

氏 名 (本 籍)	藤 井 亮 爾 (岡 山 県)
学 位 の 種 類	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 2553 号
学位授与年月日	平成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	農学研究科
学 位 論 文 題 目	Roles of RNA Helicase A in Transcriptional Regulation of HIV-1 (ヒト免疫不全ウイルス HIV-1 の転写における RNA ヘリケース A の役割)
主 査	筑波大学教授 農学博士 馬 場 忠
副 査	筑波大学教授 農学博士 祥 雲 弘 文
副 査	筑波大学教授 農学博士 深 水 昭 吉
副 査	筑波大学助教授 医学博士 中 山 和 久

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

RNA helicase A (RHA) は、エネルギー依存的に二本鎖 RNA および DNA を一本鎖にときほぐす。また転写制御因子 cAMP responsible element binding protein (CREB) の転写において、転写統合装置である CREB binding protein (CBP) と RNA polymerase II を仲介する因子として転写を活性化することが明らかにされている。

二本鎖 RNA ゲノムを有する HIV (ヒト免疫不全ウイルス) は宿主細胞に感染後、自身の RNA ゲノムを DNA ゲノムに逆転写して宿主ゲノム中に組み込む。HIV の転写は全て、組み込まれた HIV DNA ゲノムの 5' 末端側の long terminal repeat (LTR) に存在するプロモーターから行われ、スプライシングの違いにより 3 種類のウイルス mRNA が転写される。まず最初に 2 ケ所でスプライシングされる最も短いウイルス mRNA から、HIV 自身の転写を強力に活性化する trans-activator protein (Tat) などが翻訳される。この Tat は、3 種類全てのウイルス mRNA の 5' 末端側に存在する trans-acting responsive element (TAR) と呼ばれる RNA 構造に結合し、転写を強力に活性化する。

TAR RNA 構造に結合する宿主因子として TAR RNA binding protein (TRBP) や double stranded RNA-activated protein kinase (PKR) といったタンパク性因子が報告されている。両者は互いに良く保存された double-stranded RNA binding domain (dsRBD) を複数有し、このモチーフを介して TAR RNA に結合する。本研究では、RHA も同様に保存された dsRBD を有することから、RHA が TAR RNA に結合し、HIV の遺伝子発現を活性化する可能性を検証した。

まず、<sup>32</sup>P でラベルした TAR RNA と断片化した RHA との結合実験により、RHA は dsRBD2 を介して TAR RNA と結合し、特に 236 番目のリジン残基はその結合に必須であることを明らかにした。また、細胞内においても RHA と TAR RNA を含む mRNA は同一複合体中に存在し、RHA の K236E 変異はこの複合体形成を阻害することを明らかにした。

RHA は HIV の LTR プロモーターからの遺伝子発現を活性化し、結果的にウイルス生産量を増加させた。RHA の K236E 変異はこの活性を半減させた。さらに、HIV LTR プロモーター中の NF-κB 結合部位に変異を導入したレポーター遺伝子を用いて、レポーターアッセイを行ったところ、NF-κB 非依存的にも RHA の活性化効果は認められた。一方 K236E 変異体では、野生型の HIV LTR レポーターでの結果と異なり、活性化効果が全く認められなくなった。つまり、RHA と TAR RNA の結合は NF-κB 非依存的な RHA の作用に必須であると考えられる。逆に野生型 HIV LTR に対する K236E 変異体の活性化効果は野生型に比べ半減とはいえ存在するので、NF-κB 依存的な RHA の作用も存

在する。

以上の結果から、RHAはTAR RNAに結合し、HIV-1LTRからの転写を活性化することが示された。また、TAR RNA結合能を欠損させたK236E変異体の作製に成功し、この変異体を用いたレポーターアッセイの結果から、HIV LTRに対するRHAの作用には、少なくとも2つの作用が存在することが示された。一つは、RHAのTAR RNAへの結合によるものと考えられる。もう一つはNF- $\kappa$ B依存的な作用である。HIV-1LTR上でNF- $\kappa$ BはCBPと協調的に作用することがすでに報告されており、RHAはCBPと結合しRNA polymerase IIをリクルートすることがCREBの転写系で報告されている。これらのことから、HIV-1LTR上においてNF- $\kappa$ B-CBP-RHAという転写開始複合体が存在する可能性も考えられた。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

20世紀後半、人類が直面している最も深刻な感染症であるエイズの研究は爆発的に進展し、HIVの複製に関与する種々の宿主因子が同定されている。今回、著者は新たな宿主因子としてRHAが、HIVの遺伝子発現を強力に活性化することを明らかにした。

RHAは、“ATPase・ヘリケース活性”、“RNA polymerase II結合能”など複数の機能を有しており、転写統合装置であるCBPの機能発現に必須であることが、すでに報告されている (*Cell* 1997, *Nature Genet.* 1998)。また核と細胞質を行き来するシャトリング因子としても知られ (*Science* 1997)、スプライシングに関与する可能性も報告されている (*PNAS* 1998)。このようにRHAは、遺伝子発現の多段階に関わると考えられ、近年、国際的にも非常に注目されている分子である。RHAの分子機作を明らかにすることは、真核生物の遺伝子発現機構を理解する上で極めて重要であると考えられる。また非常によく研究の進んでいるHIVを対象とすることは、RHAの速やかな分子機作解明を可能にするだけでなく、応用的にも抗エイズ薬開発に寄与し得ると考えられる。

本研究の着想は著者自身の研究結果から生じた疑問に基づいており、極めて独創的である。また、著者が作製した種々のRHA変異体を用いてRHAによるHIV遺伝子発現の活性化メカニズムをよく解析している。この活性化がRHAとTAR RNAの結合によるものであると証明するには、試験管内転写実験などによるさらなる解析が必要であるが、現段階で第三者に信頼させるにたる結果を示してある。また、著者はNF- $\kappa$ B依存的なRHAの作用も予想しているが、最近、NF- $\kappa$ BとRHAが直接結合し、転写を活性化するとの報告 (分子生物学会 2000) もあり、HIVの転写においても十分に考えられるメカニズムと思われる。

よって、著者は博士 (学術) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。