



Cell type diversity in hepatitis B virus RNA splicing and its regulation

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2019-05-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 伊藤, 徳臣 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003538

博士（医学）伊藤 徳臣

論文題目

Cell type diversity in hepatitis B virus RNA splicing and its regulation

(B型肝炎ウイルス RNA スプライシングの細胞型多様性とその制御)

論文の内容の要旨

[はじめに]

B型肝炎ウイルス (HBV) はヒト肝臓に特異的に感染し、肝炎、肝細胞がんを引き起こす。ユニークな複製機構を有し、DNA ウイルスでありながら複製中間体 pregenomic (pg)RNA からの逆転写を経てゲノム DNA が複製される。pgRNA の一部はスプライシングを受けることが知られているが、その生物学的意義や制御機構はほとんど明らかではない。本研究では、pgRNA の細胞依存性、スプライシング制御機構の解明を目的とした。

[材料および方法]

ヒト肝細胞がん株 5 種類、マウス肝細胞がん株 1 種類、非肝細胞がん株 7 種類の培養細胞を用いた。HBV ゲノム 1.24 copy を含むプラスミド pUC-HBV を基にしてイントロン領域の部分欠損変異体を作製した。また simian virus 40 (SV40) 後期遺伝子発現プラスミド pCAG-SV40 及び pUC-HBV のイントロンまたエクソン領域を相互に組み換えたキメラ遺伝子を作製した。作製した各種プラスミドを培養細胞に導入し、total RNA を回収した後、ノザンブロッティング、逆転写 (RT)-PCR および定量(q)RT-PCR で HBV pgRNA のスプライシングを解析した。タンパク質発現はウェスタンブロッティングで解析した。遺伝子導入実験は組換え DNA 実験安全委員会の承認のもと行われた。

[結果]

13 種類の細胞株で HBV pgRNA の発現とスプライシングを比較したところ、HepG2、HuH-7 などヒト肝細胞がん株では他のヒト臓器由来細胞株またマウス肝がん細胞株に比べ有意にスプライシング効率が高いことが示された。

サル的小型 DNA ウイルスである SV40 の後期遺伝子 RNA は細胞種に依らず効率良くスプライスされることから、HBV スプライシングの細胞依存性に関与する遺伝子領域 (シスエレメント) を探索するため、HBV と SV40 のイントロンまたエクソン領域を置換したキメラ遺伝子を作製し各種細胞株で発現させ RNA プロセッシングを解析した。HBV イントロン領域を SV40 配列に置換したところ、そのキメラ遺伝子転写産物は HBV ゲノム野生型に比べスプライシング効率が高く、特に HepG2 細胞ではその転写産物は完全にスプライスされた。一方、SV40 後期遺伝子のイントロン領域を HBV 配列に置換すると、どの細胞種においても野生型 SV40 後期遺伝子と比べてスプライシング効率は低かった。これらの結果から、HBV には細胞種非依存的な intronic splicing silencer (ISS) と肝細胞選択的

exonic splicing enhancer (ESE)が存在する可能性が示唆された。

HBV ISS についてより詳細に解析するために、種々のイントロン領域部分欠損変異体を作製し、そのスプライシング効率を評価したところ、イントロン領域の中央部分約 400 塩基を欠損させると発現 RNA はほとんどスプライスされることを見出した。この領域には4か所のステムループ構造が存在することが RNA 二次構造予測より示された。これらの二次構造がスプライシングサイレンサー機能に関与する可能性を考え、各二次構造を変化させる種々の置換変異体を作製してスプライシングへの影響を評価したところ、nucleotide (nt) 2877-2926 領域変異体は野生型に比べ顕著に高いスプライシング効率を示した。

一方、HBV 遺伝型による pgRNA スプライシング効率の違いを評価したところ、HBV 遺伝子型 C に比べ HBV 遺伝型 A ではスプライシング効率は有意に高かった。遺伝子型 C と A の HBV ゲノムを部分的に置換した変異体の解析から、上記の ISS 領域を含む 795 塩基のイントロン領域が HBV 遺伝子型によるスプライシング効率の違いに関与する可能性が示唆された。

[考察]

本研究から、HBV pgRNA はヒト肝実質細胞由来細胞株で効率良くスプライスされることが初めて示された。HBV/SV40 キメラ遺伝子を用いた解析から、肝特異性に ESE が働きうることが示されており、肝臓特異的に発現するスプライシング制御因子と ESE との複合体形成が HBV ライフサイクルの肝指向性に関与する可能性が考えられた。また、キメラ遺伝子解析からは、スプライシング制御エレメントとして ISS の存在も示された。HBV ISS は過去の研究においても報告されているが、今回、部分欠損変異体や置換変異体による解析から、既報領域の上流に、より強いサイレンシング活性を示す ISS 領域が同定された。ISS 内のステムループ構造がスプライシング抑制に重要であることを実験的に示し、この構造は各 HBV 株でよく保存されていることをデータベース解析で確認した。このサイレンサー機能を阻害できれば、pgRNA の大部分がスプライスされ、複製に必要な複製中間体の消失に繋がることから、HBV ISS は B 型肝炎治療薬の新規標的となる可能性が考えられる。更に、二次構造周辺領域は HBV 遺伝子型間のスプライシング比率の違いに寄与し得ることから、この領域の配列多様性が HBV 遺伝子型による増殖性、病態等の違いに関与する可能性が考えられた。

[結論]

HBV pgRNA のスプライシングには細胞依存性が存在し、ヒト肝細胞がん株では他に比べスプライシング効率が高いことを見出した。スプライシング制御機構の更なる解析は、長年の疑問である「なぜ HBV はヒト肝臓で特異的に増殖するか」の解明に繋がるものと期待される。pgRNA スプライシング制御に関わるシスエレメントとして肝細胞選択的 ESE と細胞非依存的な ISS の存在を示した。