HOKKAIDO UNIVERSITY

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［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	鄭, 朱蒙 パトリック
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12163号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62196
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Jumond_Patrick_Jehung_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（歯学）　　氏　名　鄭　朱蒙パトリック

学　位　論　文　題　名

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

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．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．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．

AU-rich element (ARE) はアデニンとウラシルに富む RNA エレメントで，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．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．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.
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. 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. 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, ARE-mRNA とウイルス増殖との関連に興味が持たれる. 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. まず HeLa 細胞に wt300 を感染させ, 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, wt300 感染 24 時間後, HeLa 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. 次に 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. また, 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, 感染時間に比例して半減期が延長された. 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 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) を使い, 同様に半減期を観察した結果, dl355 と, in orf3 感染では wt300 と比較して半減期が減少しており, *E4orf6* と *E4orf3* 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, HeLa 細胞の 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. アデノウイルスによるユビキチンプロテアソーム活性が ARE-mRNA 安定化に与える影響を検討するために, プロテアソーム阻害剤である MG132 処理を行い, 半減期を観察した結果, MG132 非処理群と比較して半減期に差は見られなかった. これは ARE-mRNA の安定化システムとアデノウイルスによるユビキチンプロテアソーム活性が別経路であることを示唆している.
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.