

論文審査結果の要旨

平成 26 年 8 月 24 日

氏名（本籍）	待永 明仁
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲第 120 号
学位記の授与日	平成 26 年 9 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 創価大学大学院学則第 31 条第 2 項該当 創価大学学位規則第 3 条の 3 第 1 項該当
論文題目	Studies on the mechanisms for posttranscriptional regulation of gene expression of Friend murine leukemia virus
論文審査機関	工学研究科委員会
論文審査委員	主査委員 獣医学博士 高瀬 明 委員 理学博士 青山由利 委員 理学博士 西原祥子

<論文の内容の要旨>

本論文は、転写後調節を介したマウス白血病ウイルスの遺伝子発現機構を解析したものであり、序論、第 1 章、第 2 章、および、結論から構成されている。以下にその要旨を述べる。

序論

マウス白血病ウイルスは、比較的単純な遺伝子構造を有するシンプルトロウイルスに属している。ウイルスが宿主細胞の感染受容体に吸着した後、細胞内に侵入したウイルスゲノムは、逆転写の過程を経て、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、プロウイルスとなる。マウス白血病ウイルスのプロウイルス DNA は、5'LTR (long terminal repeat) に続いて、5'リーダー配列、*gag*、*pol*、*env*、および、3'LTR が並ぶ構造をしている。5'スプライス部位は 5'リーダー配列内に、3'スプライス部位は *pol* 遺伝子内に存在している。プロウイルス DNA からは、全長の mRNA、および、スプライシングを受けた *env*-mRNA の 2 種類の mRNA が生成される。全長の mRNA からは、Gag、および、Pol タンパク質が、*env*-mRNA からはウイルス表面タンパク質 Env が翻訳される。ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に代表されるコンプレックストロウイルスは、構造タンパク質の他に、ウイルス遺伝子の発現を制御するアクセサリタンパク質を有している。しかし、マウス白血病ウイルスは、このようなタンパク質をコードしておらず、ウイルス遺伝子の発現がどのような機構で制御されているかは不明な点が多い。これまでの当研究室の研究により、*env*-mRNA は、スプライシングの過程を経ることで安定性を獲得し、Env タンパク質が効率的に翻訳されることが明らかとなった。さらに、*gag* 遺伝子内の *HindIII*-*BglIII* 領域 (878-1904 nt) にスプライシングの制御に関わるエレメントが含まれることが示された。

本研究では、転写後調節の 1 つであるスプライシングを介した、マウス白血病ウイルスの遺伝子発現機構の解析、および、*gag* 遺伝子内に存在するスプライシング制御エレメントの同定と機能解析を行った。

第 1 章

マウス白血病ウイルス遺伝子の全長の配列を有し、スプライシングの過程を経て *env*-mRNA を産生するベクター、および、イントロンを完全に排除することにより、スプライシングの過程を経ずに *env*-mRNA を産生するベクターを用いて、マウス白血病ウイルスのスプライシングが、*env*-mRNA の

3'末端プロセッシング、および、*env*-mRNA のポリソーム構造の形成に与える影響について解析した。その結果、スプライシングを受けた *env*-mRNA は、正常に poly(A)鎖が付加されていたが、スプライシングを受けない *env*-mRNA の一部にポリアダニル化が不完全な mRNA が検出された。また、スプライシングを受けた *env*-mRNA の 69%がポリソーム構造をとっていたが、スプライシングを受けない *env*-mRNA では、ポリソーム構造をとっている mRNA は 24%であった。これらの現象は、*env* 遺伝子を *luciferase* 遺伝子に置換したベクターでは見られなかった。以上の結果から、*env*-mRNA は、スプライシングを受けることにより、*env* 遺伝子依存的に 3'末端のポリアダニル化の効率、および、ポリソーム構造の形成効率が促進されることが示された。

第2章

gag 遺伝子内の *Hind*III-*Bgl*II 領域を段階的に欠失させた種々のベクターを用いて、スプライシング制御に関わるシスエレメントの解析を行った。その結果、*gag* 領域内の 38 nt 断片 (1612-1649 nt) に、正しいスプライス部位が選択されるために必須なエレメントが含まれることが明らかとなった。また、38 nt 断片の上流領域 (1183-1611 nt) には、スプライス部位の選択に、正または負に影響を及ぼすエレメントが存在することが示された。さらに、38 nt 断片は、3'スプライス部位の上流に存在する *Sph*I-*Nde*I 領域 (5140-5400 nt) と相互作用することにより、機能することも明らかとなった。

結論

本研究により、マウス白血病ウイルスの *env*-mRNA は、転写後、スプライシングの過程を経ることにより、3'末端のポリアダニル化の効率、および、ポリソーム構造の形成効率が、*env* 遺伝子依存的に促進されることが明らかとなった。さらに、マウス白血病ウイルスのスプライス部位の選択に正に作用する 38 nt 新規シスエレメントが明らかにされた。

以上の研究成果は、一部を除いて、以下の学術雑誌に掲載されている。

- (1) Akihito Machinaga and Sayaka Takase -Yoden
A 38 nt region and its flanking sequences within *gag* of Friend murine leukemia virus are crucial for splicing at the correct 5' and 3'splice sites.
Microbiology and Immunology 58: 38-50 (2014)
- (2) Akihito Machinaga and Sayaka Takase -Yoden
Polyadenylation of Friend murine leukemia virus *env*-mRNA is affected by its splicing.
Microbiology and Immunology 58: 474-482 (2014)

<論文審査結果の要旨>

本論文は、転写後調節を介したマウス白血病ウイルスの遺伝子発現機構について、上記の結論に示した点を明らかにしたものである。これらは、本研究で初めて明らかにされたものであり、それを証明する十分なデータも有することから、学位論文に値する内容であると認定する。