

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 深瀬 美佳

学位論文題名

Effect of Human CRM1 on HIV-1 Production in both Nucleus and Cytoplasm of Rat Cells
(ラット細胞の核分画と細胞質分画での HIV-1 産生におけるヒト CRM1 の効果に関する研究)

【背景と目的】 後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスである HIV (ヒト免疫不全ウイルス) は、複雑なゲノム構造を持つレトロウイルスで、1983 年に発見された HIV-1 と 1986 年に発見された HIV-2 の 2 種類が知られている。HIV-2 は西アフリカなど一部の地域にしか感染が認められないのに対し、HIV-1 は世界中に蔓延し、人類の脅威となっている。しかし、HIV-1 に対するワクチンや根治治療法は見つかっていない。それらの開発における困難の一つは有効性・安全性の評価系としての簡便な感染動物モデルが存在しないことである。従って、HIV-1 感染小動物の樹立はワクチンと抗ウイルス治療の開発に必要である。げっ歯類には HIV-1 複製を抑制する宿主因子が存在しており、ラット細胞でも HIV-1 の増殖は非常に効率が悪い。にもかかわらず、ラットは感染モデル動物に改良できる可能性を持っている。受容体であるヒトの CD4 や CCR5 を発現させると HIV-1 の増殖が、わずかではあるが起こることが報告されているからである。ラット細胞中で HIV-1 を効率よく増殖できるようにするためには、複製抑制の原因になっている宿主因子を同定する必要がある。

以前に、当研究室ではラットの輸送因子 CRM1 (rCRM1) がヒト白血病ウイルス (HTLV-1) の輸送因子 Rex の多量体化を促さないために、ウイルス mRNA を核から細胞質に効率よく輸送しないことを報告した。また最近、当研究室でラットのマクロファージに RNA 輸送因子である hCRM1 (ヒト CRM1) を導入することにより Gag タンパク質の産生量が増加することを報告した。

そこで、HIV-1 の複製における hCRM1 の分子機構をラット細胞で検討し、ラット感染モデル作成へ資する事を目的とした。

【材料と方法】 はじめに、rCRM1 および hCRM1 と pCMV ΔR8.2 (HIV-1 molecular clone) をラット細胞にトランスフェクション法を用いて導入し、培養上清中の Gag タンパク質量を p24 ELISA 法を用いて検討した。また、Real-time PCR 法, in situ hybridization 法, Polyribosome assay, pulse chase 法と western blotting 法を用いて、gag mRNA の輸送効率と gag mRNA の局在、翻訳、Gag タンパク質の安定性、プロセッシングを調べた。また Gag タンパク質産生の増強に重要である hCRM1 の部位を調べるため、N 末端側半分を rCRM1 に代えた rhCRM1 と C 末端側を rCRM1 に代えた hrCRM1 を作製し検討した。

【結果】 はじめに、rCRM1 および hCRM1 をラット細胞にトランスフェクション法を用いて導入し、Gag タンパク質の産生を ELISA 法を用いて検討した。その結果、rCRM1 の導入では変化が見られなかったのに対し、hCRM1 導入により Gag タンパク質の産生亢進が確認された。次に、定量 PCR、および in situ hybridization assay で gag mRNA の局在を検討した。定量 PCR 法において hCRM1 の

導入によって gag mRNA の核外輸送が促進されたが、tat, β -gal mRNA の核外輸送効率は変わらなかった。このことから hCRM1 は特異的に gag mRNA の核外輸送を増強していることが分かった。またこの核外輸送効率における増強は rCRM1 を導入したときには見られなかった。In situ hybridization 法において、細胞内での gag mRNA の局在を共焦点顕微鏡を用いて観察した。ラット細胞内において hCRM1 と rCRM1 のどちらを導入したときにおいても gag mRNA のシグナルが細胞全体に見られる細胞と核内にとどまっている細胞の2種類見られた。またシグナルが細胞内全体に見られるときも、核内にとどまっているときにおいても細胞質、核内での分布の仕方に違いは見られなかった。しかし、hCRM1 を導入したときに gag mRNA が細胞質まで運ばれている細胞の数が増加したのに対して、rCRM1 を導入したときにはこのような増加は少なく、gag mRNA が核内にとどまっている細胞が多く見られた。これらのことから hCRM1 はラット細胞において、特異的に gag mRNA の核外輸送を増強することが分かった。しかし、タンパクの増強が約 20 倍であるのに対して、mRNA の核外輸送効率の増強が 2-3 倍程度しかみられないことから、hCRM1 が mRNA の核外輸送以外にも影響を与えていることが示唆された。そこで pulse-chase assay 法、polyribosome assay を用いて Gag タンパク質の安定性と翻訳効率への hCRM1 の効果を検討した。その結果、hCRM1 は Gag タンパク質の安定性、翻訳開始効率に関与していないことが分かった。最後に前駆体 Gag タンパク質 (p55) のプロセシングとウイルス粒子の放出への効果をウエスタンブロッティング法を用いて検討した。p55 がプロセシングを受けた結果生じる p24 Gag は hCRM1 を導入したときに、細胞内と細胞外粒子分画の両方で 10 倍以上増加した。しかし rCRM1 を導入したときには増加は見られなかった。これに対して p55 Gag は hCRM1 を導入したときに 2-3 倍程度の増加しか見られなかった。これは定量 PCR 法で得られた gag mRNA の増加量に一致していた。このことから hCRM1 は Gag タンパク質のプロセシングに関与していることが示唆された。また、さらに hCRM1 の budding への影響を調べるために、プロセシングマイナスの reporter である pNLmyr(+)/pro(-)Flag を用いて調べた。細胞外粒子分画の p55Gag は hCRM1 を導入したときに約 20 倍の増加が見られたのに対して、細胞内の p55Gag は約 2-3 倍の増加しかみられなかった。このことから hCRM1 は単に Gag のプロセシングではなくウイルス粒子形成過程全体の効率化に影響を与えることが示唆された。また、Gag タンパク質産生の増強に重要である hCRM1 の部位を調べるため、N 末端側半分を rCRM1 に代えた rhCRM1 と C 末端側を rCRM1 に代えた hrCRM1 を作製し検討した。rhCRM1 を導入したものは増強がほとんど見られなかったのに対して、hrCRM1 を導入したものでは増強が見られた。このことから hCRM1 の N 末端側が Gag タンパク質の生産の増強に重要であることが分かった。

【考察】 CRM1 は、従来から報告されている mRNA 輸送因子としての機能だけではなく、ウイルス粒子形成の効率化にも関係していることが示唆された。このことは mRNA の輸送様式がタンパク質のその後の運命に影響する事を示唆している。

【結論】 ラット細胞において hCRM1 を導入することにより HIV-1 複製能の増加が確認された。その要因として hCRM1 が gag mRNA の輸送だけではなく、ウイルス粒子形成の効率化にも影響を及ぼしていることが示唆された。私の得た結果は HIV-1 感染小動物モデルの構築の一助となる。