

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07283

研究課題名（和文）HIV-1の遺伝子発現を保证するための転写とRNA核外輸送との連携

研究課題名（英文）Emerging links between transcription and RNA export in HIV-1 gene expression

研究代表者

谷口 一郎（Taniguchi, Ichiro）

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：00467432

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：レトロウイルスに属するヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）の遺伝子発現では細胞の機構に加えて、ふたつのウイルスタンパク質、転写伸長因子TatとRNA核外輸送因子Revが必要である。申請者はTatとRevがウイルスRNAの共通の領域に結合することを見出した。また、HIV-1のモデルRNAを用いた試験管内反応系において、RNAスプライシング反応をTatは促進し、Revは阻害することを発見した。TatとRevはスプライシング反応の進行を切り替えることにより、HIV-1の遺伝子発現を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIV-1タンパク質のTatとRevに焦点を絞った本研究で、TatとRevが連携することによるウイルス遺伝子発現の制御機構を明らかにしつつある。ウイルスタンパク質どうしによる連携はほとんど知られていない。本研究成果は、他のウイルスの増殖機構解明につながる。また、ウイルスタンパク質どうしの連携を標的とした抗ウイルス薬剤開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：Gene expression of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) requires two viral proteins, transcription elongation factor Tat and nuclear RNA export factor Rev, in addition to cellular mechanisms. We found that Tat and Rev bind to a common region of viral RNA. We also found that Tat enhances but Rev inhibits pre-mRNA splicing in an in vitro reaction system using HIV-1 model RNA. These results suggest that Tat and Rev regulate HIV-1 gene expression by switching the progress of splicing reactions.

研究分野：遺伝子発現

キーワード：HIV-1 RNA核外輸送 RNAスプライシング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) レトロウイルスの遺伝子発現

レトロウイルス遺伝子は宿主細胞のゲノムに組み込まれるので、基本的には細胞の遺伝子のように発現するが、細胞の機構のみでは不十分な場合がある。例えばヒト免疫不全ウイルス 1 型(HIV-1)に関しては、細胞性因子だけでは転写伸長効率が非常に悪い。そこで HIV-1 は、本研究の主役である、ウイルスタンパク質の Tat を利用する。Tat はウイルス RNA の 5'末端に存在する TAR と呼ばれる配列に、転写開始直後に結合する。そして Tat が P-TEFb などの細胞の転写伸長因子群をリクルートすることで、転写伸長反応が促進される。

また、レトロウイルスの多くの RNA は転写後、細胞の規則に逆らってイントロンを含んだまま核外輸送される。HIV-1 の場合、イントロン内の RRE と呼ばれる配列に、本研究のもうひとつの主役である、ウイルスタンパク質の Rev が核内で結合する。Rev が CRM1 などの細胞の核外輸送因子群をリクルートすることによって、イントロンを含んだままの RNA は核外輸送されて、HIV-1 タンパク質へ翻訳される、またはゲノム RNA となる。なお、この CRM1 依存の仕組みは、細胞の一般的な mRNA 核外輸送では利用されない。

HIV-1 遺伝子の転写と RNA 核外輸送においては、Tat と Rev がそれぞれ独立に機能しているように見えるが、下記背景(2)と(3)から、HIV-1 遺伝子発現はそれほど単純ではないことが推測された。

(2) 真核細胞の遺伝子発現における、転写・RNA プロセッシング・RNA 核外輸送の連携

真核細胞では、転写・プロセッシング・RNA 核外輸送などは密接に連携している。例えば mRNA の転写反応は、核外輸送因子群の RNA 上へのリクルートを促進することにより、mRNA 核外輸送を確実に行わせる。転写と RNA 核外輸送を連携させる実体は、転写伸長因子群と核外輸送因子群とから構成される Transcription/Export (TREX) 複合体である[Strasser et al. *Nature* 2002]。また TREX は、mRNA の 5'末端キャップ構造に結合する CBC と相互作用して 5'末端へリクルートされるので、RNA プロセッシングも RNA 核外輸送を促進する[Cheng et al. *Cell* 2006; Nojima et al. *JBC* 2007]。

(3) HIV-1 の RNA 核外輸送に関する申請者らの研究

申請者らは、HIV-1 の RNA にも 5'末端キャップ構造があるので、TREX 依存の「細胞 mRNA 型経路」も誘導されると考えた。しかし、Rev は RRE だけではなく CBC と相互作用して 5'末端にも結合すること、そしてこの結合により TREX のリクルートを競合阻害することを明らかにした[Taniguchi et al. *Nucleic Acids Res.* 2014]。つまり、Rev は「細胞 mRNA 型経路」の利用を抑制するという新規活性を持つことがわかった。

(4) HIV-1 の転写と RNA 核外輸送とを連携する viral TREX 仮説

Rev が 5'末端に結合することを明らかにしたが、5'末端には TAR を介して Tat が結合する。したがって、ウイルス RNA の 5'末端には Tat を中心とした転写伸長因子群と Rev を中心とした核外輸送因子群が集合することになる。また、予備的結果として、Tat と Rev が直接結合することも見出した。

以上の背景から、HIV-1 の転写と RNA 核外輸送を連携させる複合体を想定した。それは、Tat と Rev が相互作用し、両タンパク質を核として形成される複合体、ウイルス型 TREX(viral TREX:vTREX)複合体である。vTREX によって、細胞とは異なる HIV-1 独自の遺伝子発現が保証されると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は HIV-1 の遺伝子発現における転写伸長因子と RNA 核外輸送因子との連携を示し、その連携の重要性を明らかにすることである。そのために、以下のことを解析する。

(1) Tat と Rev の TAR への結合

Tat は HIV-1 RNA の 5' 末端にある TAR に直接結合する。また、Tat と Rev が直接結合することがわかっている。Tat 依存的に Rev が TAR に結合する、つまり両タンパク質が TAR に協調的に結合するか、それとも Tat の TAR への結合を Rev が阻害するかを調べる。

(2) Tat と Rev のスプライシングに対する影響

Tat がスプライシング反応を促進することが知られている。一方、Rev には阻害活性があることが報告されているが、過剰量を用いたアーチファクトであることが指摘されている。TAR と RRE の両方を持つ RNA で調べられた前例がなく、また、両タンパク質の協調性や相互排他性に注目した報告はない。

3. 研究の方法

(1) Tat と Rev の TAR への結合

Tat と Rev の組換えタンパク質を大腸菌で発現させ精製する。これらのタンパク質を、試験管内転写反応によって ³²P 標識した TAR RNA とともに保温する。その後、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を用いたバンドシフトアッセイによって複合体形成を調べる。

(2) Tat と Rev のスプライシングに対する影響

Tat と Rev のスプライシングに対する影響を試験管内反応系を用いて検証する。具体的には、TAR と RRE の両方を持つ HIV-1 のモデル RNA を作製する。³²P 標識したモデル RNA を HeLa 細胞核抽出液中で保温し、スプライシング産物を変性 PAGE によって調べる。

また、生細胞においても検証する。まず、TAR を欠損した HIV-1 RNA を発現するプラスミド DNA を作製する。このプラスミド DNA を Tat と Rev それぞれを発現するプラスミド DNA とともにヒト培養細胞にトランスフェクションする。細胞からイントロンを含んだ RNA から産生されるウイルスタンパク質を抽出しウェスタンブロットティングにより調べることで、スプライシングに対する影響を調べる。

4. 研究成果

(1) Tat と Rev の TAR への結合

バンドシフトアッセイによって複合体形成を調べた結果、Tat が TAR と直接結合することを確認できた。また、Rev は単独で TAR に結合することを見出した。さらに予想に反して、Tat と Rev の TAR への結合は相互排他的であることもわかった。

(2) Tat と Rev のスプライシングに対する影響

試験管内スプライシング反応系によって解析した結果、Tat はモデル RNA のスプライシング反応を促進する一方、Rev は阻害した。この結果は、(1)で見出した Tat と Rev が TAR へ相互排他的に結合する結果と矛盾しない。また、Tat の促進活性は報告があるが、Rev の阻害活性に関しては結論が出ていなかった。TAR と RRE の両方を持つモデル RNA を用いた Rev のスプライシングに対する解析の前例はなく、重要な知見であると言える。

試験管内反応系を用いた解析に加え、HIV-1 を発現する HeLa 細胞を用いた結果、Rev は TAR 依存的に、イントロンを含む RNA から産生されるタンパク質の発現を増強することを見出した。この結果は生細胞においても Rev がスプライシング反応を阻害することを支持している。ただしウイルス RNA を調べたところ、Rev によるスプライシング反応の阻害を証明するまでには至っていない。

当初、Tat と Rev は協調的にウイルス RNA の TAR に結合することにより、ウイルス遺伝子からの転写伸長とウイルス RNA の核外輸送を連携することを仮定していた。しかし本研究において、両者は TAR に相互排他的に結合すること、Tat はスプライシング反応を促進する一方、Rev は阻害することを見出した。これらの結果から、HIV-1 遺伝子発現において以下のモデルが考えられる。初期では Tat がスプライシング反応を促進する活性によって Tat 自身と Rev の発現が誘導される。後期になると Rev がスプライシング反応を抑制することによって、イントロンを含む RNA から産生される構造タンパク質の発現が誘導される、というモデルである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Machitani Mitsuhiro, Taniguchi Ichiro, McCloskey Asako, Suzuki Tatsuya, Ohno Mutsuhito	4. 巻 26
2. 論文標題 The RNA transport factor PHAX is required for proper histone H2AX expression and DNA damage response	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 1716 ~ 1725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.074625.120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawamoto Takahito, Yoshimoto Rei, Taniguchi Ichiro, Kitabatake Makoto, Ohno Mutsuhito	4. 巻 26
2. 論文標題 ISG20 and nuclear exosome promote destabilization of nascent transcripts for spliceosomal U snRNAs and U1 variants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 18 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Machitani Mitsuhiro, Taniguchi Ichiro, Ohno Mutsuhito	4. 巻 40
2. 論文標題 ARS2 Regulates Nuclear Paraspeckle Formation through 3'-End Processing and Stability of NEAT1 Long Noncoding RNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00269-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Rei Yoshimoto, Ichiro Taniguchi, Karim Rahimi, Jorgen Kjems, Mutsuhito Ohno, Akila Mayeda
2. 発表標題 ciRS-7 is biosynthesized using back-splicing promoted by inverted MIR elements and is exported to cytoplasm via Tap/p15 pathway
3. 学会等名 Eukaryotic mRNA Processing (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ichiro Taniguchi
2. 発表標題 Nuclear export of RNA polymerase II transcripts
3. 学会等名 26th East Asia Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口 一郎、大野 睦人
2. 発表標題 U snRNA核外輸送に関するRNAヘリカーゼの同定
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芳本 玲、谷口 一郎、大野 睦人、前田 明
2. 発表標題 環状RNA (circRNA) の核外輸送機構の解明
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川本崇仁、谷口一郎、大野睦人
2. 発表標題 ヒトU snRNA前駆体の3' -プロセシングのin vitro系の構築
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 壇辻さやか、谷口一郎、大野睦人
2. 発表標題 Systematic analysis of hnRNP C domains in sorting RNA polymerase II transcripts
3. 学会等名 第19回日本RNA学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷口一郎、大野睦人
2. 発表標題 Identification of RNA helicase used in U snRNA export
3. 学会等名 第19回日本RNA学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 芳本玲、谷口一郎、大野睦人、前田明
2. 発表標題 環状RNA (circRNA) の核外輸送機構の解明
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------