

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21770204

研究課題名（和文） ヒト免疫不全ウイルスの Rev タンパク質による
ウイルス RNA の核外輸送機構の解析研究課題名（英文） A novel activity of HIV-1 Rev protein to remodel export RNPs
in directing virus-specific RNA export

研究代表者

谷口 一郎 (TANIGUCHI ICHIRO)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：00467432

研究成果の概要（和文）：ヒト免疫不全ウイルス HIV-1 の 4kb-RNA は異なる 2 種類の経路で核外へ輸送されうる。ひとつはウイルスタンパク質 Rev を介した CRM1 経路であり、もうひとつはスプライシング依存的に誘導される TAP 経路である。ではどのように HIV-1 は 4kb-RNA の輸送経路の混線を回避しているのだろうか？ この疑問を明らかにするため、4kb-RNA を模擬したモデル RNA を用いて、アフリカツメガエル卵母細胞への顕微注入実験と試験管内スプライシング実験を行った。その結果、Rev が TAP 経路の利用を抑制することを見出した。

研究成果の概要（英文）：HIV-1 Rev protein induces export of singly spliced HIV-1 transcript (4kb-RNA) that is normally retained in the nucleus. However, how 4kb-RNA is exported is not well understood, since such a transcript should have possibility of utilizing CRM1-dependent or TAP-dependent export, or both. To understand the export mechanism, we generated model RNA substrates that recapitulated the situation of export of 4kb-RNA in *Xenopus* oocytes, and investigated the action of Rev in detail. We found that such model RNA substrates utilized exclusively CRM1-dependent export pathway in the presence of Rev. Most importantly, this commitment to a single RNA export pathway is achieved by Rev's ability not only to induce CRM1-dependent export but also to suppress TAP-dependent export.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：RNA 核外輸送、mRNA スプライシング、RNA-タンパク質複合体

1. 研究開始当初の背景

真核細胞は核膜によって核と細胞質とに隔てられている。多くの RNA が核内で転写された後、細胞質へ輸送される。RNA 核外輸送機構（輸送経路）は多種類存在し、異なる種類の RNA は異なるセットの輸送因子群によって核外へ輸送される。近年の研究から、輸送経路の選択が RNA の細胞質での機能に影響を与えることがわかってきた。例えば HIV-1 RNA の輸送経路を変更するとウイルス粒子の形成に影響を与えることが報告されている。したがって、ある RNA に複数の輸送経路が誘導されうる場合、その適正な機能発現のためには、適切な経路を選択する機構が重要である。しかしながら、輸送経路の選択機構には不明な点が多い。

そのような選択機構の研究には HIV-1 の系が適している。HIV-1 ゲノムは 2 箇所イントロンを持ち、2 番目のイントロン内に RRE (Rev response element) と呼ばれるウイルスタンパク質 Rev の結合配列が存在する。HIV-1 プロウイルスからはスプライシングパターンの違いにより 3 種類の RNA が発現する。それらは、2 箇所のイントロンともスプライシングされた 2kb-RNA、最初のイントロンのみスプライシングされた 4kb-RNA、全くスプライシングされない 9kb-RNA である。2kb-RNA は一般的な mRNA と同様の経路によって輸送されると考えられる。つまり 2kb-RNA 上には TREX および EJC と呼ばれる複合体がスプライシング依存的にリクルートされ、次いでこれらの複合体に含まれる ALY が核外輸送因子 TAP をリクルートすると考えられる (TAP 経路)。9kb-RNA の場合は RRE 配列に Rev が結合し、Rev が核外輸送因子 CRM1 をリクルートする (CRM1 経路)。ところが、4kb-RNA はスプ

ライシングされ、かつ RRE 配列を持つため TAP 経路と CRM1 経路が同時に誘導されうる。

では 4kb-RNA は両経路で核外へ輸送されるのか、一方の経路が抑制されるのか、もし抑制されるならばその仕組みはどのようなものか？ これらの疑問を明らかにすることは、輸送経路の選択機構について新局面を開くのみならず、HIV-1 の増殖機構を理解し、HIV-1 を制御する上で重要である。

2. 研究の目的

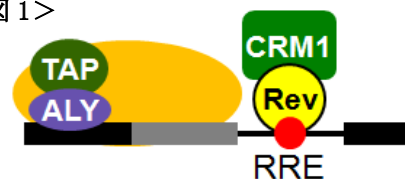
HIV-1 の 4kb-RNA の輸送経路の選択機構を明らかにするため、TAP 経路が利用されているのか、あるいは抑制されているのかを解析する。抑制されていれば、その分子機構に迫る。

3. 研究の方法

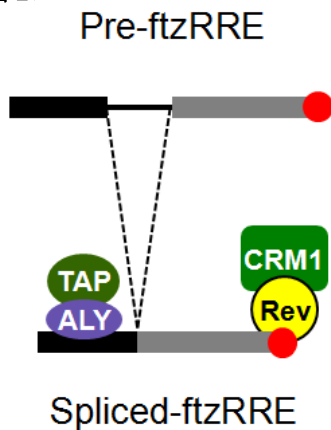
(1) モデル RNA の作製

HIV-1 の 4kb-RNA の核外輸送機構を簡便に、かつ詳細に明らかにするため、4kb-RNA の輸送複合体 (図 1) を模倣するモデル RNA (図 2) を作製した。スプライシング研究でしばしば用いられる fushi tarazu (ftz) の mRNA 前駆体の 3' 端に RRE を付加したコンストラクト (pre-ftzRRE) を作製した。試験管内転写反応によって ³²P 標識したモデル RNA を調製し、以下の解析に用いた。図 1 及び図 2 において、黒色および灰色の棒がエキソン、黒線がイントロン、赤丸が RRE を示す。

<図 1>



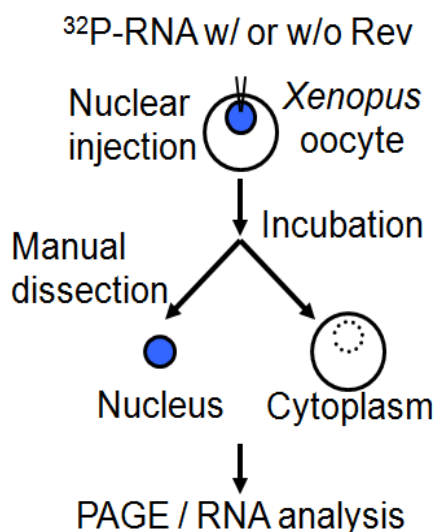
<図 2>



(2) 輸送経路の解析

モデル RNA の輸送経路に対する Rev の作用を調べるため、アフリカツメガエル卵母細胞への顕微注入実験を行った。具体的にはモデル RNA 単独で、あるいは Rev タンパク質とともに核内へ注入した。保温後、核と細胞質とに分離し、それぞれの分画から RNA を抽出し、電気泳動とオートラジオグラフィによって、核と細胞質との RNA 分配を調べた。また、輸送経路を特定するため、CRM1 経路、TAP 経路それぞれに対する阻害剤を用いて、RNA の細胞内分配に与える影響を調べた。

<図 3>



(3) 輸送複合体の解析

モデル RNA の輸送複合体の構成因子が Rev によってどのように変わるかを調べるため、卵母細胞注入系と免疫沈降法を組み合わせ実験を行った。具体的には、標識したモデル RNA を卵母細胞核に注入し、保温後、核抽出液を調製した。その核抽出液を用いて、GST-TAP による GST プルダウンや ALY に対する抗体による免疫沈降を行い、共沈降する RNA を解析した。RNA 注入の際に、RNA 単独の条件と Rev タンパク質との共注入の条件とで比較することにより、輸送複合体に対する Rev の作用を解析した。さらに、卵母細胞の代わりに HeLa 細胞核抽出液を用いた試験管内スプライシング反応系を用いた免疫沈降実験を行い、同様の結果が得られるかを確認した。

4. 研究成果

(1) Rev はモデル RNA の核外輸送において TAP 経路を抑制する

モデル RNA を卵母細胞の核内へ注入後、60 分間保温すると、スプライシングを受けたモデル RNA (spliced-ftzRRE) は効率よく細胞質へ輸送されたが (約 35%)、TAP 経路阻害剤存在下では、その輸送は強く阻害された (約 3%)。つまり、Rev が存在していないとき (-)、モデル RNA は TAP 経路で輸送されることを示している。一方、Rev 存在下 (+Rev) においてもモデル RNA は効率よく核外輸送されたが、TAP 経路阻害剤によって、その輸送は阻害されなかった。つまりこの結果は、Rev 存在下ではモデル RNA の核外輸送は TAP 経路ではないことを示している。このことは、Rev はモデル RNA の核外輸送において、TAP 経路の利用を抑制していることを示唆している。図 4 の N は核画分、C は細胞質画分を示す。

<図 4>

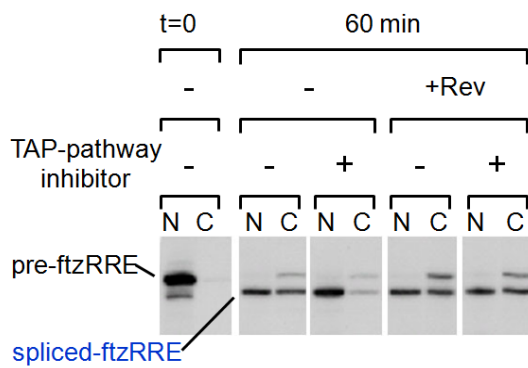
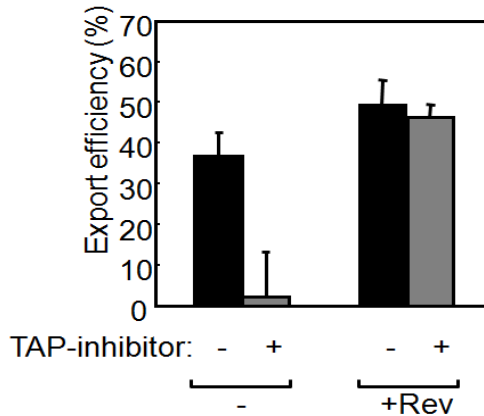


図 4 の核外輸送効率を定量した棒グラフを
図 5 に示す。

<図 5> Effect of TAP- inhibitor
on spliced-ftzRRE export

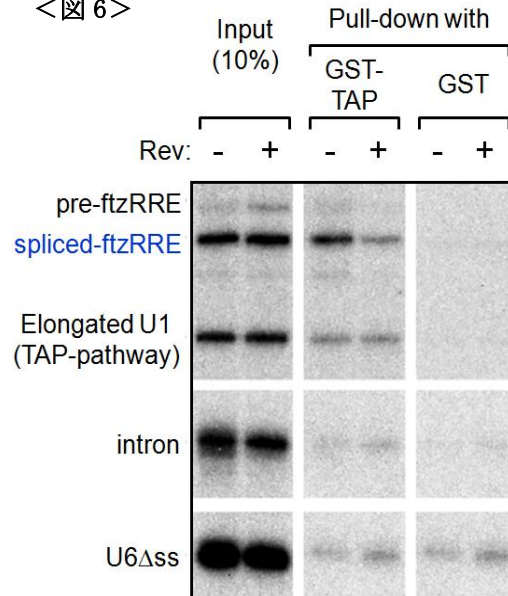


同様の結果は CRM1 経路に対する阻害剤を
用いた場合でも得られた。

(2) Rev はモデル RNA 上への TAP のリクルート
を阻害する

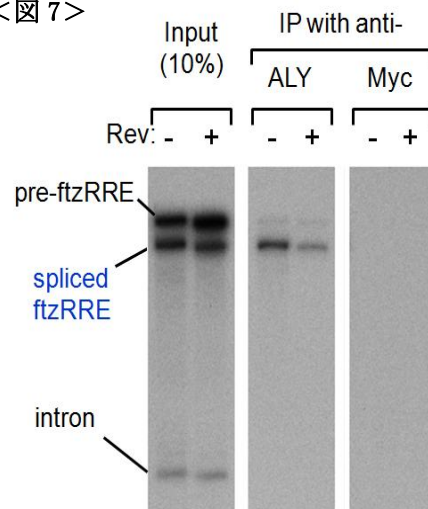
さらに Rev による TAP 経路抑制の分子機構
を明らかにするため、モデル RNA の輸送複合
体を調べた。その結果、Rev はモデル RNA
上への TAP のリクルートを阻害することを突
き止めた。また、ALY のモデル RNA 上への
リクルートも Rev によって阻害されること
もわかった。つまり Rev は 4kb-RNA の輸
送複合体を TAP 経路型から CRM1 経路型
へとリモデリングすることが示唆された (図
6)。

<図 6>



これまでは卵母細胞を用いた解析から得
られた結果であった。以上の現象がヒトの細
胞においても再現されるかを確認するため、
HeLa 細胞核抽出液を用いた試験管内スプ
ライシング反応系と免疫沈降を組み合わせた
解析を行った。その結果、この実験系にお
いても ALY のモデル RNA 上へのリクルート
が阻害されることがわかり、ヒトの細胞にお
いても Rev がウイルス RNA の輸送複合体を
TAP 経路型から CRM1 経路型へとリモデ
リングすることが示唆された (図 7)。

<図 7>



(3) 本研究課題の成果のまとめと今後の展望、および位置づけとインパクト

本研究によって、4kb-RNA の核外輸送において、Rev が TAP の 4kb-RNA 上へのリクルートを阻害することが示唆された。このことによって Rev が TAP 経路の利用を抑制し、CRM1 経路の利用を優先的に利用させることが示唆された。今後は、この現象が HIV-1 を発現するヒト培養細胞においても再現されることを確認する。さらに、Rev による TAP のリクルートの阻害についても、その詳細な分子機構を明らかにする。

Rev による HIV-1 の RNA の核外輸送の仕組みを理解することで、HIV-1 の遺伝子発現を標的にした新薬などの開発に役立つことが予想される。また、成人 T 細胞性白血病などを発症させるヒト T リンパ球向性ウイルス HTLV は Rex とよばれる Rev と同等の機能を持つタンパク質を発現する。したがって、Rev の機能の理解は HTLV 関連疾患に対する治療にもつながることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

福村和宏、谷口一郎、坂本博、大野睦人、井上邦夫、U1 非依存的 mRNA 前駆体スプライシングは選択的スプライシング制御に寄与する、Nucleic Acids Research、査読有、37 巻、2009、1907-1914

[学会発表] (計 1 件)

谷口一郎、RNA 核外輸送における HIV-1 タンパク質 Rev の新規機能、第 12 回日本 RNA 学

会年会、2010 年 7 月 27 日、一ツ橋記念講堂
(東京都千代田区)

[その他]

ホームページ等

http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/ohno_lab.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 一郎 (TANIGUCHI ICHIRO)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：00467432

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし