OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	アデノウイルス由来小分子RNAによるウイルス増殖促進メカニズムの解明
Author(s)	若林, 圭作
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72312
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

平成 30 年度　博士論文

アデノウイルス由来小分子 RNA による
ウイルス増殖促進メカニズムの解明

薬学研究科　分子生物学分野

若林　圭作

目次

緒論 1
本論 3
第一章　野生型 Ad および Ad ベクターが発現する VA-RNA の定量的解析 3
培養細胞における VA-RNA 発現プロファイルの解析 4
マウス肝臓における VA-RNA 発現プロファイルの解析 8
改良型 Ad ベクター（Ad-E4-122aT）における VA-RNA 発現プロファイルの解析 10
考察 12
第二章　VA-RNAII による Ad 増殖の促進 14
VA-RNAII による Ad 増殖の促進 17
VA-RNAII の 3'末端の配列が Ad の増殖に与える影響 19
VA-RNAII が宿主の miRNA 産生に与える影響 22
3'-mivaRNAII による Ad 増殖の促進 24
マイクロアレイ解析および *in silico* 解析による 3'-mivaRNAII 標的遺伝子の網羅的解析 .28
3'-mivaRNAII の標的候補遺伝子の絞り込み 28
mivaRNAII による CUL4A の発現抑制の詳細な解析 31
CUL4A 発現抑制時の Ad 増殖に関する詳細な解析 34
CUL4A の発現抑制による Ad 増殖促進機構の解析 37
c-Jun による Ad 増殖促進に関する詳細な検討 39
考察 42
結論 45
謝辞 46
実験材料一覧 47
引用文献 54

緒論

アデノウイルス (Ad) は、所謂「風邪症候群」を引き起こす主要病原ウイルスとして知られており、これまでに 51 種類の血清型、および 52 型以降の 30 種類以上の遺伝型が同定されている(1)。近年の分子生物学の進歩に伴い、遺伝子操作によって有益な特性を有したウイルスを創出するウイルス工学がめざましい発展を遂げているが、中でも Ad は、比較的低病原性であることや、ウイルスゲノムが二本鎖 DNA であり遺伝子組換えがし易いこと、ウイルス遺伝子の解析が進んでいることなどから、遺伝子組換えウイルスの開発研究が最も進んでいるウイルスの一つであり、これまでに Ad を基本骨格としたウイルスベクター(2, 3)や腫瘍溶解性ウイルス(4-6)が開発されてきた。これらの新しいバイオ技術は、がんや遺伝性の難治性疾患の新たな治療法となることが期待されている一方で、臨床応用に向けては克服すべき課題も残されており、さらなる技術開発の進展に向けた基礎研究が必要不可欠である。

ベクターとは、遺伝子そのものを薬物として用いる遺伝子治療において、DNA や RNA を生体内に投与するための運び屋である。DNA や RNA をそのまま生体内に投与しても細胞膜を透過することができず、細胞外で速やかに分解されてしまうため、遺伝子治療においてベクターは必要不可欠であり、ウイルスベクター、非ウイルスベクターを問わず様々なベクターが開発されてきた。それらの有用性を評価するにあたっては、遺伝子の導入効率や発現量、発現期間、安全性などがその機能を評価する際に重要なファクターであるが、Ad ベクターは、非分裂細胞を含む多くの細胞種に高効率に遺伝子導入が可能であることから、初期の遺伝子治療研究において最もよく研究されていたベクターである。しかしながら、1999 年に米国での Ad ベクターを用いた遺伝子治療臨床研究において死亡事故が発生したのを契機に、その安全性が疑問視され始めた(7)。その後も臨床研究は続けられ、これまでに全ベクターの中で最も多くヒトに投与されるなど(8)、ヒトへの使用実績は着実に積み上げられてはいるが、より安全な Ad ベクターの開発が望まれている。具体的には、Ad ベクターの投与後に誘導される自然免疫の活性化が、多量の炎症性サイトカインの産生と、それに伴う組織障害を引き起こすといわれていることから、自然免疫を活性化しない Ad ベクターの開発が望ましいとされている。また、現在汎用されている Ad ベクターは、Ad の増殖に必須である E1 遺伝子を導入遺伝子に置換して作製されるため、理論上、他の Ad 遺伝子は発現しないように設計されている。そのため Ad ベクターは自己増殖できず、病原性は欠失しているとされている。しかしながら実際には、欠損させた E1 遺伝子以外の約 90% の Ad 遺伝子がベクターゲノム上に残存しており、そこからわずかに産生されたウイルスタンパク質による細胞毒性や、獲得免疫の誘導も指摘されている(9, 10)。故に、E1 以外の Ad 遺伝子を一部、あるいは全て欠損させた Ad ベクターの開発が試みられてきたが、ベクターの調製が著しく煩雑になるなどのデメリットがあり、汎用されるには至っていない(11, 12)。Ad ベクターの安全性と汎用性を両立するためには、欠損させる Ad 遺伝子をより厳しく選

択する必要があると考えられる。

一方で腫瘍溶解性ウイルスは、がん細胞特異的に増殖し、がん細胞を死滅させるウイルスである。概念自体は古くから提唱され、野生型ウイルスを腫瘍溶解性ウイルスとして用いる研究が行われるも実用化には至っていなかったが(13)、近年の技術革新によって高機能な腫瘍溶解性ウイルスが次々と開発され、研究が加速している分野である。Ad 以外にもヘルペスウイルスやワクシニアウイルス、レオウイルスなどを基本骨格として用いたものが開発されており、多数の臨床研究が進行中であるが(14)、十分な治療効果が得られない症例も多くみられることから、さらなる改良が望まれている。腫瘍溶解性ウイルスによる抗腫瘍効果には、ウイルスの増殖そのものによる殺細胞効果のほかに、ウイルスによる抗腫瘍免疫の活性化が寄与しているといわれている。腫瘍溶解性ウイルスにはウイルスベクターと同様に種々の治療遺伝子発現カセットを搭載することができるため、現在では抗腫瘍免疫を増強するために Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF)などの免疫を活性化させる分子の発現カセットを搭載したものが盛んに研究されている。一方で、ウイルス自体の増殖効率を高めるような改良は、ほとんど行われてこなかった。当然、安全性に対する懸念もその一因であろうが、それ以前の問題として、Ad を含む腫瘍溶解性ウイルスの多くは元々の病原性が低いウイルスをベースとして開発されているために、ウイルスの増殖過程に関する知見が十分に蓄積していないことが、後者のアプローチによる開発を遅らせている原因であると考えられる。こうした背景から、私は、Ad ベクターや腫瘍溶解性 Ad の技術開発に向けて、Ad の生物学的特性を理解するための基礎研究が必要不可欠であると考えた。

一方で近年、タンパク質をコードしないノンコーディング RNA の研究が盛んに行われており、それに伴ってウイルスが発現するノンコーディング RNA も注目を集めている(15-17)。Ad のゲノムにも、1 または 2 種類の Virus-associated RNA (VA-RNA) と呼ばれる約 160 塩基の小分子ノンコーディング RNA がコードされている(18, 19)。VA-RNA は Ad の増殖を大きく促進し、現在汎用されている Ad ベクターにも VA-RNA 遺伝子が残存しているものの、VA-RNA については依然として不明な点が多いのが現状である。そこで本研究では VA-RNA に着目し研究を行った。第一章では、野生型 Ad、および Ad ベクターの VA-RNA 発現プロファイルを定量的に解析した。第二章では、2 種類ある VA-RNA のうち、VA-RNAII に着目し、その生理機能の解明を試みた。

本論

第一章　野生型 Ad および Ad ベクターが発現する VA-RNA の定量的解析

生体内に投与された Ad ベクターは自然免疫を誘導し、炎症性サイトカインや I 型 Interferon (IFN) の産生を誘導することが報告されている。また、Ad ベクターによって誘導される自然免疫活性化は、その後の Ad タンパク質および搭載遺伝子産物に対する獲得免疫を誘導することで、最終的には遺伝子発現効率の減弱につながることが知られている。Ad ベクター作用時の獲得免疫の活性化には、Ad ベクターゲノム上に残存している Ad 遺伝子の僅かな発現が寄与すると報告されているのに対して、自然免疫の活性化機構については不明な点が多い。

一方で当研究室を含む過去の研究では、VA-RNA が非増殖型 Ad ベクター（従来型 Ad ベクター）からも転写され、細胞内の核酸認識センサーである RIG-I/MDA5 を介した経路により I 型 IFN の産生を誘導することで、自然免疫を活性化することが明らかとなっている(20, 21)。さらに近年、VA-RNA は転写後、マイクロ RNA (miRNA) と同様の機構でプロセシングを受けることで宿主細胞が発現する miRNA の成熟化を競合的に阻害することが報告された(22, 23)。このような VA-RNA の生理機能は、宿主の遺伝子発現を制御することで、Ad の増殖に適した細胞内環境を造り出しているものと推察される。加えて当研究室では、VA-RNA が short-hairpin RNA（shRNA）のプロセシングを競合的に阻害することで、shRNA 発現 Ad ベクターによる RNA 干渉の効果を低下させることを報告している(24)。

こうした背景から、Ad ベクター作用時に発現する VA-RNA が、副作用の発現や、導入遺伝子の発現低下に何らかの形で寄与している可能性が考えられた。しかしながら、Ad ベクターの VA-RNA 発現プロファイルは詳細には明らかとなっていなかった。そこで本章では、Ad ベクター、および野生型 Ad 作用後の VA-RNA 発現プロファイルを、培養細胞およびマウスを用いて定量的に解析した。

【実験材料と方法】

Cells

SK HEP-1 細胞（ヒト肝癌由来細胞株）は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (10％ FBS, 抗生物質含有）、293 細胞 (ヒト胎児腎由来細胞株)は DMEM (10％ FBS, 抗生物質, L-glutamine 含有)、HUVEC (normal human umbilical vein endothelial cells)は EGM-2 をそれぞれ用いて、37℃、飽和蒸気圧、5％CO_2 存在下で培養した。なお、本研究において使用した FBS はすべて 56℃、30 分間の非働化処理を行った後に使用した。

Mice

C57BL/6 マウス（メス、5 週齢）は日本 SLC より購入した。すべての動物実験は、大阪大学動物実験規程に則って行った。

Viruses

野生型 Ad（WT-Ad; Ad serotype 5）は、American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。Ad-CAL2, Ad-E4-122aT-CAL は、当研究室で過去に作製されたものを使用した(25)。各種 Ad は、HEK293 細胞に 3-4 次感染させることで大量調製した(26)。得られた各 Ad を塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し、10 mM Tris (pH 7.5), 1 mM $MgCl_2$, 10% glycerol からなる溶液で透析した。各種 Ad の生物学的タイターは Adeno-X Rapid Titer Kit により測定した。

Real-time RT-PCR analysis

各細胞、およびホモジネートした肝臓から、ISOGEN II を用いて Total RNA を抽出し、DNaseI でゲノム DNA を除去した。Superscript VILO cDNA synthesis kit を用いて逆転写反応を行い cDNA を合成した後に、Fast SYBR Green Master Mix, Taqman 2×Fast Universal PCR Master Mix を用いて定量的 PCR を行った。測定には StepOnePlus real-time PCR systems を用いた。

Statistical analysis

実験結果は、平均値±S.D.として表示した。有意差検定には、Student's t-test を用いた。

【結果】

培養細胞における VA-RNA 発現プロファイルの解析

まず、培養細胞における VA-RNA 発現量を調べるために、正常細胞である HUVEC に WT-Ad、または Luciferase 発現カセットを搭載した従来型 Ad ベクター(Ad-CAL2) を MOI 10、または 100 で作用させ、VA-RNA 発現量を定量的 RT-PCR（qRT-PCR）法により解析した（Fig. 1）。作用後 6 時間以降全てのタイムポイントにおいて、WT-Ad, Ad-CAL2 作用群のいずれにおいても、VA-RNA の発現が確認された。WT-Ad と Ad-CAL2 を比較すると、WT-Ad 作用群では Ad ゲノムの複製が起こるため、VA-RNA コピー数が経時的に増加し、作用後 96 時間では 6 時間後と比較して数万倍にも達した。一方で、Ad-CAL2 作用群における VA-RNA コピー数は、作用後 12 時間をピークとして、発現量が維持、または緩やかに減少していた。これは、Ad ベクターが細胞内で増殖しなかったためであると考えられる。その結果、Ad ベクターから転写される VA-RNA コピー数は、WT-Ad と比較して非常に低くなり、たとえば MOI 100 で作用させた群における VA-RNAI 発現量は 48, 96 時間後でそれぞれ約 2000, 12000 倍の差がついた。過去の研究では、WT-Ad の増殖時に発現する VA-RNA は、1 細胞当たり 1×10^8 コピーともいわれており(28)、本研究で得られたデータから Ad ベクター作用

時には 1 細胞あたり数千～数万コピーの VA-RNA が発現し、維持されているものと予想される。

一方で、MOI10, 100 で比較してみると、Ad ゲノムが増殖する、しないに関わらず、VA-RNA コピー数は初期の作用量に概ね依存していた。また、VA-RNAI と II の比較では、WT-Ad, Ad-CAL2 のいずれにおいても同程度のコピー数が検出された。

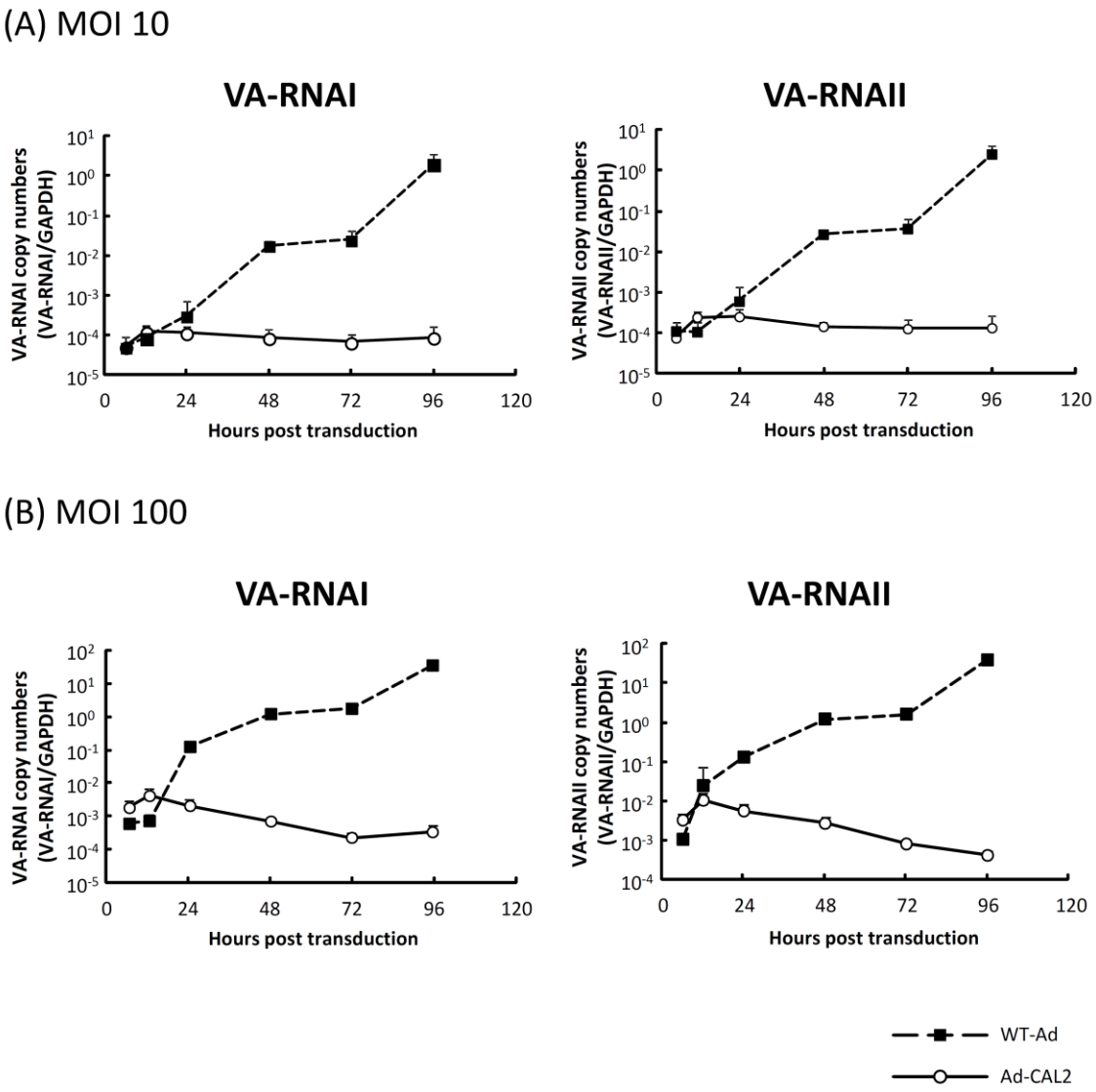


Figure 1: Time course profiles of VA-RNA expression in HUVECs following treatment with an Ad vector and WT-Ad. HUVECs were treated with WT-Ad or Ad-CAL2 at MOIs of 10 (A) and 100 (B) for 1 h, and the VA-RNA expression levels were determined 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h after treatment by real-time RT-PCR analysis. The data are expressed as means ±S.D. (n = 3 or 4).

次に、ヒト肝癌由来細胞株である SK HEP-1 細胞を用いて、同様の検討を行った。なお、Ad ベクターは理論上増殖しないとされているが、がん組織由来の細胞株ではわずかに増殖することが知られている。しかし、SK HEP-1 細胞においては、そのような Ad ベクターの自己増殖は極めて低いことが確認されている(27)。実験の結果、SK HEP-1 細胞においても各 Ad から VA-RNA が発現することが確認された（Fig. 2）。また VA-RNA 発現量についても HUVEC と同様で、Ad-CAL2 が WT-Ad を大きく下回る結果となった。以上の結果から、Ad ベクターが増殖しない細胞であっても、非増殖型 Ad ベクターより、上記の発現プロファイルで VA-RNA が発現することが示された。

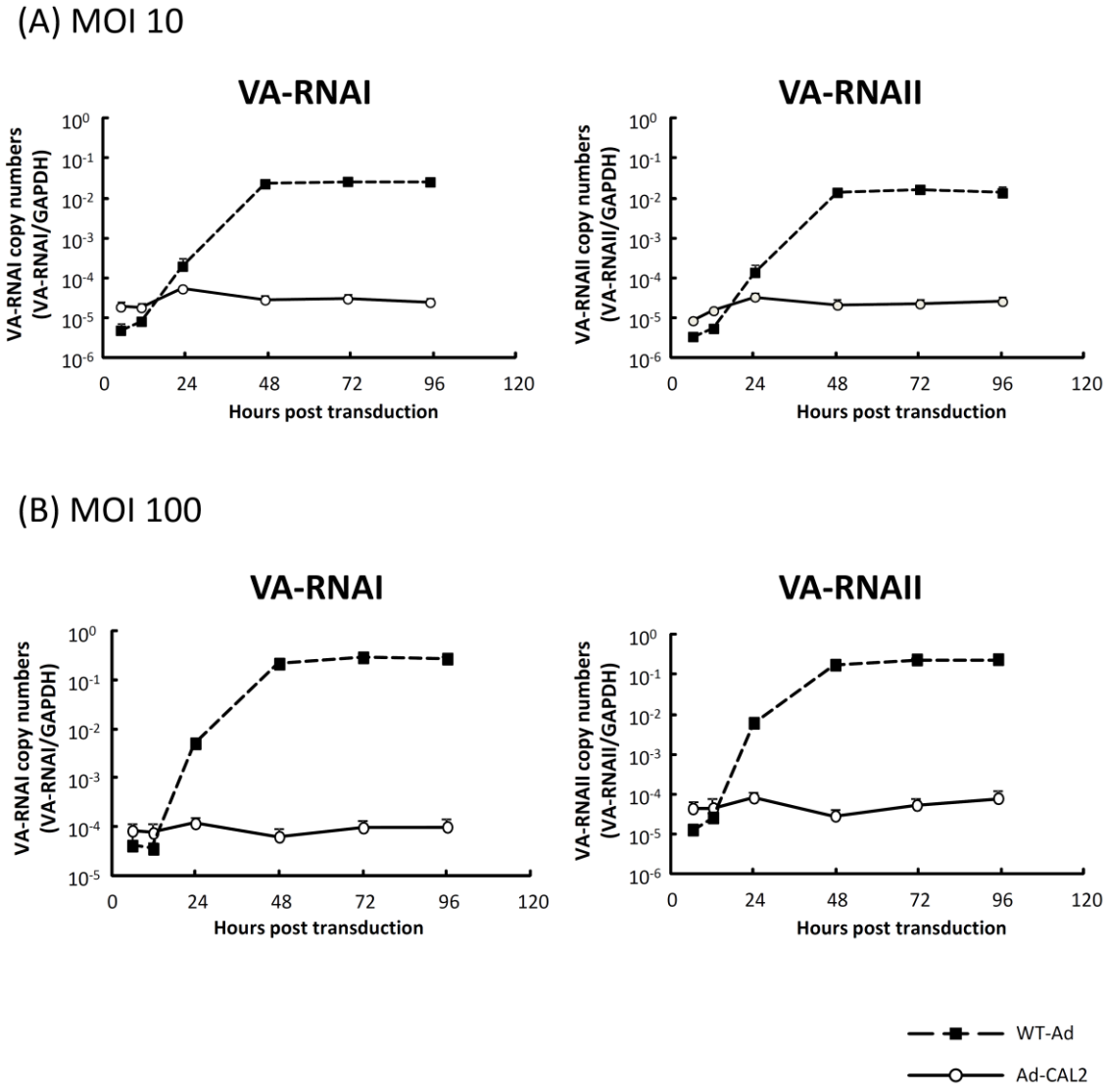


Figure 2: Time course profiles of VA-RNA expression in SK HEP-1 cells following treatment with an Ad vector and WT-Ad. SK HEP-1 cells were treated with WT-Ad or Ad-CAL2 at MOIs of 10 (A) and 100 (B) for 1 h, and the VA-RNA expression levels were determined 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h after treatment by real-time RT-PCR analysis. The data are expressed as means ±S.D. (n = 3 or 4).

マウス肝臓における VA-RNA 発現プロファイルの解析

次に、生体内における VA-RNA 発現量を調べるために、WT-Ad, Ad-CAL2 を 10^{10} IFU/mouse で尾静脈内投与し、マウス肝臓における VA-RNA の発現量を解析した。その結果、WT-Ad, Ad-CAL2 のいずれにおいても、VA-RNAI, II ともに発現が確認されたが、培養細胞でみられたように、その発現プロファイルは各 Ad 間で大きく異なるものであった。WT-Ad 投与群においては、投与後 24 時間から 48 時間後にかけて VA-RNA 発現量が増加し、その 96 時間後にかけて減少に転じていた。一方で Ad-CAL2 投与群においては、投与後 24 時間から経時的に VA-RNA コピー数が減少しており、WT-Ad と比較しても数十～数百倍程度低い発現量であった。また、非増殖型 Ad ベクターでは、各種 Ad 遺伝子が E1 遺伝子非依存的に発現することが知られているが、これらの遺伝子群に関しても VA-RNA と似たような発現プロファイルを示していた（Fig. 3）。以上の結果から、マウス肝臓においても、他の Ad 遺伝子と同様に、非増殖型 Ad ベクターより VA-RNA が発現することが示された。

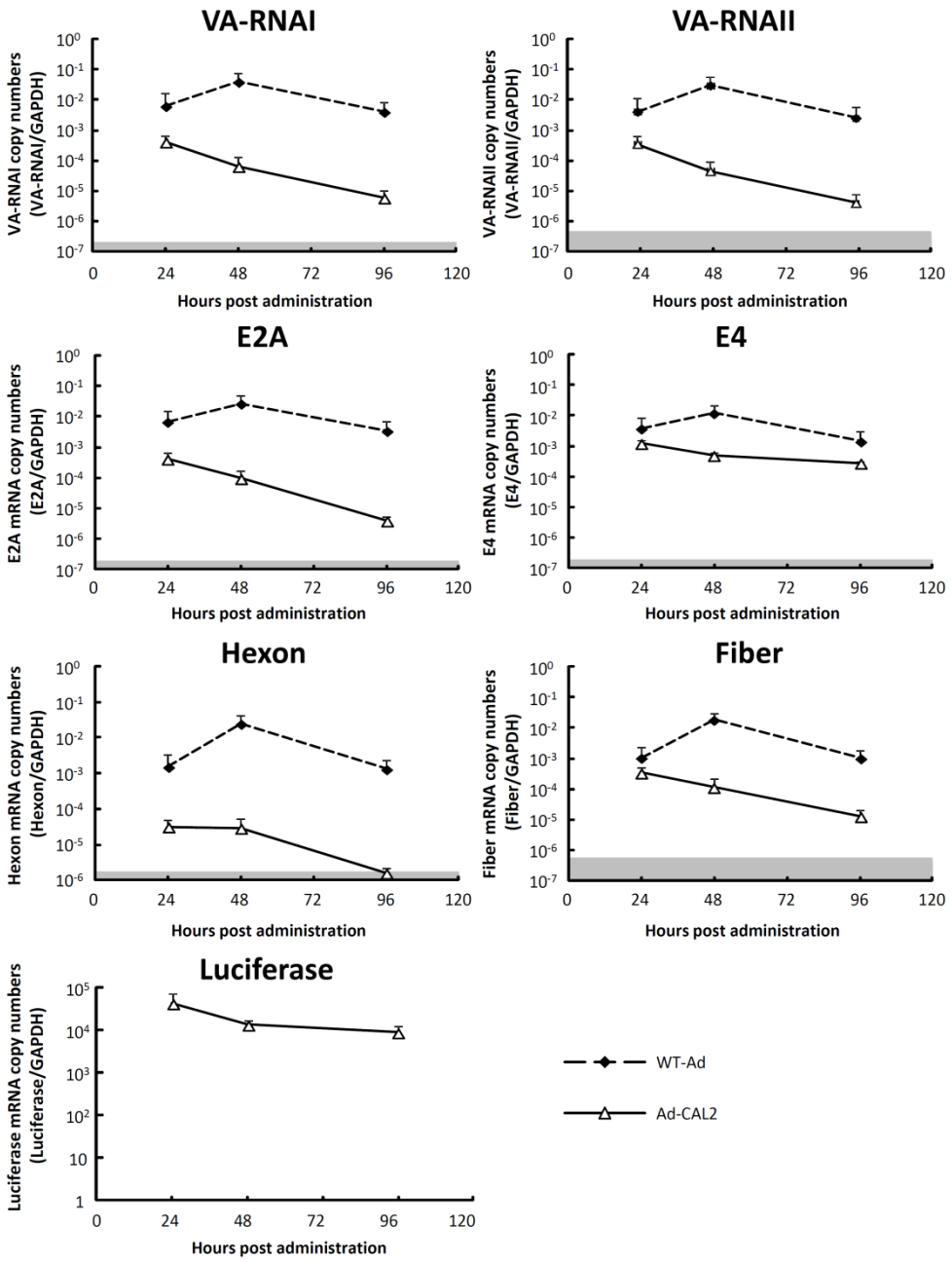


Figure 3: Time course profiles of VA-RNA expression in mouse liver following administration with an Ad vector and WT-Ad. C57BL/6 mice were intravenously administered with Ad-CAL2 or WT-Ad at a dose of 1×10^{10} IFU/mouse. Livers were harvested 24, 48, and 96 h after administration. The Ad gene expression levels were determined by real-time RT-PCR analysis. The gray shaded boxes indicate RNA levels with no significant differences between gene expression in the liver transduced with Ad-CAL2 and mock-transduced cells ($p>0.05$). The data are expressed as means ± S.D. (n=5-6).

改良型 Ad ベクター（Ad-E4-122aT）における VA-RNA 発現プロファイルの解析

先にも述べたように、非増殖型 Ad ベクターにおいても、Ad ベクターゲノム上の各種 Ad 遺伝子がわずかに発現することが知られており、これが Ad ベクター投与後にみられる組織障害や、導入遺伝子の発現低下の主要な原因であると考えられている。これに対して当研究室では、E4 遺伝子の下流に肝細胞で豊富に発現している miRNA である miR-122a の相補配列を挿入することで、肝細胞における E4 遺伝子の発現を抑制し、肝障害の減弱と搭載遺伝子の発現延長が可能な Ad-E4-122aT を開発している(25)。興味深いことに本ベクターでは、E4 遺伝子のみならず他の Ad 遺伝子の発現をも抑制可能であることが分かっているが、本ベクターにおいて VA-RNA の発現も抑制されているかという点に関しては不明であった。そこで、本ベクターに Ad-CAL2 と同じ Luciferase 発現カセットを搭載した Ad-E4-122aT-CAL（Fig. 4A）を投与したマウスの肝臓における VA-RNA の発現量を、Ad-CAL2 を投与したマウスと比較した。その結果、E4 遺伝子の発現抑制とともに、VA-RNAI, II の発現も顕著に抑制されていた。一方で、ルシフェラーゼの発現量に有意な差は観察されず、VA-RNA の発現抑制が遺伝子導入効率の差によるものではないことが示された（Fig. 4B）。以上の結果から、Ad 遺伝子の発現低下によって VA-RNA の発現も抑制されることが明らかとなり、何らかの Ad 遺伝子が VA-RNA の発現に寄与することが示唆された。

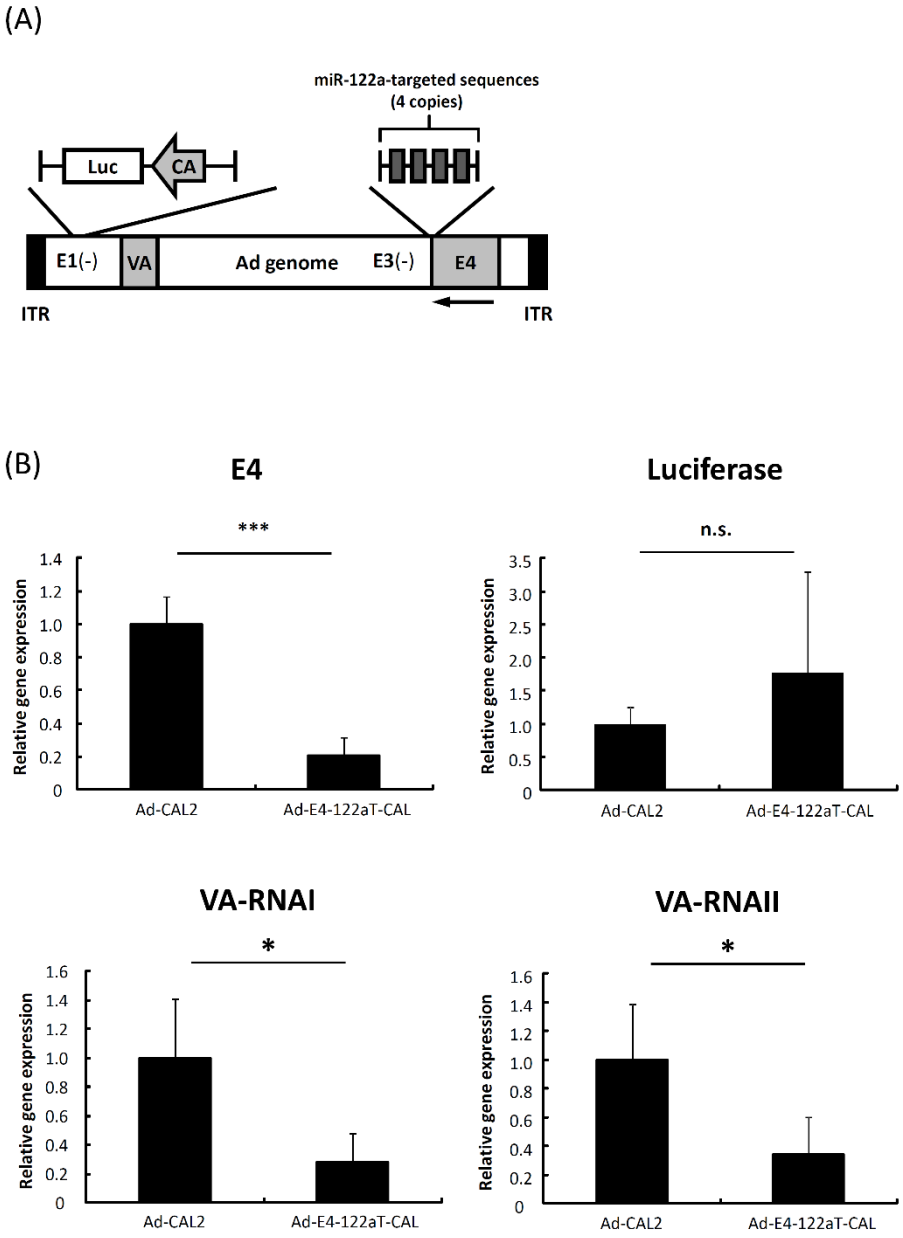


Figure 4: Reduction in VA-RNAI expression in mouse liver following administration with Ad-E4-122aT-CAL. (A) Schematic diagram of Ad-E4-122aT-CAL. A luciferase expression cassette was inserted into the E1-deleted region. CA, chicken beta-actin promoter with cytomegalovirus, CMV, enhancer; ITR, inverted terminal repeat; VA, virus-associated RNAI and II; 122aT, miR-122a−targeted sequences. (B) C57BL/6 mice were intravenously administered Ad-CAL2 or Ad-Luc-E4-122aT at a dose of 1×10^{10} IFU/mouse. Two days after administration, the livers were harvested. The Ad gene expression levels in the livers were determined by real-time RT-PCR analysis. The data are expressed as means ± S.D. (n=5-6). *p<0.05, ***p<0.0001.

【考察】

本章では、Ad ベクターによる自然免疫活性化機構の解明に向けて、VA-RNA の発現プロファイルの解析を行い、従来のノザンブロットによる解析では得られなかった VA-RNA の定量的な発現量のデータを得ることに成功した。先行研究では、Ad ベクターの作用後 12 時間以内に IFN-βの発現が確認されていたが(21)、本研究において培養細胞では作用後 6 時間から VA-RNA の発現が検出されたことから、作用直後から発現してくる VA-RNA が自然免疫を活性化している可能性が示唆された。また作用後 24 時間以降では、Ad-CAL2 群の VA-RNA 発現量は WT-Ad と比較して数千～数万分の一程度であった。

一方、マウス肝臓においては、Ad-CAL2 では WT-Ad と比較して数十～数百分の一程度の VA-RNA が発現することが明らかとなった。マウス肝臓では、培養細胞と比較して WT-Ad と Ad-CAL2 の VA-RNA 発現量の差が小さくなったが、これはマウスを含むげっ歯類の細胞では、ヒト Ad がほとんど増殖できないことに起因すると考えられる。一般的に、ウイルスの種特異性は感染受容体の有無によって規定されるが、興味深いことに、げっ歯類の細胞はヒト Ad の感染受容体である Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR)を発現するとともに、マウス CAR とヒト CAR の相同性も高い。すなわち、Ad がマウス細胞内に侵入可能であるにもかかわらず、ゲノムの複製効率が低く、子孫ウイルス粒子に至ってはほとんど産生されないという珍しい形の特異性を示すことが知られており、その原因は全く不明である(29)。加えて動物個体では、培養細胞と比較し、自然免疫の活性化や組織障害によるウイルス感染細胞の細胞死などが顕著に誘導されるため、WT-Ad であってもウイルスは速やかに排除されているものと予想される。故にマウス肝臓では、WT-Ad の VA-RNA 発現量が低くなっていると考えられ、*in vivo* においても自然免疫の活性化を誘導しうるだけの VA-RNA が発現しているものと推測される。

さらに、マウス肝臓での VA-RNA 発現プロファイルが、他の Ad 遺伝子発現プロファイルと似たような挙動を示したことから、他の Ad 遺伝子が VA-RNA の発現に寄与している可能性が考えられた。そこで、肝臓における Ad 遺伝子の発現を抑制可能な改良型 Ad ベクターである Ad-E4-122aT(25)投与時の VA-RNA 発現量を解析した。その結果、Ad 遺伝子の発現を抑制することで VA-RNA の発現も抑制されることが明らかとなった。一方で、ルシフェラーゼの発現量に有意差はなく、むしろ増加傾向であったことから、E4 遺伝子、またはその他の Ad 遺伝子の発現抑制により、VA-RNA の転写が抑制されたものと考えられる。VA-RNA は box B 配列と呼ばれる内部プロモーター依存的に RNA ポリメラーゼ III によって転写されるため、RNA ポリメラーゼ II によって転写される他の Ad 遺伝子とは全く異なる機構で発現を制御されていると推測されるが、どの Ad 遺伝子が VA-RNA の発現に寄与しているのかを含めて、その機構は全く不明である。

Ad ベクターから産生されたウイルスタンパク質は、主に細胞毒性や獲得免疫の活性化に関与すると報告されており、Ad-E4-122aT ベクターは、Ad 遺伝子の発現抑制というアプロ

ーチで肝障害を軽減することに成功している。しかしながら、Ad-E4-122aT ベクターを用いても肝障害が完全に消失するわけではなく、自然免疫の抑制というアプローチでの改善の余地があると思われる。一方で、VA-RNA は転写産物そのものが自然免疫を誘導するという点で他の Ad 遺伝子とは異なっているが、Ad-E4-122aT ベクターにおいてもその発現が確認されたことから、Ad-E4-122aT ベクターで VA-RNA を欠損させることで、より安全性の高い Ad ベクターになることが期待される。加えて、Ad ベクターの VA-RNA 発現量は、WT-Ad と比較すると極めて低いものであったが、それでも宿主の miRNA 産生機構に影響を与えるということが示唆されている。以上より、VA-RNA 欠損 Ad ベクター（AdΔVR ベクター）は次世代型 Ad ベクターとして極めて有用であると考えられる。

しかしながら、AdΔVR ベクターは、従来型 Ad ベクターと比較して増殖効率が極めて低く、Ad ベクター作製用のパッケージング細胞である HEK293 細胞で VA-RNA をトランスに発現させても、十分な量の AdΔVR ベクターを得ることはできていない(30)。故に、VA-RNA が Ad の増殖を促進するメカニズムを解明することが、次世代型 Ad ベクターの開発に重要であると考えられる。

第二章　VA-RNAII による Ad 増殖の促進

Ad ベクターや腫瘍溶解性 Ad の基本骨格として用いられる 5 型 Ad を含め、全血清型 Ad 中の約 80%の血清型は、2 種類の VA-RNA (VA-RNAI, II) をコードしている(18, 19)。特に VA-RNAI は Ad の増殖を大きく促進し、VA-RNAI の欠損により Ad 増殖は数十分の一にまで抑制される(31, 32)。そのメカニズムとしては、抗ウイルス応答に重要な Double-stranded RNA-dependent protein kinase (protein kinase R; PKR) の活性化を阻害する機構がよく知られている(28, 33)。PKR は本来、二本鎖 RNA を認識し、活性化することで細胞のタンパク質合成を停止させる分子であるが、VA-RNA は分子内での塩基対形成により、複数のステムループ構造を含む高度な二次構造をとることが知られており(34)、これにより PKR に対するデコイとして機能するものと考えられている。一方で、VA-RNAII は VA-RNAI と約 60%相同な配列を有しており、同じように複雑な二次構造をとるものの、VA-RNAI と比較して PKR の阻害能が低く(35)、VA-RNAII を単独で欠損させても Ad の増殖はほとんど変わらないことが報告されている。しかし、VA-RNAI を欠損させたうえで VA-RNAII も欠損させると、VA-RNAI のみを欠損させた場合と比較し Ad の増殖が数分の一に抑制されることから(32, 36)、VA-RNAII も何らかの形で Ad の増殖に寄与しているものと思われる。しかしながら、VA-RNAII がどのようなメカニズムを介して Ad の増殖に寄与しているかは、明らかとなっていない。

さらに近年、VA-RNA が宿主細胞の miRNA の成熟化に関わる酵素である Dicer によって切断され、VA-RNA 由来 miRNA (mivaRNA) を産生することが報告されている(37, 38)。miRNA は、RNA-induced silencing complex (RISC) を形成し、標的遺伝子 mRNA の 3'非翻訳領域 (3' untranslated region; 3'UTR) に結合することでその発現を抑制する分子である。Ad 以外のウイルスに関してもウイルス由来 miRNA が、ウイルスや宿主の遺伝子発現を抑制することで、ウイルスの感染に寄与することが報告されている(16, 17, 39-44)。mivaRNA も RISC に取り込まれることから(45-47)、mivaRNA が何らかの標的遺伝子の発現を抑制することで Ad の増殖に寄与すると考えられた。ところが当研究室のこれまでの研究で、VA-RNAI に由来する mivaRNAI は Ad の増殖を促進せず、むしろ VA-RNAI は Dicer によって mivaRNAI にプロセシングされることでその機能を失うことが明らかとなっている(48, 49)。一方でこれまでに、mivaRNAII が mivaRNAI よりも RISC 中に多く取り込まれていることが報告されており(45-47)、mivaRNAII が Ad の増殖に寄与することが示唆されている。そこで本章では、VA-RNAII の生理機能の解明に向けて、mivaRNAII に着目し、種々の検討を行った。

【実験材料と方法】

Cells

HeLa 細胞（ヒト子宮頚部癌由来細胞株）、A549 細胞（ヒト肺癌由来細胞株）は DMEM (10% FBS, 抗生物質含有）、293 細胞, 293T 細胞（ヒト胎児腎由来細胞株）は DMEM (10% FBS, 抗生物質, L-glutamine 含有) を用いて、37℃、飽和蒸気圧、5%CO_2 存在下で培養した。なお、本研究において使用した FBS は、すべて 56℃、30 分間の非働化処理を行った後に使用した。

Plasmids

VA-RNAI, II の発現を欠失したコントロールプラスミドである pAdVAntage-ΔNaeI、及びそれぞれ VA-RNAI, II のみを発現するプラスミドである pVAI, pVAII は、VA-RNAI, II を共発現するプラスミドである pAdVAntage (Promega) をもとに当研究室で過去に作製された(49)。

3'末端に変異をもつ VA-RNAII を発現するプラスミドである pVAII-mut は、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) と、プライマーとして QC pVAIImutS 及び QC pVAIImutAS (Table 1) を用いて、pVAII に変異を挿入することで作製した。

3'-mivaRNAII, miR-27b に相補的な配列を RLuc 遺伝子の 3'UTR に挿入したレポータープラスミドである psiCHECK-2-3'-mivaRNAIIT, psiCHECK-2-3'-mivaRNAIImutT, psiCHECK-2-miR-27bT,は、psiCHECK-2 (Promega) を *Xho*I/*Not*I 処理することで得たフラグメントを、合成オリゴ DNA である 3'-mivaRNAIIT-S, AS、3'-mivaRNAIImutT-S, AS、miR-27bT-S, AS (Table 1) をそれぞれハイブリダイゼーションしたフラグメントとライゲーションすることで作製した。

RLuc 遺伝子の下流に CUL4A 遺伝子の 3'UTR を挿入したレポータープラスミドである psiCHECK-2-CUL4A-3'UTR は、以下のように作製した。まず、HeLa 細胞より調製された cDNA から、CUL4A 遺伝子の 3'UTR を KOD Plus を用いた PCR によって増幅した。得られた PCR 断片を、psiCHECK-2 を *Xho*I/*Pme*I 処理することで得たフラグメントとライゲーションすることで、psiCHECK-2-CUL4A-3'UTR を得た。さらに、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて、psiCHECK-2-CUL4A-3'UTR の 3'-mivaRNAII 予測結合配列に変異を挿入することで、psiCHECK-2-CUL4A-3'UTR-mut を得た。

Determination of Ad genome copy numbers

各細胞を回収後、DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて Total DNA を抽出した。Ad ゲノムコピー数は、5 型 Ad (WT-Ad) は Taqman 2×Fast Universal PCR Master Mix を、31 型 Ad (Ad31), 11 型 Ad (Ad11), 35 型 Ad (Ad35), 4 型 Ad (Ad4)のゲノムコピー数は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix をそれぞれ用いて定量的 PCR により測定した。測定には StepOnePlus real-time PCR systems を用いた。各 Primer 及び Probe の配列は、Table 1 に示した。

Infectious titer assay

Ad 感染細胞をトリプシンで剥離、回収し、凍結融解操作を 3 回繰り返した後に、遠心することでウイルスを含む上清を得た。得られたウイルス液を HEK293 細胞に添加し、48 時間後に Adeno-X Rapid Titer Kit を用いて、Ad 感染細胞数を測定した。

Luciferase reporter assay

HeLa 細胞に Lipofectamie2000 を用いて各レポータープラスミドと、各 VA-RNA 発現プラスミド（pAdVAntage-ΔNaeI, pVAII, pVAII-mut）または 3'-mivaRNAII mimic を同時にトランスフェクションした。48 時間インキュベートした後に、Dual Luciferase Reporter Assay System、TriStar LB 941 Multimode Microplate Reader を用いて Luciferase 活性を測定した。

Viruses

WT-Ad, Ad4, Ad11, Ad31, Ad35 は、ATCC より購入した。これらの Ad は、HEK293 細胞に 3-4 次感染させることで大量調製した(26)。VA-RNAI 及び VA-RNAII 欠損 Ad である Sub720 (21, 36)および VA-RNAI 欠損 Ad である Sub722(32)は、Dr. G. Akusjarvi (Uppsala University, Sweden) から供与していただき、293T 細胞で大量調製した。 得られた各 Ad を塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し、10 mM Tris (pH 7.5), 1 mM $MgCl_2$, 10% glycerol からなる溶液で透析した。Ad の物理学的タイター（virus particle: vp）は Maizel らの方法(50)により測定し、生物学的タイター（infectious unit: IFU）は Adeno-X Rapid Titer Kit により測定した。

Determination of miR-27b copy number

miR-27b 発現レベルの測定は、各細胞から、ISOGEN を用いて Total RNA を抽出し、Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit、Taqman MicroRNA Assay Kit、StepOnePlus real-time PCR systems を用いて行った。

Western blotting assay

Whole-cell lysate 30 μg を 5×Sample Buffer (250 mM Tris-HCl (pH6.8), 30% 2-mercaptoethanol, 10% SDS, 20% glycerol) と混合した後 95℃で 5 分処理し、10%の変性ポリアクリルアミドゲルを用いて還元条件下で電気泳動を行った。電気泳動後のゲルを PVDF メンブレンに転写し、5%スキムミルク/TBS-T、または 3%BSA/TBS-T でブロッキング後、各一次抗体、二次抗体を用いて検出した。発色は Chemi-Lumi One Super を用い、LAS3000 で検出を行った。定量化は Image J を用いて行った。

Microarray gene expression analysis

HeLa 細胞に siControl、または 3'-mivaRNAII mimic をトランスフェクションし、48 時間培養した。その後、Total RNA を回収し、Agilent 2100 Bioanalyzer platform を用いて、Quality check

を行った。これらのサンプルを用いた DNA マイクロアレイ及びその解析は、タカラバイオに依頼した。

Prediction of 3'-mivaRNAII target genes

miRNA の標的遺伝子予測システムである miRDB (51)を用いて、3'-mivaRNAII の標的遺伝子を探索した。

Real-time RT-PCR analysis

第一章に準じて行った。

ChIP assay

1%ホルムアルデヒド/ D-MEM でクロスリンクした Ad 感染細胞をセルスクレーパーで剥離、回収し、SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit のプロトコルに従ってクロマチンを調製した。キットに添付の Micrococcal Nuclease で DNA を断片化し、DNA が適度なサイズに断片化されていることを電気泳動によって確認したのち、各種抗体で 2~10μg のクロマチンを免疫沈降した。ネガティブコントロールの抗体には、キットに添付の Normal Rabbit IgG を使用した。サンプルをプロテイン G 磁気ビーズを用いて洗浄したのち、脱クロスリンク、精製し、Fast SYBR Green Master Mix と各種プライマー(Table 1)を用いて DNA 断片の検出を行った。

Statistical analysis

第一章に準ずる。

【結果】

VA-RNAII による Ad 増殖の促進

まず、VA-RNAII が Ad 増殖を促進するか調べるために、VA-RNAII 発現プラスミド (pVAII) を導入した HeLa 細胞に WT-Ad を感染させ、細胞内の Ad ゲノムコピー数を経時的に解析した。感染後 12 時間以降で Ad ゲノムの複製が認められたが、VA-RNAII を強制発現させた細胞では、コントロールプラスミド (pAdVAntage-ΔNaeI; ΔNaeI) を導入した群と比較して、感染後 24、48 時間における Ad ゲノムコピー数が有意に増加していた (Fig. 5A)。一方で、感染後 3 時間では Ad ゲノムコピー数に差がないことから、VA-RNAII の発現は Ad の内在化効率には大きく影響していないことが示唆された。また、感染後 12 時間までは pVAII 由来の VA-RNAII 発現量が Ad ゲノム由来の VA-RNAII を大きく上回っていたことから、導入したプラスミドから発現した VA-RNAII が、Ad の増殖に寄与しているものと考えられる(Fig. 5B)。

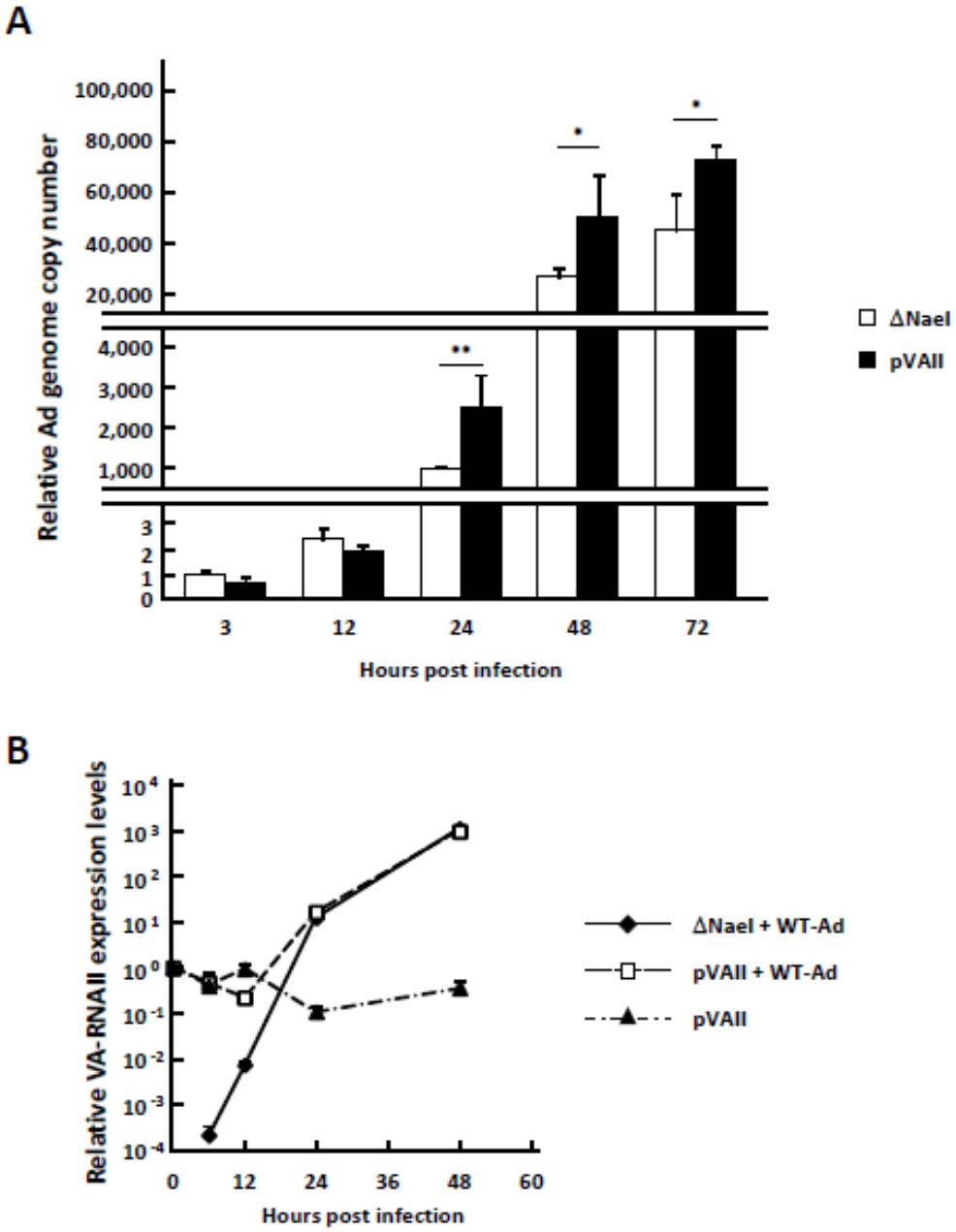


Figure 5: Ad replication is upregulated by overexpression of VA-RNAII. (A) HeLa cells were transfected with a control plasmid (pAdVAntage-ΔNaeI; ΔNaeI) or a VA-RNAII-expressing plasmid (pVAII) for 48 h, followed by infection with WT-Ad at 100 VPs/cell. After 3, 12, 24, 48, and 72 h of incubation, the Ad genome copy numbers were determined by qPCR analysis and expressed as relative values (ΔNaeI, 3 h postinfection=1). (B) HeLa cells were transfected with ΔNaeI or pVAII for 48 h, followed by infection with WT-Ad at 100 VPs/cell. After 0, 6, 12, 24, and 48 h of incubation following Ad infection, the copy numbers of VA-RNAII were determined by qRT-PCR analysis and expressed as relative values (pVAII, 0 h postinfection=1). These data are expressed as means ± SD (n=4). *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001 (Student's t-test).

VA-RNAII の 3'末端の配列が Ad の増殖に与える影響

VA-RNAII が Dicer により切断されると、VA-RNAII の 5'末端および 3'末端に由来する 2 種類の mivaRNAII (5'-mivaRNAII, 3'-mivaRNAII) が産生される。これら 2 種類の mivaRNAII のうち、3'-mivaRNAII が効率よく RISC に取り込まれることが既に報告されている(45-47)。そこで次に、VA-RNAII の 3'-mivaRNAII に相当する配列に変異をもつ VA-RNAII を発現するプラスミド (pVAII-mut) を作製し、VA-RNAII の 3'-mivaRNAII に相当する配列が Ad の増殖に与える影響を解析した。その結果、pVAII を導入した細胞において観察された Ad 増殖の促進が、pVAII-mut 導入細胞においては観察されなかった (Fig. 6A)。また、VA-RNAI, II 欠損 Ad（Sub720）では内在性の VA-RNAII が発現しないため、pVAII の導入による増殖促進効果が WT-Ad よりも大きくなると考えていたが、WT-Ad と同様の結果が得られた。これは、Fig. 5B で示したように、感染後 24 時間までは内在性の VA-RNAII 発現量が低く、Ad 増殖に対する寄与が小さいためであると考えている。加えて、A549 細胞を用いた検討（Fig. 6B）や、細胞内の子孫 Ad 粒子産生量による評価（Fig. 6C）においても、同様の結果が得られた。一方で、Renilla luciferase (Rluc) の下流に 3'-mivaRNAII、およびその変異体の相補配列を挿入したレポータープラスミドを作製し、pVAII と同時にトランスフェクションした際の Rluc の活性を測定しところ、pVAII を導入した細胞ではΔNaeI と比較して Rluc の活性が顕著に抑制されていた。従って、pVAII、および pVAII-mut から転写された VA-RNAII が、それぞれ miRNA 様に機能することが確認された（Fig. 6D）。以上の結果から、VA-RNAII の Ad 増殖促進効果には、3'-mivaRNAII をコードする領域の配列が重要であることが示された。

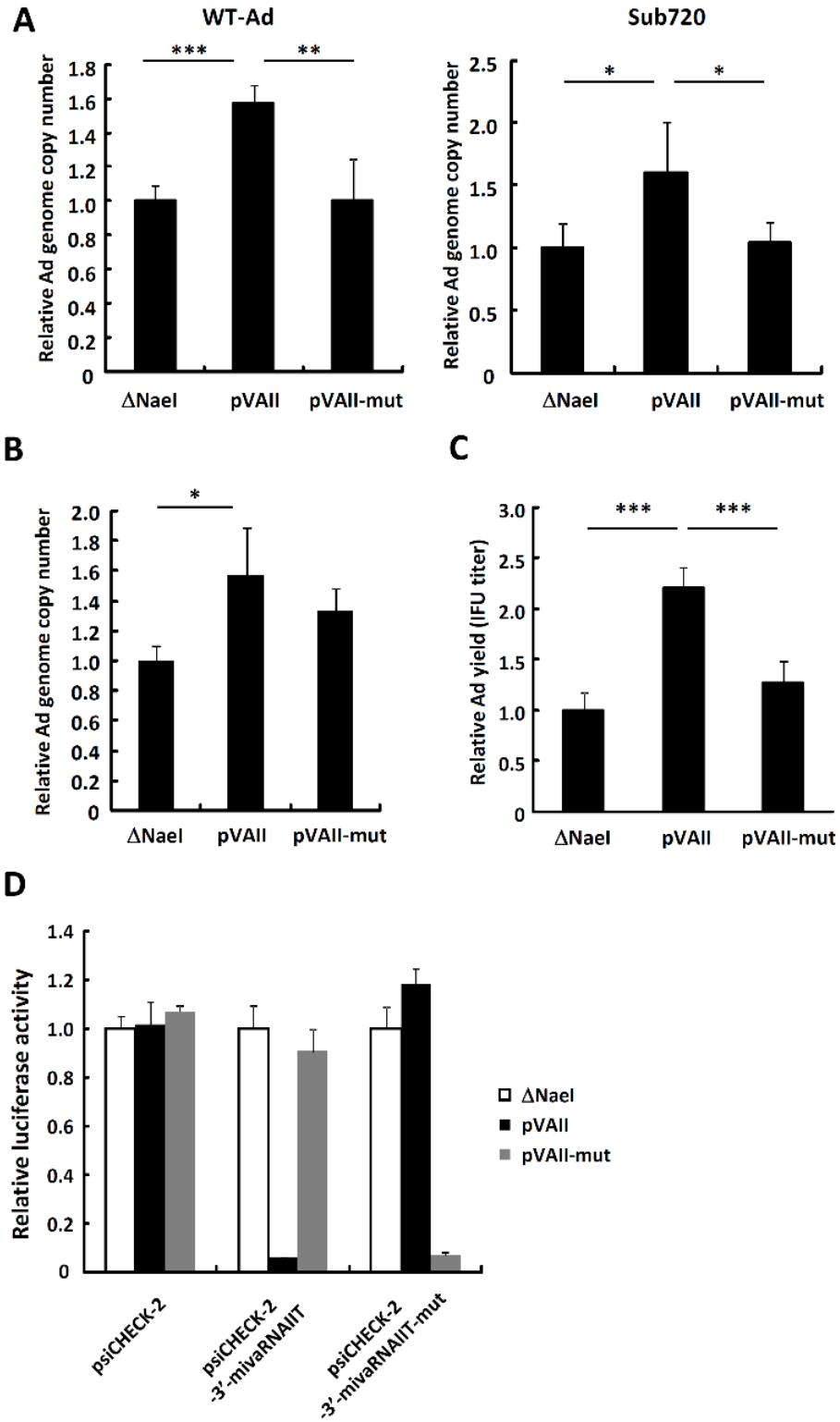

A
WT-Ad
Sub720
Relative Ad genome copy number
***
**
*
*
ΔNaeI
pVAII
pVAII-mut
B
C
Relative Ad yield (IFU titer)
D
Relative luciferase activity
psiCHECK-2
psiCHECK-2 -3'-mivaRNAIIT
psiCHECK-2 -3'-mivaRNAIIT-mut

Figure 6: 3'-mivaRNAII-encoding sequence is crucial for VA-RNAII-mediated promotion of Ad replication. (A) HeLa cells were transfected with ΔNaeI, pVAII, or pVAII-mut for 48 h, followed by infection with Ad (WT-Ad or Ad lacking VA-RNAI, II; Sub720) at 100 VPs/cell. After 24 h of incubation, the Ad genome copy numbers were determined and expressed as relative values (ΔNaeI=1). (B) A549 cells were transfected with VA-RNAII-expressing plasmids (ΔNaeI, pVAII, and pVAII-mut) for 48 h, followed by infection with WT-Ad at 100 VPs/cell. Ad genome copy numbers were determined 24 h after infection and expressed as relative values (ΔNaeI =1). (C) HeLa cells were transfected with VA-RNAII-expressing plasmids (ΔNaeI, pVAII, and pVAII-mut) for 48 h, followed by infection with WT-Ad at 100 VPs/cell. After 24 h of incubation, IFU titers of progeny WT-Ad in the cells were determined and expressed as relative values (ΔNaeI=1). (D) HeLa cells were cotransfected with VA-RNAII-expressing plasmids (ΔNaeI, pVAII, and pVAII-mut) and reporter plasmids (psiCHECK-2, psiCHECK-2-3'-mivaRNAIIT, and psiCHECK-2-3'-mivaRNAIIT-mut). After 48 h of incubation, luciferase activities were determined. RLuc activities were normalized to Fluc activities. These data are expressed as means ± SD (n=4).

VA-RNAII が宿主の miRNA 産生に与える影響

VA-RNAI は、宿主の miRNA と同様の機構でプロセシングされることから、Exportin-5, Dicer, Ago2 といった宿主の miRNA 産生に関わる分子を競合的に阻害することが報告されている(24, 52)。一方で、VA-RNAII が miRNA 産生に与える影響は明らかにされていない。そこで、VA-RNAI, II が宿主の miRNA の産生に与える影響を調べるために、HeLa 細胞で発現が確認されている代表的な miRNA である miR-27b の発現量を解析した。各 VA-RNA 発現プラスミドを導入した細胞における miR-27b のコピー数を調べたところ、VA-RNAI, II 発現プラスミド (pAdVAntage) および VA-RNAI 発現プラスミド (pVAI) を導入した細胞においては、コントロールプラスミド (ΔNaeI) と比べて miR-27b の発現量がそれぞれ約 60, 40%抑制されていた。それに対して、pVAII を導入した細胞においては miR-27b 発現量の有意な変化はみられなかった (Fig. 7A)。また、Rluc 遺伝子の下流に miR-27b の標的配列を挿入したレポータープラスミドを各 VA-RNA 発現プラスミドと同時にトランスフェクションし、レポーターアッセイを行ったところ、pAdVAntage, pVAI を導入した細胞では Rluc の活性が上昇した一方で、pVAII を導入した細胞では Rluc の活性に変化はなかった (Fig. 7B)。以上の結果から、VA-RNAI が miR-27b の産生および活性を阻害するのに対して、VA-RNAII は miR-27b の活性に影響を与えないことが示された。

一方で、VA-RNAI に関しては、miRNA 産生経路の競合的な阻害とは別に、Dicer の発現そのものを抑制することも報告されている(53)。そこで、VA-RNAII も同様に Dicer の発現を抑制するか検討するために、HeLa 細胞に WT-Ad、Sub720、および VA-RNAI のみを欠損した Ad（Sub722）を感染させたのち、Dicer の発現量を解析した。その結果、WT-Ad を感染させた細胞においては Dicer の発現量が顕著に低下していたのに対し、Sub722, Sub720 を感染させた細胞では、Dicer の発現低下は観察されなかった。したがって、VA-RNAI が Dicer の発現を抑制するのに対して、VA-RNAII は Dicer の発現を抑制しないことが示された (Fig. 7C)。

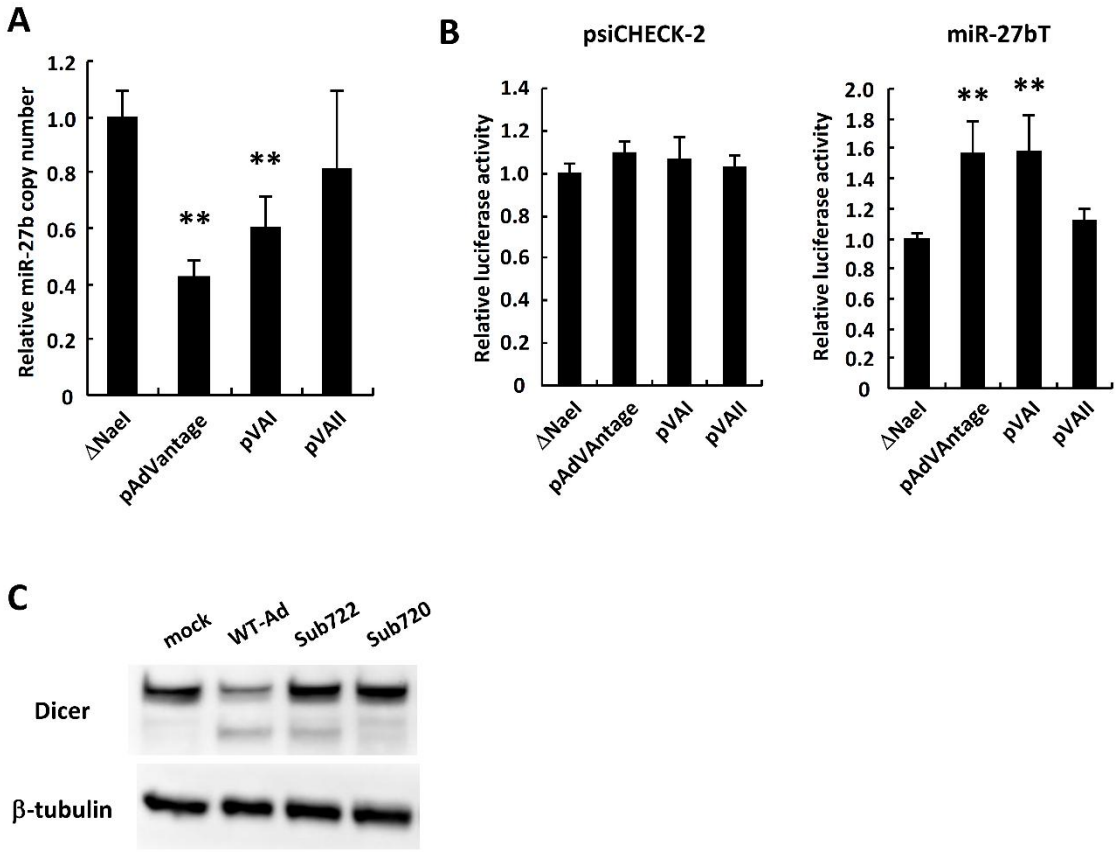
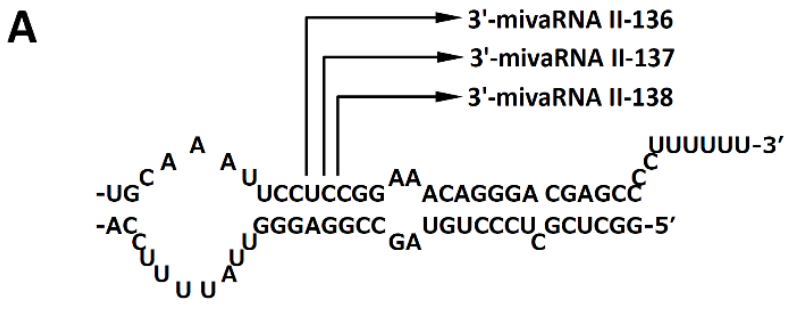
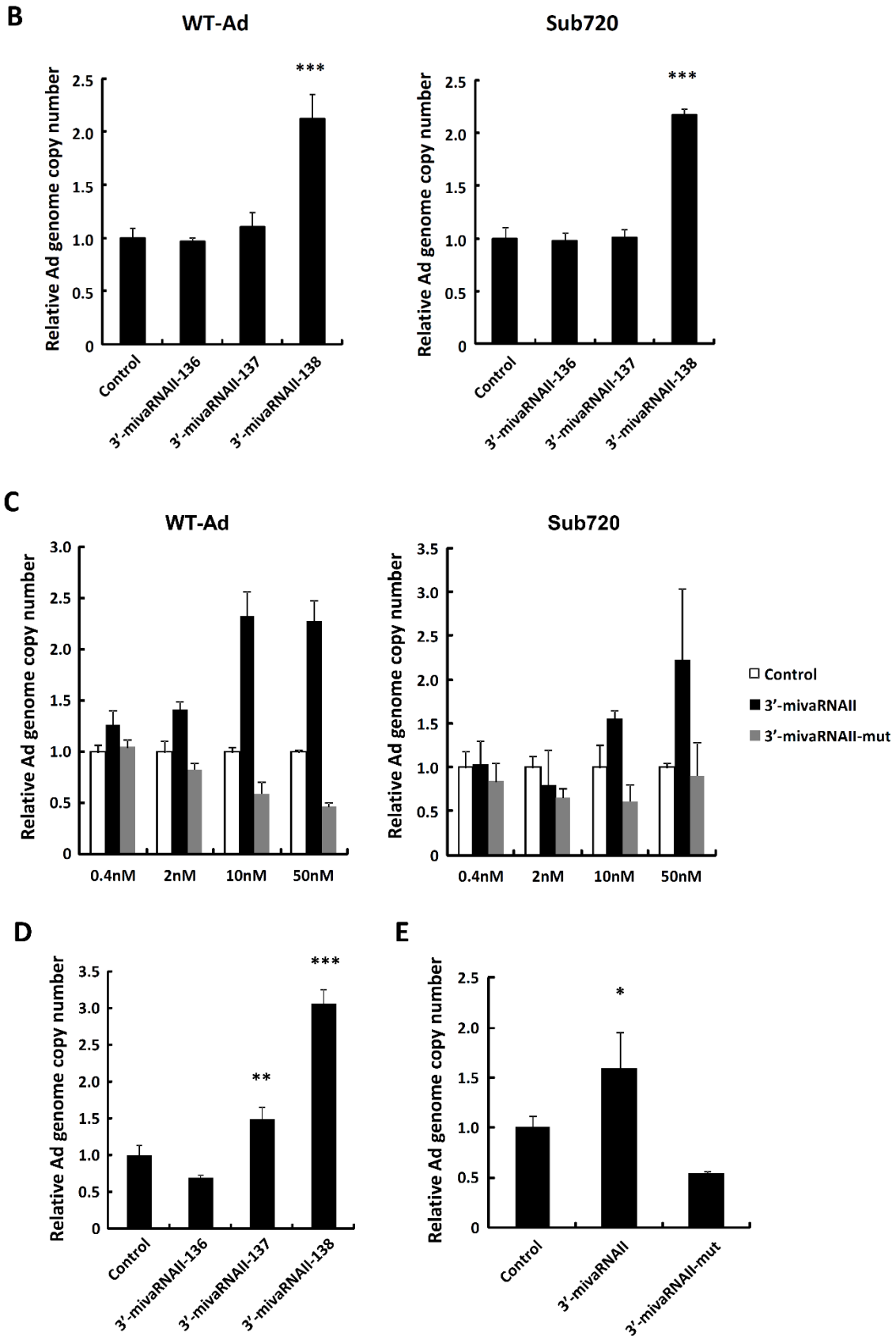


Figure 7: VA-RNAII does not inhibit miRNA activities. (A) HeLa cells were transfected with pAdVAntage-ΔNaeI (ΔNaeI), pAdVAntage, pVAI, or pVAII. After 48h incubation, miR-27b copy numbers were determined by qRT-PCR analysis. (B) HeLa cells were co-transfected with ΔNaeI, pAdVAntage, pVAI, or pVAII and reporter gene-expressing plasmids. After 48h incubation, renilla and firefly luciferase activities were determined. Renilla luciferase activities were normalized to firefly luciferase activities. These data are expressed as the means ± S.D. (n=3-4). (n=4). **p<0.01 (Student's t-test). (C) HeLa cells were infected with WT-Ad, Sub722, or Sub720 at 1000 vp/cell. After 48h incubation, Dicer expression levels were evaluated by western blotting analysis. Data shown here are representative of more than two independent experiments.

3'-mivaRNAII による Ad 増殖の促進

これまでに得られた知見から、3'-mivaRNAII が Ad の増殖を促進することが示唆された。Dicer による VA-RNAII の切断箇所は複数存在し、それゆえ 3'-mivaRNAII にはいくつかのアイソフォーム (3'-mivaRNAII-136, 137, 138) が存在する(45-47) (Fig. 8A)。そこでまず、3'-mivaRNAII の各アイソフォームを化学合成し (3'-mivaRNAII-136, 137, 138 mimic)、これらを導入した HeLa 細胞における Ad の増殖を評価した。その結果、3 つのアイソフォームのうち、3'-mivaRNAII-138 mimic だけが Ad 増殖を有意に促進することが明らかとなった (Fig. 8B)。よって以後の検討では、3'-mivaRNAII-138 mimic を 3'-mivaRNAII mimic として用いることとした。上記検討により、3'-mivaRNAII の配列が重要であることが明らかになったことで、seed 配列 (miRNA の標的遺伝子の決定に最も重要とされる 5'末端の 2-8 番目の塩基配列) に変異をもつ 3'-mivaRNAII (3'-mivaRNAII-mut) を導入した細胞における Ad の増殖を評価したところ、3'-mivaRNAII mimic が濃度依存的に Ad の増殖を促進したのに対して、3'-mivaRNAII-mut mimic は Ad の増殖に影響しなかった (Fig. 8C)。加えて、A549 細胞を用いた検討（Fig. 8D, E）や、細胞内の子孫 Ad 粒子産生量による評価（Fig. 8F）においても、同様の結果が得られた。また、3'-mivaRNAII に対する antisense 2'-O-methyl oligonucleotide（3'-miviRNAII inhibitor） を 3'-mivaRNAII mimic と同時に導入すると、3'-mivaRNAII mimic による Ad 増殖の促進がキャンセルされた (Fig. 3G)。一方で、3'-mivaRNAII inhibitor 単体を導入した実験では、A549 細胞においては Ad の増殖が有意に抑制されていた (Fig. 8H) が、HeLa 細胞では Ad の増殖に変化はなかった（data not shown)。さらに、これまでは 5 型 Ad (Ad5) を用いて検討を行ってきたが、VA-RNA の配列が異なる他の血清型の Ad (Ad4, Ad11, Ad31, Ad35) に関しても同様の検討を行ったところ、Ad5 由来の 3'-mivaRNAII mimic の導入により、他の血清型の Ad の増殖も増殖が有意に促進された (Fig. 3E)。以上の結果から、3'-mivaRNAII が Ad の増殖を促進することが示された。




B
WT-Ad
Sub720
Relative Ad genome copy number
***
Control
3'-mivaRNAII-136
3'-mivaRNAII-137
3'-mivaRNAII-138
C
WT-Ad
Sub720
Relative Ad genome copy number
0.4nM
2nM
10nM
50nM
Control
3'-mivaRNAII
3'-mivaRNAII-mut
D
Relative Ad genome copy number
**
***
Control
3'-mivaRNAII-136
3'-mivaRNAII-137
3'-mivaRNAII-138
E
Relative Ad genome copy number
*
Control
3'-mivaRNAII
3'-mivaRNAII-mut

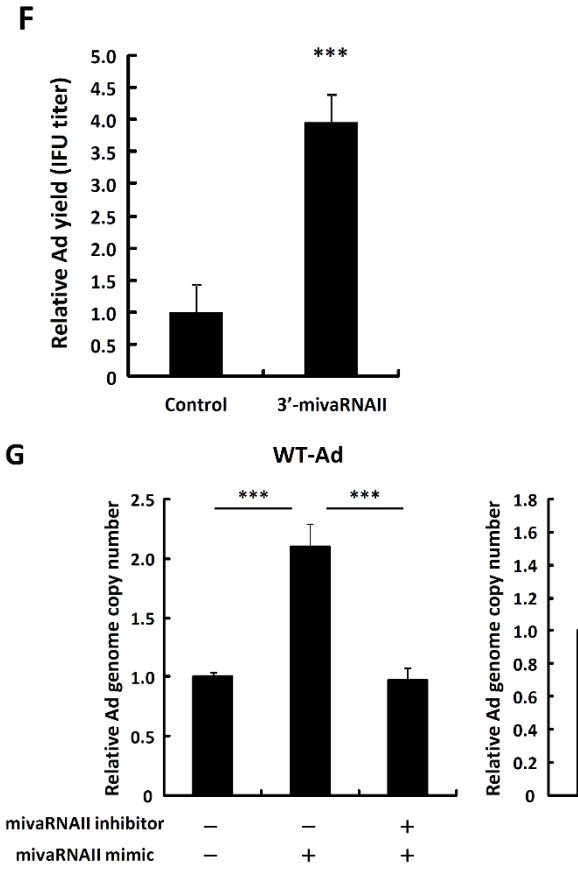

F
Relative Ad yield (IFU titer)
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
***
Control
3'-mivaRNAII
G
WT-Ad
Sub720
Relative Ad genome copy number
***
***
**
***
mivaRNAII inhibitor
mivaRNAII mimic
H
WT-Ad
Sub722
**
Control
mivaRNAII inhibitor
I
Relative Ad genome copy number
*
**
***
***
Ad4
Ad11
Ad31
Ad35
Control
3'-mivaRNAII

Figure 8: 3'-mivaRNAII promotes Ad replication. (A) A schematic diagram of the processing of VA-RNAII by dicer, producing 3=-mivaRNAII-136, -137, and -138. (B) HeLa cells were transfected with 3=-mivaRNAII-136, -137, or -138 mimics at 50 nM for 48 h, followed by infection with Ad (WT-Ad and Sub720) at 100 VPs/cell. Ad genome copy numbers were determined 24 h after infection and expressed as relative values (control=1). (C) HeLa cells were transfected with 3'-mivaRNAII (3'-mivaRNAII-138) and 3'-mivaRNAII-mut mimics at the indicated concentrations for 48 h, followed by infection with Ad (WT-Ad and Sub720) at 100 VPs/cell. Ad genome copy numbers were determined 24 h after infection and expressed as relative values (control=1 at the respective concentration). (D) A549 cells were transfected with 3'-mivaRNAII-136, -137, or -138 mimics at 50 nM for 48 h, followed by infection with WT-Ad at 100 VPs/cell. Ad genome copy numbers were determined 24 h after infection and expressed as relative values (control=1). (E) A549 cells were transfected with 3'-mivaRNAII-138 and -mut mimics at 50 nM for 48 h, followed by infection with WT-Ad at 100 VPs/cell. Ad genome copy numbers were determined 24 h after infection and expressed as relative values (control=1). (F) HeLa cells were transfected with 3'-mivaRNAII (3'-mivaRNAII-138) mimic at 50 nM and incubated for 48 h, followed by infection with WT-Ad at 100 VPs/cell. After 24 h of incubation, IFU titers of progeny WT-Ad in the cells were determined and expressed as relative values (control=1). (G) HeLa cells were co-transfected with 3'-mivaRNAII (3'-mivaRNAII-138) mimic and 3'-mivaRNAII inhibitor (antisense 2'-O-methyl oligonucleotide against 3'-mivaRNAII) at 30 nM each for 48 h, followed by infection with WT-Ad at 100 VPs/cell. Ad genome copy numbers were determined 24 h after infection and expressed as relative values (control=1). (H) A549 cells were transfected 3'-mivaRNAII inhibitor at 50 nM and incubated for 48h, followed by infection with WT-Ad or Sub722 at 100 vp/cell. Ad genome copy numbers in the cells were determined by qPCR analysis 72h after infection. (I) HeLa cells were transfected with 3'-mivaRNAII (3'-mivaRNAII-138) mimic at 50 nM for 48 h, followed by infection with Ad4, Ad11, Ad31, or Ad35 at 100 VPs/cell. Ad genome copy numbers were determined 24 h after infection and expressed as relative values (control=1). These data are expressed as means±SD (n=4).

マイクロアレイ解析および *in silico* 解析による 3'-mivaRNAII 標的遺伝子の網羅的解析

まず、3'-mivaRNAII の標的遺伝子を探索するために、HeLa 細胞に negative control siRNA (siControl), または 3'-mivaRNAII mimic をトランスフェクションし、両者の遺伝子発現をマイクロアレイ解析によって網羅的に比較した。その結果、3'-mivaRNAII mimic の導入によって、発現量が siControl 導入群と比較して半分以下に抑制される遺伝子が 918 遺伝子存在した。この中から、miRNA の標的遺伝子予測システムのひとつである miRDB(51)を用いて、3'UTR に 3'-mivaRNAII の標的配列をもつ遺伝子を抽出した。ここでいう標的配列とは、seed 配列に対する相補配列のことであり、すなわち 3'-mivaRNAII-138 の標的配列は TGTTTCC である。検索の結果、3'-mivaRNAII の標的候補遺伝子を 14 遺伝子に絞り込むことができた (Fig. 9A)。

3'-mivaRNAII の標的候補遺伝子の絞り込み

マイクロアレイ解析および *in silico* 解析によって標的候補遺伝子として抽出された 14 遺伝子について、さらなる絞り込みを行った。まず、HeLa 細胞に 3'-mivaRNAII mimic を導入し、各遺伝子の発現量を qRT-PCR によって解析した。有意な発現が認められた 10 遺伝子のうち、8 遺伝子は 3'-mivaRNAII mimic の導入により発現量が有意に低下していたが、ANK2, DUSP16 については発現の低下がみられなかったため、候補から除外した(Fig. 7B)。なお、検出されなかった 4 遺伝子（FXYD6, KMO, SEZ, SNTN）については、マイクロアレイ解析のシグナル値も低いことから、HeLa 細胞ではほとんど発現していないものと考えられた。

次に、HeLa 細胞に WT-Ad, Sub722, Sub720 を感染させ、各遺伝子の発現量を qRT-PCR によって解析した。その結果、WT-Ad, Sub722 感染細胞（VA-RNAII 発現群）と Ad 非感染細胞, Sub720 感染細胞（VA-RNAII 非発現群）を比較して発現量の低下がみられたのは、8 遺伝子のうち 5 遺伝子（CUL4A, RNF4, CD164, KCTD16, NFATC2）であった（Fig. 9C）。さらに、これら 5 つの標的遺伝子から、Ad の増殖に関与するものを選択するために、siRNA を用いて各遺伝子をノックダウンした細胞における Ad の増殖を評価した。各 siRNA が標的遺伝子の発現を有意に抑制できることを確認したのち（Fig. 9D）、感染後 24 時間の Ad ゲノムコピー数を測定したところ、siCUL4A 導入群では siControl 導入群と比較して約 7 倍ものAd ゲノムが検出された(Fig. 7E)。以上の結果から、Ad の増殖に関与する mivaRNAII 標的遺伝子として、CUL4A を同定することに成功した。

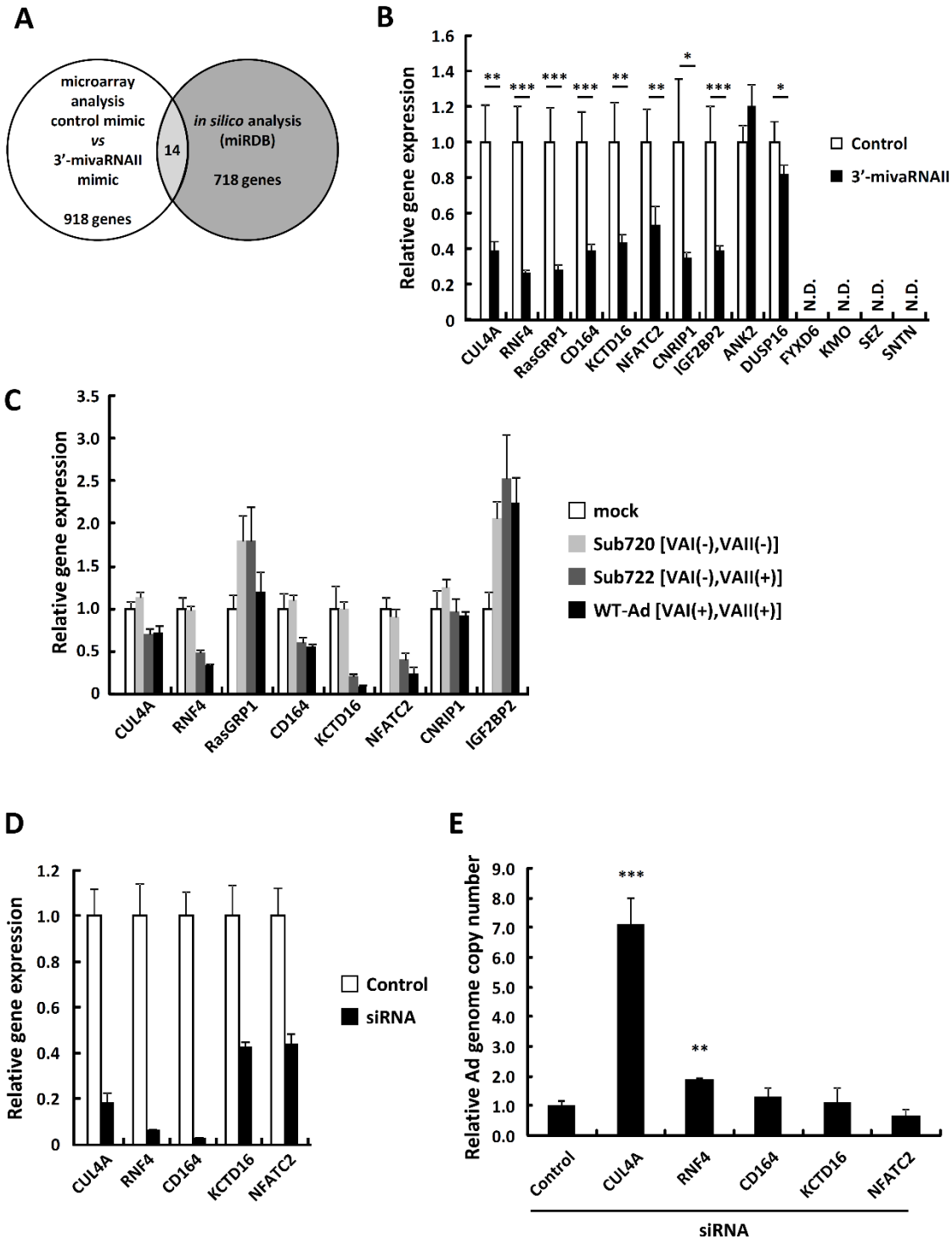

A
microarray analysis control mimic vs 3'-mivaRNAII mimic
918 genes
14
in silico analysis (miRDB)
718 genes
B
Relative gene expression
Control
3'-mivaRNAII
CUL4A
RNF4
RasGRP1
CD164
KCTD16
NFATC2
CNRIP1
IGF2BP2
ANK2
DUSP16
FYXD6
KMO
SEZ
SNTN
N.D.
C
Relative gene expression
mock
Sub720 [VAI(-),VAII(-)]
Sub722 [VAI(-),VAII(+)]
WT-Ad [VAI(+),VAII(+)]
D
Relative gene expression
Control
siRNA
E
Relative Ad genome copy number
Control
siRNA

Figure 9: Identification of 3'-mivaRNAII target genes. (A) A schematic diagram of analysis for identification of mivaRNAII target genes. (B) HeLa cells were transfected with 3=-mivaRNAII (3=-mivaRNAII-138) mimic at 50 nM. After 48 h of incubation, mRNA levels of the indicated genes were determined by qRT-PCR analysis. (C) HeLa cells were infected with Ad (WT-Ad, Sub722, and Sub720) at 1,000 VPs/cell. After 48 h of incubation, mRNA levels of the indicated genes were determined by qRT-PCR analysis. (D and E) HeLa cells were transfected with siRNAs targeting the indicated genes at 50 nM. (D) After 48 h of incubation, mRNA levels of the indicated genes were determined by qRT-PCR analysis. (E) After 48 h of incubation, cells were infected with WT-Ad at a multiplicity of infection (MOI) of 5. Ad genome copy numbers in the cells were determined 24 h after infection and expressed as relative values (control=1). These data are expressed as means±SD (A to C, F, and G, n=4; D and E, n=3).

mivaRNAII による CUL4A の発現抑制の詳細な解析

まず、CUL4A の発現量を Western blot によって解析したところ、3'-mivaRNAII mimic を導入した細胞、および WT-Ad 感染細胞において、CUL4A の発現がタンパク質レベルでも抑制されていた (Fig. 10A, B)。また、3'-mivaRNAII の各アイソフォームを導入した際の CUL4A の発現量を解析したところ、Ad の増殖を促進しなかったアイソフォーム（3'-mivaRNAII-136, -137）は、CUL4A の発現を抑制しなかった（Fig. 10C）。3'-mivaRNAII の各アイソフォームはそれぞれ異なる seed 配列をもつが、3'-mivaRNAII-136, 137 は配列上 CUL4A を標的としておらず、配列と表現型に矛盾がないことが確認された。さらに、プラスミドで全長の VA-RNAII を発現させた細胞でも、CUL4A の発現が有意に抑制されていた（Fig. 10D）。

さらに、mivaRNAII が CUL4A の 3'UTR に結合し、Post-transcriptional gene silencing によりその発現を抑制するかを検討するために、CUL4A の 3'UTR を Rluc の下流にクローニングしたレポータープラスミド (psiCHECK-2-CUL4A-3'UTR)、およびクローニングした CUL4A の 3'UTR 上に存在する 3'-mivaRNAII の予測結合配列に変異を加えたレポータープラスミド (psiCHECK-2-CUL4A-3'UTR-mut) を作製した。3'-mivaRNAII の完全相補配列 2 コピーを Rluc の下流に挿入したレポータープラスミドである psiCHECK-2-3'-mivaRNAIIT をポジティブコントロールとした。HeLa 細胞にこれらのプラスミドと 3'-mivaRNAII mimic を同時にトランスフェクションし、Rluc の活性を測定した。その結果、psiCHECK-2-3'-mivaRNAIIT, psiCHECK-2-CUL4A-3'UTR を導入した群では、3'-mivaRNAII mimic の導入により Rluc の活性が顕著に減弱した。一方で、psiCHECK-2-CUL4A-3'UTR-mut では Rluc の活性はコントロール群と比較して変化しておらず、mivaRNAII が CUL4A の 3'UTR 上に存在する標的配列を介してその発現を抑制することが示された（Fig. 10E）。また、RISC の主要な構成タンパクである Ago2 をノックダウンすると、3'-mivaRNAII mimic による CUL4A の発現抑制が消失したことから、mivaRNAII が RISC を介した Post-transcriptional Gene Silencing により CUL4A の発現を抑制することが示された（Fig. 10F）。

以上の結果から、Ad 感染時に発現した VA-RNAII が mivaRNAII にプロセシングされ、Post-transcriptional gene silencing により CUL4A の発現を抑制することが示された。

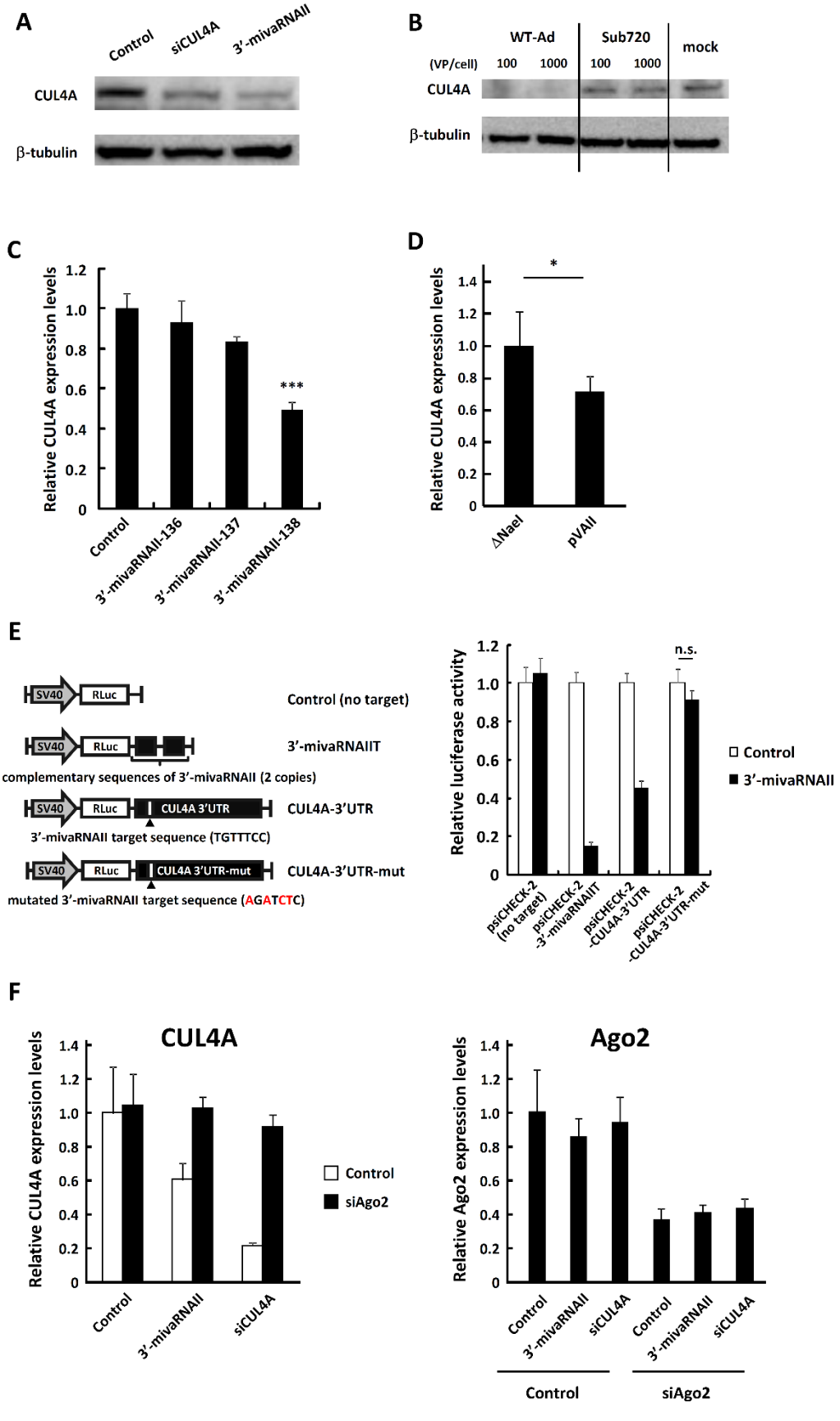
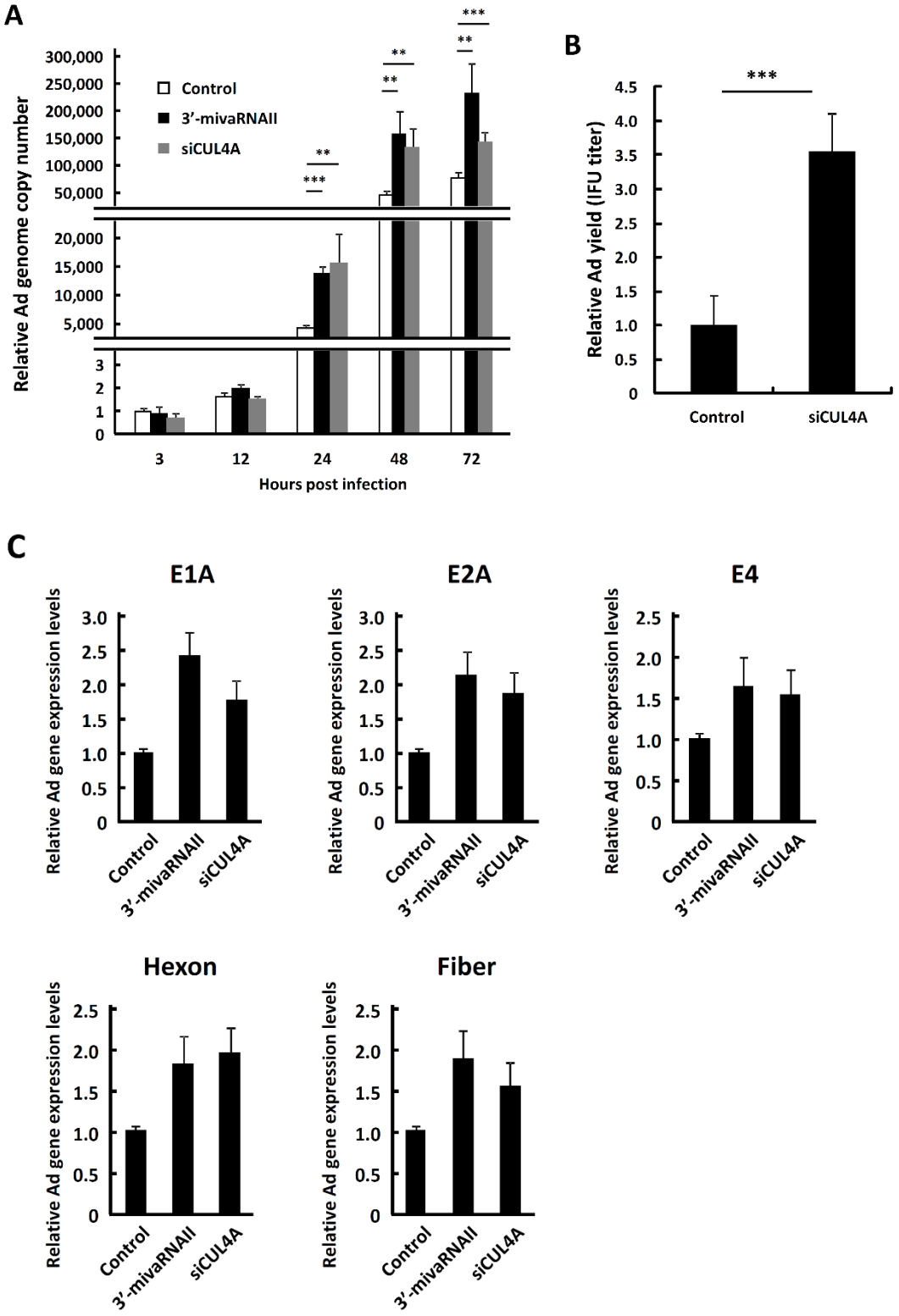

A
Control
siCUL4A
3'-mivaRNAII
CUL4A
β-tubulin
B
WT-Ad
Sub720
mock
(VP/cell)
100
1000
100
1000
CUL4A
β-tubulin
C
Relative CUL4A expression levels
***
Control
3'-mivaRNAII-136
3'-mivaRNAII-137
3'-mivaRNAII-138
D
Relative CUL4A expression levels
*
ΔNael
pVAII
E
SV40
RLuc
Control (no target)
3'-mivaRNAIIT
complementary sequences of 3'-mivaRNAII (2 copies)
CUL4A 3'UTR
CUL4A-3'UTR
3'-mivaRNAII target sequence (TGTTTCC)
CUL4A 3'UTR-mut
CUL4A-3'UTR-mut
mutated 3'-mivaRNAII target sequence (AGATCTC)
Relative luciferase activity
n.s.
Control
3'-mivaRNAII
psiCHECK-2 (no target)
psiCHECK-2 -3'-mivaRNAIIT
psiCHECK-2 -CUL4A-3'UTR
psiCHECK-2 -CUL4A-3'UTR-mut
F
CUL4A
Relative CUL4A expression levels
Control
siAgo2
Control
3'-mivaRNAII
siCUL4A
Ago2
Relative Ago2 expression levels
Control
3'-mivaRNAII
siCUL4A
Control
3'-mivaRNAII
siCUL4A
Control
siAgo2

Figure 10: 3'-mivaRNAII suppresses CUL4A expression *via* posttranscriptional gene silencing. (A) HeLa cells were transfected with 3'-mivaRNAII (3'-mivaRNAII-138) mimic, or siCUL4A at 50 nM. After 48 h of incubation, protein levels of CUL4A were evaluated by Western blotting analysis. (B) HeLa cells were infected with Ad (WT-Ad and Sub720) at 100 or 1,000 VPs/cell. After 48 h of incubation, protein levels of CUL4A were evaluated by Western blotting analysis. (C) HeLa cells were transfected with 3'-mivaRNAII-136, -137, or -138 mimics at 50 nM.After 48 h of incubation, mRNA levels of CUL4A were determined by qRT-PCR analysis. (D) HeLa cells were transfected with ΔNaeI or pVAII. After 48 h of incubation, the mRNA levels of CUL4A were determined by qRT-PCR analysis. (E) HeLa cells were cotransfected with 3'-mivaRNAII (3'-mivaRNAII-138) mimic and the indicated reporter plasmids, described in the left portion. Luciferase activities were determined 48 h after transfection. RLuc activities were normalized to Fluc activities. The mutated nucleotides in the sequences complementary to the seed sequences of 3'-mivaRNAII are shown in red. SV40,SV40 promoter; n.s., not significant. (F) HeLa cells were cotransfected with a 3'-mivaRNAII mimic (3'-mivaRNAII-138), siCUL4A, and siAgo2 at 50 nM. After 48 h of incubation, the mRNA levels of CUL4A and Ago2 were determined by qRT-PCR analysis. These data are expressed as means±SD (A and C, n=4).

CUL4A 発現抑制時の Ad 増殖に関する詳細な解析

上述の標的遺伝子のスクリーニングでは、感染後 24 時間の Ad ゲノムコピー数でしか評価を行っていなかったので、CUL4A ノックダウン時の Ad の増殖について、より詳細な解析を行った。まず、CUL4A ノックダウン細胞における Ad ゲノムコピー数を経時的に測定したところ、感染後 24 時間だけでなく、48, 72 時間後でも有意に高い Ad ゲノムコピー数が検出された（Fig. 11A）。一方で、感染後 3 時間の Ad ゲノムコピー数に差が見られないことから、CUL4A をノックダウンしても Ad の細胞内在化効率に影響はなく、CUL4A のノックダウンが Ad ゲノムの複製を促進していることが示された。また、細胞内の子孫ウイルス粒子量についても解析したところ、CUL4A のノックダウンにより Ad タイターが有意に増加していた（Fig. 11B）。加えて、各 Ad 遺伝子の発現量についても、mRNA 量、タンパク量をそれぞれ qRT-PCR、Western blot によって評価したところ、CUL4A のノックダウンにより、各 Ad 遺伝子の発現量が増加していた（Fig. 11C,D）。さらに、A549 細胞で CUL4A をノックダウンしても、Ad の増殖が有意に促進された（Fig. 11E）。

以上の結果から、CUL4A のノックダウンによって、Ad の感染が促進されることが示された。


A
Relative Ad genome copy number
300,000
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
20,000
15,000
10,000
5,000
3
2
1
0
Control
3'-mivaRNAII
siCUL4A
**
***
**
**
***
**
3
12
24
48
72
Hours post infection
B
Relative Ad yield (IFU titer)
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
***
Control
siCUL4A
C
E1A
E2A
E4
Hexon
Fiber
Relative Ad gene expression levels
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
Control
3'-mivaRNAII
siCUL4A

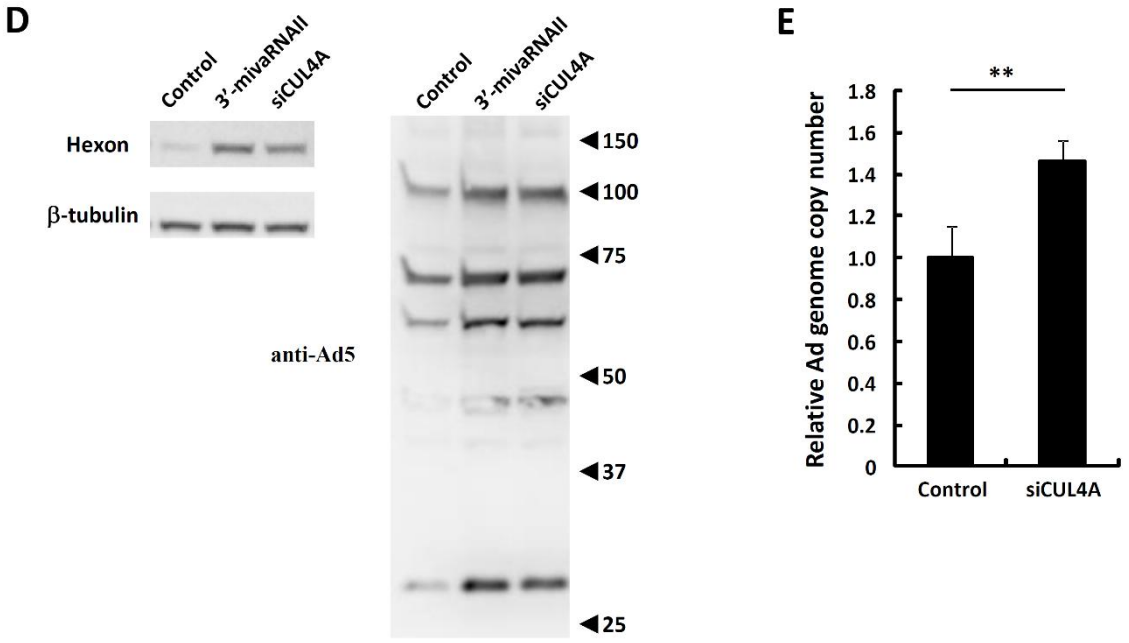


Figure 11: Suppression of CUL4A gene expression promotes Ad infection. (A) HeLa cells were transfected with a 3'-mivaRNAII mimic (3'-mivaRNAII-138) or siCUL4A at 50 nM for 48 h, followed by infection with WT-Ad at 100 VPs/cell. After 3, 12, 24, 48, or 72 h of incubation, the Ad genome copy numbers were determined and expressed as relative values (control, 3 h postinfection=1). (B) HeLa cells were transfected with siCUL4A at 50 nM for 48 h, followed by infection with WT-Ad at 100 VPs/cell. After 24 h of incubation, IFU titers of progeny WT-Ad were determined and expressed as relative values (control=1). (C) HeLa cells weretransfected with a 3'-mivaRNAII mimic (3'-mivaRNAII-138) or siCUL4A at 50 nM for 48 h, followed by infection with WT-Ad at 100 VPs/cell. mRNA levels of the Ad genes were determined by qRT-PCR analysis at 12 h (E1A, E2A, and E4) or 24 h (hexon and fiber) after infection. (D) HeLa cells were transfected with a 3'-mivaRNAII mimic (3'-mivaRNAII-138) or siCUL4A at 50 nM for 48 h, followed by infection with WT-Ad at 100 VPs/cell. After 24 h of incubation, the protein levels of the Ad genes were evaluated by Western blotting analysis. Numbers at the right of the membranes indicate the protein sizes in kilodaltons. Note that the sizes of the Ad major capsid proteins, hexon, penton base, and fiber, are 108 kDa, 63 kDa, and 61 kDa, respectively. (E) A549 cells were transfected with siCUL4A at 50 nM for 48h, followed by infection with WT-Ad at 100 VPs/cell. After 24 h of incubation, Ad genome copy numbers were determined and expressed as relative values (control=1). These data are expressed as means±SD (n=4).

CUL4A の発現抑制による Ad 増殖促進機構の解析

CUL4A の発現抑制による Ad の増殖促進が、どのような機構によるものか解析を試みた。CUL4A は、他のタンパク質と会合し、E3 ユビキチンリガーゼとして機能することが知られている。タンパク質のユビキチン化はプロテアソームによる分解の目印となるが、CUL4A に関しても、分解の標的となるタンパク質がいくつか報告されている(54-58)。そこで、報告されている標的分子のうち、HeLa 細胞で発現している幾つかの標的分子を siRNA を用いてノックダウンした際の Ad の増殖を評価した。まず、各 siRNA による標的遺伝子の発現抑制を確認したのち（Fig. 12A）、Ad ゲノムコピー数を測定した。その結果、c-Jun, c-Myc をノックダウンした細胞において、Ad の増殖が有意に抑制されており、これらの遺伝子が Ad の増殖に寄与することが示唆された（Fig. 12B）。

次に、CUL4A のノックダウン時に、c-Jun, c-Myc の発現が増加するか検討を行った。これらのタンパク質の分解に CUL4A が寄与しているならば、CUL4A のノックダウンにより分解が阻害され、発現量が上昇するはずであるが、c-Myc の発現量は CUL4A のノックダウンによりむしろ減少していた。一方で、c-Jun の発現量は CUL4A のノックダウンによって上昇しており、mivaRNAII mimic 導入群でもわずかながら上昇傾向が見られた（Fig. 12C）。

以上の結果から、CUL4A の発現抑制によって分解を免れた c-Jun が、Ad の増殖に寄与することが示唆された。

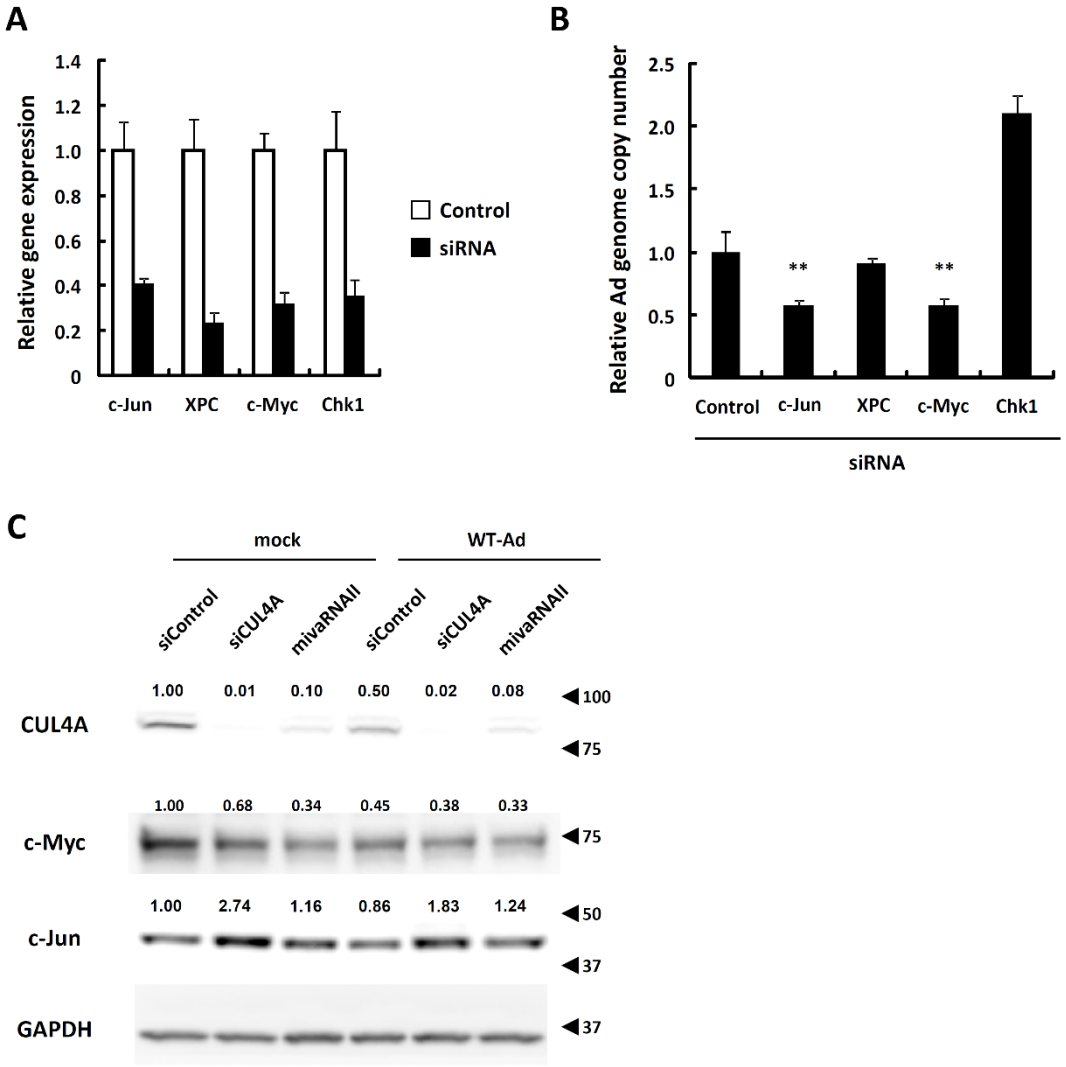


Figure 12: Identification of CUL4A-target protein involved in Ad replication. (A and B) HeLa cells were transfected with siRNAs targeting the indicated genes at 50 nM. (A) After 48 h of incubation, mRNA levels of the indicated genes were determined by qRT-PCR analysis. (B) After 48 h of incubation, cells were infected with WT-Ad at 100 VPs/cell. Ad genome copy numbers in the cells were determined 24 h after infection and expressed as relative values (control=1). These data are expressed as means ± SD (n=4). (C) HeLa cells were transfected with 3'-mivaRNAII (3'-mivaRNAII-138) mimic or siCUL4A at 50 nM for 48 h, followed by infection with WT-Ad at 100 VPs/cell. After 24 h of incubation, protein levels of the indicated genes were evaluated by Western blotting analysis. The optical density of the bands quantified by Image J. Relative values normalized by GAPDH were shown above the bands (mock, siControl=1).

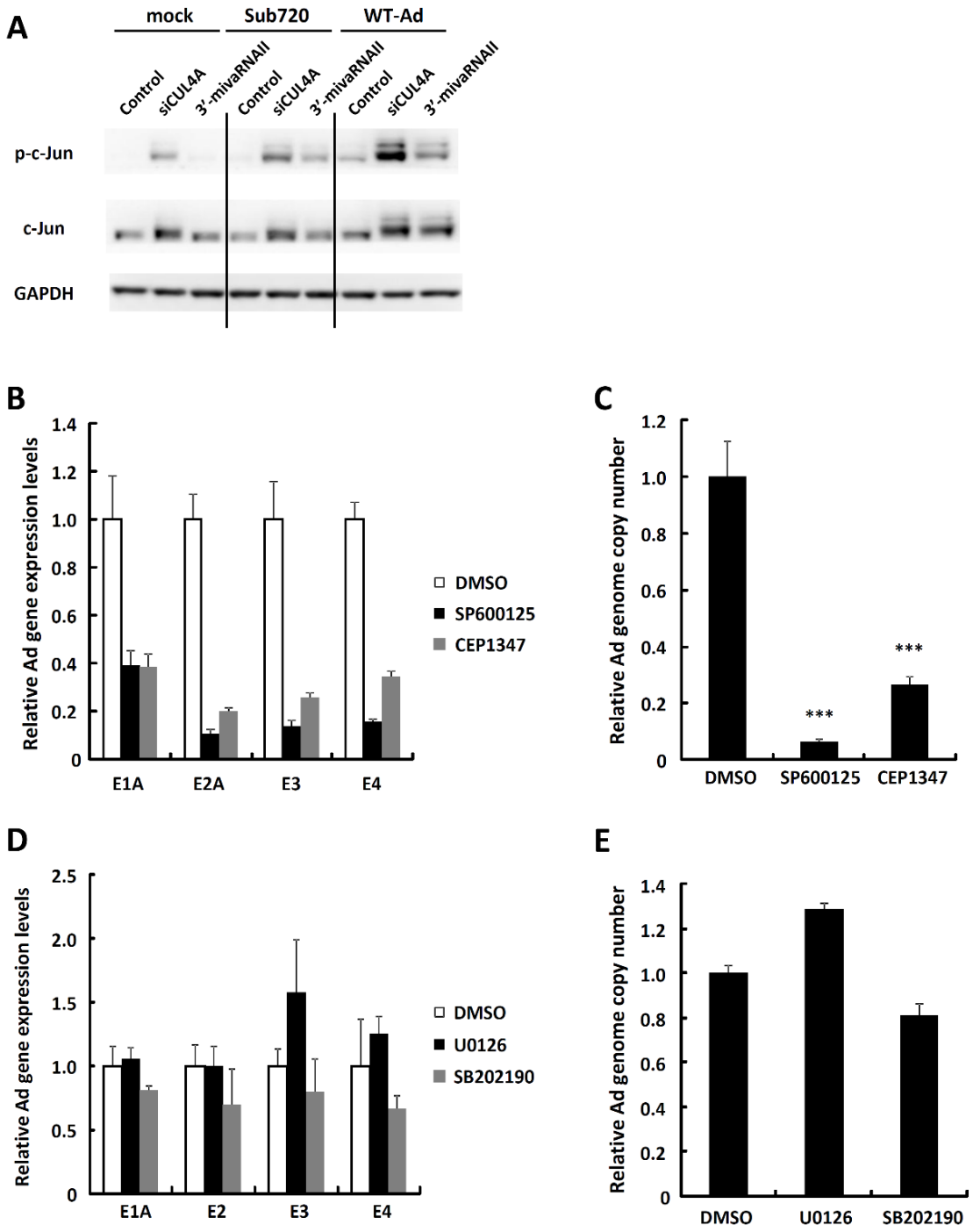
c-Jun による Ad 増殖促進に関する詳細な検討

c-Jun は、転写因子 AP-1 の構成因子であり、c-Jun N-terminal kinase (JNK) によるリン酸化を受けて活性化することが知られている。そこで、Ad 感染時に c-Jun がリン酸化されるか Western blot により検討したところ、WT-Ad, Sub720 の感染によって c-Jun のリン酸化が誘導されていた (Fig. 13A)。特に siCUL4A 導入群では、c-Jun の発現上昇と共に、c-Jun のリン酸体も増加しており、JNK シグナルが増強されていることが示唆された（Fig. 13A）。一方で予想に反して、mivaRNAII 導入群では c-Jun の発現上昇がほとんど見られなかった。この点については、CUL4A のノックダウン効率の差が一つの原因ではないかと考えている。しかしながら、Ad 感染時には mivaRNAII 導入細胞でも c-Jun の発現が上昇していることから、mivaRNAII も c-Jun の発現上昇に寄与しているものと考えている。

次に、JNK シグナルが Ad の増殖に寄与するか検討するために、JNK の阻害剤（SP600125(59), CEP1347(60)）を用いた検討を行った。まず、Ad 遺伝子の発現量を、ゲノムがほとんど複製していない感染後 12 時間で定量したところ、阻害剤の添加によって Ad 遺伝子の発現が顕著に抑制されていた（Fig. 13B）。また、感染 24 時間後の Ad ゲノムコピー数を定量したところ、こちらも著しく減少していた（Fig. 13C）ことから、JNK が Ad の遺伝子発現、および増殖に寄与していることが示された。一方で、JNK は Mitogen-activated Protein Kinase（MAPK）ファミリーのメンバーであり、JNK 以外の MAPK としては ERK, p38 が知られている。そこで、ERK 阻害剤（U0126(61)）、p38 阻害剤（SB202190(62)）を用いて同様の検討を行ったところ、JNK 阻害剤で見られたような Ad の感染阻害効果は見られなかった（Fig. 13D, E）ことから、MAPK のなかでは JNK シグナルが特異的に Ad の増殖に寄与するものと考えられた。

さらに、JNK が Ad の遺伝子発現に寄与していたことから、c-Jun が直接 Ad のゲノム DNA に結合し、Ad 遺伝子の発現を誘導しているのではないかと考えた。そこで、リン酸化 c-Jun に対する抗体を用いた ChIP アッセイにより、c-Jun と Ad ゲノムが結合しているか検討した。転写因子の結合予測配列に関するオープンアクセスデータベースである JASPAR(63)で調べた c-Jun の結合モチーフを Ad ゲノム上で検索し、該当する配列を含む領域を定量的 PCR によって検出を試みた。その結果、Ad ゲノム上に点在する c-Jun 結合モチーフに c-Jun が結合していることが示唆された（Fig. 13F）。

以上の結果から、Ad 感染時に活性化される c-Jun が Ad の増殖に寄与しており、CUL4A のノックダウンによりそのシグナルが増強されることで Ad の増殖が促進されることが示唆された。


A
mock
Sub720
WT-Ad
Control
siCUL4A
3′-mivaRNAII
p-c-Jun
c-Jun
GAPDH
B
Relative Ad gene expression levels
DMSO
SP600125
CEP1347
E1A
E2A
E3
E4
C
Relative Ad genome copy number
***
DMSO
SP600125
CEP1347
D
Relative Ad gene expression levels
DMSO
U0126
SB202190
E1A
E2
E3
E4
E
Relative Ad genome copy number
DMSO
U0126
SB202190

F

c-Jun binding motif	Location on Ad genome		Sequence
	site 1	16382-16390	ATGACTCAG
	site 2	7073-7082	ATGATGTCAT
	site 3	9802-9811	ATGATGTAAT
	site 4	16050-16059	ATGACGCCAT
	site 5	35649-35658	ATGACGTAAC

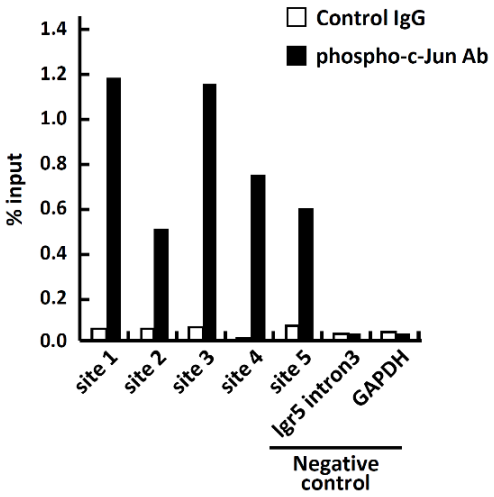


Figure 13: JNK signaling is involved in mivaRNAII-mediated promotion of Ad infection. (A) HeLa cells were transfected with 3'-mivaRNAII (3'-mivaRNAII-138) mimic or siCUL4A at 50 nM for 48 h, followed by infection with Ad (WT-Ad, Sub720) at 100 VPs/cell. After 24 h of incubation, protein levels of c-Jun and phospho-c-Jun were evaluated by Western blotting analysis. (B and C) HeLa cells were treated with JNK inhibitors (10 μM SP600125 or 20 μM CEP1347), followed by infection with WT-Ad at 100 VPs/cell. (B) After 12 h of incubation, mRNA levels of the Ad genes were determined by qRT-PCR analysis. (C) After 24 h of incubation, Ad genome copy numbers were determined and expressed as relative values (dimethyl sulfoxide [DMSO]=1). (D and E) HeLa cells were treated with 10 μM U0126 (an ERK inhibitor) or 20 μM SB202190 (a p38 inhibitor) and infected with WT-Ad at 100 VPs/cell. (D) After 12 h of incubation, mRNA levels of the Ad genes were determined by qRT-PCR analysis. (E) After 24 h of incubation, Ad genome copy numbers were determined. These data are expressed as means±SD (B and C, n=4; D and E, n=3). (F) HeLa cells were infected with WT-Ad at 100 VPs/cell. After 24h of incubation, cells were hanvested and ChIP assay was performed. Data shown here are representative of more than two independent experiments.

【考察】

これまで、VA-RNAI の生理機能の解明は進んでいる一方で、VA-RNAII がどのような機能を有するかはほとんど明らかとなっていなかったことから、本章では VA-RNAII に焦点を絞り解析を行った。その結果、VA-RNAII が mivaRNAII へのプロセシングを介して miRNA 様に機能することで、Ad の増殖を促進することを見出した。先行研究では、VA-RNAI が Ad の増殖を促進する一方で、mivaRNAI は Ad の増殖を促進しないことを報告している(48, 49)。つまり、2 種類の VA-RNA のうち、VA-RNAI は Dicer に切断されずに Ad の増殖を促進し、VA-RNAII は Dicer によって切断され mivaRNAII となることで Ad の増殖を促進するという、対照的な機能を有しているといえる。そもそも VA-RNAII は、VA-RNAI の重複によって生まれたと考えられているが(34)、VA-RNAI の方が PKR の阻害能が高いこと(35)や、反対に VA-RNAII の方が Dicer による切断効率が高いこと(47)、さらに RISC に最も効率よく取り込まれる 3'-mivaRNAII-138 が特異的に Ad の増殖を促進したことを踏まえると、Ad が様々な細胞内環境に適応するために進化する過程で、VA-RNA の機能を変化させていったと推測される。これまで、VA-RNAI があるにもかかわらず、VA-RNAII が存在する理由はほとんど議論されてこなかった。従って、本研究によって得られた知見は、「Ad の進化」というウイルス学的な観点において、非常に重要な意味をもつと考えている。

一方で、ウイルス由来 miRNA の重要な機能として、ウイルス自身の遺伝子発現を抑制することで、ウイルスの潜伏感染を成立させることが知られている(16)。そこで、RISC に最も効率よく取り込まれる 3'-mivaRNAII-138 の標的配列を、Ad ゲノム上で検索した。その結果、11014-11020（VA-RNAII 自身）, 25140-25146, 32215-32221, 32661-32667 番目の塩基が該当した。いずれもマイナス鎖に存在しているが、このうち 32215-32221, 32661-32667 が E4 遺伝子の下流に位置しており、mivaRNAII が E4 遺伝子の発現を抑制する可能性が考えられた。しかしながら、mivaRNAII 導入時には他の Ad 遺伝子と同じように E4 遺伝子の発現も促進されていたことから（Fig. 11C）、この可能性は否定された。

マイクロアレイ解析による網羅的な解析の結果、Ad の増殖に関与する mivaRNAII 標的遺伝子として、CUL4A を同定することに成功した。しかし一方で、今回のマイクロアレイ解析においては、①mivaRNAII 導入時に、siControl 導入時と比較して標的遺伝子の mRNA 量が半分以下になる　②siControl 導入時に、一定値以上のシグナルが検出されている、という条件で検索を行ったにもかかわらず、Fig. 9B でマイクロアレイ解析と同様の結果が得られた遺伝子は、14 遺伝子中 8 遺伝子にとどまった。また、*in silico* 解析では seed 配列に完全相補的な配列を 3'UTR にもつ遺伝子を検索したが、実際には miRNA による標的遺伝子の発現制御は複雑で、5'UTR や ORF 上に標的配列が存在したり、seed 配列と完全に相補的ではなくても発現が抑制されたりすることもある。そのため、今回のスクリーニングで漏れてしまった標的遺伝子が存在する可能性は否定できず、この点に関しては、さらなる検討の余地がある。

本研究で mivaRNAII の標的遺伝子として同定した CUL4A は、Cullin ファミリーの一員である。Cullin ファミリーは、E3 ユビキチンリガーゼの足場タンパクとして機能し、ユビキチン化を介して標的タンパク質を分解することで、細胞周期や DNA の修復など様々な生理現象を制御することが知られている(56, 64, 65)。Cullin ファミリーのウイルス増殖への関与に関する報告もいくつかあり、たとえばヘルペスウイルスの一種である Epstein-Barr Virus は、CUL1/4 を阻害することで Cdt1 の分解を抑制し、細胞周期を制御することでウイルスの増殖を促進する(66)。また、ヒトパピローマウイルスの一種（HPV16）は、CUL2 を利用してがん抑制遺伝子 Rb の分解を促進することでウイルスの感染を促進する(67)。加えて Ad に関しても、Ad の E1B-55k、E4orf6 が CUL2/5 を利用して p53 などの宿主タンパク質を分解することが報告されている(68)。しかしながら、CUL4A が Ad の増殖に関与するという報告は過去になく、本研究によって Ad の増殖に寄与する新たな宿主遺伝子を同定することに成功したといえる。

さらに本研究では、CUL4A の発現抑制によって分解を免れた c-Jun が、Ad の増殖に寄与することを明らかとした。c-Jun を含む JNK のシグナルカスケードは、アポトーシスや神経変性、細胞の分化・増殖、炎症性サイトカインの産生など様々な生理現象に関与しており、Ad 以外のウイルス感染との関連に関する報告もある(69-71)。たとえばヒトサイトメガロウイルス（CMV）は、本研究で用いた JNK 阻害剤によって増殖が阻害され、遺伝子発現ベクターのプロモーターとして汎用されている CMV プロモーターの活性も JNK 阻害剤で減弱することが報告されている(72, 73)。従って、CMV のゲノム DNA に AP-1 が結合して、ウイルス遺伝子の発現を誘導することでウイルスの増殖に寄与しているものと考えられる。Ad においても c-Jun が同様の機構で増殖に寄与するものと予想し、実際に ChIP アッセイの結果から、Ad のゲノム DNA にも c-Jun が結合することが明らかとなった。しかしながら、c-Jun 結合配列は必ずしも Ad 遺伝子の上流に位置するわけではなかった。また、各サブグループに属する各血清型の Ad のゲノム上で c-Jun 結合モチーフを検索してみたところ、全ての血清型のゲノム上で 5 つ以上の結合モチーフが見つかった。しかし、Ad5 と同じサブグループ C に属する Ad2 を除き、他の Ad では、c-Jun 結合モチーフの位置は、一部で保存されているのみであった。従って、c-Jun が特定のプロモーター領域に結合し遺伝子の発現を誘導するというよりも、Ad ゲノムの複数箇所に結合して全体的な遺伝子発現に寄与しているものと推測している。本知見をベクター開発に応用すべく、Ad ベクターから発現する Ad 遺伝子の発現を JNK 阻害剤で抑制できないかと考え検討を行ったが、JNK 阻害剤による Ad ベクターからの Ad 遺伝子の発現抑制は観察されなかった（data not shown）。

一方で、本研究成果を腫瘍溶解性 Ad に応用することは、十分可能であると考えている。Ad から発現する内在性の VA-RNAII による CUL4A の発現低下は、約 30%（Fig. 9C）であるのに対して、mivaRNAII 導入時には CUL4A の発現量が 50%以下に低下している（Fig. 9B）。この結果より、内在性の mivaRNAII 発現量はそれほど高くなく、その機能を補うことで Ad の増殖を促進できると予想される。故に、腫瘍溶解性 Ad に CUL4A に対する shRNA 発現カ

セットを搭載し、CUL4A の発現をより強く抑制できるように改良することで、がん細胞における腫瘍溶解性 Ad の増殖効率を底上げできると考えられる。加えて、CUL4A は一部のがん細胞で発現が亢進しているなど、がんの創薬標的にもなりうることから(56)、CUL4A のノックダウン自体が、抗腫瘍効果に寄与する可能性もある。また、Ad にはパッケージング可能なゲノムサイズに限界があり、腫瘍溶解性 Ad に搭載可能な遺伝子サイズは約 4kbp である。shRNA 発現カセットは、約 400bp と非常に小さいことから、腫瘍溶解性 Ad に shRNA 発現カセットを搭載しても、他の治療遺伝子を搭載するための十分なスペースが残されているという点でも優れている。今後、このような改良型 Ad が、創薬研究に寄与することを期待したい。

結論

本研究では、遺伝子組換え Ad の改良に向けた基礎研究の一環として、Ad が発現する non-coding RNA である VA-RNA に着目した研究に取り組んだ。

第一章では、Ad ベクター作用時の自然免疫の活性化や、miRNA の成熟化阻害に関与するとされる VA-RNA の発現プロファイルを明らかにした。過去の研究では、VA-RNA が細胞内の核酸認識受容体を介して I 型 IFN の産生を誘導することや、miRNA の成熟化を競合的に阻害することで shRNA の効果を減弱させることが報告されてきたが、それらがわずかな発現量の VA-RNA によって引き起こされていることが明らかとなり、今後の Ad ベクターの技術開発における重要な知見が得られた。

第二章では、これまで研究が進んでいなかった VA-RNAII の生理機能の解明を試みた。その結果、VA-RNAII のプロセシング産物である mivaRNAII が、Post-transcripitonal gene silencing によって CUL4A の発現を抑制することで、Ad の増殖を促進することが明らかとなった。これにより、既知の VA-RNAI の生理機能とは対照的な VA-RNAII の機能が明らかとなり、ウイルス学的な観点において大変興味深い知見が得られた。加えて詳細なメカニズム解析を行ったことにより、CUL4A や JNK が Ad の増殖に寄与するという、Ad と宿主の相互作用に関する新しい知見を得ることに成功し、基盤技術の改良に向けても有用な研究成果が得られた。

以上より、本研究では VA-RNA に着目し、Ad ベクターによる遺伝子治療研究や腫瘍溶解性 Ad によるがん治療研究への応用可能な新しい知見を得ることに成功した。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なるご指導、ご鞭撻を賜るとともに、温かいご配慮を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科　教授　水口裕之先生に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究にあたり、多大なるご指導を頂いた大阪大学大学院薬学研究科　准教授　櫻井文教先生、京都大学ウイルス・再生医科学研究所　町谷充洋博士に謹んで深謝いたします。

本研究に関して、貴重な御助言、ご指導を頂きました大阪大学大学院薬学研究科　特任准教授　立花雅史先生、助教　高山和雄先生、特任研究員　酒井英子博士に謹んで感謝の意を表します。

研究生活を送るにあたり、終始温かく支えていただいた大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野の皆様に深謝いたします。

また、大学院博士後期課程において経済的援助を賜りました独立行政法人日本学術振興会に心より御礼申し上げます。

最後に、長い学生生活を見守り、応援して頂きました家族に心より御礼申し上げます。

実験材料一覧

Table 1. The oligonucleotides and primers used in this study.

No.	Name	Sequence (5'-3')
1	hGAPDH-F	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA
2	hGAPDH-R	GTGGTCGTTGAGGGCAATG
3	hGAPDH-Probe	FAM-CACTCCTCCACCTTTGACGCTGGG-TAMRA
4	mGAPDH-F	CAATGTGTCCGTCGTGGATCT
5	mGAPDH-R	GTCCTCAGTGTAGCCCAAGATG
6	mGAPDH-Probe	FAM-CGTGCCGCCTGGAGAAACCTGCC-TAMRA
7	VA-RNAI-F	GGGCACTCTTCCGTGGTCTG
8	VA-RNAI-R	AGGAGCACTCCCCCGTTGTC
9	VA-RNAII-F	GGCTCGCTCCCTGTAGCCGG
10	VA-RNAII-R	AGGGGCTCGTCCCTGTTTCC
11	E2A-F	CACTACGGTGCGAGTGCAA
12	E2A-R	GGTAGCTGCCTTCCCAAAAAG
13	E2A-Probe	FAM-TCAAAGCCTGGGCACGCGC‑TAMRA
14	E4-F	GGGATCGTCTACCTCCTTTTGA
15	E4-R	GGGCAGCAGCGGATGAT
16	E4-Probe	FAM-ACAGAAACCCGCGCTACCATACTGGAG-TAMRA
17	Hexon-F	ACGATGACAACGAAGACGAAGTAG
18	Hexon-R	GGCGCCTGCCCAAATAC
19	Hexon-Probe	FAM-CGAGCAAGCTGAGCAGCAAAAAACTCA-TAMRA
20	Fiber-F	GCGCCTATCCGAACCTCTAGT
21	Fiber-R	AGAGGCCGTTGCCCATTT
22	Fiber-Probe	FAM-ACCTCCAATGGCATGCTTGCGC-TAMRA
23	Luc-F	TCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAA
24	Luc-R	TGTAGCCATCCATCCTTGTCAA
25	Luc-Probe	FAM-AATCCGGAAGCGACCAACGCC-TAMRA
26	3'-mivaRNAIIT-S	TCGAGAAGGGGCTCGTCCCTGTTTCCGGACAGCAAG GGGCTCGTCCCTGTTTCCGGATTAATTAAGCGC
27	3'-mivaRNAIIT-AS	GGCCGCGCTTAATTAATCCGGAAACAGGGACGAGCC CCTTGCTGTCCGGAAACAGGGACGAGCCCCTTC
28	QC-pVAIImutS	CCCCGCTTGCAAATTCCTCGAGCCACGGGTGCGAGCC CCTTTTTTGC

29	QC-pVAIImutAS	GCAAAAAAGGGGCTCGCACCCGTGGCTCGAGGAATT TGCAAGCGGGG
30	mivaRNAIIT-S	TCGAGAAGGGGCTCGTCCCTGTTTCCGGACAGCAAG GGGCTCGTCCCTGTTTCCGGATTAATTAAGCGC
31	mivaRNAIIT-AS	GGCCGCGCTTAATTAATCCGGAAACAGGGACGAGCC CCTTGCTGTCCGGAAACAGGGACGAGCCCCTTC
32	mivaRNAII-mutT-S	TCGAGAAGGGGCTCGCACCCGTGGCTCGACAGCAAG GGGCTCGCACCCGTGGCTCGATTAATTAAGCGC
33	mivaRNAII-mutT-AS	GGCCGCGCTTAATTAATCGAGCCACGGGTGCGAGCC CCTTGCTGTCGAGCCACGGGTGCGAGCCCCTTC
34	miR-27bT-S	TCGAGGCAGAACTTAGCCACTGTGAACAGCGCAGAA CTTAGCCACTGTGAATTAATTAAGCGC
35	miR-27bT-AS	GGCCGCGCTTAATTAATTCACAGTGGCTAAGTTCTGC GCTGTTCACAGTGGCTAAGTTCTGCC
36	Ad4-F	AGACAGCGACTCTTCACTGC
37	Ad4-R	TCGTCCTCATCATCGCTTGG
38	Ad11-F	GCACTGCTATGAAGACGGGT
39	Ad11-R	TCCGGGCAATCCAACTGAAA
40	Ad31-F	ATTGATGTGGAGTCTGCCGG
41	Ad31-R	ACAGGGGGCTCCGGTAATAT
42	Ad35-F	TCCGTGGACTGTGATTTGCA
43	Ad35-R	CCAACATTGGCAGCCTTCAC
44	CUL4A-F	ACCTCGCACAGATGTACCAG
45	CUL4A-R	AGGTTGACGAACCGCTCATTC
46	RNF4-F	ATGAGTACAAGAAAGCGTCGTG
47	RNF4-R	CACAAGTGAGGTCCACAATTTCA
48	RasGRP1-F	ACATCACCCAGTTCCGAATGA
49	RasGRP1-R	GCTGTCAATGAGATCGTCCAG
50	CD164-F	ACCCGAACGTGACGACTTTAG
51	CD164-R	CGTGTTCCCCACTTGACAATC
52	KCTD16-F	ATGGCTCTGAGTGGAAACTGT
53	KCTD16-R	TCAATGTGGAATGGCGAGTAAA
54	NFATC2-F	GAGCCGAATGCACATAAGGTC
55	NFATC2-R	CCAGAGAGACTAGCAAGGGG
56	CNRIP1-F	TAATGACGGCCCGGTCTTTTA

57	CNRIP1-R	TGCAGCGTGCTGGGTTTAAT
58	IGF2BP2-F	AGTGGAATTGCATGGGAAAATCA
59	IGF2BP2-R	CAACGGCGGTTTCTGTGTC
60	ANK2-F	ACCTGCAATCAGAATGGACTCA
61	ANK2-R	TGCAATGTGAAGAGCGGTATT
62	DUSP16-F	GCCCATGAGATGATTGGAACTC
63	DUSP16-R	CGGCTATCAATTAGCAGCACTTT
64	FXYD6-F	ACCCTGAGGATTGGGGGAC
65	FXYD6-R	CATTGGCGGTGATGAGGTT
66	KMO-F	TAGCCCTTTCTCATAGAGGACG
67	KMO-R	CTCTCATGGGAATACCTTGGGA
68	SEZ-F	CTGGCTCACGGACTCTCTTTA
69	SEZ-R	CTGTTGTGACAAAGTGGACGC
70	SNTN-F	TGTATGCACAGTACCCAGGAC
71	SNTN-R	AGCAGTGGTGGCAATAGCTTT
72	CUL4A-3'UTR-F	TTCTCGAGCGCATCTGCAGACGGTTC
73	CUL4A-3'UTR-R	GGGTTTAAACCACTGTTCAACCTC
74	QC-CUL4A-3'UTR-F	GGGGCTAGTGTGTTTGAGATCTCATTCTAAGATTGAG TCTGGCAG
75	QC-CUL4A-3'UTR-R	CTGCCAGACTCAATCTTAGAATGAGATCTCAAACACA CTAGCCCC
76	Ago2-F	CGCGTCCGAAGGCTGCTCTA
77	Ago2-R	TGGCTGTGCCTTGTAAAACGCT
78	E1A-F	TCCGGTCCTTCTAACACACCTC
79	E1A-R	ACGGCAACTGGTTTAATGGG
80	c-Jun-F	TCCAAGTGCCGAAAAAGGAAG
81	c-Jun-R	CGAGTTCTGAGCTTTCAAGGT
82	XPC-F	CTTCGGAGGGCGATGAAAC
83	XPC-R	TTGAGAGGTAGTAGGTGTCCAC
84	c-myc-F	GGCTCCTGGCAAAAGGTCA
85	c-myc-R	CTGCGTAGTTGTGCTGATGT
86	Chk1-F	ATATGAAGCGTGCCGTAGACT
87	Chk1-R	TGCCTATGTCTGGCTCTATTCTG
88	Ad5-site1-F	GGTATTGTCACTGTGCCCCC
89	Ad5-site1-R	CCCAATACACGTTGCCCCT

90	Ad5-site2-F	CGCAGTAGTCCAGGGTTTCC
91	Ad5-site2-R	ACTGGAAAGACCGCGAAGAG
92	Ad5-site3-F	GGTTGTTTCTGGCGGAGGT
93	Ad5-site3-R	AGGACATGGTGCTTCTGTCG
94	Ad5-site4-F	AAGAAGCGCTCCGACCAAC
95	Ad5-site4-R	GTAGTTGCGCGCCTCCTC
96	Ad5-site5-F	GCCAAGTGCAGAGCGAGTAT
97	Ad5-site5-R	TCGTTTCTGGGCGTAGGTTC
98	lgr5 intron3-F	TCTGCCTCAGGCTTACATGGA
99	lgr5 intron3-R	CACAAGAATTCTGCAGCACATTT

Table 2. The miRNA mimics, inhibitors, and siRNAs used in this study.

No.	Name	Sequence (5'-3')
1	3'-mivaRNAII-136 mimic	UCCGGAAACAGGGACGAGCCCC
2	3'-mivaRNAII-137 mimic	CCGGAAACAGGGACGAGCCCC
3	3'-mivaRNAII-138 mimic	CGGAAACAGGGACGAGCCCC
4	3'-mivaRNAII-mut mimic	CAAAGAUAGGGACGAGCCCC
5	3'-mivaRNAII inhibitor	CGGAAACAGGGACGAGCCCC
6	siCUL4A	AAGCAUGAGUGCGGUGCAGCC
7	siRNF4	GAAUGGACGUCUCAUCGUUUU
8	siCD164	GGACUGGUGAUUCAUUUGU
9	siNFATC2	CCAUUAAACAGGAGCAGAA
10	siAgo2	GCACGGAAGUCCAUCUGAA
11	sic-Jun	GUCAUGAACCACGUUAACA
12	siXPC	GCAAAUGGCUUCUAUCGAA
13	sic-Myc	CGAGCUAAAACGGAGCUUU
14	siChk1	GGUGCCUAUGGAGAAGUUC

Table 3 The primary antibodies used in this study

No.	Antigen	Host	Manufacturers
1	Dicer (13D6)	mouse	Abcam, Cambridge, UK
2	β-tubulin	rabbit	Abcam, Cambridge, UK
3	CUL4A	goat	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
4	Hexon (65H6)	mouse	Abnova, Taipei, Taiwan

5	Ad5	rabbit	Abcam, Cambridge, UK
6	CUL4A (EPR3198)	rabbit	Abcam, Cambridge, UK
7	c-Myc (9E10)	mouse	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
8	c-Jun (60A8)	rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, MA
9	GAPDH	rabbit	Trevigen, Gaithersburg, MD
10	phospho-c-Jun (Ser63)	rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, MA
11	phospho-c-Jun (Ser73) (D47G9)	rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, MA

Table 4. Materials used in this study

No.	実験材料	購入先
1	DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM (DMEM), Opti-MEM	Wako
2	牛胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS)	GIBCO-BRE, Biosera
3	抗生物質	GIBCO-BRE
4	培養ディッシュ	Nunc
5	HUVEC	Lonza
6	EGM-2	Lonza
7	野生型 Ad5 (WT-Ad)	American Type Culture Collection (ATCC)
8	Adeno-X Rapid Titer Kit	Clontech
9	ISOGEN, ISOGEN II	Nippon Gene
10	DNaseI	New England Biolabs
11	Superscript VILO cDNA synthesis kit	Invitrogen
12	THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix	TOYOBO
13	Fast SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems
14	Taqman 2×Fast Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
15	オリゴ DNA	Fasmac
16	Taqman probe	Hokkaido System Science

17	StepOnePlus real-time PCR systems	Applied Biosystems
18	C57BL/6 mice	Nippon SLC
19	pAdVAntage	Promega
20	各種制限酵素	New England Biolabs
21	コンピテントセル DH5α	TOYOBO
22	QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent
23	Lipofectamine2000	Invitrogen
24	Ad lacking both VA-RNAI and II (Sub720), VA-RNAI-deleted Ad (Sub722)	kindly provided by Dr. G. Akusjarvi (Uppsala University, Sweden)
25	psiCHECK-2	Promega
26	Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega
27	TriStar LB 941 Multimode Microplate Reader	Berthold Technologies
28	DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen
29	Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
30	Taqman MicroRNA Assay Kit	Applied Biosystems
31	10% polyacrylamide gel	Wako
32	PVDF membrane	Millipore
33	Chemi-Lumi One Super	Nacalai tesque
34	anti-mouse IgG, anti-rabbit IgG, anti-goat IgG HRP-linked antibody	Cell Signaling Technology
35	LAS3000	FUJIFILM
36	miRNA mimic, inhibitor	Qiagen
37	Agilent 2100 Bioanalyzer platform	Agilent
38	siRNA	Gene Design
39	siKCTD16	Qiagen
40	KOD Plus	TOYOBO
41	DMSO	Sigma Aldrich
42	SP600125	Wako

43	CEP1347	Tocris Bioscience
44	SB202190	Cayman Chemical
45	U-0126	Cayman Chemical
46	SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads)	Cell Signaling Technology
47	37%ホルムアルデヒド	Nacalai tesque

引用文献

1. Human Adenovirus Working Group. http://hadvwg.gmu.edu/. Accessed Dec. 13th. 2018.
2. **Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T.** 1995. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA− SCID: initial trial results after 4 years. Science **20**.
3. **Swisher SG, Roth JA, Nemunaitis J.** 1999. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. Journal of the National Cancer Institute **91**.
4. **Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S.** 1996. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. Science **274**.
5. **Kawashima T, Kagawa S, Kobayashi N.** 2004. Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. Clinical Cancer Research **10**.
6. **Miest TS, Cattaneo R.** 2014. New viruses for cancer therapy: meeting clinical needs. Nature Reviews Microbiology **12:**23-34.
7. **Marshall E.** 1999. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. Science **286:**2244-2245.
8. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide http://www.abedia.com/wiley/vectors.php. Accessed Dec. 21th. 2018.
9. **Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM.** 1994. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A **91:**4407-4411.
10. **Shimizu K, Sakurai F, Machitani M, Katayama K, Mizuguchi H.** 2011. Quantitative analysis of the leaky expression of adenovirus genes in cells transduced with a replication-incompetent adenovirus vector. Mol Pharm **8:**1430-1435.
11. **Andrews JL, Kadan MJ, Gorziglia MI, Kaleko M, Connelly S.** 2001. Generation and characterization of E1/E2a/E3/E4-deficient adenoviral vectors encoding human factor VIII. Mol Ther **3:**329-336.
12. **Dormond E, Chahal P, Bernier A, Tran R, Perrier M, Kamen A.** 2010. An efficient process for the purification of helper-dependent adenoviral vector and removal of helper virus by iodixanol ultracentrifugation. J Virol Methods **165:**83-89.
13. **Moore AE.** 1949. The destructive effect of the virus of Russian Far East encephalitis on the transplantable mouse sarcoma 180. Cancer **2:**525-534.
14. **Fukuhara H, Ino Y, Todo T.** 2016. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. Cancer Science **107:**1373-1379.
15. **Borah S, Darricarrere N, Darnell A, Myoung J, Steitz JA.** 2011. A Viral Nuclear

Noncoding RNA Binds Re-localized Poly(A) Binding Protein and Is Required for Late KSHV Gene Expression. Plos Pathogens **7**.

16. **Kincaid RP, Sullivan CS.** 2012. Virus-Encoded microRNAs: An Overview and a Look to the Future. PLoS Pathog **8**.
17. **Gupta A, Gartner JJ, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG, Fraser NW.** 2006. Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. Nature **442:**82-85.
18. **Söderlund H, Pettersson U, Vennström B, Philipson L, Mathews MB.** 1976. A new species of virus-coded low molecular weight RNA from cells infected with adenovirus type 2. Cell **7:**585-593.
19. **Ma Y, Mathews MB.** 1996. Structure, function, and evolution of adenovirus-associated RNA: a phylogenetic approach. Journal of Virology **70**.
20. **Minamitani T, Iwakiri D, Takada K.** 2011. Adenovirus Virus-Associated RNAs Induce Type I Interferon Expression through a RIG-I-Mediated Pathway. Journal of Virology **85:**4035-4040.
21. **Yamaguchi T, Kawabata K, Kouyama E, Ishii KJ, Katayama K, Suzuki T, Kurachi S, Sakurai F, Akira S, Mizuguchi H.** 2010. Induction of type I interferon by adenovirus-encoded small RNAs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107:**17286-17291.
22. **Lu SH, Cullen BR.** 2004. Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and microRNA biogenesis. Journal of Virology **78:**12868-12876.
23. **Andersson MG, Haasnoot PCJ, Xu N, Berenjian S, Berkhout B, Akusjarvi G.** 2005. Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. Journal of Virology **79:**9556-9565.
24. **Machitani M, Sakurai F, Katayama K, Tachibana M, Suzuki T, Matsui H, Yamaguchi T, Mizuguchi H.** 2013. Improving adenovirus vector-mediated RNAi efficiency by lacking the expression of virus-associated RNAs. Virus Research **178:**357-363.
25. **Shimizu K, Sakurai F, Tomita K, Nagamoto Y, Nakamura S, Katayama K, Tachibana M, Kawabata K, Mizuguchi H.** 2014. Suppression of leaky expression of adenovirus genes by insertion of microRNA-targeted sequences in the replication-incompetent adenovirus vector genome. Molecular Therapy-Methods & Clinical Development **1**.
26. **Mizuguchi H, Kay MA.** 1998. Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. Human gene therapy **9:**2577-2583.
27. **Nelson JE, Kay MA.** 1997. Persistence of recombinant adenovirus in vivo is not

dependent on vector DNA replication. Journal of Virology **71:**8902-8907.

28. **Mathews MB, Shenk T.** 1991. Adenovirus virus-associated RNA and translation control. Journal of Virology **65**.
29. **Blair GE, Dixon SC, Griffiths SA, Zajdel MEB.** 1989. Restricted Replication of Human Adenovirus Type-5 in Mouse-Cell Lines. Virus Research **14:**339-346.
30. **Machitani M, Katayama K, Sakurai F, Matsui H, Yamaguchi T, Suzuki T, Miyoshi H, Kawabata K, Mizuguchi H.** 2011. Development of an adenovirus vector lacking the expression of virus-associated RNAs. Journal of Controlled Release **154**.
31. **Bhat RA, Thimmappaya B.** 1984. Adenovirus mutants with DNA sequence perturbations in the intragenic promoter of VAI RNA gene allow the enhanced transcription of VAII RNA gene in HeLa cells. Nucleic Acids Res **12**.
32. **Bhat RA, Thimmappaya B.** 1985. Construction and analysis of additional adenovirus substitution mutants confirm the complementation of VAI RNA function by two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus. Journal of Virology **56**.
33. **O'Malley RP, Mariano TM, Siekierka J, Mathews MB.** 1986. A mechanism for the control of protein synthesis by adenovirus VA RNA I. Cell **44**.
34. **Akusjärvi G, Mathews MB.** 1980. Structure of genes for virus-associated RNAI and RNAII of adenovirus type 2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the Unite **77**.
35. **Ma Y, Mathews MB.** 1993. Comparative analysis of the structure and function of adenovirus virus-associated RNAs. Journal of Virology **67**.
36. **Bhat RA, Thimmappaya B.** 1983. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus can functionally substitute for the virus-associated RNAs in the lytic growth of adenovirus 5. Proceedings of the National Academy of Sciences of the Unite **80**.
37. **Aparicio O, Razquin N, Zaratiegui M, Narvaiza I, Fortes P.** 2006. Adenovirus Virus-Associated RNA Is Processed to Functional Interfering RNAs Involved in Virus Production. Journal of Virology **80:**1376-1384.
38. **Zhao H, Chen M, Pettersson U.** 2013. Identification of adenovirus-encoded small RNAs by deep RNA sequencing. Virology **442:**148-155.
39. **Feldman ER, Kara M, Coleman CB, Grau KR, Oko LM, Krueger BJ, Renne R, van Dyk LF, Tibbetts SA.** 2014. Virus-encoded microRNAs facilitate gammaherpesvirus latency and pathogenesis in vivo. mBio **5:**14.
40. **Grundhoff A, Sullivan CS.** 2011. Virus-encoded microRNAs. Virology **411:**325-343.
41. **Shinozaki-Ushiku A, Kunita A, Isogai M, Hibiya T, Ushiku T, Takada K, Fukayama M.** 2015. Profiling of Virus-Encoded MicroRNAs in Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma and Their Roles in Gastric Carcinogenesis. Journal of Virology

89:5581-5591.

42. **Suffert G, Malterer G, Hausser J, Viiliainen J, Fender A, Contrant M, Ivacevic T, Benes V, Gros F, Voinnet O, Zavolan M, Ojala PM, Haas JG, Pfeffer S.** 2011. Kaposi's sarcoma herpesvirus microRNAs target caspase 3 and regulate apoptosis. PLoS Pathog **7:**e1002405.
43. **Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM, Ganem D.** 2005. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. Nature **435:**682-686.
44. **Yao Y, Nair V.** 2014. Role of virus-encoded microRNAs in Avian viral diseases. Viruses **6:**1379-1394.
45. **Bellutti F, Kauer M, Kneidinger D, Lion T.** 2015. Identification of RISC-Associated Adenoviral MicroRNAs, a Subset of Their Direct Targets, and Global Changes in the Targetome upon Lytic Adenovirus 5 Infection. Journal of Virology **89**.
46. **Kamel W, Segerman B, Punga T, Akusjärvi G.** 2014. Small RNA Sequence Analysis of Adenovirus VA RNA-Derived MiRNAs Reveals an Unexpected Serotype-Specific Difference in Structure and Abundance. PLoS ONE **9**.
47. **Xu N, Segerman B, Zhou X, Akusjärvi G.** 2007. Adenovirus Virus-Associated RNAII-Derived Small RNAs Are Efficiently Incorporated into the RNA-Induced Silencing Complex and Associate with Polyribosomes. Journal of Virology **81:**10540-10549.
48. **Kamel W, Segerman B, Öberg D, Punga T, Akusjärvi G.** 2013. The adenovirus VA RNA-derived miRNAs are not essential for lytic virus growth in tissue culture cells. Nucleic Acids Res **41:**4802-4812.
49. **Machitani M, Sakurai F, Wakabayashi K, Tomita K, Tachibana M, Mizuguchi H.** 2016. Dicer functions as an antiviral system against human adenoviruses via cleavage of adenovirus-encoded noncoding RNA. Scientific Reports **6:**27598.
50. **Maizel JV, Jr., White DO, Scharff MD.** 1968. The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. Virology **36:**115-125.
51. **Wong N, Wang X.** 2015. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. Nucleic Acids Res **43:**52.
52. **Pei Z, Shi G, Kondo S, Ito M, Maekawa A, Suzuki M, Saito I, Suzuki T, Kanegae Y.** 2013. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication. Scientific Reports **3**.
53. **Bennasser Y, Chable-Bessia C, Triboulet R, Gibbings D, Gwizdek C, Dargemont C, Kremer EJ, Voinnet O, Benkirane M.** 2011. Competition for XPO5 binding between

Dicer mRNA, pre-miRNA and viral RNA regulates human Dicer levels. Nature structural & molecular biology **18:**323-327.

54. **Choi SH, Wright JB, Gerber SA, Cole MD.** 2010. Myc protein is stabilized by suppression of a novel E3 ligase complex in cancer cells. Genes & Development **24:**1236-1241.

55. **Leung-Pineda V, Huh J, Piwnica-Worms H.** 2009. DDB1 targets Chk1 to the Cul4 E3 ligase complex in normal cycling cells and in cells experiencing replication stress. Cancer Res **69:**2630-2637.

56. **Sharma P, Nag A.** 2014. CUL4A ubiquitin ligase: a promising drug target for cancer and other human diseases. Open biology **4:**130217.

57. **Sugasawa K, Okuda Y, Saijo M, Nishi R, Matsuda N, Chu G, Mori T, Iwai S, Tanaka K, Hanaoka F.** 2005. UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. Cell **121:**387-400.

58. **Wertz IE, O'Rourke KM, Zhang Z, Dornan D, Arnott D, Deshaies RJ, Dixit VM.** 2004. Human De-etiolated-1 regulates c-Jun by assembling a CUL4A ubiquitin ligase. Science **303:**1371-1374.

59. **Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu WM, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW.** 2001. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98:**13681-13686.

60. **Maroney AC, Glicksman MA, Basma AN, Walton KM, Knight E, Murphy CA, Bartlett BA, Finn JP, Angeles T, Matsuda Y, Neff NT, Dionne CA.** 1998. Motoneuron apoptosis is blocked by CEP-1347 (KT 7515), a novel inhibitor of the JNK signaling pathway. Journal of Neuroscience **18:**104-111.

61. **Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM.** 1998. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. Journal of Biological Chemistry **273:**18623-18632.

62. **Lee JC, Laydon JT, Mcdonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, Mcnulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, Strickler JE, Mclaughlin MM, Siemens IR, Fisher SM, Livi GP, White JR, Adams JL, Young PR.** 1994. A Protein-Kinase Involved in the Regulation of Inflammatory Cytokine Biosynthesis. Nature **372:**739-746.

63. **Sandelin A, Alkema W, Engstrom P, Wasserman WW, Lenhard B.** 2004. JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. Nucleic Acids Research **32:**D91-D94.

64. **Jackson S, Xiong Y.** 2009. CRL4s: the CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. Trends in biochemical sciences **34:**562-570.

65. **Petroski MD, Deshaies RJ.** 2005. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. Nat Rev Mol Cell Biol **6:**9-20.

66. **Gastaldello S, Hildebrand S, Faridani O, Callegari S, Palmkvist M, Di Guglielmo C, Masucci MG.** 2010. A deneddylase encoded by Epstein-Barr virus promotes viral DNA replication by regulating the activity of cullin-RING ligases. Nat Cell Biol **12:**351-361.

67. **Huh K, Zhou X, Hayakawa H, Cho J-Y, Libermann TA, Jin J, Harper WJ, Munger K.** 2007. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. Journal of Virology **81:**9737-9747.

68. **Schreiner S, Wimmer P, Dobner T.** 2012. Adenovirus degradation of cellular proteins. Future microbiology **7:**211-225.

69. **Ceballos-Olvera I, Chavez-Salinas S, Medina F, Ludert JE, del Angel RM.** 2010. JNK phosphorylation, induced during dengue virus infection, is important for viral infection and requires the presence of cholesterol. Virology **396:**30-36.

70. **Ludwig S, Ehrhardt C, Neumeier ER, Kracht M, Rapp UR, Pleschka S.** 2001. Influenza virus-induced AP-1-dependent gene expression requires activation of the JNK signaling pathway. Journal of Biological Chemistry **276:**10990-10998.

71. **McLean TI, Bachenheimer SL.** 1999. Activation of cJUN N-terminal kinase by herpes simplex virus type 1 enhances viral replication. Journal of Virology.

72. **Bruening W, Giasson B, Mushynski W, Durham HD.** 1998. Activation of stress-activated MAP protein kinases up-regulates expression of transgenes driven by the cytomegalovirus immediate/early promoter. Nucleic Acids Res **26:**486-489.

73. **Zhang H, Niu X, Qian Z, Qian J, Xuan B.** 2015. The c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 inhibits human cytomegalovirus replication. J Med Virol **87:**2135-2144.