

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月15日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590413

研究課題名（和文） C型肝炎ウイルスの新規内部認識翻訳開始機構

研究課題名（英文） Novel internal initiation mechanism of translation of hepatitis C virus RNA

研究代表者

鴨下 信彦（KAMOSHITA NOBUHIKO）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90302603

研究成果の概要（和文）：C型肝炎ウイルス RNA の5' 部位に内在が予想される新規内部認識翻訳開始部位（IRES）について、変異 IRES を組み込んだジシストロニック RNA 発現系を、組換えウイルスを使用するなどして構築、改良し、活性を検出した。ジシストロニック RNA を用いた解析に影響を与える転写後遺伝子発現機構について、選択的・異所性スプライシングの関与と第1シストロンの終止コドン読み飛ばしの機序を解析した。

研究成果の概要（英文）：Activity of putative novel internal ribosomal entry mechanism of translation initiation within hepatitis C virus (HCV) RNA was quantified in cultured cells in which mutant internal ribosomal entry site (IRES) is expressed. Recombinant virus vector, which harbors mutant IRES, was constructed for the sake of efficient purification of polypeptides translated from novel mechanism. Post-transcriptional gene expression mechanisms such as alternative/ectopic splicing and termination readthrough of the 1<sup>st</sup> cistron, which affects dicistronic mRNA assays, were delineated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス, RNA, 翻訳 (translation), 内部認識翻訳開始部位 (internal ribosomal entry site), 転写後遺伝子発現, 選択的スプライシング, termination readthrough

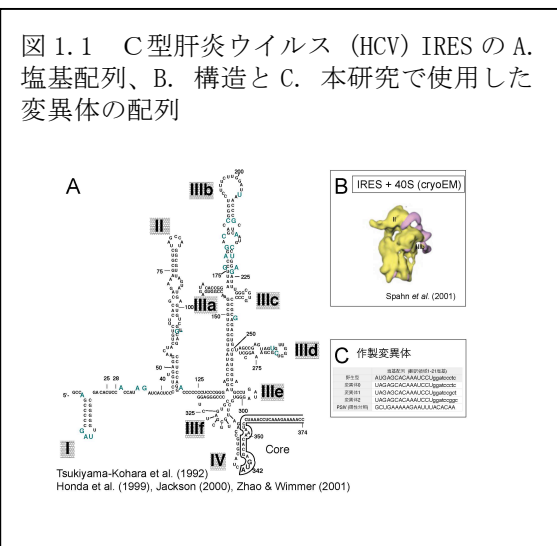
## 1. 研究開始当初の背景

1992年にTsukiyama-Koharaらによって報告されたC型肝炎ウイルス (HCV) 内部認識翻訳開始部位/IRES (internal ribosomal entry site) (図1.1 A) の構造・機能は、研究代表者を含む国内外の研究者により詳細に解析され、IRES領域の5' 端は5' 非翻訳領域の28-

46番目の塩基の間に、3' 端は翻訳領域の30塩基ほどの中に存在することが明らかにされている。無細胞再構成系を用いた研究によると、IRES自身に40Sサブユニットと直接結合する活性がある他、通常のカップ依存性の翻訳開始に用いられる翻訳開始因子のうち eIF4A/E/Gはなくても翻訳開始複合体が形成

される、といったIRESが最初に報告されたピコルナウイルスと比較して特異な分子機構が明らかにされた。しかしながら、実際にはIRES領域外のRNAの配列も影響を及ぼすことが報告されているし、他の宿主因子の関与も明らかにされている。一方で、活性を削り込む方向のアプローチからは、最初のTsukiyama-Koharaらの報告にも見られる通り、HCV RNAの5' 端から110塩基前後まで欠失させたIRESも活性を持つことが、研究代表者を含む複数の研究者により確認されている。

これらの結果からはウイルス感染細胞内で、ウイルス複製と宿主の生体防御の進展に伴い、ウイルスRNAの構造やトランス因子が刻々と変わる中で、活性を変化させる動的なIRES像が浮かび上がる。にもかかわらず、実際には、無細胞再構成系を使用した研究やそこから得られた結果を追認する構造生物学的な手法(図1.1 B)による成果が唯一無二の機構であるように記載されることが多い。



直接リボソームに結合する性質を持つIRESとしては、HCVのほかにもNakashima研究室にて分離されたチャバネアオカメムシ腸管ウイルス (*Plautia stali* intestine virus, 1998 Nakashima et al.) を初めとする昆虫ジストロウイルスのIGR IRES (IGRはintergenic region 遺伝子間領域の意, 4ページ図2.1 A)、ピコルナウイルス科のテスコウイルスが存在する。無細胞再構成系と構造生物学的な手法により、ジストロウイルスのIGR IRESでは、翻訳開始因子は全く必要とされず、延長因子と延長tRNAで翻訳を開始できることが明らかにされていた。研究代表者は米国留学中の解析を通して、PSIVのIGR IRESが、開始tRNAおよびそれに結合する開始因子を利用して、IGR IRESの構造に依存して翻訳を開始で

きることを、変異tRNAと変異IRESを用いた解析により証明した。tRNAの成熟には、核内でのプロセッシングや塩基修飾が必要であり、この結果はin vivoでの培養細胞への発現実験を中心として得られた結果であった。

これらの結果から、開始 tRNA を用いている IRES の中でも、延長 tRNA を用いて翻訳開始を行うものが存在する可能性を考えた。HCV IRES は、IRES の中で、翻訳開始因子の要求性が低く、直接リボソームと結合するといった、IGR IRES に近い性質を持つので、同様のアプローチで IRES の性状を明らかにする上で、格好の研究材料と考えられた。

## 2. 研究の目的

HCV IRESについて、新規の内部認識翻訳開始機構が存在することを証明し、機序を明らかにする。

ジストロニック RNA を核から発現する実験系を作製する。そのために、培養細胞で IRES を解析する上で障壁となりうる、様々な遺伝子発現機構について、検証を加える。

## 3. 研究の方法

研究代表者自身の PSIV での解析結果を踏まえ、無細胞再構成系では発見できない新しい機構を、in vivo の解析から同定ができることを考え、ヒト培養細胞でのアッセイを確立して中心的に使用することを考えた。

### 1) 新規内部認識翻訳開始機構の解析

翻訳開始点の同定のために、ジストロニック RNA の発現ユニットを組み込んだ組み換えウイルスを作製し、培養細胞で IRES 依存性に翻訳される第 2 シストロタンパク質を大量に発現し、精製する。その際に開始コドン 342AUG を消失させた、フレームが異なる 3 つの IRES 変異体を作製して利用する (図 1.1 C)。

### (2) ジストロニック RNA 発現系の改良

単一RNAを発現する障壁となりうる、選択的スプライシングや異所性プロモーター、異所性ポリA付加について細胞内のRNAの解析を行う。

単一RNAが発現する場合でも、第 1 シストロンの終止コドン読み飛ばし (termination readthrough) が、IRES をアッセイする上で障害となることを観察しており、詳細な機序を、PSIV を用いて検討する (4ページ図2.1 A)。

## 4. 研究成果

### (1) 新規内部認識翻訳開始機構の解析

#### ① 新規翻訳開始機構の活性の確認

ジストロニック遺伝子としてデュアルリソフェラーゼを用い、開始コドンを消失し

たフレームの異なる3つの変異体について、第1シストロンの発現を内部対照として、第2シストロンの発現効率を比較した(表1.1)。

表 1.1 レポーター遺伝子の遺伝子導入による変異 IRES 活性の測定

HCV IRES	第2シストロン相対活性
変異体0	0.05
変異体1	0.56
変異体2	ND <sup>a</sup>
PSIV (陽性対照)	1.00

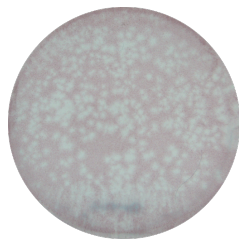
a) プラスミド上で、変異体2の第2シストロン中に終止コドンが出現していることが分かり、除外した。

変異体1では変異体0と比較し、有意に高いIRES活性が得られ、通常の開始コドンを開始部位としない未知の機構が存在することが示された。

## ② 組換えウイルスの作製と発現系の改良

翻訳開始点を明らかにするために、第2シストロンにコードされるタンパク質を精製することを考えた。ルシフェラーゼタンパク質は、タンパク質の安定性が低く、精製に向かないと考え、第2シストロンを別個のタンパク質に換え、ヒト培養細胞へ高効率で導入される組み換えウイルスベクターを作製した(図1.2)。

図 1.2 組換えウイルスによるプラーク形成



作製したウイルスベクターをヒト培養細胞へ導入したところ、第1シストロンについては十分な活性が得られるものの、抗体による第2シストロンの確認が困難であった。そこで、タグタンパク質とレポータータンパク質の融合遺伝子を作製し、培養細胞中への遺伝子導入により、表1.2に示す結果を得た。

表 1.2 タグ-レポーター融合遺伝子の導入による変異 IRES 活性の測定

HCV IRES	第2シストロン相対活性
変異体0	0.06
変異体1	0.94
変異体2	0.80
PSIV (陽性対照)	1.00

表1.1では除外した変異体2にも、有意に高い活性があることが確認された。現在は変異体1,2の発現産物の確認を行っている。

今後は、変異体1,2の翻訳開始がどのコドンで行われているのか、その開始が、PSIV同様に、延長tRNAを用いて行われているのか、効率の悪い形で開始tRNAを用いて行われているのかを、判別する必要がある。

## (2) ジシストロニック RNA 発現系の改良

RNAを核から発現することによりタンパク質の発現の増大を図る本研究においては、発現を期待しているジシストロニックRNA以外のRNAが発現しないことと、発現したジシストロニックRNAで第2シストロンの翻訳がIRESのみに依存することが肝要である。前者について、選択的スプライシングの解析、後者について過去に研究代表者が同定していた昆虫RNAウイルスのtermination readthroughの解析を行った。

### ① 選択的・異所性スプライシングの解析

RT-PCRにより選択的・異所性スプライシングで生じるバリエーションを検出した。

### (ア) ジシストロニック遺伝子発現系

デュアルルシフェラーゼの第1・第2シストロン間の異所性スプライシングを、過去に報告した箇所(Kamoshita et al. 2009)以外に複数箇所同定した。いずれも過去に同定したものに比べ、発現量が極端に低く、スプライシング自体の効率が悪いのか、不安定化されているか、さらにはその両方であると考えられた。

IRES領域を含むスプライシングは、過去にKozakにより、キャップ依存性に第2シストロンのみが翻訳されるモノシストロニックmRNAや、ジシストロニックmRNAではあるがIRES内に欠失変異を含むmRNAを形成することにより、IRESをアッセイする際の障壁となることが激しく批判された。しかしながら、研究代表者が検索したIRES(PSIV IGR-IRES, HCV IRES)については、このようなRNAは同

定することができなかつた。この結果より、PSIVあるいはHCVを対象とする限りにおいては、IRES内に異所性スプライスサイトが生じる影響は、アッセイをする上で無視できるレベルに落ち着いていると考えられた。

(イ) 宿主遺伝子の選択的スプライシング

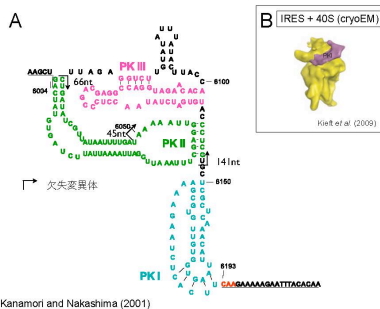
IL-33受容体であり、RNAウイルス感染時に誘導されることが知られているST2/IL1RL1について、細胞外ドメインをコードするエクソンが抜け落ちるスプライスバリエーションST2V2を同定した(学会発表②)。

現在転写産物の全貌を明らかにする目的で、RNAシークエンスを含む網羅的な解析が進んでいるが、ST2V2の配列は遺伝子データベースに登録されておらず、サイトカイン受容体のように基礎発現量の低い遺伝子については、依然未知のスプライスバリエーションが存在することが示された。

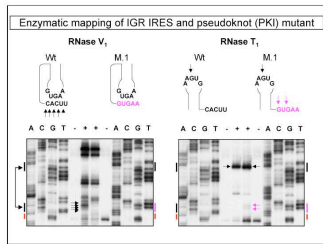
(ア-イ)の解析を通して、異所性スプライシング自体は高等真核細胞生物の細胞に遍在する現象であることが分かった。今後の課題として、バリエーションの発現量の抑制に、mRNAの不安定化がどのように関与するのか、解明が必要であることがはっきりした。

② 第1シストロンの終止コドン読み飛ばし(termination readthrough)の評価

図 2.1 PSIV IGR IRES の A. 塩基配列、B. 構造と、C. 構造の変化。A 中の矢印は表 2.1 で使用した欠失変異体の塩基残存部を示す。



野生型のIRES (M1)は、二本鎖特異的な切断酵素RNase V1、一本鎖特異的な切断酵素RNase T1を用いて切断される(→)ことから分かる通り、シュドノット(左側)、ステムループ(右側)の構造をとる。これに対して変異体M1では、V1で切断されず、ステムループ構造しかたらず。



Kamoshita et al. (2009)

チャバネアオカメムシ腸管ウイルス(Plautia stali intestine virus, PSIV)のIGR IRESについて(図 2.1 A)、第1シストロンの終止コドンの読み飛ばし(termination readthrough)が起こることが知られている。この現象に、IRESを含むIGRの配列がどのように影響するかを解析した。

IGR内のリボソーム結合領域の欠失変異体で、readthrough効率が上昇したことから(表 2.1)、IRESを形成する二次構造・三次構造がreadthroughに必須のものではなく、むしろ抑制的に働いていることが明らかになった。一方終始コドンとその直後の塩基配列を変更するとreadthrough効率は低下し、終始コドンとその直後の塩基配列が重要であると考えられた。

表 2.1 PSIV IGR 欠失変異体の readthrough 効率

IGR 長	第2シストロン相対活性
141 nt	1.00
66 nt	5.83
45 nt	10.11

以上の結果から、PSIVの第1フレーム-IGR間に見られるreadthroughがアルファウイルスのreadthroughに類似したものであることが示されると同時に、ジシストロニックRNA発現ユニット構成上は、第1シストロンの終始コドンと直後の配列に注意が必要であることが明らかになった。

本報告書の主要部分は今後発表されて行く未発表データであり、表中の数値は、再現性の確認がとれている予備的実験のものを使用した。また、図で使用した自他の仕事には、発表者・年を引用した。

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)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Kamoshita N, Tamemoto H, Hayakawa M, Tominaga S. Effects of ASF/SF2 and HuR/ELAV1 on alternative splicing in ST2 gene. 第 85 回日本生化学会大会, 2012.12.15 (福岡)
- ② 嶋下信彦, 為本浩至, 早川盛禎, 富永眞一 IL-33受容体ST2L/IL1RL1遺伝子座における選択的スプライシング. 第 14 回日本RNA学会年会, 2012.7.19 (仙台)
- ③ Kamoshita N, Tamemoto H, Hayakawa M, Tominaga S. ST2 and its related mRNA

expression in human cell lines. International Symposium in honor of Professor Uttam Raj-Bhandary: From Innovations in Nucleic acids research to Regulation of Biological Processes, 2012.12.16 (インド, バンガロール)

- ④ Kamoshita N, Tamemoto H, Hayakawa M, Tominaga S. Alternative splicing in ST2 gene. 第34回日本分子生物学会, 2011.12.14 (横浜)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鴨下 信彦 (KAMOSHITA NOBUHIKO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90302603