

earlier work indicated that overexpression of Clk/Sty mimicked insulin signaling by promoting PKC β II exon inclusion (17). In the present study we found that insulin-regulated PKC β II mRNA alternative splicing was inhibited by Clk/Sty and Akt2 siRNA as well as by TG003, a specific Clk/Sty inhibitor, which further indicated that Clk/Sty was involved in insulin signaling. Additionally, Clk1-stimulated splicing of PKC β II mRNA was blocked by LY294002, suggesting that an upstream kinase was involved in the process.

We identified SRp75, SRp55, and SRp30b/SC35 as Clk/Sty substrates using various criteria including siRNA in addition to a specific Clk inhibitor to differentiate Clk phosphorylation from Akt phosphorylation in immunoprecipitated SR proteins. Furthermore, we found that insulin-induced Clk/Sty-mediated regulation of SR proteins was distinct from serum-induced Clk/Sty regulation. To ascertain whether Akt2 and Clk/Sty regulation of phosphorylation and resulting activation of SR splicing factors was a universal phenomenon, we showed that SR proteins were also substrates for Akt2-regulated Clk/Sty activation. A PI3K/Akt2→Clk/Sty connection was also involved in the regulation of SRp75 phosphorylation induced by serum, and there was also a requirement for PI3K/Akt2 in Clk/Sty phosphorylation of SRp30b/SC35. SRp30b/SC35 appeared to be a less-preferred substrate for Clk/Sty during insulin activation but a more robust substrate with serum conditions. However, insulin regulation of splicing is best demonstrated after serum starvation. These results suggested that this serum-initiated PI3K/Akt2→Clk/Sty pathway was distinct from the one used by insulin.

We concluded that Akt2 phosphorylated Clk/Sty and activated Clk/Sty-mediated SR protein phosphorylation and PKC β II exon inclusion in response to insulin. Furthermore, our observations that SR protein phosphorylation depended on PI3K were supported by a recent finding that SRp55, SRp40, and SC35 phosphorylation was decreased by wortmannin, another inhibitor of PI3K, in anti-IgM receptor-induced splicing of BPV-1 pre-mRNAs in the ASF/SF2-depleted B cell line DT40 (36). It was also conceivable that the PI3K/Akt2 pathway regulated different kinases involved in SR protein phosphorylation and splicing complexes such as PKC or SRPK, because the insulin-initiated pathway was distinct from the one used by serum in regulating SR proteins.

Akt modulates gene expression via regulation of gene transcription by phosphorylating CREB and forkhead transcription factors (37, 38). However, the role and the control of signaling by Akt in splicing regulation had not been clearly defined because Akt becomes nuclear after it is activated. Multiple Akt-substrate consensus motifs exist in the C-terminal Arg/Ser domains of all the SR proteins (5, 21, 33). We found that Akt phosphorylated these consensus sequences in multiple SR proteins (SRp75, SRp55, and SRp30b/SC35). A recent report provides both *in vivo* and *in vitro* evidence for Akt-mediated modification of SR proteins SF2/ASF and 9G8 by direct phosphorylation (33). Akt associates with and phosphorylates YB-1, another RNA-binding protein involved in regulation of mRNA transcription, splicing, and translation (24). The possibility exists that Akt2 phosphorylation directs SR proteins to the nucleus before Clk phosphorylation.

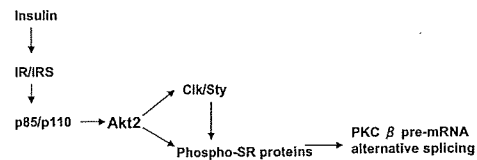


FIG. 11. Signaling linkage between PI3K, Akt2, Clk/Sty, SR proteins, and PKC β pre-mRNA alternative splicing. The diagram depicts the proposed dual role of Akt2 and Clk/Sty in mediating insulin-induced pre-mRNA splicing and gene expression via the networked phosphorylation of SR proteins.

In this study, cellular and genetic evidence showed that Akt2 phosphorylated Clk/Sty. A new role played by Akt2 was also identified: regulation of alternative splicing and gene expression via simultaneously modulating Clk/Sty kinases and specific SR splicing factors. Tissues from Akt2-null mice with early stages of type 2 diabetes had impaired Clk/Sty activation, reduced SR protein phosphorylation, and reduced PKC β II protein. To demonstrate a more physiological effect, the Clk inhibitor TG003, which also blocked SR protein phosphorylation and PKC β II splicing, blocked the effect of insulin on 2-deoxyglucose uptake in L6 cells, further suggesting the role of these kinases in insulin action.

Taken together, the results of this study establish the requirement for PI3K/Akt2 signaling in SR protein regulation in response to multiple stimuli. As summarized in Fig. 11, the signaling linkage implied that PI3K/Akt2 was pivotal in mediating pre-mRNA splicing and gene expression through inducing a sophisticated phosphorylation network that acted on Clk/Sty and SR proteins. Whether Akt2 regulation of kinases such as SRPK2 (26, 39) function similarly is under investigation. The hierarchy of SR protein phosphorylation sites is also questioned. Previous work demonstrated that PKC β II is necessary for full insulin action as measured by alterations in glucose uptake in multiple systems (18–20, 40, 41). The PKC β splice variants differ in their binding to F-actin and implicate PKC β II in the process of insulin-stimulated actin rearrangements (42). The current experiments identifying a PI3K/Akt2/Clk/Sty/SR protein/PKC β II linkage place Clk/Sty in the signaling pathways of insulin action. Identification of the dual regulation demonstrated for Akt on SR protein phosphorylation introduces a new category of controlling pre-mRNA splicing and gene expression initiated by extracellular signaling.

Acknowledgments

We thank Dr. Morris J. Birnbaum (Howard Hughes Medical Institute, Department of Medicine, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania) for providing Akt2-null mouse tissues and Dr. James Manley for providing Clk/Sty antibody and the HA-Clk/Sty construct (Department of Biological Sciences, Columbia University, New York, NY). We also thank Karen D. Corbin for technical assistance and Dr. Stefan Stamm for critical reading and useful comments.

Address all correspondence and requests for reprints to: Denise R. Cooper, Ph.D., Research Service 151, J. A. Haley Veterans Hospital, 13000 Bruce B. Downs Boulevard, Tampa, Florida 33612. E-mail: dcooper@hsc.usf.edu.

The National Institutes of Health Grant DK54393 (D.R.C.), and Department of Veterans Affairs (tp D.R.C. and N.A.P.) supported this work.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Bourgeois CF, Lejeune F, Stevenin J 2004 Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* 78:37–88
- Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D, Thanaraj TA, Soreq H 2005 Function of alternative splicing. *Gene* 344:1–20
- Schwerk C, Schulze-Osthoff K 2005 Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 19:1–13
- Staal SP, Hartley JW 1988 Thymic lymphoma induction by the AKT8 murine retrovirus. *J Exp Med* 167:1259–1264
- Patel NA, Kaneko S, Apostolatos HS, Bae SS, Watson JE, Davidowitz K, Chappell DS, Birnbaum MJ, Cheng JQ, Cooper DR 2005 Molecular and genetic studies imply Akt-mediated signaling promotes protein kinase C β II alternative splicing via phosphorylation of serine/arginine-rich splicing factor SRp40. *J Biol Chem* 280:14302–14309
- Gui JF, Lane WS, Fu XD 1994 A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature* 369:678–682
- Lee K, Du C, Horn M, Rabinow L 1996 Activity and autophosphorylation of LAMMER protein kinases. *J Biol Chem* 271:27299–27303
- Nayler O, Stamm S, Ullrich A 1997 Characterization and comparison of four serine- and arginine-rich (SR) protein kinases. *Biochem J* 326(Pt 3):693–700
- Colwill K, Pawson T, Andrews B, Prasad J, Manley JL, Bell JC, Duncan PI 1996 The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *EMBO J* 15:265–275
- Hanes J, von der Kammer H, Klaudiny J, Scheit KH 1994 Characterization by cDNA cloning of two new human protein kinases. Evidence by sequence comparison of a new family of mammalian protein kinases. *J Mol Biol* 244:665–672
- Prasad J, Manley JL 2003 Regulation and substrate specificity of the SR protein kinase Clk/Sty. *Mol Cell Biol* 23:4139–4149
- Lai MC, Lin RI, Tarn WY 2003 Differential effects of hyperphosphorylation on splicing factor SRp55. *Biochem J* 371:937–945
- Prasad J, Colwill K, Pawson T, Manley JL 1999 The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing. *Mol Cell Biol* 19:6991–7000
- Chalfant CE, Watson JE, Bisnauth LD, Kang JB, Patel N, Obeid LM, Eichler DC, Cooper DR 1998 Insulin regulates protein kinase C β II expression through enhanced exon inclusion in L6 skeletal muscle cells. A novel mechanism of insulin- and insulin-like growth factor-*i*-induced 5' splice site selection. *J Biol Chem* 273:910–916
- Patel NA, Chalfant CE, Watson JE, Wyatt JR, Dean NM, Eichler DC, Cooper DR 2001 Insulin regulates alternative splicing of protein kinase C β II through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway involving the nuclear serine/arginine-rich splicing factor, SRp40, in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 276:22648–22654
- Patel NA, Yamamoto M, Illingworth P, Mancu D, Mebert K, Chappell DS, Watson JE, Cooper DR 2002 Phosphoinositide 3-kinase mediates protein kinase C β II mRNA destabilization in rat A10 smooth muscle cell cultures exposed to high glucose. *Arch Biochem Biophys* 403:111–120
- Patel NA, Apostolatos HS, Mebert K, Chalfant CE, Watson JE, Pillay TS, Sparks J, Cooper DR 2004 Insulin regulates protein kinase C β II alternative splicing in multiple target tissues: development of a hormonally responsive heterologous minigene. *Mol Endocrinol* 18:899–911
- Chalfant CE, Mischak H, Watson JE, Winkler BC, Goodnight J, Farese RV, Cooper DR 1995 Regulation of alternative splicing of protein kinase C β by insulin. *J Biol Chem* 270:13326–13332
- Chalfant CE, Ohno S, Konno Y, Fisher AA, Bisnauth LD, Watson JE, Cooper DR 1996 A carboxy-terminal deletion mutant of protein kinase C β II inhibits insulin-stimulated 2-deoxyglucose uptake in L6 rat skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol* 10:1273–1281
- Cooper DR, Watson JE, Patel N, Illingworth P, Acevedo-Duncan M, Goodnight J, Chalfant CE, Mischak H 1999 Ectopic expression of protein kinase C β II, - δ , and - ϵ , but not - β I or - ζ , provide for insulin stimulation of glucose uptake in NIH-3T3 cells. *Arch Biochem Biophys* 372:69–79
- Obata T, Yaffe MB, Leparo GG, Piro ET, Maegawa H, Kashiwagi A, Kikkawa R, Cantley LC 2000 Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB. *J Biol Chem* 275:36108–36115
- Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gaffney P, Reese CB, MacDougall CN, Harbison D, Ashworth A, Bowles M 1997 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol* 7:776–789
- Mora A, Komander D, van Aalten DM, Alessi DR 2004 PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* 15:161–170
- Evdokimova V, Ruzanov P, Anglesio MS, Sorokin AV, Ovchinnikov LP, Buckley J, Triche TJ, Sonenberg N, Sorensen PH 2006 Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species. *Mol Cell Biol* 26:277–292
- Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw 3rd EB, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ 2001 Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β). *Science* 292:1728–1731
- Umehara H, Nishii Y, Morishima M, Kakehi Y, Kioka N, Amachi T, Koizumi J, Hagiwara M, Ueda K 2003 Effect of cisplatin treatment on speckled distribution of a serine/arginine-rich nuclear protein CROP/Luc7A. *Biochem Biophys Res Commun* 301:324–329
- Roth MB, Murphy C, Gall JG 1990 A monoclonal antibody that recognizes a phosphorylated epitope stains lampbrush chromosome loops and small granules in the amphibian germinal vesicle. *J Cell Biol* 111:2217–2223
- Hagiwara M 2005 Alternative splicing: a new drug target of the post-genome era. *Biochim Biophys Acta* 1754:324–331
- Patel NA, Cooper DR 2005 The signal to splice: insulin regulation of alternative splicing via the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Clin Ligand Assay* 28:75–81
- Perrotti N, He RA, Phillips SA, Haft CR, Taylor SI 2001 Activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase (Sgk) by cyclic AMP and insulin. *J Biol Chem* 276:9406–9412
- Rosenzweig T, Aga-Mizrachi S, Bak A, Sampson SR 2004 Src tyrosine kinase regulates insulin-induced activation of protein kinase C (PKC) δ in skeletal muscle. *Cell Signal* 16:1299–1308
- Muraki M, Ohkawara B, Hosoya T, Onogi H, Koizumi J, Koizumi T, Sumi K, Yomoda J, Murray MV, Kimura H, Furuichi K, Shibuya H, Krainer AR, Suzuki M, Hagiwara M 2004 Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. *J Biol Chem* 279:24246–24254
- Blaustein M, Pelisch F, Tanos T, Muñoz MJ, Wengier D, Quadrana L, Sanford JR, Muschietti JP, Kornblihtt AR, Cáceres JF, Coso OA, Srebrow A 2005 Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat Struct Mol Biol* 12:1037–1044
- Mastaitis JW, Wurmbach E, Cheng H, Sealfon SC, Mobbs CV 2005 Acute induction of gene expression in brain and liver by insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes* 54:952–958
- Howell BW, Afar DE, Lew J, Douville EM, Icelly PL, Gray DA, Bell JC 1991 STY, a tyrosine-phosphorylating enzyme with sequence homology to serine/threonine kinases. *Mol Cell Biol* 11:568–572
- Liu X, Mayeda A, Tao M, Zheng ZM 2003 Exonic splicing enhancer-dependent selection of the bovine papillomavirus type 1 nucleotide 3225 3' splice site can be rescued in a cell lacking splicing factor ASF/SF2 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Virol* 77:2105–2115
- Paradis S, Ruvkun G 1998 *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev* 12:2488–2498
- Du K, Montminy M 1998 CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* 273:32377–32379
- Wang HY, Lin W, Dyck JA, Yeakley JM, Songyang Z, Cantley LC, Fu XD 1998 SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J Cell Biol* 140:737–750
- Kawano Y, Rincon J, Soler A, Ryder JW, Nolte LA, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H 1999 Changes in glucose transport and protein kinase C β (2) in rat skeletal muscle induced by hyperglycaemia. *Diabetologia* 42:1071–1079
- Cortright RN, Azévedo Jr JL, Zhou Q, Sinha M, Porjes WJ, Itani SI, Dohm GL 2000 Protein kinase C modulates insulin action in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E553–E562
- Blobe GC, Stribling DS, Fabbro D, Stabel S, Hannun YA 1996 Protein kinase C β II specifically binds to and is activated by F-actin. *J Biol Chem* 271:15823–15830

3. ウイルスによるスプライシング暗号の利用と攪乱

野島孝之, 萩原正敏

mRNA 前駆体は複数の成熟 mRNA へとスプライシングされ, 1つの遺伝子から多様なタンパク質を生み出すことができる. この選択的スプライシングという現象は組織特異的あるいは発生段階特異的に制御されており, その制御機構はスプライシング暗号と呼ばれる. DNA ウイルスやレトロウイルスはさまざまな方法で宿主のスプライシング暗号を活用し, 限定されたサイズのゲノムから多様なタンパク質を産生していることが判明しつつある. スプライシング暗号に対するウイルスの干渉機構を解明することで新しい抗ウイルス薬を開発できるものと期待される.

はじめに

種々の生物の全ゲノム解析が進展するにつれて, ヒトを含む高等動物も予想以上に数少ない遺伝子から多様なタンパク質を生み出していることが判明し, mRNA

の選択的スプライシング^{※1}の重要性が脚光を浴びることとなった. そもそも mRNA の選択的スプライシングという現象は, アデノウイルスの複数ポリペプチドが同一の pre-mRNA に由来することから見出され¹⁾, その後, 細胞の mRNA でも同様な選択的スプライシングが起きていることが確認された. 当初, 選択的スプライシングは免疫グロブリンなど, 一部の特殊な遺伝子の mRNA だけに見出される現象だと思われていたが, 高速シーケンサーの登場により, 現在ではヒトで複数エクソンを有する遺伝子の 95% 以上が, 選択的スプライシングにより 2 種類以上の mRNA を生成すると試算されている²⁾. 選択的スプライシングは組織特異的あるいは発生時期特異的に制御され, スプライシング暗号^{※2}と呼ばれる制御メカニズムの解読が進展しつつある^{3)~5)}. 本稿では, 種々のウイルス mRNA の選択的スプライシング制御機構を概説

【キーワード&略語】

アデノウイルス, 選択的スプライシング, 単純ヘルペスウイルス, ヒトパピローマウイルス, ヒト免疫不全ウイルス, E1A 遺伝子, RNA 結合タンパク質, SR タンパク質, SR タンパク質リン酸化酵素, SRPIN340

ADV Adenovirus
ESE exonic splicing enhancer
ESS exonic splicing silencer
HIV human immunodeficiency virus
HPV human papilloma virus
HSV herpes simplex virus
ICP27 infected cell protein 27
ISS intronic splicing silencer
MLTU major late transcription unit
SR Serine-Arginine rich
SRPK SR protein kinase

※1 選択的スプライシング

1つの mRNA 前駆体からいくつか異なる組合せのエクソンをもつ mRNA がつくられる現象.

Interference of splicing codes by virus infection

Takayuki Nojima/Masatoshi Hagiwara: Laboratory of Gene Expression, School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University (東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所形質発現制御学研究室)

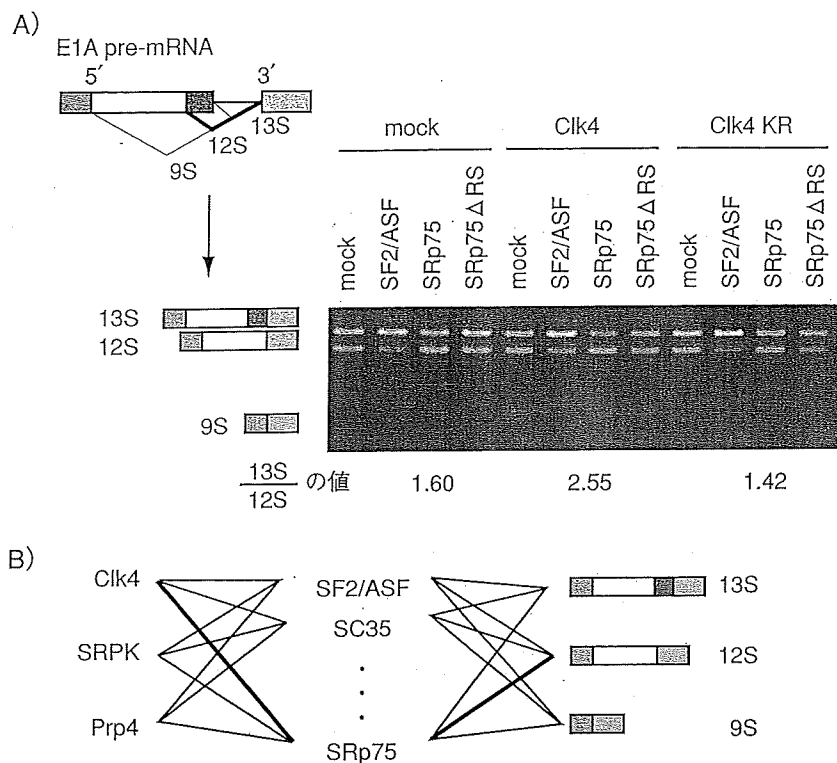


図1 ADV E1A 遺伝子の選択的スプライシング

A) ADV E1A の遺伝子構造とスプライシング産物。E1A 遺伝子の一次転写産物は 5' スプライス部位の選択により、3 種類の mRNA (13S, 12S, 9S mRNA) を産生する。E1A 遺伝子の選択的スプライシングを受ける領域をレポーター化し、SR タンパク質とリン酸化酵素 Clk4 との共発現を行った後、RT-PCR によって E1A スプライシング産物を検出した。図下に 12S/13S の値を示す (文献 9 より転載)。B) E1A スプライシング産物の 12S mRNA の選択を Clk4 によるリン酸化された SRp75 が促進することが示唆される。選択的スプライシング制御機構の 1 つとして、スプライシング因子とそのリン酸化酵素の組合せが重要となる

するとともに、スプライシング制御機構を標的とする抗ウイルス薬の可能性や、宿主細胞側の mRNA スプライシングに対するウイルスの干渉について、最新の知見を紹介する。

■ DNA ウイルスのスプライシング制御

ヒトアデノウイルス (human adenovirus: ADV) は 5 種類の初期転写ユニット (E1A, E1B, E2, E3, E4), 3 種の遅延初期転写ユニット (IX, IVa2, E2 late), 1 種の後期転写ユニット (major late tran-

※2 スプライシング暗号

選択的スプライシングのパターンは、スプライシングに影響を与える RNA 結合タンパク質 (トランス因子) が mRNA 前駆体上の特定配列 (シス因子) に結合することによって決定されると考えられている。その制御ルールをスプライシング暗号 (splicing code) と呼ぶ。

scription unit: MLTU) をコードし、それぞれの転写産物がスプライシングされる。例えば、初期転写ユニットの選択的スプライシングによって 9S, 12S, 13S の 3 種の E1A タンパク質が産生される⁶⁾。E1A タンパク質は ADV ゲノムの中で最も早く発現する遺伝子であり、他の初期遺伝子の転写を活性化するウイルス転写因子である。E1A タンパク質のそれぞれのスプライシング産物にはウイルス転写活性化における機能的な違いがある。E1A 遺伝子のスプライシング産物のうち E1A 9S mRNA は感染後期になって発現することから、初期遺伝子の転写活性化には影響しないと考えられている。また、ADV 遺伝子変異株を用いた実験から、E1A 12S タンパク質は初期遺伝子転写活性化を引き起こすことはないが、E1A 13S タンパク質がその役割を担っていることがわかっている^{7) 8)}。最近われわれは、この E1A 遺伝子の選択的スプライシング制

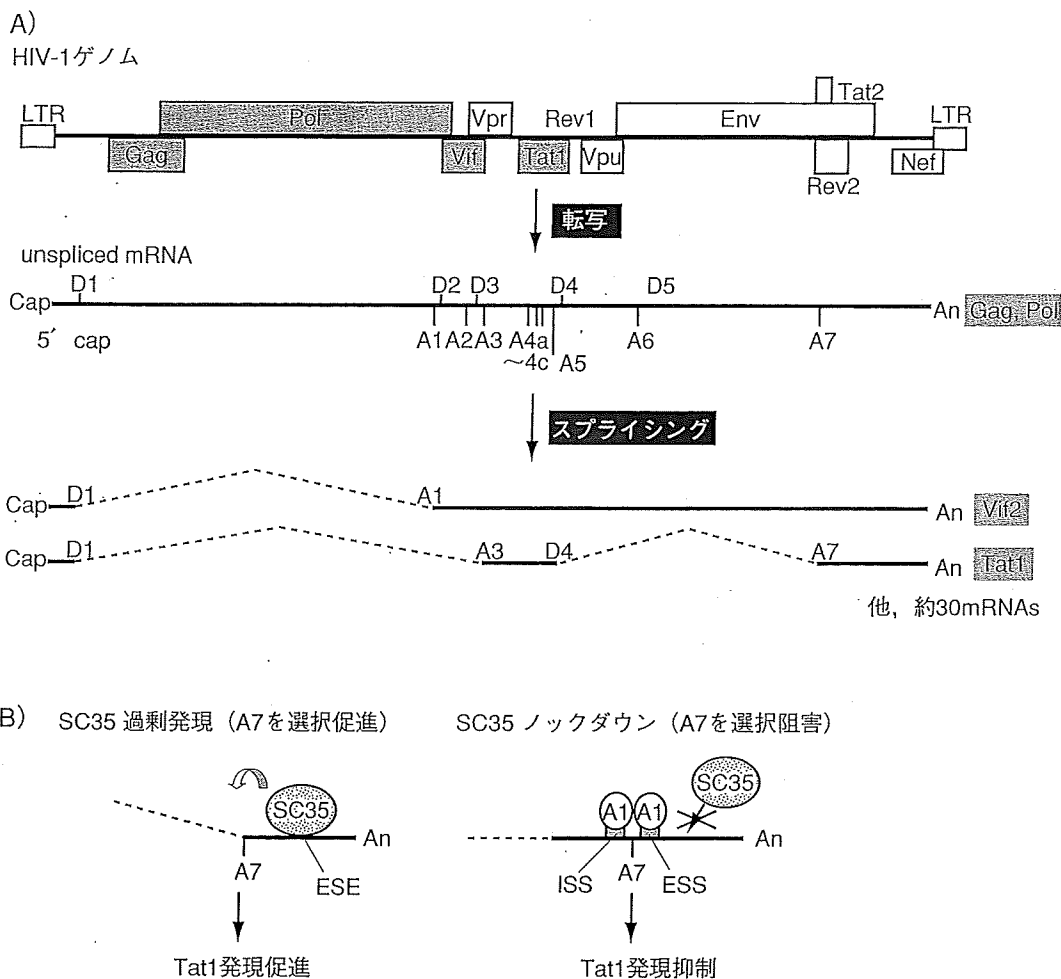


図2 HIV-1の選択的スプライシング制御

A) HIV-1のゲノム構造とスプライシング産物. HIV-1のゲノムには複数のタンパク質情報がコードされており, 選択的スプライシングによってそのタンパク質が使い分けられている. 選択的スプライシングは splicing donor site (D1~D5) と splicing acceptor site (A1~A7) の組合せで行われている. B) 3'スプライス部位A7の選択にはSRタンパク質 (SC35) とhnRNP A1タンパク質がかかわる. SC35がA7付近のESEに結合するとA7が3'スプライス部位として認識され, Tat1 mRNAの発現が促進する. 一方, A7付近のISS, ESSにhnRNP A1が結合するとA7が認識されなくなり, Tat1 mRNAの発現が抑制される

御機構を詳細に解析し (図1 A), 宿主細胞の特定のSR (Serine-Arginine rich) タンパク質とリン酸化酵素の組合せが, E1A遺伝子のスプライシングパターンを決定することを明らかにした (図1 B) ⁹⁾.

ADVは自身のウイルスゲノム上においても選択的スプライシング制御因子をコードしている. MLTUは5カ所で切断後ポリA付加され, L1, L2, L3, L4, L5 mRNAとなる. L1~5はそれぞれスプライシングされることが知られている. L1からは52,55KとIIIaという2種類のmRNAが産生するが, IIIa mRNAの選択的発現にADVのウイルスタンパク質であるL4-33Kがかかわっている¹⁰⁾. L1遺伝子一次転写産物上の選

択的3'スプライス部位付近には3VDEと呼ばれるシス配列が存在し, L4-33Kは3VDE依存的にスプライシングを制御していることが, *in vitro*実験や細胞内で確かめられている¹⁰⁾.

ヒトパピローマウイルス (human papilloma virus : HPV) の遺伝子発現の制御は上皮細胞の分化段階とリンクしており, 特にカプシドタンパク質をコードするL1とL2の発現は上皮細胞に局限する. 子宮頸がんによく発見されるHPV16の場合, カプシドタンパク質は選択的スプライシングによって生み出される¹¹⁾. このスプライシング制御にはhnRNPA1, SF2/ASF, CUG-BP1など多くの宿主側制御因子が関与しており,

上皮細胞の分化段階ごとにこれらスプライシング制御因子の発現が異なることがウイルス増殖の可否を決定しているものと思われる¹¹⁾。

2 レトロウイルスのスプライシング制御

ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus : HIV) は、1983年にエイズ患者からMontagnierやBarré-Sinoussiらによって発見されたレトロウイルス科に属する一本鎖RNAウイルスである。HIVゲノムから合成される1種類の転写産物には9種類のウイルスタンパク質 (Gag, Pol, Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu, Env, Nef) がコードされており、ウイルスタンパク質が産生する過程で選択的スプライシングが必要とされる (図2 A)。さらに、HIVゲノムからは少なくとも30種類以上のmRNAが5種類の5'スプライス部位 (5'ss D1~D5) と9種類の3'スプライス部位 (3'ss A1~A7, ただしA4は4a, b, cの3種類が知られている) の使い分けによって産生される¹²⁾。例をあげると、スプライシングがまったく行われなかった場合、Gag, Gag/Polタンパク質が発現する。また、5'ss D1と3'ss A1の組合せでスプライシング反応が行われると、Vifタンパク質が発現するようになる。このHIV mRNAの多様性にかかわる選択的スプライシングはウイルス自身でコードしたタンパク質を使っているわけではなく、宿主のRNA結合タンパク質を利用している。

HIVのRNA上にはスプライシングに対して抑制に働くexonic splicing silencer (ESS), intronic splicing silencer (ISS) や促進に働くexonic splicing enhancer (ESE) が多数存在し、ESSやISSに結合するhnRNP A1タンパク質やESEに結合するSRタンパク質がスプライス部位の選択に大きく関与していることが知られている。例えば、Tatのコード領域にはhnRNP A1が強く結合するISSとESS3が存在し、SRタンパク質と競合することでTatタンパク質の発現を調節している¹³⁾。実際、Tat1 mRNAの発現はSRタンパク質の1つであるSC35の過剰発現によって亢進し、SC35のノックダウンによって低下することが知られている (図2 B)¹⁴⁾。

HIV RNA上にあるスプライス部位は宿主のコンセンサス配列と比べて比較的弱く、約半分のRNAがスプライシング反応を一度も受けずにunspliced mRNA

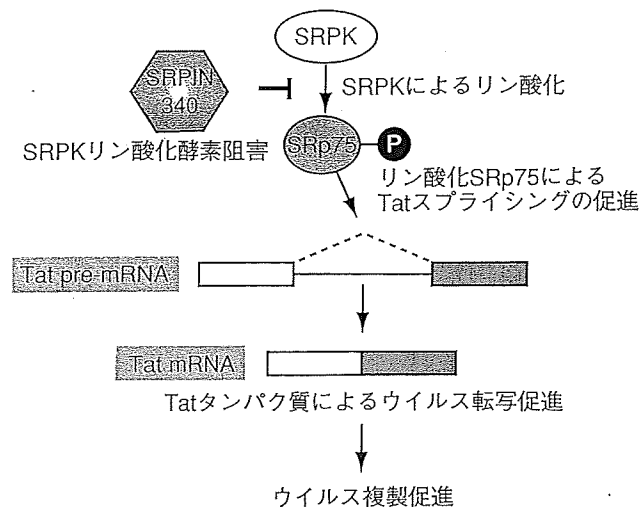


図3 SRタンパク質リン酸化酵素阻害剤によるウイルス増殖抑制

SRPKとSRp75をHIV-1 pNL4-3とともに発現させると、HIV-1転写活性化因子であるTatタンパク質の発現が促進し、HIV-1ウイルス産生量が増加した。SRPKリン酸化阻害剤であるSRPIN340はSRp75のリン酸化を抑えることによって、HIV-1増殖を抑制すると考えられる

として細胞質へと輸送される。一度もスプライシングを受けなかったmRNAからはGag, Gag/Polタンパク質が発現する。ここで、5'ss D2をコンセンサス配列と完全に一致させると5'ss D2直上流の3'ss A1が選択され、unspliced mRNAが減少するようになる。そのことで、GagやGag/Polタンパク質が減少し、さらにHIV-1ウイルス量の減少もみられるようになる¹⁵⁾。このことはスプライス部位の配列が完全にコンセンサス配列と一致していないことがHIV-1粒子産生にとって重要であることを示しており、選択的スプライシング制御の微妙なバランスが重要であることが明らかである。しかしながら、どのようなRNA結合タンパク質がどのような配列を認識して、HIV-1選択的スプライシングを正しく行っているのかは未だ不明な点が多く、解明すべき大きな課題が残されている。

われわれは、SRp75とSRタンパク質リン酸化酵素 (SR protein kinase : SRPK) の共発現によってHIV-1 p24の産生量が増加し、SRPKによるSRp75のリン酸化がTatのスプライシングを促進していることを見出した (図3)¹⁶⁾。また、われわれが合成したSRPKのリン酸化酵素阻害剤であるSRPIN340がHIV-1複製を抑制することも報告している¹⁶⁾。われわ

れの発見は、選択的スプライシングが抗ウイルス薬の新しいターゲットになりうることを示した初めての成果である。

③ 宿主 mRNA スプライシングへの干渉

DNA ウイルスであるヘルペスウイルス科のウイルスゲノムの中には、ウイルス間でよく保存され、RNA 結合ウイルスタンパク質をコードしている遺伝子が知られている。その代表的な例が単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus : HSV) の ICP27 (infected cell protein 27) である。

ICP27 は、N 末端側に RNA 結合にかかわるアルギニン・グリシンに富んだモチーフ RGG-box, C 末端側に hnRNP K の RNA 結合領域に相同性が高い KH ドメイン (KH1-KH3) を 3 つ有する¹⁷⁾。ICP27 タンパク質は、ウイルス遺伝子の転写反応を促進する転写調節因子として知られていたが、その後の解析で転写後の RNA 代謝においても重要な働きをしていることが示されてきた。免疫沈降や免疫染色などから、ICP27 タンパク質は snRNPs, SR タンパク質, SRPK1, SAP145 などいくつかのスプライシング関連因子と相互作用することや細胞内で共局在することが知られている。このことから、ICP27 タンパク質がスプライシング制御因子であることが考えられ、Sandri-Goldin らは ICP27 タンパク質が宿主のスプライシング反応をシャットオフし、宿主遺伝子発現を抑制するモデルを提唱している¹⁸⁾。彼女らは、野生型 HSV と ICP27 遺伝子を欠失した変異 HSV 感染細胞から抽出した核抽出液を用いて、 β -globin を基質とした *in vitro* スプライシング反応を行った。その結果、野生型 HSV 感染細胞核抽出液を用いた反応ではスプライシング産物は検出できなかったが、ICP27 欠失 HSV 感染細胞核抽出液を用いるとスプライシング産物は検出できるようになった。 β -globin のイントロンが構成的スプライシングによって除去される典型的なイントロンであることから、ICP27 タンパク質は宿主のすべてのスプライシング反応を阻害していると彼女らは考えている。

しかしながら、ICP27 タンパク質と snRNPs との相互作用がスプライシング反応阻害に必要とされないことも報告されていることから¹⁹⁾、すべてのイントロン除去を阻害しているわけではない可能性も考えられる。実際、われわれはウイルス増殖にかかわる遺伝子の選

択的スプライシング制御因子を探索したところ、ICP27 遺伝子を同定するに至った (野島ら, 論文投稿中)。また、ICP27 タンパク質はその他に解析したいいくつかの遺伝子のスプライシング (構成的, 選択的, マイナススプライシング含む) には影響がなかった。われわれの結果は、ICP27 タンパク質の RNA 結合には何らかのルールが存在することを示している。ICP27 タンパク質の RNA 認識配列は未だ不明であるため、現在われわれは ICP27 タンパク質標的遺伝子の網羅的解析をすすめているところである。

ヘルペスウイルス科には、HSV ICP27 の相同性遺伝子として EB ウイルスの SM (EB2) 遺伝子、カポジ肉腫関連ウイルスの ORF57 遺伝子などが知られており、最近になって、それらがスプライシング制御因子として働いていることが報告されている^{20) 21)}。Swaminathan らは、STAT1 のイントロン 23 中に 5' スプライス部位を見つけ出し、EB ウイルスの SM タンパク質を発現させると新しいスプライシングバリエント STAT1 α' を発現することを見出した。この SM タンパク質の選択的スプライシング制御は、UV クロスリンク実験から SM タンパク質がイントロン 23 の 5' スプライス部位付近に直接結合し、SF2/ASF タンパク質と競合することで得られる。ICP27 相同遺伝子はヘルペスウイルス科のすべてのウイルスにおいて存在し、少なくとも 4 種類のウイルスで同様な機能を有している。ヘルペスウイルス科以外では、アデノウイルスやワクシニアウイルス感染時には SR タンパク質の SF2/ASF が脱リン酸化されて減少し、逆に HPV 感染ではウイルスの E2 タンパク質が SF2 の発現を促進することが報告されている。それぞれのウイルスごとに異なったメカニズムで、宿主の mRNA スプライシング制御機構に干渉しているものと推測される。

まとめ

ウイルスは限定されたサイズのゲノムから多様なタンパク質を産生する必要があるため、mRNA の選択的スプライシングを積極的に活用していると考えられる。しかしながら、ウイルス自身がコードする RNA 結合タンパク質だけでは複雑なスプライシングの制御は行えず、宿主側の制御因子を利用することによって、ウイルス増殖に有利なスプライシングパターンをつくり出している。また、その結果として、宿主側の

mRNAのスプライシングにも多大な影響を与えているものと予想されている。また、われわれが開発したSRPK阻害剤は、スプライシング制御因子のリン酸化を抑えることによってさまざまなウイルスに対して増殖阻害活性を有していた。スプライシング制御因子を標的とした新規抗ウイルス薬が開発されるのもそう遠い話ではないと信じている。

文献

- 1) Berget, S. M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 : 3171-3175, 1977
- 2) Wang, E. T. et al. : Nature, 456 : 470-476, 2008
- 3) Kuroyanagi, H. et al. : Nat. Methods, 3 : 909-915, 2006
- 4) Ohno, G. et al. : Genes Dev., 22 : 360-374, 2008
- 5) David, C. J. & Manley, J. L. : Genes Dev., 22 : 279-285, 2008
- 6) Akusjarvi, G. : Front Biosci, 13 : 5006-5015, 2008
- 7) Moran, E. et al. : J. Virol., 57 : 765-775, 1986
- 8) Winberg, G. & Shenk, T. : EMBO J. 3 : 1907-1912, 1984
- 9) Yomoda, J. et al. : Genes Cells, 13 : 233-244, 2008
- 10) Tormanen, H. et al. : J. Biol. Chem., 281 : 36510-36517, 2006
- 11) Zheng, Z. M. & Baker, C. C. : Front Biosci., 11 : 2286-2302, 2006
- 12) Cochrane, A. W. et al. : Retrovirology, 3 : 18, 2006
- 13) Zhu, J. et al. : Mol. Cell, 8 : 1351-1361, 2001
- 14) Jablonski, J. A. & Caputi, M. : J. Virol., 83 : 981-992, 2009
- 15) Madsen, J. M. & Stoltzfus, C. M. : Retrovirology, 3 : 10, 2006
- 16) Fukuhara, T. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103 : 11329-11333, 2006
- 17) Smith, R. W. et al. : Biochem. Soc. Trans., 33 : 499-501, 2005
- 18) Hardy, W. R. & Sandri-Goldin, R. M. : J. Virol., 68 : 7790-7799, 1994
- 19) Sandri-Goldin, R. M. et al. : J. Virol., 69 : 6063-6076, 1995
- 20) Verma, D. & Swaminathan, S. : J. Virol., 82 : 7180-7188, 2008
- 21) Majerciak, V. et al. : J. Virol., 82 : 2792-2801, 2008

<著者プロフィール>

野島孝之：2001年北里大学薬学部卒業（水本清久教授）。その後、東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所の萩原正敏教授のもと転写と共役したスプライシング研究で学位（理学）を取得。'03～'06年COEスーパーシュウデント、'06年から同研究室の特任助教として従事、現在に至る。最近、ウイルス感染時や悪性腫瘍形成時の選択的スプライシング制御機構の解明をテーマにしている。

萩原正敏：1984年三重大学医学部卒業。同大学院でH-8などタンパク質リン酸化酵素阻害の作用機構を解明し学位（医学）を取得。名古屋大学医学部薬理学講座助手、Salk研究所ポスドク、名古屋大学医学部解剖学講座助教授等を経て、'97年1月より東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所形質発現制御学研究室教授。

