

# 論文内容の要旨

## 論文題目 HIV-1 由来新規 antisense RNA の探索と機能解析

氏名 小林(石原) 美栄

### [背景・目的]

後天性免疫不全症候群 (AIDS)の原因ウイルスである **Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)** は (+)鎖 ssRNA をゲノムに持つレトロウイルスであり、自身の逆転写酵素を用いてゲノム RNA を DNA に逆転写し、宿主のゲノム内に組み込む (プロウイルス)。このプロウイルスから宿主の転写・翻訳機構を利用して子孫ウイルスが産生される。今日まで HIV-1 プロウイルスゲノムのセンス鎖にコードされる 9 つの遺伝子についての研究が進んでいるが、HIV-1 の複雑な生活環に対し十分な理解が得られていないのが現状である。

*Herpesviridae* などの dsDNA をゲノムとするウイルスはアンチセンス鎖側にも遺伝子を有し、限られたゲノムサイズに多くの遺伝子を保持している。HIV-1 は 9.7kb というコンパクトなゲノムサイズのプロウイルス DNA を介した特徴的な増殖形態を持つことから、DNA ウイルスと同様な方法でより多くの遺伝子を保持している可能性がある。また、近年哺乳類細胞の転写産物の約 70%においてアンチセンス鎖からの転写も起こっていることが明らかとなり、哺乳類 natural antisense RNA のセンス鎖遺伝子発現制御における重要性が徐々に究明されつつある。HIV-1 は宿主の転写・翻訳機構を利用して複製を行うことから、宿主遺伝子と同様に sense RNA だけでなく antisense RNA (asRNA)が転写されている可能性が高い。

実際、レトロウイルスに属する Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) は *HTLV-1 Basic leucine Zipper factor (HBZ)* をアンチセンス鎖に持ち、HTLV-1 のセンス鎖発現調節や感染細胞の癌化に寄与していることが知られている。HIV-1 に関しては、プロウイルスから asRNA が転写されていることを示唆する報告が多くなされているが、いまだその構造及び機能について十分な理解が得られていない。最初の研究報告は 1988 年 Miller によるもので、ウイルス株間で高度に保存されている ASP (Antisense Protein) が HIV-1 のアンチセンス鎖にコードしうることが予測された。その後、Michael らにより ASP mRNA が HIV-1 感染 A3.01 細胞から同定された(図 1)。以降も HIV-1 からの asRNA の転写を示唆するような論文や ASP の機能に関する報告が単発的に報告されたが、結論は各々異なっている。従って HIV-1 由来 asRNA の存在評価及び構造決定、機能解析を総括的に検討する必要がある。

哺乳類やウイルスなど、さまざまな生物種における asRNA の同定と機能解析により、さまざまな生命現象が明らかとなってきた。従って HIV-1 プロウイルスにおける asRNA の存在及びその機

能的意義を追求することが複雑な HIV-1 生活環の理解する上で急務であると考えられる。本研究において私は改めて HIV-1 由来 asRNA を探索し、感染細胞での HIV-1 由来 asRNA の同定と機能解析を行うことを目的とした。

## [方法と結果]

### 1. HIV-1 プロウイルスから転写されうる候補 asRNA の網羅的予測

感染細胞で低コピー数と考えられる asRNA を同定するにあたり、sense RNA の非特異的な検出が懸念される。そこで HIV-1 由来 asRNA を特異的に検出するため、HIV-1 プロウイルス DNA のアンチセンス鎖を発現するベクターを構築し、HEK293T 細胞に強制発現させた(アンチセンス鎖強制発現系)。この total RNA を用いて Northern blot を行い、HIV-1 由来 asRNA を網羅的に解析した結果、全長 RNA のほか、5.5kb、4kb、3kb、2kb の候補 asRNA を得ることに成功した。次に RT-PCR 法及び 3'RACE 法を用いてこれらの配列を解析した結果、スプライシングされた 3 種の asRNA と HIV-1 ゲノム内で転写終結する 4 種の asRNA が同定された。このうち特に、3kb の env 遺伝子領域で転写終結している asRNA が Northern blot 及び 3' RACE 法にて多く検出された。この実験により、複数の asRNA が HIV-1 プロウイルスから転写されうるということが分かった。

### 2. 感染細胞で転写されている HIV-1 由来 asRNA の確認

RT-PCR 法によって、sense RNA と重複する遺伝子領域を持った asRNA を増幅する際、多量に存在する sense RNA による非特異的増幅が問題となる。1. で挙げられた候補 asRNA が感染細胞でも転写されているかを評価するため、私は strand-specific RT-PCR 法を確立し、HIV-1<sub>NL4-3</sub> 感染 MAGIC-5A 細胞 RNA から asRNA を特異的に増幅してくることに成功した。配列特異的な RT primer の 5'末端に tag 配列を付けた Tag-RT primer を用いて cDNA を作製し、tag に対する primer とターゲット配列に相補的な primer で PCR 反応を行い、sense RNA 由来 cDNA を排他的に増幅する方法である。この結果、HIV-1 由来 asRNA は gag から nef 遺伝子領域 (657bp~9094bp) に渡って検出された。また、1. で予測されたようなスプライシングされた asRNA は検出されなかった。

### 3. HIV-1 由来新規 asRNA, ASP-L の同定

候補 HIV-1 asRNA の配列情報をもとに感染細胞における HIV-1 由来 asRNA の転写終結点を決定するため、3' RACE 法を行った。その結果、1. で高発現に予測された、env 遺伝子領域のアンチセンス鎖で転写終結している asRNA を同定することに成功した。また、同様に 5' RACE 法により、

この asRNA は 3' LTR の U3 領域に転写開始点があることが分かった。全長の配列決定の結果、この asRNA は図 1 のような構造をしており、ASP ORF を含んでいた。従って、この asRNA は ASP mRNA の新規バリエーションフォームと考えられ、**ASP-L (ASP mRNA-Lomg variant)**と名付けた。

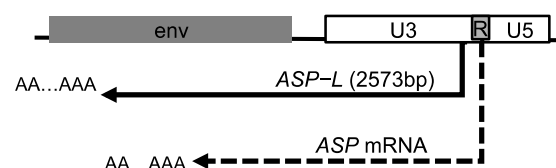


図1. HIV-1由来新規asRNA, ASP-Lの構造と報告済みのASP mRNA.

### 4. ASP-L プロモーター活性の探索

ASP-L の転写開始点上流のプロウイルス DNA に ASP-L の発現に影響する配列があるかを検討

するために、*ASP-L* 遺伝子上流の配列を pGL4.10 に上流配列を挿入したレポーターを作製し、Molt-4 細胞に発現させ luciferase assay を行った。この結果、アンチセンス方向のプロモーター活性はセンス方向のプロモーター活性の 1/3 程度であった。また、センス鎖 HIV-1 転写活性化因子である Tat によるアンチセンス方向の転写活性化は認められなかった。一方、宿主由来 HIV-1 活性化因子である TNF- $\alpha$  による濃度依存的な活性化が認められた。変異体 LTR を用いたレポーターアッセイの結果、センス鎖方向の転写活性に寄与している NF- $\kappa$ B 結合領域が、アンチセンス鎖方向の転写活性にも関与していることが示された。これらの結果より、HIV-1 LTR にアンチセンス鎖方向のプロモーター活性があり、NF- $\kappa$ B の活性が *ASP-L* の転写活性に重要なことが分かった。

## 5. 複数の感染細胞を用いた *ASP-L* の発現評価

*ASP-L* の発現動態を調べるために、複数の HIV-1 感染細胞における *ASP-L* の発現を antisense-specific RT-PCR を用いて調べた結果、新規感染 Molt-4 細胞、HIV-1 慢性感染細胞である ACH2 細胞、OM10.1 細胞、さらには HIV-1 感染 PBMC で *ASP-L* が転写されていることが分かった。 *ASP-L* とそれに相補的な RNA を strand-specific qRT-PCR 法を用いて定量したところ、*ASP-L* は相補鎖 RNA の 1/100~1/2500 の発現量であることが分かった。

## 6. *ASP-L* の細胞内局在

asRNA の機能の理解する上で、asRNA の細胞内局在が重要である。複数の感染細胞を核画分及び細胞質画分に分け、それぞれ RNA を抽出し、strand-specific qRT-PCR 法により *ASP-L* の存在比を計測した。この結果、HIV-1 新規感染細胞や慢性感染細胞で *ASP-L* の大部分が核に分布していることが明らかとなった。

## 7. *ASP-L* の HIV-1 複製に対する効果の検討

*ASP-L* の機能解析として、*ASP-L* の HIV-1 増殖に対する効果を調べた。*ASP-L* を一過性に過剰発現させた MAGIC-5A 細胞に対し HIV-1 を感染させると、ウイルス RNA 量及びプロウイルス量が減少していた。さらに培養上清中のウイルス粒子産生量を RT-assay にて測定したところ、ウイルス粒子産生に対して *ASP-L* は抑制的に機能することが分かった。さらに *ASP-L* を恒常的に発現する Molt-4 細胞を樹立し、同様に HIV-1 に対する効果を検討した結果、*ASP-L* 過剰発現細胞では 1 カ月以上にわたってウイルス粒子産生が阻止され、ウイルス RNA 量及びプロウイルス量も減少していることが確認された。

内在性 *ASP-L* の HIV-1 複製に対する影響を調べるため、*ASP-L* に対する shRNA を 2 種作製し、Molt-4 細胞に恒常発現させた。これらに HIV-1 を感染させたところ、コントロールに比べウイルス RNA レベルおよびウイルス粒子産生量が亢進した。これらの結果、*ASP-L* は HIV-1 複製を抑制する機能があることが示唆された。

## [考察]

博士課程の研究において私は HIV-1 感染 MAGIC-5A 細胞から HIV-1 由来 asRNA である *ASP-L* を同定することに成功した。*ASP-L* は 3' LTR の U3 領域から *env* 遺伝子領域のアンチセンス鎖に渡るスプライスサイトを持たない 2.6kb の asRNA であり、HIV-1 急性感染細胞や慢性感染細胞でも発現していることが分かった。機能解析の結果、*ASP-L* は核に局在し、HIV-1 の複製を抑制することが示唆された。

*ASP-L* は以前報告された *ASP* mRNA と配列構造が類似していることから、*ASP* mRNA の新規バリエーションとして考えられる。これまでに *ASP* mRNA の配列構造に関して、Michael らおよび Landry らによって報告されているが、両者とも感染細胞における発現評価は曖昧なものである。本研究における RACE 法に結果、両者が報告した *ASP* mRNA の発現がアンチセンス強制発現系で認められたが、感染細胞で認めることができなかったため、これらの配列がアーチファクトであるか、感染細胞で低発現している asRNA であると考えられた。一方、*ASP-L* は HIV-1 NL4-3 株および IIB 株感染細胞から RACE 法を用いて同定され、感染細胞から優位に発現している HIV-1 由来 asRNA であると考えられた。

レポーターアッセイの実験では、3' LTR にアンチセンス鎖方向のプロモーター活性があることが示された。またこのプロモーター活性は Tat による影響を受けないことが示されたが、これは Tat の作用点である TAR 配列が HIV-1 asRNA にはないことによると考えられた。一方、LTR 上にある NF- $\kappa$ B 結合配列がセンス鎖方向・アンチセンス鎖方向の転写活性に重要であることが明らかとなり、LTR のプロモーター活性は両方向で一部共有されていることが推測できた。

*ASP-L* の細胞内局在を調べた結果、*ASP-L* は核内 RNA であることが示された。*ASP-L* には 189a.a. の *ASP* ORF が予測されるが、本研究の結果から、*ASP-L* がタンパク質に翻訳される効率はきわめて低いと考えられる。今日までの報告では *ASP* タンパク質に対する抗体が HIV-1 感染者の血清に存在すること、感染細胞を抗 *ASP* 抗体で染色すると細胞膜上に局在していることが報告されているが、*ASP* タンパク質としての機能は分かっていない。*ASP-L* が実際に感染細胞でタンパク質に翻訳されているのか、そしてどのような機能を担っているのかは今後慎重に検討しなくてはならない。

*ASP-L* の過剰発現およびノックダウン実験にて HIV-1 複製に対する影響を調べた結果、*ASP-L* は機能性 RNA として HIV-1 複製を自己抑制する因子であることが示唆された。近年、HIV-1 asRNA 由来の small RNA が同定されており、それらが HIV-1 複製に抑制的に働くことが報告されている。報告された small RNA の配列が *ASP-L* と重複することから、*ASP-L* が small RNA にプロセッシングされ、ウイルス RNA の発現を干渉しているのかもしれない。*ASP-L* の機能詳細を追求することにより HIV-1 の複雑な生活環のさらなる理解に貢献できると期待される。