

# ライフサイエンス研究

## LIFE SCIENCE RESEARCH PROGRAMS

生物がもつ諸機能を研究し、それらを支配している原理を明らかにすることによって、生物関連産業・バイオテクノロジー・医療に新しい技術の種を提供することを目指した長期計画研究を行っている。これらは当研究所の一般研究を基盤として、所内外の研究者の協力のもとに次の1課題について研究を実施している。

### 1) 遺伝子科学研究

## 遺伝子科学研究

### Gene Science Research

代表研究者 天 沼 宏

(分子細胞生物学研究室)

#### 1. レトロウイルス遺伝子発現機構解析研究

研究担当者：間 陽子，蒲田政和<sup>\*1</sup>，田島 茂<sup>\*1</sup>，久保嘉直<sup>\*1</sup>(分子細胞生物学研)；石井俊輔，野村照明(分子遺伝学研)；血井明倫(遺伝子基盤研究部)

レトロウイルスの感染、増殖機構の未解決な問題を基礎ウイルス学的、分子生物学的に解明するとともに、種々の疾患の遺伝子治療のためのより付加価値の高い遺伝子導入ベクターの開発、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)、ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-1)などの哺乳類レトロウイルスによる疾病の発症機構の解明を目指した研究を行っている。

細胞種特異的に遺伝子導入する標的化レトロウイルスベクターの作製を試みた。ペプチド性リガンドをレトロウイルスのエンベロープタンパク質(Env)に組み込んでキメラタンパク質とし、これによりリガンドに対する受容体をレトロウイルスの細胞内侵入のための受容体として機能させるという方法をとった。リガンドとしてはヒト上皮成長因子(EGF)およびケモカインの一種であるヒトストローマ細胞由来因子-1(SDF-1 $\alpha$ )を用いた。マウス同種指向性レトロウイルス(MLV)であるモロニー白血病ウイルス Env の本来の感染受容体認識領域(VRA)内においてこれらのリガンドとのキメラタンパク質を作製した。VRA中の異なる6つの部位を選び、それぞれにEGF配列をリンカーとともに挿入した。また、タンパク質三次構造モデリングに従いVRAの配列の一部を除き、これをEGFの配列で置換した。挿入EGFキメラのうちsite3挿入キメラ Envのみがウイルス粒子に再構成されたが、あとのキメラ Envは細胞中に発現するもののウイルス粒子中には取り込まれなかった。置換EGFキメラ Envも同様であった。site3挿入EGFキメラ Envを持つベクターは同種指向性ウイルスの感染受容体であるCAT-1経路での細胞侵入能を維持していたが、EGF受容体経路での細胞侵入は起こさず、EGF受容体とCAT-1との両方を発現する細胞ではEGF受容体の

存在によりCAT-1経路での細胞侵入が阻害された。

SDF-1 $\alpha$ をsite3に挿入したキメラ Envは効率は低いがウイルス粒子に再構成され、このベクターはSDF-1の受容体であるCXCR4経路での細胞侵入を起こした。EGFの場合と同様、このベクターはCAT-1経路での細胞侵入も起こし、CXCR4経路での細胞侵入の効率はCAT-1経路のその約1/100程度であった。置換SDF-1キメラ Envはウイルス粒子に取り込まれなかった。リガンドキメラ Envの方法により細胞侵入の受容体特異性の改変に明確に成功したのは本研究が初めてである。種々の膜タンパク質の中でMLVの細胞侵入の受容体として機能できるものは限られていると考えられ、上記の結果より受容体として機能するための膜タンパク質の必要条件としては、複数回膜貫通タンパク質であることが示唆された。

リガンドキメラ Envの方法による標的化レトロウイルスベクター作製における最大の問題は、リガンドによる新たな受容体認識と Envによる膜融合反応との共役の問題である。MLV Envの受容体結合依存的膜融合能は、その膜貫通サブユニットであるTMタンパク質のウイルス粒子内領域のC末端16アミノ酸(Rペプチド)によって負に制御される。ウイルス粒子内ではRペプチドはウイルス性プロテアーゼによって切り離され、Envの膜融合能は潜在的に活性化された状態になる。Rペプチド切断部位の周辺のアミノ酸を変異させた変異 Envを作製し、その諸性質を調べたところ、切断部位の両側のアミノ酸であるLeuおよびValは共に、膜融合能の阻害、Rペプチドの切断に関与していることが明らかになった。

HIV-1アクセサリ遺伝子の1つであるvprの産物は、感染効率の上昇および潜伏感染細胞でのプロウイルスの活性化を導くなど、AIDS発症のkey factorとして注目されている。一方、リンパ球をG2 arrestすること、細胞の分化、多倍体化およびアポトーシスを誘導することが報告されている。vprの欠失変異体をHeLa細胞に導入すること

により G2 arrest 能を完全に消失しているが、G1 arrest 能と強いアポトーシス活性を獲得した Vpr の C 末端欠失変異体を見だし、G2 arrest とアポトーシスは異なる経路で発揮される可能性を示した。同様に、野生型 Vpr も G2 arrest とは異なる機序によるアポトーシス誘導能を有することを明らかにした。HIV-1 潜伏感染細胞を特異的に破壊するために、上記変異体を HIV-1 LTR の下流に連結し、更に抗 HIV-1gp120 抗体結合リポソームに封入したベクターを作製中である。

Vpr は相互作用する細胞因子も複数存在する。野生型 Vpr と同様の核膜・核への局在能を保持しているが細胞増殖抑制能を完全に消失している Vpr17-81 を bait として yeast two-hybrid 法を行った。UNG, DNA 除去修復機構関連分子 HHR23A を含む 5 種類の既知タンパク質と、6 種類の未知タンパク質をコードする遺伝子が同定された。HHR23A については、C 末端側 UBA ドメインが Vpr との結合に重要であること、また、この結合には Vpr の 2 つの  $\alpha$ -helix ドメイン内の 33 位の His, 67 位の Leu および 74 位の Ile の各アミノ酸が重要であることを証明した。

Vpr は preintegration complex (PIC) に結合し、それを核に移行させることにより、マクロファージ等の非分裂細胞への HIV-1 の感染を可能にする。Vpr の機能ドメインを解析したところ、2 つの  $\alpha$ -helix ドメインが共に核移行シグナルとして機能していることを明らかにした。In vitro translation で作製した野生型および変異型 Vpr を用いて pull-down assay を行った結果、GST 融合型 Importin  $\alpha$  および  $\beta$  は Vpr の 2 つ目の  $\alpha$ -helix ドメインと相互作用していることが示された。digitonin 処理した HeLa 細胞を用いた Nuclear import assay により、Vpr の 2 つ目の  $\alpha$ -helix ドメインは核内への移行に、1 つ目の  $\alpha$ -helix ドメインは

核膜局在に重要であることを明らかにした。以上の結果を基に、Vpr の核移行に關与する領域をコードする発現ベクターを用いて、マクロファージへの HIV-1 の感染拡大を阻止する遺伝子治療用ベクターの開発を目指している。

BLV の転写活性化因子 Tax はウイルス遺伝子の発現を制御し、初代培養細胞をトランスフォームする能力も有していることから、白血病誘導の主要因と考えられる。BLV Tax により活性化される細胞遺伝子は未だ同定されておらず、白血病誘導機構の解析も殆ど進展していない。これまでに、BLV LTR に対し野生型に比べ著しく高い転写活性化能を示す高活性型 Tax 変異体を同定した。これらの活性は Tax 応答配列内のサイクリック AMP 応答配列 (CRE) に変異を導入すると著しく低下した。一部の高活性型 Tax は CRE 配列を有する c-fos 遺伝子のエンハンサーばかりでなく、HTLV-I と MMTV LTR をも明らかに活性化した。MMTV LTR では、CRE 配列を有しないにもかかわらず高活性型 Tax による活性化は顕著であった。野生型 Tax はいずれのエンハンサーも活性化しなかった。この変異体の in vivo でのウイルス感染能および白血病誘導能に及ぼす影響を調べるために、感染性分子クローンをヒツジに接種した。野生型および高活性型分子クローンを各 6 頭に接種したところ、野生型 2 頭および高活性型 3 頭で感染が成立した。個体間で、末梢血中の BLV 陽性細胞の割合およびウイルス発現量に差異が観察されたものの、接種した分子クローンの種類との間に関連は認められなかった。高活性型 Tax は、in vivo でのウイルス感染の成立、感染個体内でのウイルスの伝搬および発現に対し、顕著な影響を及ぼさないことが明らかとなった。

---

\*1 基礎科学特別研究員