

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460564

研究課題名(和文) ヒト免疫不全ウイルスがウイルスRNAの核外輸送経路を取捨選択する意義

研究課題名(英文) Importance of Specification of RNA export pathway for HIV-1 gene expression

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

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)：HIV-1のRNAは細胞のmRNAの特徴を持つが、その核外輸送ではmRNA輸送因子TAPの利用が抑制され、別の因子CRM1が誘導される。この抑制は、ウイルスタンパク質RevがTAPのRNA上へのリクルートを遮断する活性に依存する。なぜRevはTAP経路の利用を遮断するのだろうか。ウイルスRNAはイントロンを持ったまま核外輸送されるので、RevはTAP経路の遮断によって、スプライシングを回避する可能性を考えた。つまり、TAPはスプライシングを促進する活性を持つという仮説をたてた。この仮説を検証するために、試験管内スプライシング反応を行った結果、TAPがスプライシングを促進することが示唆された。

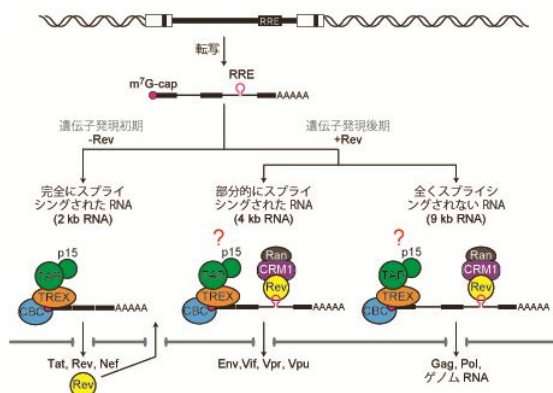
研究成果の概要(英文)：Although intron-containing HIV-1 RNAs have the same features as cellular general mRNAs, HIV-1 blocks the utilization of mRNA export factor, TAP, during nuclear RNA export. The blockage was achieved by the activity of viral Rev protein to inhibit TAP recruitment to viral RNAs. However, why Rev inhibits the recruitment remains a mystery. Since viral RNAs are exported without being spliced, Rev may block TAP recruitment to escape the commitment to RNA splicing. I hypothesized that TAP stimulates RNA splicing. To test the hypothesis, we performed in vitro splicing assay. Splicing products were increased when purified recombinant TAP protein was added. Conversely, RNA splicing was delayed by TAP inhibitor. These results support the hypothesis that TAP stimulates RNA splicing.

研究分野：遺伝子発現制御

キーワード：ヒト免疫不全ウイルス RNA核外輸送 RNAスプライシング

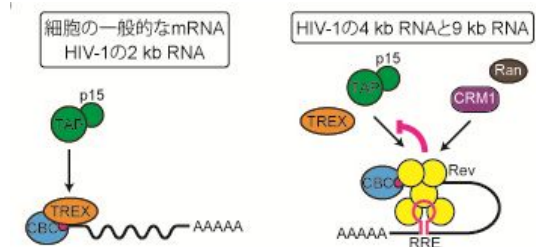
1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞の一般的な mRNA は、輸送因子の TAP を含む複合体が RNA の 5' 末端近傍に形成されて、主にこの複合体によって核外輸送される (TAP 経路)。一方、HIV-1 の RNA 核外輸送では、ウイルス RNA にある RRE と呼ばれるシスエレメントにウイルスタンパク質の Rev が結合する。この Rev を介して別の輸送因子の CRM1 がリクルートされることによって、ウイルス RNA は核外輸送される (CRM1 経路)。しかし、HIV-1 の RNA は細胞の mRNA と同じ特徴があることから、申請者は「HIV-1 の RNA には CRM1 経路だけではなく 5' 末端に TAP 経路の複合体も形成される」という輸送経路の混線問題に気付いた (下図の “?” 部分)。



(2) ウイルス RNA の核外輸送における混線問題を、HIV-1 がどのように解決しているのかを明らかにするため、ウイルス RNA を模擬するモデル RNA を用いて解析した。その結果、Rev は RRE だけではなく 5' 末端にも結合することで、TAP の結合を競合的に阻害していた (右上図)。また、TAP の過剰発現によって強制的にウイルス RNA に TAP 経路を誘導すると、これらの RNA 量が特異的に減少し、ウイルス粒子の産生が低下した。以上の結果から、ウイルス RNA の核外輸送において、Rev は CRM1 経路を誘導するだけではなく TAP 経路の利用を抑制するという新たな活性を持つこ

と、そしてこの活性は HIV-1 の複製にとって重要であることを明らかにした。



2. 研究の目的

(1) ウイルス RNA の核外輸送において TAP 経路の利用を抑制する意義は、TAP 経路によるウイルス RNA 量の減弱を回避することであると考える。それでは、どのような仕組みでウイルス RNA が TAP 経路によって減弱するのだろうか。本研究の目的は、TAP 経路の誘導によってウイルス RNA 量が減弱する仕組みを明らかにすることである。

(2) TAP 経路によって減弱するウイルス RNA と細胞の mRNA との大きな違いはイントロンの有無である。前者はイントロンを持ったまま核外輸送されるのに対して、後者はイントロンを持たないか、イントロンを持っていても核外輸送前に核内で完全にスプライシングされる。したがって、TAP 経路による RNA 量の減弱はスプライシング反応に関連すると考えた。本研究の具体的な目的は、TAP は mRNA を核外輸送するという既知の役割だけではなく、スプライシング反応を促進するという活性も持つかどうかを検証することである。

3. 研究の方法

(1) TAP 過剰発現によって、ウイルス RNA 量が減弱したことから、TAP 過剰発現細胞では

スプライシング活性が増強したことが考えられた。このことを検証するために、TAP 過剰発現細胞を超音波によって破碎したライセートを調製した。このライセートを、試験管内スプライシング反応系に添加した結果、コントロールライセートと比較して、スプライシング反応が亢進した。つまり、TAP 過剰発現細胞ではスプライシング活性が増強したことを示唆している。

(2) 次に、TAP が直接的にスプライシング反応を増強するかを調べるために、TAP の組み換えタンパク質を大腸菌で発現させ、精製した。このタンパク質を試験管内スプライシング反応系に添加すると、期待通りスプライシング反応が亢進した。

(3) さらに、TAP を強制的に mRNA 前駆体に結合させたときに、その RNA のスプライシングが亢進するか調べた。このことを検証するために、以下の知見に基づき基質を作製した。TAP は mRNA 核外輸送の際には、直接 RNA に結合するのではなく、アダプタータンパク質群を介して結合することが知られている。例外として、サルのレトロウイルスの RNA には CTE と呼ばれる RNA エlementがあり、TAP は CTE に直接結合する。この CTE を一般的な mRNA 前駆体に連結させた RNA を作製した (pre-mRNA-CTE)。pre-mRNA-CTE を試験管内スプライシング反応系で保温した結果、TAP の結合しない CTE 変異体のコントロール RNA (pre-mRNA-M36) と比較して、pre-mRNA-CTE ではスプライシング効率が上がった。

(4) 最後に、TAP の RNA 結合を阻害した場合にスプライシング効率が減弱するかを調べた。このために、上述の CTE を試験管内スプライシング反応系に添加した。これによって、TAP の mRNA 前駆体への結合が競合的に阻害される。この結果、期待通り、スプライシング

効率が減弱した。

4. 研究成果

(1) 一連の試験管内スプライシング反応系を用いた解析結果をまとめると以下の通りである。

TAP 過剰発現細胞のライセートではスプライシング活性が強い。

大腸菌で精製した TAP の組み換えタンパク質はスプライシング反応を促進する。

TAP を強制的に RNA に結合させると、スプライシング反応が促進される。

TAP の RNA 結合を阻害すると、スプライシング反応が阻害される。

以上の結果は、TAP にはスプライシング反応を促進する活性があることを示している。

(2) 近年の研究から、真核細胞では遺伝子発現の素過程は密接に連携していることがわかってきた。つまり、転写・スプライシングなどのプロセッシング・RNA 核外輸送・翻訳は相互に影響を及ぼしている。例えば、転写反応がプロセッシングを促進したり、プロセッシングが核外輸送因子の RNA 上へのリクルートを促進したりする。このような連携によって、遺伝子発現が適切に、かつ効率よく行われるようになる。しかし、これまで明らかになった連携のほとんどは、遺伝子発現における上流の過程が下流の過程に影響を及ぼすというものである。本研究で得られた知見は、下流の過程が上流の過程を制御するというものであり、遺伝子発現の新しい枠組みを提示することができる。

(3) 本研究課題の期間内では、試験管内スプライシング反応系を用いた解析に留まった。今後は、細胞において、TAP がスプライシングを促進するかを検証する予定である。具体

的には、TAP を RNA 干渉法や CRISPR-Cas9 によってノックダウン・ノックアウトさせ、スプライシングが阻害されるかを、ゲノムワイドに解析していく。そして、本研究の成果を国際雑誌に論文発表する。

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 4 件)

1: Taniguchi I, Ohno M.
Regulation of proper complex formation for nuclear RNA export.
Seikagaku. 2015 Feb;87(1):68-74. Review. Japanese.

2: Takeiwa T, Taniguchi I, Ohno M.
Exportin-5 mediates nuclear export of SRP RNA in vertebrates.
Genes Cells. 2015 Apr;20(4):281-91.

3: Taniguchi I, McCloskey A, Ohno M.
Analysis of RNA transport in *Xenopus* oocytes and mammalian cells.
Methods Cell Biol. 2014;122:395-413.

4: #Taniguchi I, Mabuchi N, #Ohno M.
(# corresponding authors)
HIV-1 Rev protein specifies the viral RNA export pathway by suppressing TAP/NXF1 recruitment.
Nucleic Acids Res. 2014 Jun;42(10):6645-58.

[学会発表](計 2 件)

1: Taniguchi I, Mabuchi N, Ohno M. (国際学会、招待講演)

HIV-1 Rev protein specifies the viral RNA export pathway by suppressing TAP/NXF1 recruitment.

The 22nd East Asia Joint Symposium on Biomedical Research. 2015 Nov 11-14: Okinawa

2: 谷口一郎, 馬淵直人, 大野睦人.

HIV-1 の Rev タンパク質は TAP/NXF1 のリクルートを抑制することによりウイルス RNA の核外輸送経路を規定する.

第 16 回日本 RNA 学会年会. 2014 Jul 23-25: 愛知県

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[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。