k12163
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/67917">http://hdl.handle.net/2115/67917</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	Jumond_Patrick_Jehung.pdf



[Instructions for use](#)

# 博士論文

---

アデノウイルスの増殖には ARE-mRNA の安定化  
システムが必要である

---

平成 28 年 3 月申請

北海道大学  
大学院歯学研究科口腔医学専攻

鄭 朱蒙パトリック

アデノウイルスの増殖には ARE-mRNA の安定化システムが必要である

鄭朱蒙パトリック

〒060-8586 札幌市北区北 13 条西 7 丁目

北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座口腔病理病態学教室

(主任：進藤 正信 教授)

jehung25@den.hokudai.ac.jp

キーワード：Adenovirus, E4orf6, HUR, ARE-mRNA stability

略題：アデノウイルスには ARE-mRNA が必要である

本文原稿枚数： 30 枚

表枚数 : 0 枚

図枚数 : 10 枚

写真枚数 : 0 枚

必要別刷数 : 50 部

## 抄録

AU-rich element (ARE) はがん遺伝子など、主に細胞増殖にかかわる多くの遺伝子の mRNA に含まれている遺伝子領域で、RNA 結合タンパク HUR が ARE に特異的に結合することによって ARE-mRNA を核外輸送・安定化することが知られている。アデノウイルスの初期遺伝子タンパク E4orf6 による細胞がん化には、ARE-mRNA の恒常的な核外輸送・安定化が必須であることが解明されている。しかしながら、このシステムとアデノウイルスの増殖にどのような関連が存在するかはいまだ不明である。本研究ではアデノウイルスが ARE-mRNA とそれに結合する HUR タンパクのウイルス増殖に及ぼす影響について検討した。

Tet-off システムを導入した HeLa 細胞に、*FOS* 遺伝子の ARE 領域を持つルシフェラーゼ遺伝子 (*LUC-ARE*) を導入し、アデノウイルス感染後、doxycycline 処理をして *LUC-ARE* の発現を停止させ、継時的に *LUC-ARE* mRNA を定量しその半減期を決定した。また、各種アデノウイルスの初期遺伝子を導入し、ARE-mRNA 量の変化をリアルタイム RT-PCR 法で解析した。さらに RNAi 法によって HUR を knockdown した細胞を用いてアデノウイルスの増殖効率を検討した。さらに、アデノウイルスによる E3 ユビキチンリガーゼ活性が ARE-mRNA

安定化に関与しているかについて検討した.

*LUC-ARE* 導入細胞にアデノウイルスを感染させると, *LUC-ARE* の半減期が延長され, 感染細胞では **ARE** を持つ **mRNA** が安定化された. さらに, ウイルス感染初期よりも, 後期の方がより安定化された. ウイルス遺伝子が欠損した変異型アデノウイルスの感染実験より, この安定化には **E4** 領域より翻訳される **E4orf3** および **E4orf6** タンパクが関与することが明らかになり, この結果は各遺伝子を細胞に導入した実験系でも確認できた. さらに, **HUR** を knockdown させたがん細胞にアデノウイルスを感染させると, ウイルス力価が 1/3 に減少した. また, プロテアソーム阻害剤を処理した実験により, **ARE-mRNA** の安定化と, ユビキチンプロテアソーム系の経路は別であることが明らかになった.

これらの結果は, アデノウイルスの増殖には **HUR** を含む **ARE-mRNA** の安定化システムが重要であることを示している.

キーワード : Adenovirus, E4orf6, HUR, ARE-mRNA stability

## 緒言

アデノウイルスは二本鎖直線状 DNA をゲノムに持ち、正二十面体を形作るタンパク質によってカプシド形成されているウイルスである。通常、ヒトアデノウイルスはヒトに対しては呼吸器疾患や、ウイルス性結膜炎<sup>1)</sup>、乳児の胃腸炎<sup>2)</sup>などを引き起こすが、げっ歯類に対しては腫瘍原性を持つことが知られている<sup>3)</sup>。ヒトアデノウイルスはこれまで、赤血球の凝集パターンやハムスターへの造腫瘍能、GC含有率などからA~Gの7つの亜群と、56の血清型に分類されており、このうちアデノウイルス5型が古くからよく研究されている<sup>4)</sup>。アデノウイルスの実験からは、遺伝子発現と制御、DNA複製、細胞周期制御、細胞増殖システムなど様々なことが明らかになっており、特にmRNAのスプライシング現象の発見は細胞が持つ生命現象における最も重要な解明のひとつである。また近年では遺伝子治療用のベクターとしても用いられており、様々な改良が行われている。

アデノウイルスは宿主細胞表面のレセプターであるCAR (coxsackie-adenovirus receptor) に結合し、エンドソームによって取り込まれ、核にウイルスDNAを放出する。ウイルスDNA複製開始前に発現する遺伝子を初期遺伝子 (E1~E4) といい、宿主細胞の免疫機能を制御し、ウイルスの生存に有利な環境を作り

出す。ウイルス DNA の複製が開始されると後期遺伝子 (L1~L5) が発現し、ウイルス粒子の構成タンパク質をコードする mRNA の転写・翻訳が行われる<sup>4)</sup>。

AU-rich element (ARE) はアデニンとウラシルに富む RNA エlement で、3' 非翻訳領域に ARE を持つ mRNA (ARE-mRNA) には、細胞周期の制御や細胞分裂など増殖に関連する多くの遺伝子から転写される mRNA が該当する<sup>5) 6)</sup>。ARE-mRNA には様々な RNA 結合タンパクが ARE に結合することで、その挙動が制御されている。HUR は ARE に特異的に結合するタンパクで、宿主細胞がストレスに暴露された時、ARE-mRNA を核外輸送させ、安定化することが知られている<sup>7) 8)</sup>。また、ARE-mRNA の安定化には、細胞質顆粒構造体の Stress Granule (SG) が関与しており、SG 内に ARE-mRNA が一時保管されることで安定化されることが知られている<sup>9)</sup>。

アデノウイルスの初期遺伝子産物の1つである E4orf6 はウイルス増殖のために宿主細胞の機能を制御している。Higashino らは、E4orf6 が、がん細胞において HUR や PP32 と結合し、宿主細胞の ARE-mRNA を強制的かつ恒常的に核外輸送し、細胞をがん化することを解明した<sup>10)11)</sup>。また、同じアデノウイルスの初期遺伝子タンパクである、E1B55k や E4orf3 等も、E4orf6 同様細胞がん化活性を持っており、ARE-mRNA の挙動に関与している可能性がある<sup>12)13)</sup>。さらに、これらのウイルス遺伝子は、アデノウイルスの増殖にも重要な働きを持つこと

が明らかになっており<sup>14)15)16)</sup>, ARE-mRNA とウイルス増殖との関連に興味を持たれる。しかしながら, 宿主細胞の ARE-mRNA の核外輸送・安定化が, ウイルスの増殖にどのような役割を果たすかいまだに解明されていない。

本研究では, アデノウイルスの感染が ARE-mRNA の安定化システムに与える影響を調べ, アデノウイルスの複製との関連について検討した。Tet-off システムを導入した細胞を使い, ルシフェラーゼ遺伝子に ARE を挿入した融合遺伝子 (*LUC-ARE*) から転写される mRNA の半減期をアデノウイルス感染細胞で検討した。その結果, *LUC-ARE* mRNA の半減期はアデノウイルス感染により延長された。安定化に関与するウイルス初期遺伝子を決定するために変異型ウイルスを使い, 同様に半減期を観察した結果, E4orf6, E4orf3 などが ARE-mRNA の安定化に関与することが明らかになった。さらに, HUR タンパク質をノックダウンし, ARE-mRNA の安定化システムを破壊すると, アデノウイルスの生産効率が減少した。以上の結果は, アデノウイルスの複製には HUR が関与する ARE-mRNA の安定化システムが必要であり, アデノウイルスの初期遺伝子がこの安定化を調節していることを示している。



## 材料及び方法

### 1) 細胞培養および tet-off システムの導入

HeLa Tet-Off® Advanced Cell Line (Clontech) を 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 下で, 10% Tet システム仕様ウシ胎児血清含有 DMEM を用いて培養した. 培養した細胞に, ルシフェラーゼ遺伝子に *FOS* 遺伝子の ARE を組み込んだ融合遺伝子 (*LUC-ARE*) を持つプラスミド pTRE-LUC-ARE を Hilimax (同仁科学研究所) を用いて導入し, 800 µg/ml ハイグロマイシン B でプラスミド保有細胞を選択し細胞株を確立した. 細胞分画は, 以前から我々が用いている方法に従った<sup>10)</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. 残留したペレットを RIPA バッファー (150 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl, pH 7.6; 1% Nonidet P-40; 1% sodium deoxycholate; 0.1% SDS) で融解し核分画とした.

### 2) アデノウイルス

野生型の 5 型ヒトアデノウイルス (wt300), *E4orf6* 遺伝子を欠失した変異型アデノウイルス (dl355), *E4orf3* 領域に塩基配列を挿入した変異型アデノウイルス (in orf3), *E1B55k* を欠失した変異型アデノウイルス (dl1520) を使用し

た. 感染効率 multiplicity of infectivity (MOI) が 100 (ifu/cell) となるようにウイルス液を添加した.

### 3) ノックダウン法, ウイルス力価測定

RNA 干渉法で, HUR のノックダウンを行うために, HeLa 細胞に Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を使用して, HUR に対する 3 種類の siRNA を導入した. 対照群として negative control siRNA (Qiagen) を導入した.

HUR に対する siRNA 配列は以下のとおりである :

5'-AAUCUUAAGUUUCGUAAGUUA-3' (HUR U1),

5'-UUCGUAAGUUAUUUCCUUUAA-3' (HUR U3),

5'-AAGUGCAAAGGGUUUGGCUUU-3' (HUR H4). siRNA を導入して 48 時間後

に wt300 を感染させ, wt300 感染後 24 時間経過時に細胞液を回収し, 液体窒素で凍結融解を 3 回繰り返してウイルス液とした. ウイルス液を HEK293 細胞に感染させ Adeno-X Rapid Titer Kit (Clontech)によりヘキソタンパクを染色し, ウイルス力価 (Infectivity of Unit : IFU) を測定した.

### 4) Western blotting 法

RIPA バッファーを用いて培養細胞からタンパク質を回収し, 10%SDS-PAGE によりタンパク質を電気泳動後, PVDF 膜 (polyvinylidene difluoride membranes ; Millipore Billerica) に転写した. 各 1 次抗体, HuR (Santa Cruz),

$\beta$ -actin (Sigma-Aldrich), E4orf6 (RSA3 ; プリンストン大学の T. Shenk 氏より分譲), E1B55k (2A6; プリンストン大学の T. Shenk 氏より分譲), HA-tag (Santa Cruz), で インキュベート後, HRP (Horseradish peroxidase) 標識した 2 次抗体 (Molecular probes) で 処 理 し , Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer)を用いて発光させた.

#### 5) リアルタイム PCR 法

TRI REAGENT (Sigma-Aldrich)を使用して培養細胞から RNA を抽出後, RNA を ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡)を使用して cDNA を作成し, C1000 Thermal Cycler (BIO RAD) を用いて解析し, 各 RNA 発現量を *GAPDH* で定量した. 使用したプライマーと配列は以下の通りである :

*FOS*, forward 5'-CCAACCTGCTGAAGGAGAAG-3', reverse  
5'-GCTGCTGATGCTCTTGACAG-3'; *MYC*, forward  
5'-CTCCTGGCAAAGGTCAGAG-3', reverse 5'-TCGGTTGTTGCTGATCTGTC-3';  
*COX2*, forward 5'-TGAGCATCTACGGTTTGCTG-3', reverse  
5'-TGCTTGTCTGGAACAACACTGC-3'; *LUC*, forward  
5'-CAACTGCATAAGGCTATGAAGAGA-3', reverse  
5'-ATTTGTATTCAGCCCATATCGTTT-3'; *GAPDH*, forward  
5'-ATCCTGGGCTACACTGAGCA-3', reverse 5'-TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3'.

## 6) mRNA 半減期測定

ARE-mRNA の半減期を測定するために， tet-off システムを持つ細胞は 100ng/ml ドキシサイクリン， それ以外の細胞は 1 $\mu$ g/ml アクチノマイシン D で処理し， 時間経過とともに RNA を抽出し， リアルタイム PCR 法で各 mRNA 量を検討した． また， ARE-mRNA の安定化とプロテアソーム活性の関連を観察するために， 10 $\mu$ M MG132 で処理し， 同様に mRNA 量を測定した．

## 結果

### 1) アデノウイルス感染による宿主細胞の ARE-mRNA 量減少

アデノウイルス感染細胞の ARE-mRNA 量を確認するために、HeLa 細胞に wt300 を MOI 100 で感染させ、24 時間後に *FOS*, *MYC*, *COX2* mRNA の量をリアルタイム PCR 法で測定した。その結果、非感染細胞 (Mock) と比較して、*FOS*, *MYC*, *COX2* いずれの ARE-mRNA 量も減少した。また、感染 24 時間後、細胞を核と細胞質に分離し、両分画のそれぞれの ARE-mRNA の定量をリアルタイム PCR 法で行ったが、核分画、細胞質分画いずれの ARE-mRNA 量も減少した (図 1)。

### 2) アデノウイルス感染による宿主細胞の ARE-mRNA 安定化システム活性化

アデノウイルス感染による、ARE-mRNA の安定化をさらに詳しく検証するために、tet-off システムを用いて、ARE-mRNA の半減期を解析した。Tet-off システムを所有する HeLa 細胞に、ルシフェラーゼ遺伝子に *FOS* 遺伝子の ARE を組み込んだ融合遺伝子 (*LUC-ARE*) を持つプラスミドを導入し、ハイグロマイシン B でセレクションをかけ、*LUC-ARE* を恒常的に発現する細胞株 (A4) を作成した (図 2a)。この細胞に、wt300 を感染させて 24 時間後にドキシサ

イクリンを添加し， *LUC-ARE* mRNA の転写を停止し， 一定時間ごとに細胞を回収して RNA を抽出し， リアルタイム PCR 法で *LUC-ARE* mRNA の定量を行った (図 2b) . アデノウイルス非感染群では *LUC-ARE* mRNA の半減期が 99 分であったのに対し， アデノウイルス感染群では半減期が 231 分と延長した. 次に， アデノウイルスの感染時間と ARE-mRNA の安定化の関連を検討するために， ウイルス感染後， 経時的に RNA を抽出しリアルタイム PCR 法で *LUC-ARE* mRNA の定量を行った. その結果， 感染後 3 時間， 6 時間， 12 時間， 18 時間で半減期はそれぞれ 119 分， 132 分， 153 分， 222 分となった (図 2c) .

### 3) ARE-mRNA 安定化の責任ウイルス遺伝子

ARE-mRNA の安定化システム活性化に関与するアデノウイルスの遺伝子領域を探索するため， 各種変異型ウイルス感染後の *LUC-ARE* mRNA の半減期を測定した. A4 にアデノウイルス wt300 と， それぞれ細胞がん化活性を持ち ARE-mRNA を安定化する可能性のあるウイルス遺伝子の欠失株， dl355 (*E4orf6* 遺伝子欠損)， dl1520 (*E1B55k* 遺伝子欠損)， in orf3 (*E4orf3* 遺伝子欠損) (図 3a) を感染させて 24 時間後にドキシサイクリンを添加し， 一定時間ごとに細胞を回収して RNA を抽出し， リアルタイム PCR 法で *LUC-ARE* mRNA を定量した. その結果， dl1520 と wt300 感染細胞では， ほぼ同様の半減期を示したのに対し，

dl355 および in orf3 感染細胞の *LUC-ARE* mRNA は半減期が短くなった (図 3b) .

#### 4) HUR ノックダウンによるアデノウイルスの生産効率減少

ARE 結合タンパク HUR は, ARE-mRNA 安定化に必須のタンパクであり, HUR のノックダウンは ARE-mRNA の核外輸送や安定化を阻害することが知られている<sup>17)</sup>. ARE-mRNA の安定化システムと, アデノウイルスの複製との関連を検討するため, RNAi 法で HUR をノックダウンした細胞でアデノウイルスの増殖を調べた. HUR に対する三種類の siRNA を混合して HeLa 細胞に導入し, HUR タンパクの量をウェスタン法で確認した (図 4a) . また, コントロールとして非感染細胞およびランダム siRNA を導入後, ウイルスを感染させた細胞を用い, 同様の実験を行った. 導入後 24 時間, 48 時間, 72 時間で HUR タンパク質の減少が確認できた. 次に siHUR 導入 48 時間後に wt300 を感染させ, ウイルスの生産効率を検討した. その結果, HUR をノックダウンした細胞のウイルス生産効率は, コントロール群と比較して低くなり, およそ 3 分の 1 程度に減少した (図 4b,c) . これらの結果は, アデノウイルスの増殖には HUR が必要で, HUR を含む ARE-mRNA の安定化システムが重要な働きをしていることを示唆している.

## 5) アデノウイルスによる ARE-mRNA の安定化と E3 ユビキチンリガーゼ活性との関連

図 3b で示した様に， アデノウイルス感染による ARE-mRNA 安定化システムの活性化には， アデノウイルスの E4 領域の遺伝子が関連している (図 3a)． これまでに， E4orf6 および E1B55k 遺伝子産物は， E3 ユビキチンリガーゼのサブユニットの一部になり， 宿主細胞の様々なタンパクのユビキチン化に関わり， ユビキチン-プロテアソーム系によりその分解を制御することが明らかになっている<sup>18)</sup>． そこで， アデノウイルス感染による ARE-mRNA 安定化システム活性化とユビキチン-プロテアソーム系にどのような相互関係があるのかを検討するために， A4 細胞に wt300 を感染させ， プロテアソーム阻害剤である MG132 で細胞を処理し， *LUC-ARE* mRNA の半減期をリアルタイム PCR で測定した (図 5)． DMSO 処理を行ったコントロール群と比較すると， *LUC-ARE* mRNA の半減期に差はみられなかった．



## 考察

本研究では、アデノウイルス感染細胞での ARE-mRNA 安定化システムの活性化を解析し、さらにそのウイルス増殖との関連を検討した。感染細胞では、*FOS*, *MYC*, *COX2* などの ARE-mRNA の量が減少することが示されたが、この結果はアデノウイルス感染後期になると宿主細胞の mRNA 量が減少することと合致している<sup>19)</sup>。一方で、tet-off のシステムを用いたモデル実験系より、ウイルス感染によって ARE-mRNA の安定化システムは活性化することが明らかになり、安定化の程度は感染後の時間経過に比例して高くなることが示された。この安定化システムの活性化にはアデノウイルスの E4 領域の遺伝子産物、E4orf6 と E4orf3 が必要であることが解明された。また、HUR のノックダウンにより ARE-mRNA の安定化システムの活性化を阻害すると、アデノウイルスの増殖が減少することがわかった。これらの結果は、アデノウイルスの増殖には HUR が必要で、HUR を含む ARE-mRNA の安定化システムが重要な働きをしていることを示唆している。さらに、プロテアソーム阻害剤を使用した実験により、ARE-mRNA の安定化システムは、アデノウイルスの E4 領域が関与するユビキチン-プロテアソーム系に非依存的であることが示唆された。

アデノウイルス感染系では、ARE-mRNA 安定化システムは活性化されるの

に、宿主細胞の ARE-mRNA は安定化されない。このことは、この安定化システムが他の mRNA、特にウイルス側の mRNA に利用されている可能性を示している。アルファウイルスの研究では、ウイルス遺伝子産物の働きにより細胞中の大部分の HUR が ARE-mRNA ではなくウイルス自身の mRNA に結合することが示されている<sup>20)</sup>。このように、ある種のウイルスは、宿主細胞の HUR を搾取し、ウイルスの mRNA の核外輸送や安定化に HUR を利用して自身の増殖に役立てている。アデノウイルスの場合も、後期 mRNA がウイルス粒子の構成タンパクをコードしていることが知られており、後期遺伝子の mRNA の安定化に HUR が利用されている可能性がある。今後、後期 mRNA に HUR が結合することなど、後期 mRNA と HUR との関わりを検討する必要がある。

さらに、HUR がウイルス後期 mRNA の輸送に関わっていると思われる理由がもう一つある。HUR は、前述のように ARE 結合タンパク質の 1 つであるが、このタンパクは核と細胞質の間を shuttle する機能を持つ<sup>21)</sup>。アデノウイルスが感染しておよそ 12 時間経過した感染後期では、ほぼ全ての宿主細胞の mRNA 核外輸送は停止し<sup>19)</sup>、ウイルス後期 mRNA が優先的に核外へ輸送され、後期タンパクに翻訳される。HUR はアデノウイルス感染後期になると、核外に輸送されることが見出されており<sup>22)</sup>、これらの事実からも、ウイルス後期 mRNA が HUR と共に核外に輸送されると考えられる。ウイルス後期 mRNA に

は ARE もしくはそれに類似した配列は存在しないが、全ての後期 mRNA に共通して存在する tripartite leader と呼ばれる配列が知られている<sup>4)</sup>。この配列は、後期 mRNA の核外輸送や翻訳に必須の配列であることから、HUR が結合する可能性があると考えられる。実際、RNP IP 法により、ウイルス後期 mRNA の L5 mRNA が HUR と結合することを示唆するデータも出ており(未発表データ)、今後後期 mRNA と HUR の相互作用を詳細に検討する必要がある。

ARE-mRNA の安定化システムに関与する初期遺伝子としては、がん細胞を用いた実験により、これまでも E4orf6 が報告されている<sup>10)</sup>。E4orf6 は PP32 との結合を介して ARE-mRNA を核外輸送し、さらに ARE-mRNA を安定化することにより細胞がん化に寄与することも示されている<sup>11)</sup>。これまで、ウイルス増殖に対して ARE-mRNA 安定化システムに関与するかは不明であったが、本研究の結果よりこのシステムはウイルスの生産にも重要であることが証明された。さらに、図3に示すように、E4orf6 のみならず E4orf3 も、ARE-mRNA 安定化システムに関与することが明らかになった。E4orf6、E4orf3 は、細胞がん化だけではなく、ウイルス増殖、宿主細胞の DNA 修復・アポトーシス制御に深く関与している重要なタンパク質であり、これらのタンパク質が ARE-mRNA の安定化機能も持っていることは興味深い。

アデノウイルス E4orf6 タンパクは E1B55k タンパクと複合体を形成すること

が知られており<sup>23)</sup>、この複合体は E3 ユビキチンリガーゼのサブユニットとして機能し、宿主細胞のタンパクをユビキチン化し、プロテアソームで分解することが解明されている<sup>18)</sup>。例えば、がん抑制遺伝子産物であり、アポトーシスも誘導する P53 は E4orf6 タンパクと E1B55k タンパクの両方に結合し、ユビキチン化された後分解される<sup>18)</sup>。この機能はアデノウイルスが宿主細胞のアポトーシス機能を阻害し、細胞死を回避することでアデノウイルス複製の場を維持するのに極めて重要である。アデノウイルスによる E3 ユビキチンリガーゼ活性が ARE-mRNA 安定化に関与するかについてはこれまで報告が無かった。本研究では、図 5 に示す通り、ユビキチン化タンパクのプロテアソームの阻害剤で処理しても ARE-mRNA の安定化には変化がなかった。従って、E4orf6 は ARE-mRNA の安定化に関わるが、ユビキチン-プロテアソーム系とは別の pathway でこの安定化に関わっていることが明らかになった。

## 結論

本研究により， アデノウイルス感染細胞では， ARE-mRNA 安定化システムが活性化され， このシステムはアデノウイルスの複製に必要であることが明らかになった．

## 文献

1. Jawetz E: The story of shipyard eye. *Br Med J*, 1: 873-876, 1959.
2. Yolken RH, Lawrence F, Leister F, Takiff HE, Strauss SE: Gastroenteritis associated with enteric type adenovirus in hospitalized infants. *J Pediatr*, 101: 21-26, 1982.
3. Trentin JJ, Yabe Y, Taylor G: The quest for human cancer viruses. *Science*, 137: 835-841, 1962.
4. Arnold J. Berk: *Adenoviridae*. edited by David M. Knipe, Peter M. Howley, *FIELDS VIROLOGY* 6th ed, 1704-1731, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2013.
5. Chen CY, Shyu AB: AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci*, 20: 465-470, 1995.
6. Jacobson A, Peltz SW: Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*, 65: 693-739, 1996.
7. Brennan CM, Steitz JA: HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci*, 58: 266-277, 2001.
8. Hinman MN, Lou H: Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci*,

- 65: 3168-3181, 2008.
9. Kedersha N, Anderson P: Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans*, 30: 963-969, 2002.
  10. 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.
  11. Kuroshima T, Aoyagi M, Yasuda M, Kitamura T, Jehung JP, Ishikawa M, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F: Viral-mediated stabilization of AU-rich element containing mRNA contributes to cell transformation. *Oncogene*, 30: 2912-2920, 2011.
  12. Bernardis R, Schrier PI, Bos JL, Van der Eb AJ: Role of adenovirus types 5 and 12 early region 1b tumor antigens in oncogenic transformation. *Virology*, 127:45-53, 1983.
  13. Nevels M, Täuber B, Kremmer E, Spruss T, Wolf H, Dobner T: Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *J Virol*, 73: 1591-1600, 1999.
  14. Barker DD, Berk AJ: Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection.

- Virology, 156: 107-121, 1987.
15. Halbert DN, Cutt JR, Shenk T: Adenovirus Early Region 4 Encodes Functions required for Efficient DNA Replication, Late Gene Expression, and Host Cell Shutoff. *J Virol*, 56: 250-257, 1985.
  16. Huang M, Hearing P: Adenovirus Early Region 4 Encodes Two Gene Products with Redundant Effects in Lytic Infection. *J Virol*, 63: 2605-2615, 1989.
  17. Kakuguchi W, Kitamura T, Kuroshima T, Ishikawa M, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F: HuR knockdown changes the oncogenic potential of oral cancer cells. *Mol Cancer Res*, 8: 520-528, 2010.
  18. Blanchette P, Cheng CY, Yan Q, Ketner G, Ornelles DA, Dobner T, Conaway RC, Conaway JW, Branton PE: Both BC-box motifs of adenovirus protein E4orf6 are required to efficiently assemble an E3 ligase complex that degrades p53. *Mol Cell Biol*, 24: 9619-9629, 2004.
  19. Pildere S, Moore M, Shenk T: The Adenovirus E1B-55K Transforming Polypeptide Modulates Transport or Cytoplasmic Stabilization of Viral and Host Cell mRNAs. *Mol Cell Biol*, 6: 470-476, 1986.
  20. Sokoloski KJ, Dickson AM, Chaskey EL, Garneau NL, Wilusz CJ, Wilusz J: Sindbis virus usurps the cellular HuR protein to stabilize its transcripts and promote



productive infections in mammalian and mosquito cells. *Cell Host Microbe*, 19: 196-207, 2010.

21. Fan XC, Steitz JA: HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 15293-15298, 1998.

22. 黒嶋雄志: アデノウイルス感染による RNA 結合タンパク HuR の制御. *北海道歯誌*, 33: 3-9, 2012.

23. Sarnow P, Hearing P, Anderson CW, Halbert DN, Shenk T, Levine AJ: Adenovirus early region 1B 58,000-dalton tumor antigen is physically associated with an early region 4 25,000-dalton protein in productively infected cells. *J Virol*, 49: 692-700, 1984.

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご指導、ご助言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病理病態学教室の教室員の皆様に厚くお礼申し  
上げます。

## 図説

### 図 1 アデノウイルス感染細胞における ARE-mRNA 量

野生型 5 型アデノウイルス (wt300) を MOI:100 で HeLa 細胞に感染させ、感染 24 時間後に細胞を核と細胞質に分離し、各分画の *FOS*, *MYC*, *COX2* mRNA 量をリアルタイム PCR で計測した。コントロールとしてアデノウイルス非感染細胞 (Mock) の各 mRNA の定量を行い、その値と比較した数値をグラフにした。各 ARE-mRNA 量は *GAPDH* の mRNA で補正した。実験はそれぞれ独立して 3 回行い、平均値と標準誤差を求めた。

### 図 2a Tet-off システムの概略図

Tet-Off システムでは、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (tTA) を発現するプラスミドと、テトラサイクリン応答因子 (TRE) をコードする応答発現プラスミドを使用する。tTA は Tet リプレッサータンパク質 (TetR) と VP16 活性化ドメイン (AD) より構成される融合タンパク質で、ドキシサイクリン非存在下でテトラサイクリン応答因子 (TRE) と結合して下流の *LUC-ARE<sup>FOS</sup>* 遺伝子発現を誘導する。ドキシサイクリン存在下では tTA にドキシサイクリンが結合し、tTA が TRE から解離することで、転写が抑制される。

図 2b tet-off システムを用いたアデノウイルス感染細胞における ARE-mRNA 半減期

Tet-off システムを持つ HeLa 細胞 に, pTRE-LUC-ARE を導入した系(A4)を作り, wt300 感染 24 時間後, 継時的にドキシサイクリン処理を行い, *LUC* mRNA の定量をリアルタイム PCR 法で行い半減期を求めた. コントロールとしてアデノウイルス非感染細胞 (Mock) に継時的にドキシサイクリン処理を行い, *LUC* mRNA の定量をリアルタイム PCR 法で行い比較した. 実験はそれぞれ独立して 3 回行い, 平均値と標準誤差を求めた.

図 2c アデノウイルス感染時間による半減期

図 2b と同様の実験系を用いて, wt300 感染後, 3, 6, 12, 18, 24 時間にドキシサイクリンで細胞を処理し, 継時的に mRNA を抽出し, *LUC* mRNA の定量をリアルタイム PCR 法で行い半減期を求めた. コントロールとしてアデノウイルス非感染細胞 (Mock) に継時的にドキシサイクリン処理を行い, *LUC* mRNA の定量をリアルタイム PCR 法で行い比較した. 実験はそれぞれ独立して 3 回行い, 平均値と標準誤差を求めた.

### 図 3a アデノウイルスの遺伝子領域と変異型アデノウイルスの模式図

本研究で用いたアデノウイルス変異株の模式図。黒四角は欠損，黒三角は挿入を表し，塩基配列の変更を赤字斜体で示す。

### 図 3b 各種変異型アデノウイルスと A4 細胞における半減期

図 2b と同様の手法で，wt300，dl355 (*E4orf6* 遺伝子欠損)，dl1520 (*E1B55k* 遺伝子欠損)，in orf3 (*E4orf3* 遺伝子欠損) (図 3a) を感染させ，24 時間後にドキシサイクリンを添加し，一定時間ごとに細胞を回収して RNA を抽出後，リアルタイム PCR 法で *LUC-ARE* mRNA を定量し，*LUC* mRNA の半減期を求めた。コントロールとしてアデノウイルス非感染細胞 (Mock) に継時的にドキシサイクリン処理を行い，*LUC* mRNA の定量をリアルタイム PCR 法で行い比較した。実験はそれぞれ独立して 3 回行い，平均値と標準誤差を求めた。

### 図 4a HUR ノックダウン

HeLa 細胞に，HUR に対する三種類の siRNA の混合，negative control siRNA を導入し，24，48，72 時間後の HUR の発現をウエスタン法で検討した (上)。各タンパク量を測定し，各実験条件における siHUR(-)を 100%としたときのタンパク量の割合をヒストグラムにまとめた (下)。β-actin はウエスタン法のタンパ

ク量のコントロールとして示している。

#### 図 4b,c HUR ノックダウンによるアデノウイルスの生産効率

HeLa 細胞を HUR ノックダウン処理し、48 時間後、wt300 を 24 時間感染させウイルス生産効率を観察した。(b) 感染細胞からウイルスを抽出し、293 細胞を用いてヘキソンタンパクを染色した。(c) 非感染細胞 (mock) , negative control siRNA 導入細胞, siHUR 導入細胞のウイルス生産量を測定した。実験はそれぞれ独立して 3 回行い、平均値と標準誤差を求めた。

#### 図 5 アデノウイルス感染による ARE-mRNA 安定化システムとユビキチンプロテアソーム系の関連

図 2b と同様の手法で、細胞に wt300 を感染させ、以前 E4orf6 による p53 のユビキチンプロテオソーム系による分解を検討した手法<sup>11)</sup>と同様に、プロテアソーム阻害剤 MG132 (10 $\mu$ M) で 2 時間処理し、LUC mRNA の半減期を計測した。実験はそれぞれ独立して 3 回行い、平均値と標準誤差を求めた。

ARE-mRNA stabilization system is necessary to replicate adenovirus

Jumond Patrick Jehung

Department of Oral Pathological Science, Hokkaido University Graduate School of  
Dental Medicine (Chief: Prof. Masanobu Shindoh)

North 13 West 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan.

## Abstract

AU-rich element (ARE) is RNA element, which is a target for rapid degradation of ARE containing mRNA. ARE is present in the 3'-untranslated regions of certain mRNA transcribed from growth-related genes. Several RNA binding proteins are known to interact with ARE and modulate the fate of ARE-mRNA. HUR, which is a member of the embryonic lethal abnormal vision (ELAV) family, binds to ARE in order to export and stabilize ARE-mRNA, when cells are under certain conditions such as heat shock or serum stimulation.

Although the stabilization of ARE-mRNA is required for oncogenic activity mediated by E4orf6, one of the oncogene products of adenovirus, there is no evidence about the effect of the stabilization for adenovirus replication. In this study, I examined the correlation between ARE-mRNA stabilization and adenovirus replication.

Luciferase and ARE fusion gene (*LUC-ARE*) was introduced into HeLa cells including tet-off system to examine the stabilization of the fusion gene in adenovirus infected cells. In order to estimate the half-life of the fusion gene, the quantity of the mRNA was detected using real-time RT-PCR after stopping the transcription of *LUC-ARE* mRNA by adding doxycyclin. The half –life of the fusion mRNA in adenovirus infected cells was longer in the late time of the infection than that of



non-infected cells. I determined that adenovirus E4orf3 and E4orf6 were required for this stabilization by using mutant adenoviruses. Furthermore, adenovirus production was inhibited when ARE-mRNA stabilization system was disrupted by HUR knockdown, indicating that this system is necessary to adenovirus replication.

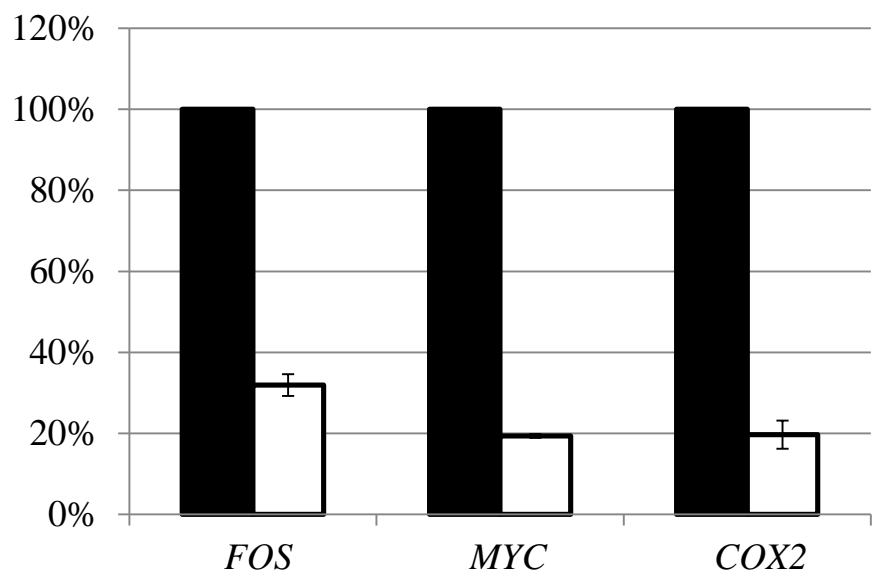
Adenovirus E4orf6/E1B55kD complex is known to activate E3 ubiquitin ligase. To investigate whether the viral E3 ubiquitin ligase is required for the system of ARE-mRNA stabilization, adenovirus infected cells were treated with proteasome inhibitor MG132. There was no difference in the half-life of *LUC-ARE* mRNA, suggesting that ARE-mRNA stabilization and E3 ubiquitin ligase were independent with each other.

These data indicate that adenovirus infection induce the stabilization system of ARE-mRNA, which is required for the virus replication.

Key word: Adenovirus, E4orf6, HUR, ARE-mRNA stability

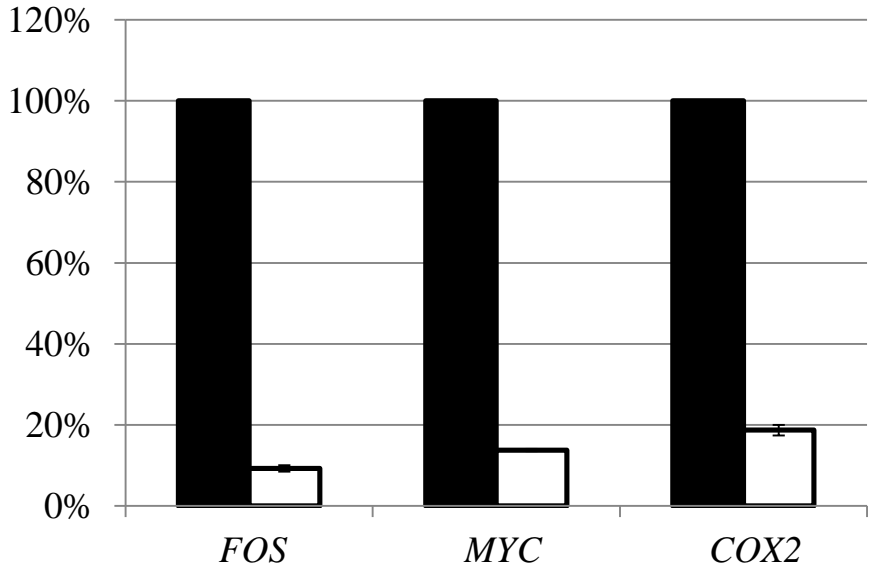
Mock  
 wt300

**Total mRNA**

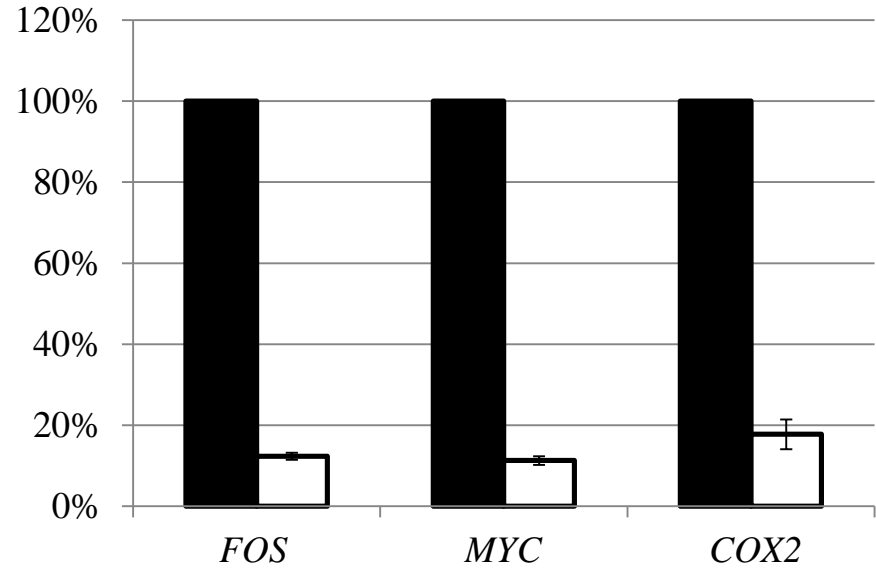


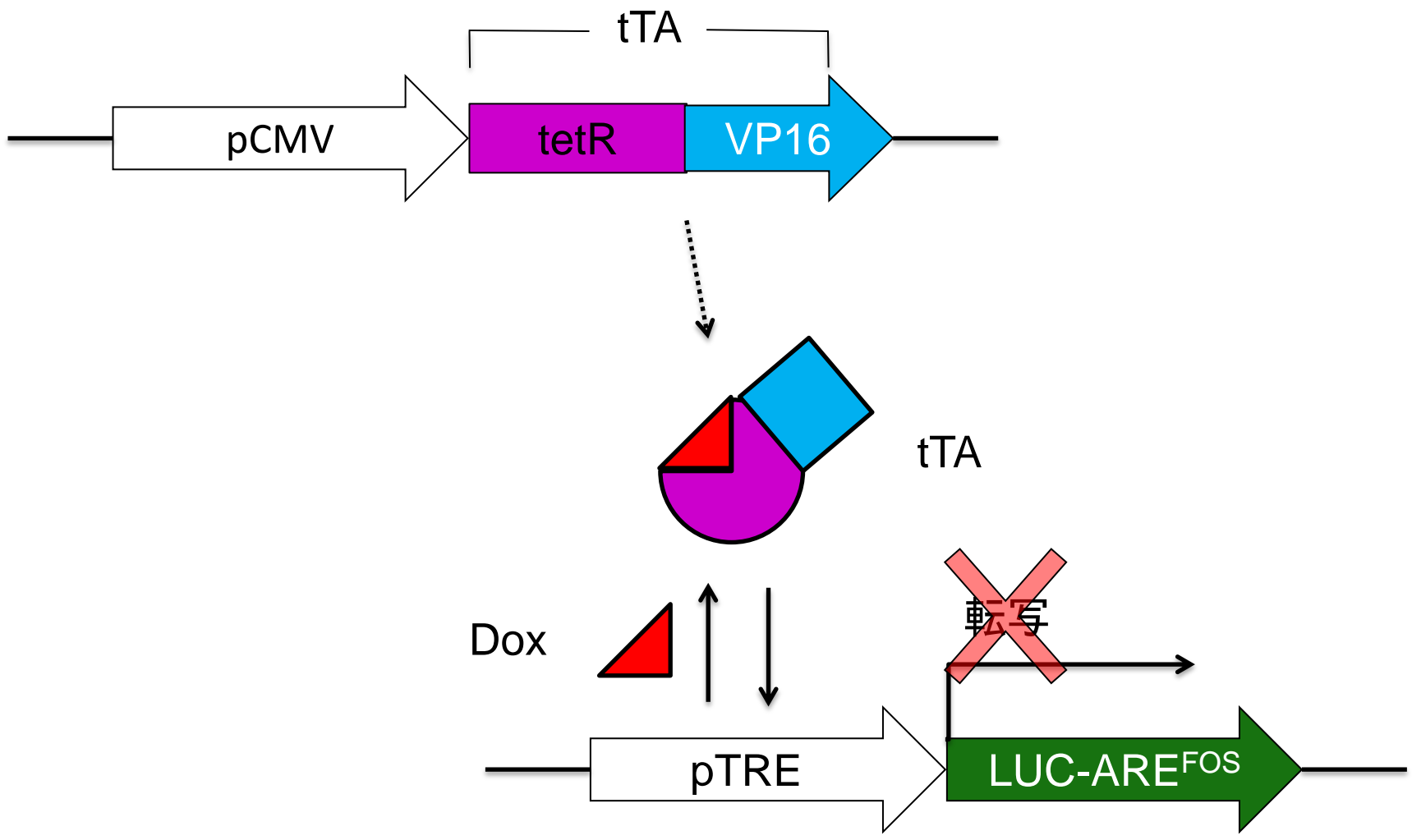
**Nucleoplasmic mRNA**

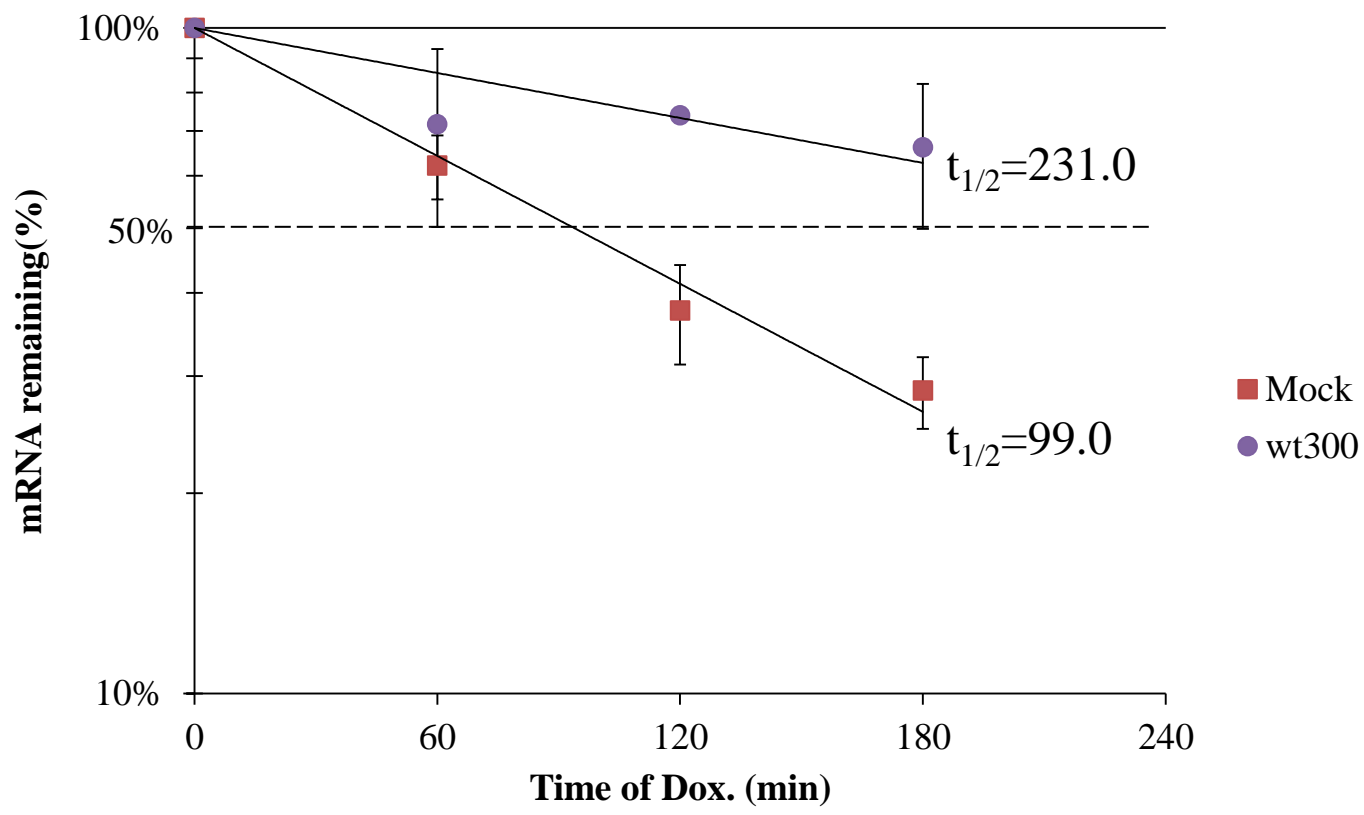
**mRNA Expression / GAPDH**

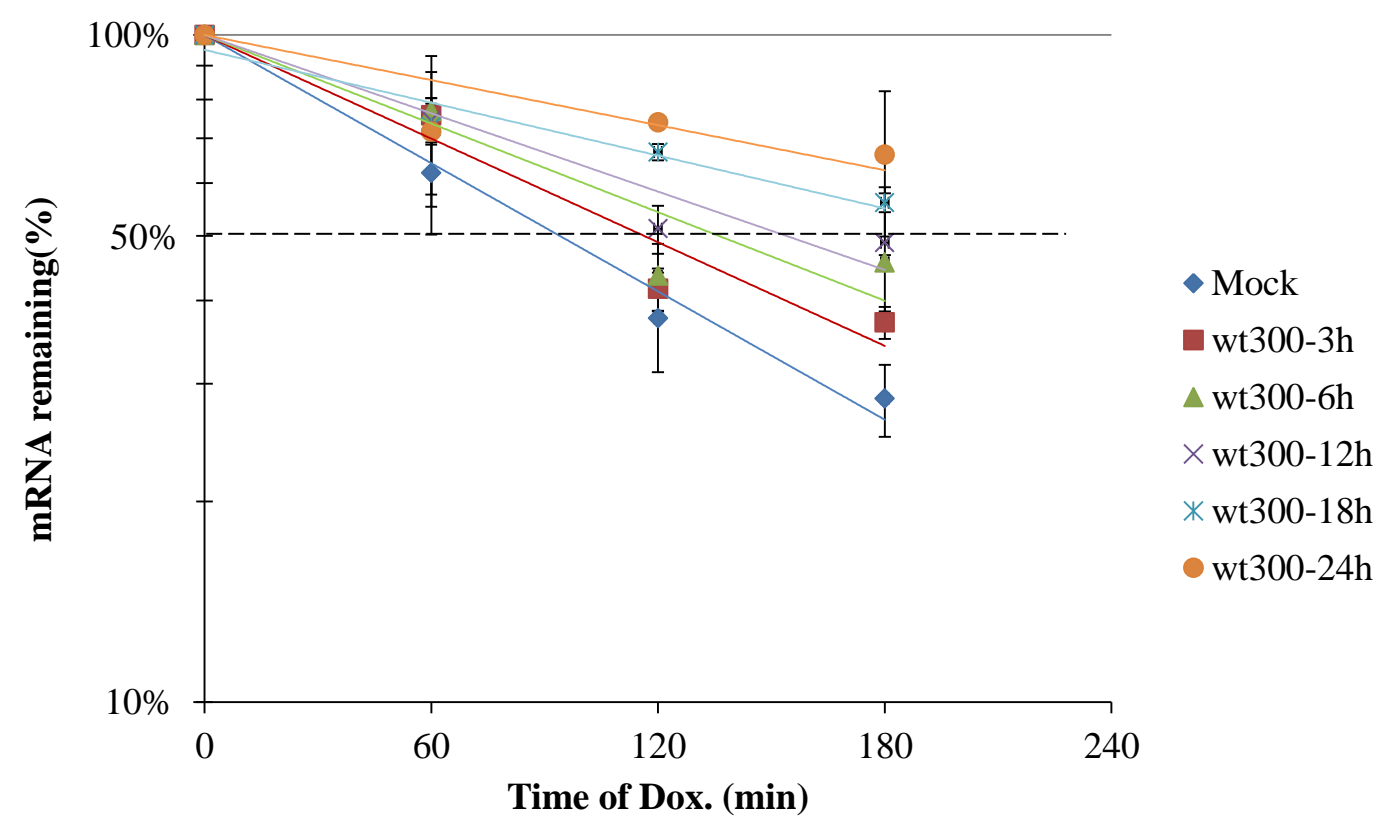


**Cytoplasmic mRNA**

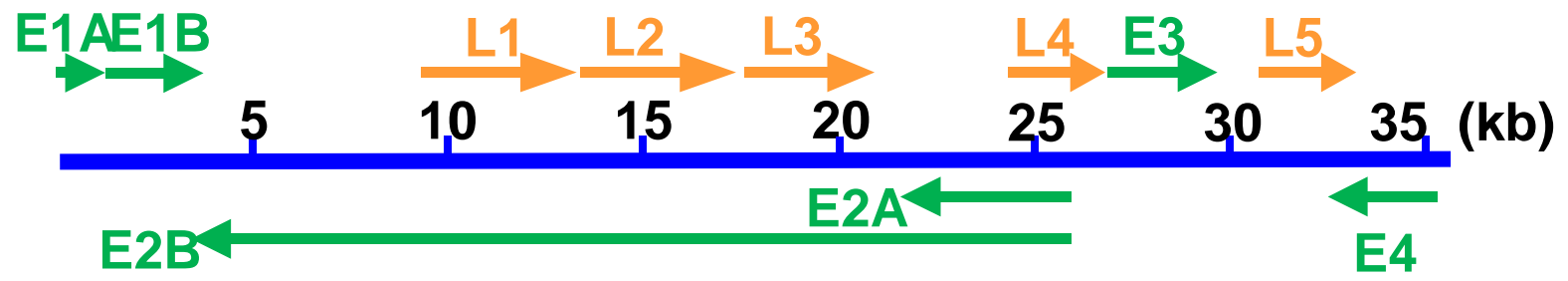




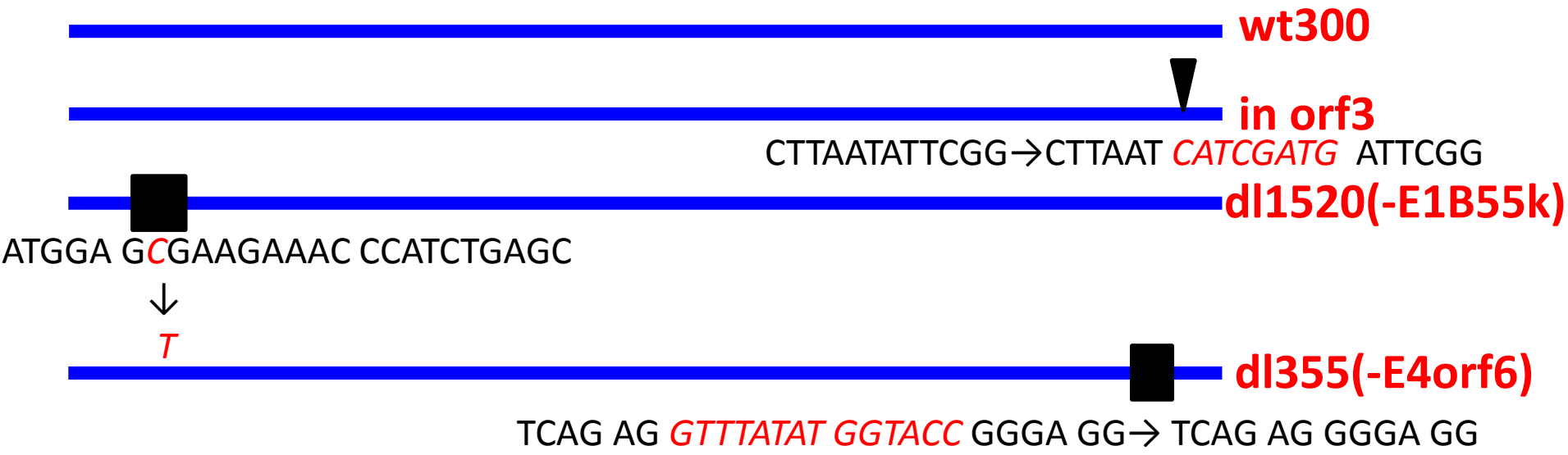




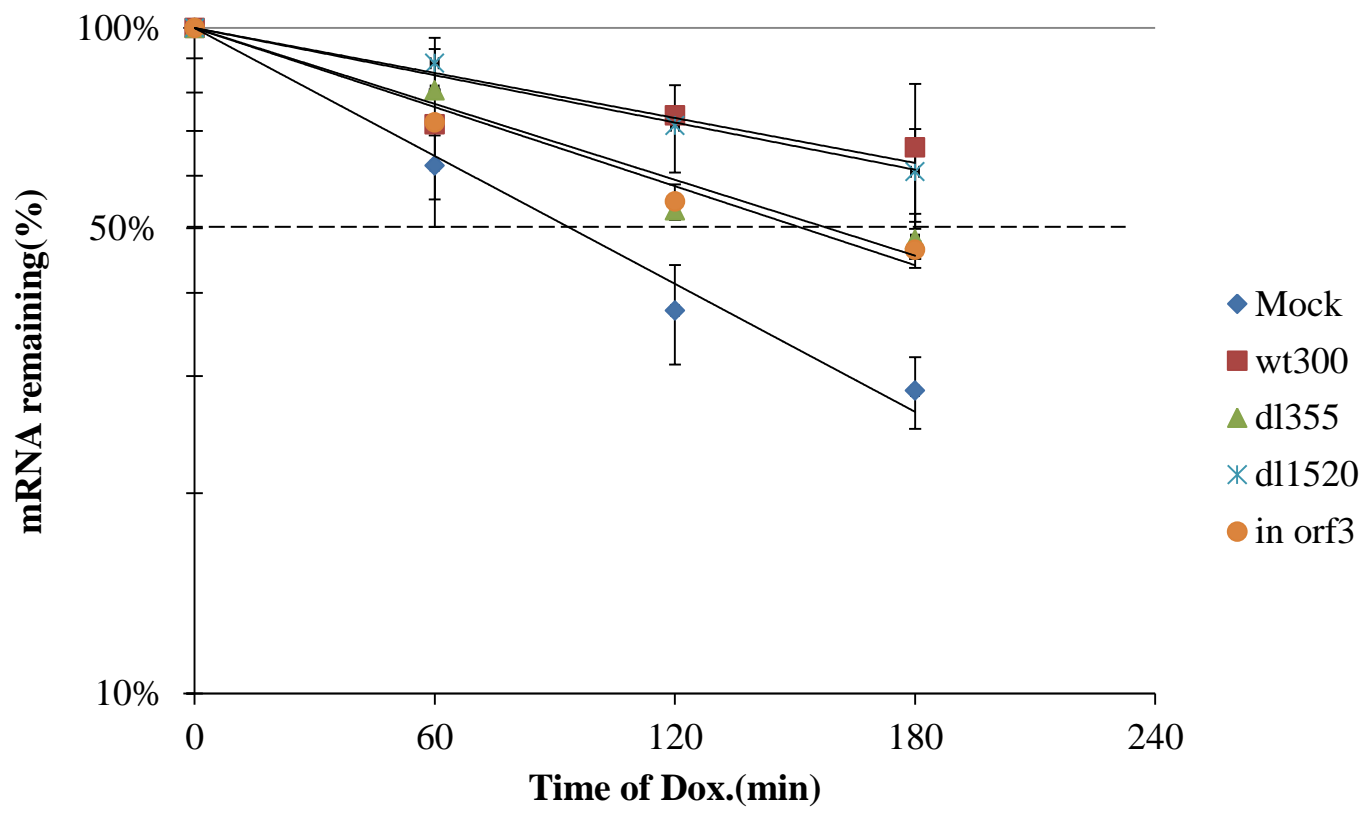
### Adenovirus genome

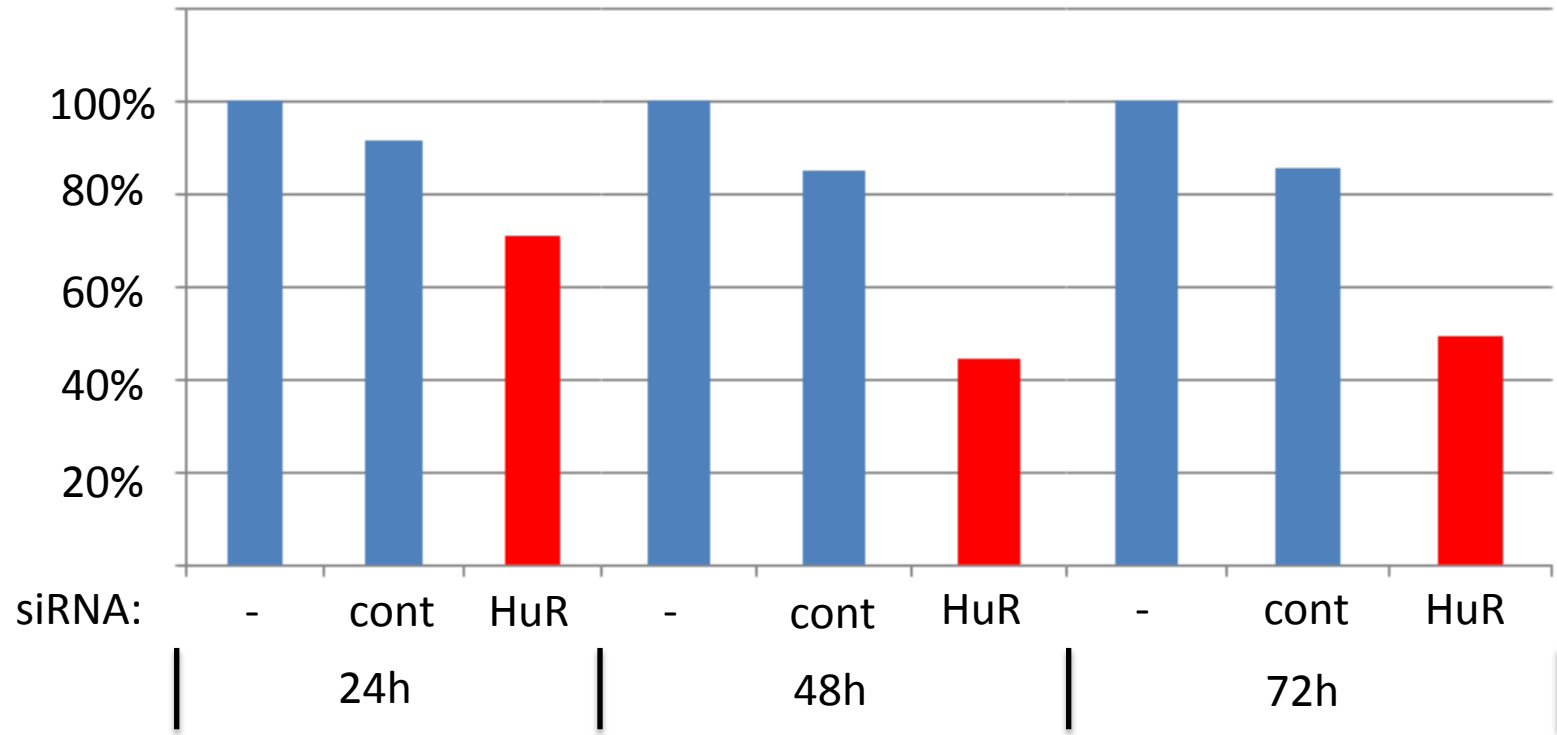
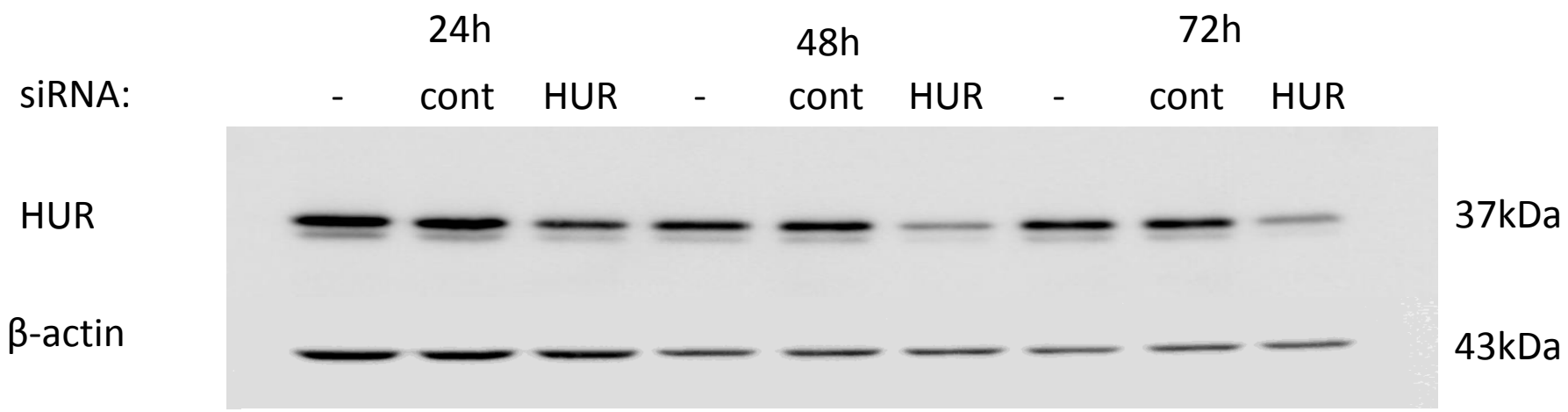


### Adenovirus deletion mutants

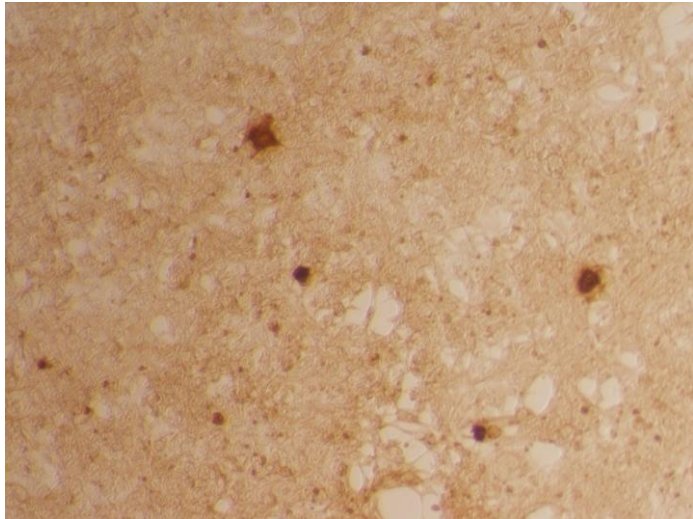
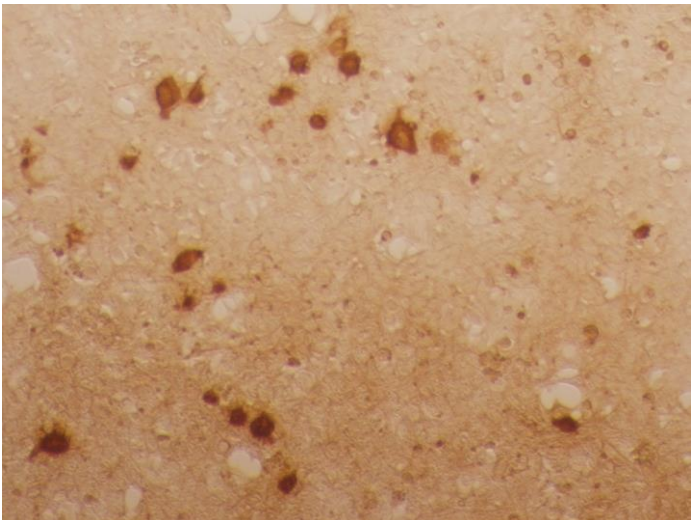
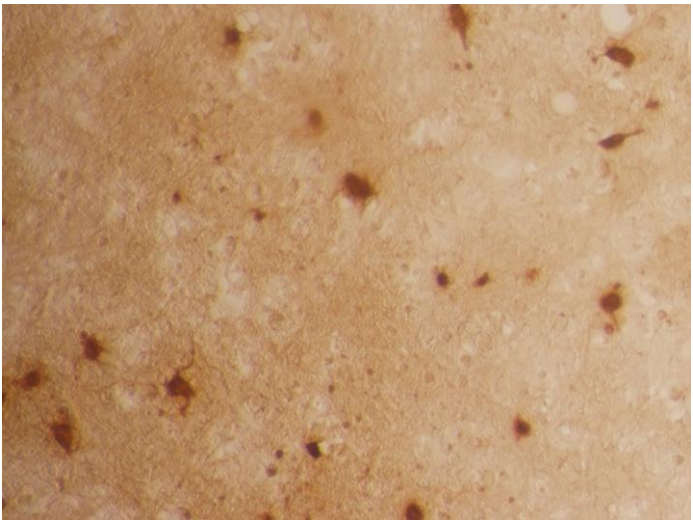


: deleted region  
 : inserted region









No siRNA	Negative control siRNA
siHUR	

