

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23790501

 研究課題名（和文） HIV-1 の Rev タンパク質によるウイルス RNA 核外輸送複合体
のリモデリング

研究課題名（英文） HIV-1 Rev protein remodels viral export RNP

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の 4-kb および 9-kb RNA は、ウイルスタンパク質の Rev を介して CRM1 経路で核外へ輸送される。ところが、それらの RNA はキャップ構造を持つため、一般的な mRNA と同じ TAP 経路でも輸送される可能性が考えられた。それらの RNA の核外輸送において TAP 経路が利用されるかを、ウイルス RNA を発現する培養細胞で調べた結果、Rev が TAP の RNA 上へのリクルートを阻害することが示唆された。さらに Rev が、TAP と RNA とのアダプターである Aly とキャップに結合する CBC との結合を阻害することを明らかにした。この活性により、TAP 経路の誘導を抑制することが考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein induces export of the singly spliced and the unspliced HIV-1 transcripts. However, how these RNAs are exported is not well understood, since such transcripts should have both the transcription/export (TREX) complex and Rev on the same RNA, and therefore should have possibility of utilizing the TAP-dependent or CRM1-dependent export, or both. When HIV-1 transcripts were expressed in HEK293T cells, it was suggested that Rev suppresses the TAP recruitment to those transcripts. We also found that Rev interacts with the cap-binding complex (CBC) and inhibits the recruitment of Aly/REF, an adaptor for the TAP-dependent export.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：RNA 核外輸送

1. 研究開始当初の背景

RNA の核外輸送機構（輸送経路）は多種類存在し、それぞれの輸送経路は RNA の細胞質での機能に影響を与える。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、RNA は適切な経路を選択しなければならない。しかしながら、そのような選択機構は全く不明である。この機構の研究には、2 種類の輸送経路が誘導されうるヒト免疫不全ウイルス HIV-1 の 4-kb RNA および 9-kb RNA の核外輸送の解析が適している。

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 2-kb RNA、最初のイントロンのみスプライシングされた 4-kb RNA、全くスプライシングされない 9-kb RNA である。2-kb RNA の核外輸送は宿主の mRNA と同じ経路で行われると考えられる。つまり、2-kb RNA 上にはその 5' 末端のキャップ構造に結合するキャップ結合タンパク質複合体 CBC を介して、RNA 結合タンパク質 Aly/REF (以下、Aly) がリクルートされ、次いで Aly が核外輸送因子 TAP をリクルートする (TAP 経路)。一方、4-kb と 9-kb RNA の場合は RRE 配列に Rev が結合する。Rev は TAP とは異なる経路を誘導する因子、CRM1 をリクルートする (CRM1 経路)。ところが、これらの RNA はキャップ構造を持ち、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。

これらの 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分子機構はどのようなものか？ 申請者らは、これらの問題を明らかにすることを大目的として研究を開始した。これまで、それらの RNA を模擬するモデル RNA の核外輸送を、アフリカツメガエル卵母細胞への顕微注入系を用いて解析を行った。その結果、Rev が TAP 経路の利用を抑制することがわかった。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 RNA 輸送複合体を調べた結果、Rev はモデル RNA 上への TAP および Aly のリクルートを阻害することを突き止めた。つまり Rev は 4-kb および 9-kb RNA の輸送複合体を TAP 型から CRM1 型へとリモデリングすることが示唆された。

2. 研究の目的

(1) アフリカツメガエル卵母細胞への顕微注入実験を用いて、HIV-1 の RNA を模擬するモデル RNA の核外輸送を調べた結果、Rev がそれらの RNA 上への TAP のリクルートを阻害することがわかった。本研究課題においては、HIV-1 の 4-kb および 9-kb RNA への TAP のリクルートが Rev によって阻害されるかを、HIV-1 の RNA を発現するヒト培養細胞を用いて検証することを目的とする。

(2) さらに、Rev によるリモデリングの詳細な分子機構を、レコンビナントタンパク質を精製して、生化学的手法を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 申請者らはアフリカツメガエル卵母細胞への顕微注入系を用いた解析から、HIV-1のRNAを模倣するモデルRNAの核外輸送において、RevはCRM1経路を誘導し、TAP経路の利用を抑制することを示す結果を得た。さらにRevはTAPのモデルRNA上へのリクルートを阻害した。つまり、HIV-1感染細胞においてもRevは4-kbおよび9-kb RNA上へのTAPのリクルートを阻害すると考えられた。この現象がウイルスRNAを発現するヒト培養細胞でも観察されるかを以下の方法によって調べた。

ヒト培養細胞としてHEK293T細胞を用いた。HIV-1 RNAの発現はNL4-3株由来のプラスミドを利用した。Revの活性を検証するためには、Rev存在下と非存在下でのRNA輸送複合体を比較する必要がある。そのため、Rev非存在下の条件ではNL4-3株のRevの開始コードに変異を導入したプラスミドpNL4-3ΔRevを用いた(京都大学ウイルス研究所 松岡教授より分与していただいた)。一方、Rev存在下の条件ではpNL4-3ΔRevとともにCMVプロモーターで発現するプラスミドpCMV-Revを用いた。これらのプラスミドをHEK293T細胞にトランスフェクションし、ウイルスRNAとRevを発現させた。TAPの4kb-RNA上へのリクルートを調べるため、細胞から界面活性剤処理によって核画分を調製し、その核画分を用いてTAPに対する抗体で免疫沈降実験を行った。

(2) Revによる4-kbおよび9-kb RNA上へのTAPのリクルートの阻害が、ヒト培養細胞において確認できれば、その阻害の詳細な分

子機構に迫る。TAPとRNAとのアダプターであるAlyのRNA上へのリクルートにはRNAのキャップ構造に結合するCBCとの相互作用が重要であることが知られている。そこで、RevがAlyとCBCとの結合を阻害するかを調べるため、精製したレコンビナントタンパク質同士の結合実験を行った。

4. 研究成果

(1) HEK293T細胞にHIV-1のRNAを発現させると、Revの発現に関わらず、TAPのウイルスRNAとの結合は検出できなかった。したがってこの段階では、期待通りの結果が得られなかった。しかし、TAPを過剰発現させると、4-kbおよび9-kb RNAの量が低下することを見出した。この結果は、TAPがそれらのRNAに結合すると、何らかの機構によってウイルスRNAが分解されると考えられる。次に、TAPとともにRevを過剰発現させると、それらのRNA量が元に戻った。この結果は、HIV-1のRNAを発現する細胞においても、RevはTAPの、4-kbおよび9-kb RNA上へのリクルートを阻害していることを示唆しており、当初の予測を支持する結果が得られた。

(2) 精製したレコンビナントタンパク質を用いたGSTプルダウン実験を行った結果、RevがAlyとCBCとの結合を阻害することを見出した。さらに、RevはCBCと結合することもわかった。したがって、RevがCBCと結合することにより、AlyとCBCとの結合を競合阻害することが考えられた。

以上の結果を現在、論文投稿準備中である。

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3件)

- (1) Sasaki-Haraguchi N, Shimada MK, Taniguchi I, Ohno M, Mayeda A. (2012)
“Mechanistic insights into human pre-mRNA splicing of human ultra-short introns: potential unusual”
Biochem Biophys Res Commun. 423, 289-94.
doi: 10.1016/j.bbrc.

- (2) McCloskey A, Taniguchi I, Shinmyozu K, and Ohno M. (2012)
“HnRNP C tetramer measures RNA length to classify RNA polymerase II transcripts for export”
Science. 335, 1643-1646.
doi: 10.1126/science.1218469.

- (3) Takemura R, Takeiwa T, Taniguchi I, McCloskey A, and Ohno M. (2011)
“Multiple factors in the early splicing complex are involved in the nuclear retention of pre-mRNAs in mammalian cells”
Genes Cells. 16, 1035-1049.
doi:
10.1111/j.1365-2443.2011.01548.x.

[学会発表] (計2件)

- (1) Ichiro Taniguchi, Naoto Mabuchi, Mutsuhito Ohno
“A Novel Activity of HIV-1 Rev Protein to Remodel Export RNPs in Directing

Virus-specific RNA Export”
第34回日本分子生物学会年会
2011年12月16日
横浜

- (2) Ichiro Taniguchi, Naoto Mabuchi, Mutsuhito Ohno
“A Novel Activity of HIV-1 Rev Protein to Remodel Export RNPs in Directing Virus-specific RNA Export”
The 16th Annual Meeting of the RNA Society
2011年6月15日
Kyoto, Japan

[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) 研究分担者はいない。

(3) 連携研究者はいない。