

アデノウイルス感染後期に合成される VA RNA の抗インターフェロン作用機構

森 健一

インターフェロン- α (IFN- α) 処理した KB 細胞内に chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 遺伝子を導入して発現させる transient expression assay を用いて, ヒト型アデノウイルス 2 型のコードする VA RNA の機能を検討した. CAT 活性は VA RNA 遺伝子及び CAT 遺伝子を組み込んだそれぞれのクローンを共移入した細胞の抽出液を用いて測定した. 正常細胞では VAI RNA が対照 (VA RNA なし) と比べ CAT 活性を 67% 促進し, IFN- α 処理細胞では対照より約 2 倍の促進効果を示すことがわかった. VAII RNA は正常細胞で CAT 活性を 31% 促進したが, IFN- α 処理細胞では有意な促進効果がみられなかった. IFN- α 処理により CAT の mRNA 量は約 1/30 に低下するが, VAI RNA と VAII RNA の間には CAT-mRNA 量の差は認められない. したがって, VA RNA の効果は翻訳レベルのものであることが明らかとなった. VAI RNA は CAT 遺伝子発現を翻訳レベルで促進し抗 IFN- α 作用を示す. VAII RNA もまた翻訳促進効果を示すが, 転写発現レベルが VAI RNA の 1/30~1/50 と非常に低いため, 明瞭な抗 IFN- α 作用は認められなかった. 今後, 更に検討する必要がある.

(平成 3 年 2 月 22 日採用)

Mechanism of Anti-Interferon- α Action of VA RNA Synthesized Late in Adenovirus Infection

Kenichi Mori

The effects of the VAI RNA and VAII RNA of adenovirus type 2 on the expression of the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene was studied in interferon- α (IFN- α) treated human KB cells by a transient expression assay. CAT activity was determined in extracts prepared from cells co-transfected with respective clones of VAI or VAII RNA and the CAT gene.

We showed that VAI RNA increased CAT activity 67% in the control; i. e. normal cells without transfection of VAI RNA and approximately two-fold in IFN- α treated cells. VAII RNA increased CAT activity by 31% in normal cells, but no significant increase was observed in IFN- α treated cells. The level of CAT-mRNA was decreased by IFN- α treatment, but it was not affected by either VAI RNA or by VAII RNA, indicating that VA RNA has its effect at the translational level. It was concluded that VAI RNA exhibits anti-IFN- α action through translational stimulation of CAT gene expression. VAII RNA also mediates translational stimulation, but the level of accumulation is too low; that is, 1/30-1/50 of that of VAI

RNA, to demonstrate anti-IFN- α action. This awaits future investigation. (Accepted on February 22, 1991) *Kawasaki Igakkaishi* 17(1): 65-76, 1991

Key Words ① Interferon- α ② VA RNA

はじめに

ウイルスが哺乳動物細胞に感染すると、インターフェロン(interferon; IFN)が産生されて、ウイルスの増殖を阻害する。¹⁾ IFN はウイルス感染により生成されるdouble stranded-RNA(ds-RNA)が引き金となって細胞内で誘導合成されるサイトカインであり、分泌により cytotoxic な効果を自己及び周囲の細胞に及ぼす。IFN が細胞膜のレセプターを介して作用すると、68 kDa の ds-RNA 依存性 protein kinase (ds-RNA activated inhibitor (DAI)あるいは eukaryotic initiation factor-2 (eIF-2) kinase^{2),3)}ともいわれる)を産生する。eIF-2 kinase は ds-RNA の存在下に自己リン酸化して活性型 eIF-2 kinase となり、次のような作用を行う。⁴⁾ (1)活性型 eIF-2 の α サブユニット (37 kDa) をリン酸化して不活性型とし、翻訳開始を阻害する。(2)2', 5'-oligoadenylate synthetase がリン酸化して活性型になると、ATP を重合して2', 5'-oligoadenylate を生成し、これが既存の RNase L (endonuclease) を活性化してウイルス mRNA を分解する。

以上のような作用で IFN はウイルスの翻訳鋳型を分解したり、宿主細胞の翻訳機構を損なうことによりウイルスの複製を阻止する。

もし、ウイルスが IFN のもつ抗ウイルス作用と対抗できないならば、子孫を作ることができない。しかしながら、アデノウイルスやヘルペスウイルス属の Epstein-Barr (EB) ウイルスは、anti-IFN agent としてそれぞれ virus associated RNA (VA RNA)⁵⁾ や EB virus encoded RNA (EBER)⁶⁾ を合成して増殖する。また、他の動物 RNA ウイルスにも anti-IFN agent が存在することが知られている。^{7),8)}

アデノウイルスゲノムのコードする VA RNA は約160塩基の small RNA であり、RNA poly-

merase III で転写される。VA I RNA と VA II RNA の2種類が存在し、互いの塩基配列のホモロジーは67%である。⁹⁾ 両者ともウイルス感染初期には、わずかの基底量しか合成されないが、VA I RNA のみは感染後期になると活発に合成される。VA I RNA は、eIF-2 kinase (DAI) の ds-RNA binding site に競合的に結合して eIF-2 kinase の自己リン酸化を阻害する結果、間接的にウイルスタンパクの翻訳を促進する。¹⁰⁾ しかし、VA I RNA は既に活性型になった eIF-2 kinase (eIF-2 kinase-P) の作用を阻害することができない。²⁾ 一方、VA II RNA は感染初期後期を通して基底レベルしか合成されず、VA II RNA を欠く変異ウイルスは増殖に異常がみられない。しかし、増殖が1/10に低下している VA I RNA 欠損ウイルス株に VA II RNA の重欠損変異を導入すると、増殖が更に数倍悪化することから VA I RNA の欠損を補う機能があると考えられている。¹¹⁾

IFN- α は cytotoxic な効果が比較的少なく、より特異的にタンパク合成を阻害する。本論文では従来余り解明されていない IFN- α を用いて、VA I RNA の抗 IFN 作用機構の解明を試みた。ヒト喉頭癌由来の KB 細胞に chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 遺伝子¹²⁾ を reporter として移入し、IFN 濃度を変えたり、IFN や VA I RNA を加える時期を変えるなどの詳細な動態分析を行い、VA I RNA の存在下では IFN のタンパク合成阻害が明らかに回復していることを認めた。また VA II RNA の作用も比較検討した結果、正常細胞では VA I ほどではないが、翻訳促進効果を示した。IFN- α 処理細胞では CAT 活性は30%に抑制されたが、VA I RNA 遺伝子の存在下にほぼ正常まで回復した。VA II RNA 遺伝子の付加では、IFN- α による抑制の解除は有意ではなかった。VA II RNA の転写発現レベルが VA I RNA の約1/50である

ことを考えると VAI RNA の機能に関しては結論できない。VAI RNA が mRNA を安定化する可能性も論じられている^{13),14)}が、IFN- α 処理により低下した CAT-mRNA レベルは VAI RNA 遺伝子の共移入により有意に回復していないことから否定的である。

材料及び方法

1. CAT assay^{12),15)}

(a) 共移入 (リン酸カルシウム法)

KB細胞は10%ウシ胎児血清 (fetal calf serum; FCS) を含む Eagle's minimum essential medium (MEM) で継代し、共移入の前日に増殖状態の良いものを60 mm ディッシュに 2×10^5 cells 巻き込む。当日、共移入の3時間前に3 ml の新しい培地と交換する。共移入実験は Gorman ら¹²⁾の方法を参考にして、次のように行った。

エタノール沈殿した10 μ g のプラスミド DNA を174 μ l の10 mM Tris-HCl, pH 7.5に溶かし、26 μ l の2M CaCl_2 を加える。このDNA- CaCl_2 溶液を200 μ l の $2 \times \text{HBS}$ (50 mM Hepes, 280 mM NaCl, 15 mM Na_2HPO_4 , pH 7.10) を含む試験管を vortex で攪拌しながら滴下し20~30分放置する。うすく白濁したDNA-リン酸カルシウムの懸濁液をKB細胞の培地に加えて攪拌し、 CO_2 インキュベーターにもどす。

(b) グリセロール・ショック

共移入4時間後、培地をアスピレーターで除いたのち、2 ml の15%グリセロール/HBSを加えて正確に1分間静置する。直ちにグリセロール液をアスピレーターで除き、3 ml の無血清培地で3回洗う。5 ml の血清を含む新しい培地を加えて CO_2 インキュベーターにもどす。

(c) 細胞抽出液の調製

共移入48時間後に、細胞をPBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4) で3回洗った後、1 ml のTEN (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA, 2.5 mM NaCl)を加え、ラバーポリスマンで細胞

をはがす。細胞をマイクロチューブに移し、7,000 rpm, 5分間遠心して上清を除く。細胞を150 μ l の0.25 M Tris-HCl, pH 7.5-0.1% Triton-Xに懸濁し、氷中に20分間置いて細胞を破壊する。その後、12,000 rpm, 10分間遠心し、核や細胞破片などを沈殿させた上清の細胞抽出液を得る。

(d) CAT 酵素反応

細胞抽出液150 μ l に10 μ l の10 mM Acetyl CoA (Sigma 社製) と基質に4 μ l (29.6 KBq) の [^{14}C]-chloramphenicol (New England Nuclear; NEN 社製)を加える。37°Cで2時間反応させ、300 μ l の酢酸エチルを加えて vortex で攪拌後、遠心により基質及び生成物を酢酸エチル層 (上層) に抽出する。酢酸エチル層をマイクロチューブに移し、残った水層を200 μ l の酢酸エチルで再抽出する。遠心エバポレーターでチューブを乾燥させ、沈殿を再び20 μ l の酢酸エチルに溶かした後、シリカゲル TLC プレートは (Merk 社製, Silica gel 60, 0.25 mm) を用い、95%クロロホルム・5%メタノールの溶媒系でクロマトグラフィーを行う。展開後プレートを乾燥させ、フィルムとともにX線フィルムカセットに密封し、常温でオートラジオグラフィーを行う。

2. 細胞質 RNA の抽出¹⁶⁾

プラスミド DNA を共移入 (1の(a), (b)と同様の操作)したKB細胞を、48時間後にPBSで3回洗い、1 ml のTENを加えて細胞をはがす。4°Cの条件下で細胞を遠心して上清を除き、RNase inhibitor (Takara 社製) を1 unit/ μ l を含む Iso-high-pH 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.14M NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.5% (v/v) Nonidet P-40) を150 μ l 加え、氷水中に10分間置いて細胞をこわす。ときどき、ゆるやかに振盪する。3,000 rpm, 4°C, 5分間遠心して、核成分が混ざらないよう慎重に上清を回収する。すみやかに、上清に15 μ l の10% (v/v) SDS 及び150 μ l の尿素溶液 (7 M Urea, 0.35 M NaCl, 10 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5)を加え混合する。さらに等量のフェノ

ール：クロロホルム：イソアミルアルコール混合液 (24:24:1 容量比) を加え室温で2分間振盪する。12,000 rpm で遠心後上層を回収し、もう一度この処理を繰り返す。遠心上層液に2倍量の冷却エタノールを加え、 -20°C で一晩静置する。その後、12,000 rpm, 4°C で15分遠心して得られたエタノール沈殿を、RQ 1 DNase (Promega 社製) 2 units と RNase inhibitor 12 units を含む12 μl の DNase 反応緩衝液 (40 mM Tris-HCl, pH 7.9, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl_2) に溶かし、 37°C 、15分間反応させて DNA を完全に除去した後、次の Northern blot analysis を行う。

3. Northern blot analysis^{13),17),18)}

(a) Nick translation

Nick translation kit (Takara 社製) と10 μl (3.7 MBq) の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (NEN 社製) を用いて、0.5~1 μg の DNA (CAT 遺伝子, VA RNA 遺伝子) をラベルする。 15°C 、2時間反応した後、5 μl の反応停止液 (0.5 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.25 M EDTA) を加え、 70°C で10分間処理して反応を止める。その後、全量を1 cm \times 5 cm の Sephadex G 50 (Pharmacia 社製) カラムに通して、はじめに溶出する void 画分を標識 DNA プローブとした。

(b) アガロース-ホルマリン電気泳動および Northern transfer

Davis らの方法¹⁸⁾の変法を用い、VA RNA 検出には1.5%、CAT-mRNA検出には1.2% アガロース-16.5%ホルマリリングルを用い、morpholine-propanesulfonic acid (MOPS) 泳動緩衝液 (20 mM MOPS, pH 7.0, 0.5 mM NaOAc, 1 mM EDTA) で電気泳動を行う。泳動後、ナイロンフィルター (Schleicher and Schuell 社製; ポアサイズ 0.45 μm) に10 \times SSC 緩衝液 (150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate の10倍液) で一晩 transfer 後、真空オープンを用いて 80°C 、2時間、インキュベートする。

(c) ハイブリダイゼーション

RNAをナイロンフィルターに固定後、Pre-

hybridization 溶液 (20 \times SSC 12.5 ml, 1 M KH_2PO_4 , pH 6.5, 2.4 ml, formamide 20 ml, 50 \times Denhardt 5 ml, 変性サケ精子 DNA (10mg/ml) 2 ml, 滅菌蒸留水 6 ml) で 42°C 、4時間、前処理する。そして、hybridization 溶液 (20 \times SSC 6 ml, 1M KH_2PO_4 , pH 6.5, 0.6 ml, formamide 14.4 ml, 50 \times Denhardt 0.5 ml, 変性サケ精子 DNA (10 mg/ml) 0.5 ml, 50% (w/v) dextran sulfate 6 ml, 滅菌蒸留水2.4 ml) として変性した ^{32}P ラベルの標識 DNA プローブ (500万 cpm) で 42°C 、一晩、処理する。翌日、フィルターを 42°C 、200 ml 以上の洗浄溶液 I (2 \times SSC, 0.1% (v/v) SDS) で2度洗い、 56°C 、200 ml 以上の洗浄溶液 II (0.1 \times SSC, 0.1% (v/v) SDS) で3度洗う。洗浄したフィルターを 55°C 、15分間乾燥後、 -80°C 、一晩以上オートラジオグラフィーを行う。

結 果

はじめに CAT 遺伝子の transient expression assay の実験系を用いて IFN- α と VA RNA の作用を調べた。基本実験条件として単層細胞培養を用いて KB 細胞の巻き込み直後に IFN- α を 2,000 international units (IU)/ml の濃度に投与し、その24時間後に pSV2CAT 及び VA RNA 遺伝子クローンを共移入し、72時間後に細胞を回収して CAT 活性を測定した。これに種々の対照系を並行させて実験を行い、対照と比較することにより、IFN- α 及び VA RNA の CAT 遺伝子発現に与える影響を調べた (Fig. 1 の(1), (2))。まず Figure 2 のごとく No. 1~4 を IFN- α 2000 IU/ml 処理群, No. 5~8 を IFN- α 未処理群とし, No. 1, 5 に pSV2CAT と pAd2 VAI を, No. 2, 6 に pSV2CAT と対照プラスミド pUC9 を共移入した。ここでいう CAT 活性は、全 chloramphenicol に対するアセチル化 chloramphenicol の割合を%で表し、この値が高いほど CAT 遺伝子の転写・翻訳を含めたオーバーオールが発現が高いことを意味する。pSV2CAT の移入 (No. 2, 6) では60%の CAT 活性

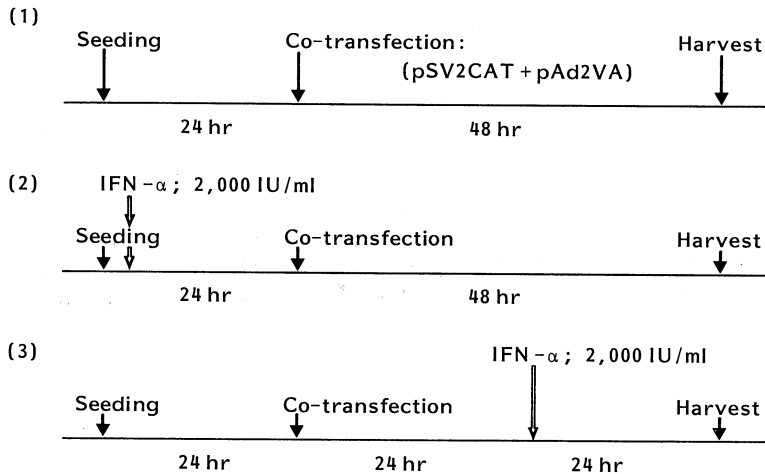


Fig. 1. Effect of interferon- α treatment before or after cotransfection of KB cells with pSV2CAT and pAd2VA RNA

Monolayer culture of KB cell was treated with IFN- α before or after cotransfection. (1) Control without IFN- α treatment, (2) IFN- α treatment 24 hr before cotransfection, (3) IFN- α treatment 24 hr after cotransfection

IFN- α : Interferon- α
 CAT : Chloramphenicol acetyltransferase
 VA RNA : Virus associated RNA

が, IFN- α 処理により24%に抑制された. 一方, pSV2CAT に pAd2VA I を共移入 (No. 1, 5) すると, IFN- α により86%から73%に抑制されるに止まった. IFN- α 処理による CAT 活性の低下が pAd2VA I を加えることで明らかに弱められている. また, pSV0 CAT (pSV2CAT のプロモーター・エンハンサー領域を欠いたプラスミド) を用いた群 (No. 3, 4, 7, 8) や, 共移入を行わない KB 細胞抽出物のみの群 (No. 9, 10) では, 有意の活性は認めなかった.

この実験では, ① VA I RNA は IFN- α 処理・未処理を問わず CAT 活性を促進する. ② IFN- α 2000 IU/ml の処理によって全体に CAT 活性が抑制されるが, VA I RNA により抑制効果は弱められることが言える.

次に (Fig. 1 の (1) (2)) と同様の方法で, IFN- α 処理濃度を 2000, 200, 20 IU/ml と段階的に低下させて未処理の群と比較した. そして, ①

VA I RNA が, 対照と比べて IFN 処理濃度に関係なく CAT 活性を促進する. ② IFN- α は CAT 遺伝子のオーバーオール発現を抑制する. その抑制作用は IFN- α 処理濃度が増加するほど強められる. ③ IFN- α 処理による CAT 活性の阻害度は, VA I RNA 遺伝子移入群と比べ対照の方が強い (VA I RNA は抗 IFN 作用をもつ), などの点が明らかとなった.

次に, VA I RNA と VA II RNA の機能比較を目的とした詳細な動態分析を行った. IFN 処理濃度 (2,000 IU/ml) や細胞巻込み・共移入・収穫の時間を一定にして, IFN 処理時期や時間を変えて CAT assay を行った (Fig. 1). そして, IFN- α 未処理群の (対照 DNA + pSV2CAT) の CAT 活性を 100 とした比活性を出し 7 回の実験結果の平均及び標準偏差を算出してヒストグラムにしたのが Figure 3 である. CAT 活性は, IFN- α 未処理群で (pAd2VA I +

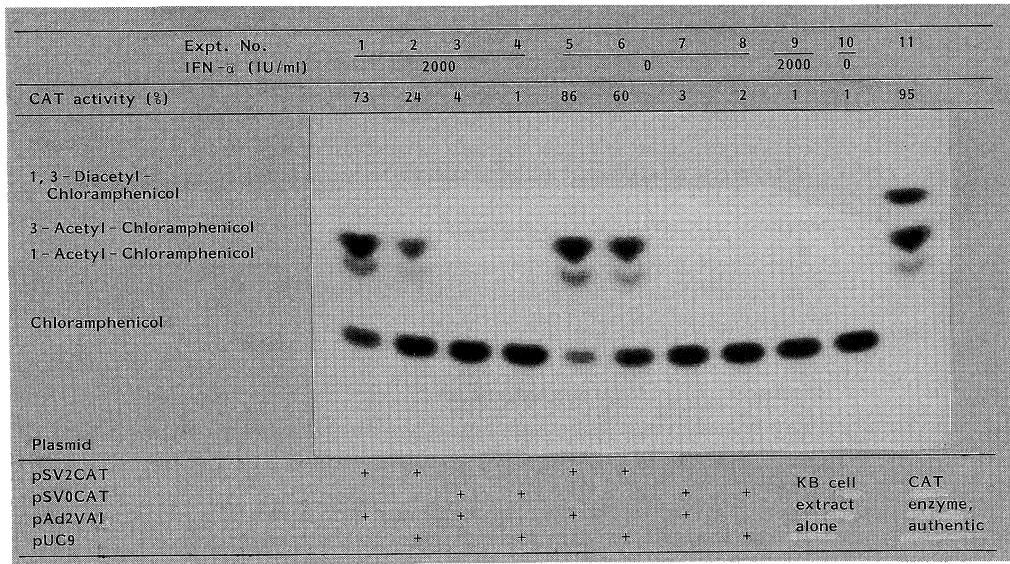


Fig. 2. Effect of VAI RNA on the expression of chloramphenicol acetyltransferase gene fused with SV40 promoter, pSV2CAT in interferon- α treated KB cells

pSV0CAT : Plasmid deleted of SV40 promoter out of pSV2CAT

pAd2VAI : Plasmid with VAI RNA gene sequence of adenovirus type 2 inserted

pUC9 : Plain vector to serve as blank

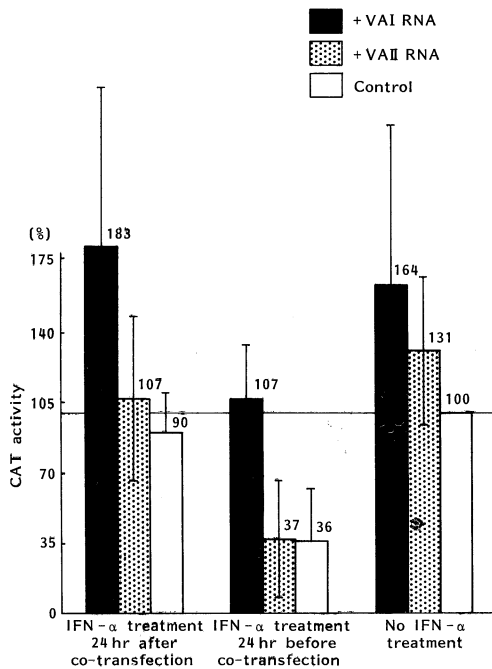


Fig. 3. Effect of length of interferon- α treatment on the VA RNA stimulated expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in KB cells

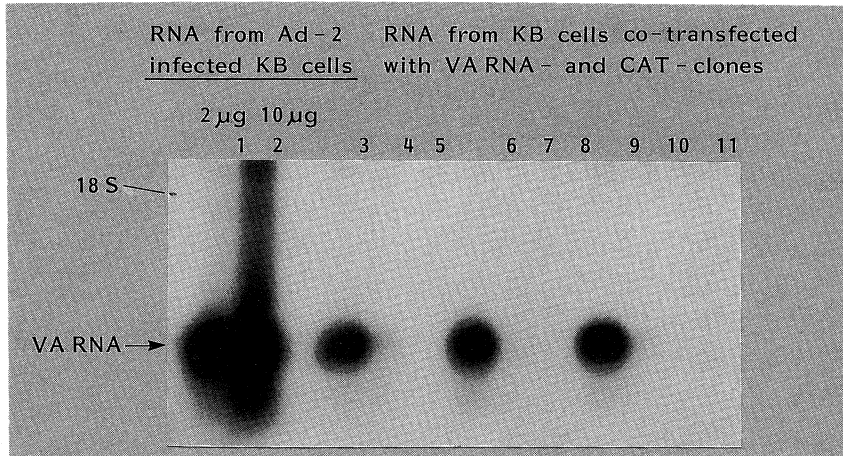


Fig. 4. Northern gel blot analysis of VA RNA expression

The experimental procedure was essentially the same as described in the legend to Fig. 1.

| | | |
|---------------|----------------------------------|---|
| 1 | } RNA from Ad2 infected KB cells | |
| 2 | | |
| 3: pAd2VA I | + pSV2CAT | } IFN- α treatment 24 hr after cotransfection |
| 4: pAd2VA II | + " | |
| 5: pUC18 | + " | |
| 6: pAd2VA I | + pSV2CAT | } IFN- α treatment 24 hr before cotransfection |
| 7: pAd2VA II | + " | |
| 8: pUC18 | + " | |
| 9: pAd2VA I | + pSV2CAT | } No IFN- α treatment |
| 10: pAd2VA II | + " | |
| 11: pUC18 | + " | |

Hybridization probe: [32P] labelled (VA I + VA II) gene restriction fragment

pSV2CAT) 164%, (pAd2VA II + pSV2CAT) 131%, (対照 DNA + pSV2CAT) 100%だったが、共移入24時間後に IFN- α 処理すると (pAd2VA I + pSV2CAT) 183%, (pAd2VA II + pSV2CAT) 107%, (対照 DNA + pSV2CAT) 90%であり、共移入24時間前の処理で (pAd2VA I + pSV2CAT) 107%, (pAd2VA II + pSV2CAT) 37%, (対照 DNA + pSV2CAT) 36%となる。いずれの処理群でも CAT 活性は VA I > VA II \geq 対照の順序で、同じ IFN- α 処理濃度でも処理時期が異なると CAT 活性も異なってくる。IFN- α 未処理では VA I RNA が52%の CAT 遺伝子発現促進効果を示す。IFN- α 処理すると CAT 活性は抑制を受けるが、相対的に促進効果が顕著となった。VA II

RNA も未処理で31%の CAT 活性促進効果を示すものの IFN- α 処理すると、その効果は減少する。

また、共移入した KB 細胞内での VA I 及び VA II RNA の発現の程度を、Northern blot hybridization で確認した (Fig. 4)。同量 (10 μ g) の VA RNA 遺伝子クローンを細胞内に導入しても、VA I RNA と VA II RNA では細胞内の生成量が50:1と大きく異なる。IFN- α 処理した KB 細胞でも VA RNA はいずれも発現しており、量もあまり変わらない。

以上は CAT 活性の発現を調べることにより、VA I 及び VA II RNA と IFN- α との相互作用を検討したものである。したがって、① IFN- α が CAT 遺伝子の転写・翻訳のどちらを抑制して

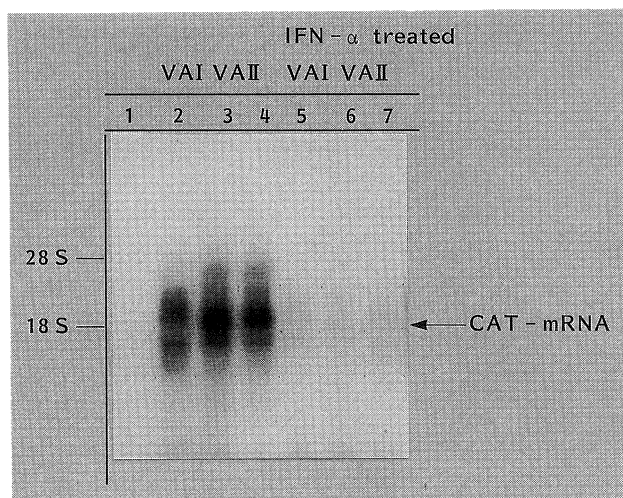


Fig. 5. Effect of VA RNA on the level of mRNA synthesized in interferon- α treated KB cells

RNA from KB cells cotransfected with pSV2CAT and pAd2VAI or pAd2VAII was extracted and subject to Northern gel blot analysis as described in Materials and Methods.

- | | | |
|-----------------------|---|--|
| 1 : Negative control | | |
| 2 : pAd2VAI + pSV2CAT | } | without IFN- α treatment |
| 3 : pAd2VAII + " | | |
| 4 : pUC18 + " | | |
| 5 : pAd2VAI + pSV2CAT | } | treated with IFN- α , 2,000 IU/ml |
| 6 : pAd2VAII + " | | |
| 7 : pUC18 + " | | |
- Hybridization probe : [32 P] labelled CAT gene restriction fragment

いるのか? ② VAI RNA 及び VAII RNA が CAT 遺伝子の転写・翻訳のどちらを促進しているのか? という二つの大きな疑問点については、今までの実験系ではわからない。

これらの疑問点を解くために二つの実験を行った。実験条件は **Figure 1** と同じで、共移入48時間後に RNA 抽出と CAT assay を同時に行い、IFN- α 処理群 (2,000 IU/ml) と未処理群の CAT-mRNA 量を Northern blot 法で確認した (**Fig. 5**)。IFN- α 処理すると CAT-mRNA 量は、いずれも未処理のレベルの1/30に低下していた。少なくとも、IFN- α 処理によって CAT-mRNA 量が減少するのは確かである。また IFN 処理・未処理に関わらず、VAI RNA・VAII RNA・control の3者間にはCAT-

mRNA 量の有意差を認めないが、CAT 活性には明らかな差がある。このことは、VAI 及び VAII RNA が CAT 遺伝子の転写レベルには影響せず、それ以降の翻訳促進に関与していることを示唆する。

考 察

CAT assay は'82年 Gorman ら¹²⁾ により確立された transient expression assay 法であり、CAT 遺伝子を reporter gene に用いて作製した発現ベクターを培養細胞内に導入して、その転写・翻訳活性を容易に知ることができる。われわれは CAT 発現プラスミドとして Gorman ら¹²⁾ が構築した pSV2CAT を用い、これと VA

RNA 遺伝子クローン(pAd2VA I, pAd2VA II)をKB細胞内に共移入してCAT活性への影響を検討した. VAI RNAがCAT活性に与える影響については、既に Svensson と Akusjärvi¹⁹⁾が報告している. そしてCAT-mRNA レベルも検討し、VAI RNAが翻訳のみを促していると結論づけている. これはアデノウイルス感染細胞を用いた従来の報告²⁰⁾と同じである. しかしIFN 処理した細胞を用いたり、VAI RNAとVAII RNAの機能比較を目的としてCAT assayを行った報告はない. インターフェロンはウイルス増殖阻害因子として一般に知られているが、種特異性が高いという特徴がある. われわれは、ヒトIFN- α とヒト由来のKB細胞を用い、Orita ら²¹⁾の報告を基にして、まずIFN- α 処理濃度を2,000 IU/mlに設定した.

IFN 処理による生化学的な細胞内の変化には主に三つの経路^{22)~24)}があり、うち二つはds-RNA依存性のeIF-2 kinase (DAI; 68 kDa)と関与している.^{1), 22), 23)} このeIF-2 kinaseは通常、不活性型として細胞内に存在するが、ds-RNAを触媒として自己リン酸化し活性型となる. そして、活性型eIF-2 α (37 kDa)をリン酸化し不活型にして、ウイルスタンパクの翻訳開始を阻害する.

一方、アデノウイルスの感染後期に活発に合成されるVAI RNAは、不活性型eIF-2 kinase (DAI)のds-RNA binding siteに競合的に結合し、eIF-2 kinaseが活性型になる過程を阻害する(Fig. 6).¹⁰⁾ その結果、活性型eIF-2 α のリン酸化を阻害して間接的にIFNの抗ウイルス作用を阻害する. しかし、感染初期後期を通してごくわずかの基底量しか合成されないVA

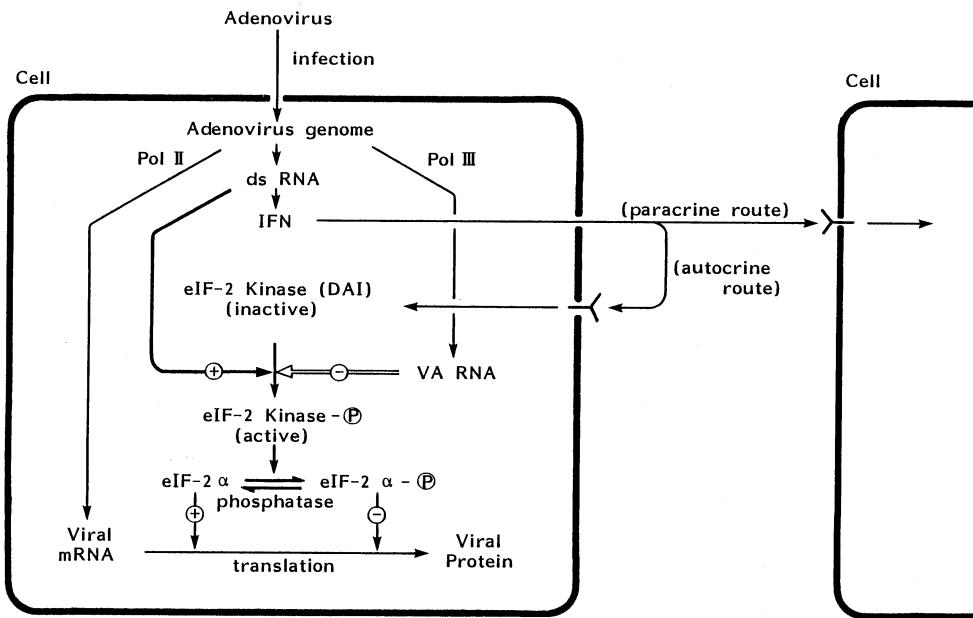


Fig. 6. Scheme for mode of action of VA RNA

- Pol II : RNA polymerase II
- Pol III : RNA polymerase III
- ds-RNA : double stranded-RNA
- IFN : interferon
- eIF-2 kinase : eukaryotic initiation factor-2 kinase
- DAI : double stranded-RNA activated inhibitor

II RNA については、VAI RNA の翻訳促進効果に補助的な関与を示すという報告はあるものの不明点が多い。^{11), 25)}

もう一つの eIF-2 kinase の作用として、不活性型 RNase L (endonuclease) を活性化しウイルスゲノムや mRNA を分解して転写を抑制する経路¹⁾がある。この RNase L には特異性がなく、ウイルスの mRNA も細胞の mRNA も分解する。このため、IFN- α 処理群と未処理群の CAT-mRNA 量を比較する際には、収穫した細胞の数を一定にして RNA 抽出を行い、Northern blot 法を用いてハイブリダイゼーションにより CAT-mRNA を定着した。IFN- α 処理をすると、CAT-mRNA 量が VAI RNA, VAII RNA, 対照を問わず同様に 1/30 に低下し、IFN- α 処理のときも未処理のときもレベルは異なるが 3 者の CAT-mRNA 量は同じだった。つまり CAT 活性は、VAI RNA あるいは VAII RNA の存在による翻訳レベルの促進を反映している。

また、VAI RNA と VAII RNA の機能比較を目的とした詳細な動態解析を行ったところ、**Figure 3** のような結果が得られた。いずれの処理群でも CAT 活性は VAI > VAII \geq 対照の順序であり、同じ IFN- α 処理濃度でも IFN 処理時期・時間が異なると活性も異なってくる。とくに VAI RNA は、IFN- α 未処理で 64% の CAT 遺伝子翻訳促進を示すが、共移入 24 時間前に IFN- α 処理すると、促進効果が最も顕著になる。また、共移入 24 時間後に IFN- α 処理すると、IFN- α による CAT 発現の抑制効果は認められない。これは、VAI RNA が不活性型 eIF-2 kinase のリン酸化 (活性化) を阻害するが、既に活性化した eIF-2 kinase (eIF-2 kinase- \textcircled{P}) の作用は阻害できないという **Figure 6**¹⁰⁾ のモデルに矛盾しない。IFN の抑制効果は処理後 12~16 時間までには現れ、24 時間以内に最大限に達する¹⁾といわれている。また、細胞を 18 時間 IFN 処理後に eIF-2 kinase (DAI) を精製して性質を調べ、この酵素は容易に活性化するという報告²⁾もある。一方、VAII RNA は IFN-

α 未処理で 31% の翻訳促進を認めるが、共移入 24 時間前に IFN 処理すると、CAT 活性は対照とほぼ同じレベルまで低下する。共移入 24 時間後の IFN 処理では、CAT 活性がわずかに対照より促進されるものの有意の差とは言い難い。以上より、この実験条件下では、VAI RNA は CAT 遺伝子の翻訳を促進し、抗 IFN- α 作用を示す。VAII RNA も VAI ほどではないが翻訳を促進するものの、IFN- α 処理すると有意の促進効果はみられない。しかし、VAII RNA の発現レベルが VAI の約 1/50 であるから、IFN- α 処理群については VAI と VAII の妥当な機能比較とはいえない。

そして、**Figure 6** のモデルが IFN 存在下での VAI RNA の作用機序であるため、IFN 未処理細胞における CAT 遺伝子の翻訳促進は説明できない。これには、① ds-RNA を介しない eIF-2 kinase 活性化、② このモデルと異なる作用機序、という二つの可能性が考えられる。IFN 未処理の哺乳動物細胞内には、低レベルの eIF-2 kinase が存在するという報告²⁾もあることから、①の可能性のほうが高い。いずれにしても今後の研究に解答を待たねばならない。

アデノウイルスは VA RNA を作って IFN の作用と対抗するが、他の多くの動物 RNA ウィルスも anti-IFN agent を作っている。たとえば、IFN 処理細胞に reovirus や encephalomyocarditis virus が感染すると eIF-2 kinase (DAI) が活性化される。²⁶⁾しかし、reovirus は $\delta 3$ protein を合成して IFN によるウイルスタンパク合成阻害をブロックすることがわかっている。⁷⁾ influenza virus⁸⁾ や vaccinia virus²⁶⁾ もまた感染時の eIF-2 kinase の活性化を阻害する。最近、eIF-2 kinase と類似のものがトマト細胞に viroid が感染した場合にも見いだされた。つまり、eIF-2 kinase が真核生物の世界ではタンパク合成の制御に関与する一般的な機構と考えられる。

一方、eIF-2 kinase のような eIF-2 α をリン酸化するもう一つの酵素が、hemin controlled inhibitor (HCI) である。⁴⁾ HCI は主に網状赤血球の分野で研究がなされており、熱処理やヘム

の低下消失などいろいろな刺激により活性化される。しかし、eIF-2 kinase の活性化因子である ds-RNA では活性化されない。

今後は、eIF-2 kinase と HCl 及び他の anti-IFN agent 同士との機能比較が興味ある問題点となるであろうし、in vitro 翻訳系を用いて、等量の VA I RNA 及び VA II RNA と IFN 処理細胞抽出物を加えて、機能を比較検討する必要がある。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただいた川崎医科大学学生化学教室 (I) 細川桂一教授に謹んで深謝いたします。また、研究に御協力いただいた生化学教室 (I) 研究補助員各位 (小林佳代子さん、栗本美千子さん) に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、1990年9月第62回日本生化学会大会 (於：大阪) において発表した。

文 献

- 1) Lengyel, P. : Biochemistry of interferons and their actions. *Annu. Rev. Biochem.* 51 : 251—282, 1982
- 2) Kostura, M. and Mathews, M. B. : Purification and activation of the double-stranded RNA-dependent eIF-2 kinase DAI. *Mol. Cell. Biol.* 9 : 1576—1586, 1989
- 3) Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N. S. B., Kerr, I. M., Williams, B. R. G. and Hovanessian, A. G. : Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 62 : 379—390, 1990
- 4) Ochoa, S. and Haro, C. : Regulation of protein synthesis in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 48 : 549—580, 1979
- 5) Reich, P. R., Forget, B. G., Weissman, S. M. and Rose, J. A. : RNA of low molecular weight in KB cells infected with adenovirus type 2. *J. Mol. Biol.* 17 : 428—439, 1966
- 6) Howe, J. G. and Shu, M. : Isolation and characterization of the genes for two small RNAs of herpesvirus papio and their comparison with Epstein-Barr virus-encoded EBER RNAs. *J. Virol.* 62 : 2790—2798, 1988
- 7) Imani, F. and Jacobs, B. L. : Inhibitory activity for the interferon-induced protein kinase is associated with the reovirus serotype 1 δ 3 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 : 7887—7891, 1988
- 8) Katze, M. G., Tomita, J., Black, T., Krug, R. M., Safer, B. and Hovanessian, A. : Influenza virus regulates protein synthesis during infection by repressing autophosphorylation and activity of cellular 68,000-Mr protein kinase. *J. Virol.* 62 : 3710—3717, 1988
- 9) Akusjärvi, G., Mathews, M. B., Anderson, P., Vennström, B. and Pettersson, U. : Structure of genes for virus-associated RNA I and RNA II of adenovirus type 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77 : 2424—2428, 1980
- 10) Mellits, K. H., Kostura, M. and Mathews, M. B. : Interaction of adenovirus VA RNA I with the protein kinase DAI : nonequivalence of binding and function. *Cell* 61 : 843—852, 1990
- 11) Bhat, R. A. and Thimmappaya, B. : Adenovirus mutants with DNA sequence perturbations in the intragenic promoter of VA I RNA gene allow the enhanced transcription of VA II RNA gene in HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* 12 : 7377—7388, 1984
- 12) Gorman, C. M., Moffat, L. F. and Howard, B. H. : Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 2 : 1044—1051, 1982
- 13) Strijker, R., Fritz, D. T. and Levinson, A. D. : Adenovirus VA I -RNA regulates gene expression by controlling stability of ribosome-bound RNAs. *EMBO J.* 8 : 2669—2675, 1989
- 14) Svensson, C. and Akusjärvi, G. : A novel effect adenovirus VA RNA I on cytoplasmic mRNA abundance. *Virology* 174 : 613—617, 1990

- 15) 佐藤建三, 伊藤良次, Agarwall, K., 細川桂一: 最新のバイオテクノロジー, 遺伝子発現の制御 (その2). 代謝 25: 189—198, 1988
- 16) Anderson, C. W., Lewis, J. B., Atokins, J. F. and Gesteland, R. F.: Cell-free synthesis of adenovirus 2 proteins programmed by fractionated messenger RNA: A comparison of polypeptide products and messenger RNA lengths. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71: 2756—2760, 1974
- 17) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.: *Molecular cloning*. 14th ed. USA, Cold Spring Harbor Laboratory. 1982, pp. 109—112
- 18) Davis, L. G., Dibner, M. D. and Battey, J. F.: *Basic methods in molecular biology*. 1st ed. USA, Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1986, pp. 143—146
- 19) Svensson, C. and Akusjärvi, G.: Adenovirus VA RNA I mediates a translational stimulation which is not restricted to the viral mRNAs. *EMBO J.* 4: 957—964, 1985
- 20) Thimmappaya, B., Weinberger, C., Schneider, R. J. and Shenk, T.: Adenovirus VAI RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection. *Cell* 31: 543—551, 1982
- 21) Orita, K., Ando, S. and Kurimoto, M.: Synergism between human tumor necrosis factor and human interferon- α : Effects on cells in culture. *Acta. Med. Okayama* 41: 155—160, 1987
- 22) Lebleu, B., Sen, G. C., Shaila, S., Cabrer, B. and Lengyel, P.: Interferon, double-stranded RNA and protein phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73: 3107—3111, 1976
- 23) Kerr, I. M. and Brown, R. E.: pppA2' p5' A2' p5' A: An inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75: 256—260, 1978
- 24) Schmit, A., Zilberstein, A., Shulman, P., Federman, P., Berissi, H. and Revel, M.: Interferon action: Isolation of nuclease F, a translation inhibitor activated by interferon-induced (2'—5') oligo-isoadenylate. *FEBS Lett.* 95: 257—264, 1978
- 25) Akusjärvi, G., Svensson, C. and Nygard, O.: A mechanism by which adenovirus virus-associated RNA I controls translation in a transient expression assay. *Mol. Cell. Biol.* 7: 549—551, 1987
- 26) Schneider, R. J. and Shenk, T.: Impact of virus infection on host cell protein synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 317—332, 1987