

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 尾崎 さおり

子宮頸癌発症の最大リスクファクターは、ヒトパピローマウイルス(以下、HPV)の潜伏持続感染である。HPV16のキャプシド蛋白質であるL1蛋白質が最終分化段階にある表皮細胞でしか発現しない仕組みを明らかにするために、この発現抑制機構について検討した。

HPV16のL1遺伝子を、強い転写活性を持つサイトメガロウイルス(CMV)初期プロモーターの下流につないでさまざまな細胞に導入しても、L1蛋白質を検出できなかった。ORFの塩基配列そのものが抑制的な仕組みを持つと推定し、L1遺伝子の全長に渡ってアミノ酸を変えずに塩基配列のみを変えるコドン変異体を作製した。この変異遺伝子からはL1mRNA及びL1蛋白質の発現が検出できた。そこで、野生型のL1遺伝子とコドン変異L1遺伝子のキメラを作製し、発現抑制機能がL1遺伝子のどの領域によって担われているかを調べた。様々なキメラ遺伝子からのL1蛋白質の発現は、基本的にL1mRNA量と平行しており、発現抑制はmRNA量の低下が直接の原因であることがわかった。

全長1518塩基長のL1遺伝子のうち、5'端から515塩基までを野生型に置換すると、変異遺伝子からのL1蛋白質の発現が検出できなくなることが示され、5'端から515塩基までの領域(Suppressing Region:SR)が抑制を担うことがわかった。

SRの抑制機能はL1遺伝子に限って示されるのか、それとも他の遺伝子のORFに挿入しても発現抑制効果があるか、ルシフェラーゼ遺伝子について調べたところ、転写されたRNA量より、SRが転写開始部位の5'端からおおよそ1000塩基長以内に存在する場合にRNA量が著しく低下することがわかった。ベータガラクトシダーゼ遺伝子でも同様の成績が得られた。即ち、mRNAのCAPに近い領域にSR由来配列が存在すると、L1遺伝子に限らずmRNA量の低下が起こることがわかった。

発現プラスミドを細胞に導入後、培養液にアクチノマイシンDを添加して新たなmRNA合成を停止させた。その後、経時的に細胞からRNAを抽出し、その残存量を経時的に測定した。8時間までのRNAの残存曲線は、SR由来配列の有無に影響されず、一度、検出可能となったRNAについては分解速度に差はないことがわかった。

一方、*in vitro*で転写反応を行うと、SRをもつDNAもSRを持たない場合と同様にRNAが合成された。合成されたRNAにCAPとpolyAを付加してからHeLa

細胞に導入すると、細胞内で発現するルシフェラーゼ活性は SR 由来配列の有無に影響されなかった。従って、SR 由来配列を持つ mRNA は細胞質で安定で、正常に翻訳されることがわかった。以上より、L1 の発現抑制は細胞質ではなく、核内で起こることが強く示唆された。

ルシフェラーゼ ORF の 5' 側に SR を配置した発現プラスミドを細胞に導入しても、そこから転写された mRNA は検出されない。しかし SR の両側をスプライシングのドナー及びアクセプター配列で挟んでおくと、SR が除かれた mRNA が検出される。この成績は、SR を付加した場合も転写は起こるが、RNA が速やかに分解されることを示唆している。分解は RNA 上の SR 配列に依存しており、SR がスプライシングで除かれると RNA の分解が止まるらしい。

SR ないし mSR を 5' 端に持つルシフェラーゼ遺伝子を細胞に導入し、G418 や CH で NMD を阻害したが、やはり 5' SR 遺伝子から転写された mRNA レベルが上がることはなかった。以上の結果より、SR の機能としては、

- 1) SR は転写を阻害することはない。
- 2) 5' 端に近い領域に SR 由来配列を持つ RNA は核内で速やかに分解される。
- 3) SR 由来配列を持っていても、成熟した mRNA であれば安定で、正常に翻訳される。
- 4) SR を持つ遺伝子から転写された RNA に CAP や polyA が付加され、スプライシングが起こって mRNA として成熟するまでの短い間に、分解が進むらしい。分解は NMD とは異なる機構である。

以上、本論文は、HPV16 L1 蛋白質の発現抑制機構の一つとして SR の存在を明らかにし、その機能を解析した。

L1 蛋白質はウイルス粒子中にもっとも多く存在する蛋白質であり、免疫系の格好の標的となりうる。本研究によって明らかにされた SR の機能を阻害することによって、L1 蛋白質の合成を人為的に誘導し、免疫系による感染細胞の除去やウイルス粒子形成の阻害が可能になると期待され、学位の授与に値するものと考えられる。