

## 分担研究報告書

### レトロウイルスベクターによる神経栄養因子遺伝子導入・発現に関する研究 分担研究者 渡辺里仁 創価大学生命科学研究所教授

レトロウイルスベクターに導入した BDNF の発現部位を確かめるため、変異型緑色蛍光蛋白質 (EGFP) 遺伝子と BDNF 遺伝子との融合蛋白遺伝子を作成した。EGFP の発現が、レトロウイルスベクターで導入・発現させた場合特に減弱しかつ不安定になることから、標識遺伝子として EGFP 以外の別の遺伝子を使うことを検討した。昨年度までに、パッケージング細胞の env 遺伝子の安定発現のためにポリ A シグナルの構造の関与があることを明らかにしたが、本年度は、不安定な発現を誘導する責任部位を更に絞り込んだ。

#### A. 研究目的

レトロウイルスベクターを用いた遺伝子発現系で、神経栄養因子の遺伝子が個体内で安定に遺伝子発現する条件を決定する。本研究では、中枢神経系に親和性をもつレトロウイルス (A8 ウイルス) を複製欠損ウイルスベクターとして用いて代表的な神経栄養因子であるニューロトロフィンを局所的に発現することにより、大脳皮質神経系細胞の発生、移動、分化に対する影響を細胞種レベルで詳細に検討することを目的とする。ベクターは、人獣共通の新規なレトロウイルスベクターを構築し、サル、ラットで遺伝子導入効率を確かめ、更にヒトの遺伝子治療に用い得る形にするための基礎研究を行う。

#### B. 研究方法

1. 神経栄養因子と標識蛋白質との融合蛋白質の作成：LXSN レトロウイルスベクターの 3-prime LTR を A8 の LTR と置換して LXSN8 を作成した。SV40 と チミジンキナーゼの複合プロモーター (SV-TK) を挿入した。green fluorescent protein の変異型 EGFP (青色蛍光 GFP) 又は BDNF-EGFP 複合タンパク質を SV-TK promoter の後ろに挿入した (図 1b)。EGFP、BDNF を c-Myc (ヒト c-Myc の部分ペプチド) -His<sub>6</sub> tag 複合タンパク質を作成した (図 1c)。パッケージング細胞として A8 ウイルスのパッケージングシグナルを除く配列を遺伝子導入したラットグリオーマ由来 C6 細胞 (3E10) を用いた。
2. ベクター系：安定なパッケージング細胞構築にあたっては、我々が分離したウイルス株である A8-V の遺伝子を基にしたパッケージング細胞  $\Psi$  FrC6/NIH 及び  $\Psi$  FrC6/C6 をパッケージング細胞と

して用いた。A8 ウイルス遺伝子よりパッケージングシグナル  $\Psi$  を除き更に下流の LTR を SV40 のスプライシング型ポリ A 付加シグナルで置換して得たベクター pA8( $\Psi$ )- $\beta$  を NIH3T3 細胞に導入し、パッケージング細胞  $\Psi$  FrC6- $\beta$  を樹立した。安定したエンベロープ蛋白遺伝子 (env) 発現のためのポリ A 構造について検討した。特に、RNA の立体構造が異常スプライシングによる遺伝子発現の不安定さを誘導している可能性が高いため、ポリ A 構造周辺部位が異なった遺伝子構造を構築し、その立体構造に与える影響と、異常スプライシングを誘導する機構を検索した。

#### C. 研究結果

1. 神経栄養因子の遺伝子：NIH 3T3 細胞を用いて LXSN8 に導入した EGFP (図 1 a) の発現を指標に力値の測定を行った。感染後、3 日までの EGFP の発光はなく、4 日以降に初めて発現した。力値は、クローンにより異なり、 $10^3$ - $10^5$  cfu/ml のものが得られた。同様な構築により、BDNF-EGFP 複合タンパク質を発現させるための予備実験として、この蛋白質の cDNA を作成し、CMV promoter を含む発現ベクターに遺伝子を挿入した。COS7 細胞に遺伝子導入した後、発現を蛍光顕微鏡にて確認した。24 時間以内に蛍光発現が観察されたが、EGFP の蛍光よりかなり弱かった (発現は 36 時間後まで観察された)。トランスフォーマントでは検討した全てのクローンで発現が検出感度以下であった。LXSN-A8 ( $\psi$ +) ベクターに挿入し、3E10 細胞に遺伝子導入した場合でも結果は同じであった。EGFP-cMyc-His<sub>6</sub> tag (図 1c) を用いた場合、EGFP 単独のトランスフ

エクションでは、ステーブルトランスフォーマントのほとんど (>90%) が GFP の蛍光を発した。しかし、EGFP-cMyc-His<sub>6</sub> tag では、20 個のクローンのうち、1 個のみがコントロールに比べ極めて弱い蛍光を示したのみであった。しかし、c-Myc の抗体でウエスタンブロットを行ったところ、20 個のクローンのうち、蛍光を検出できた 1 個を含む 6 個のクローンが目的の大きさのタンパク質を検出した。また、このタンパク質は GFP 抗体でも検出された。

図1a

**LXSNA8 ( $\phi$ +) EGFP**

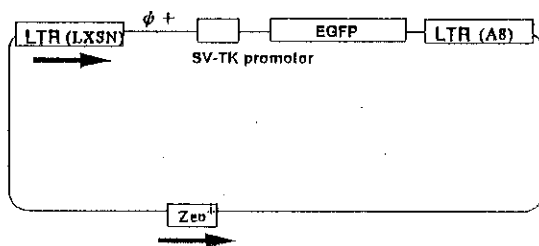
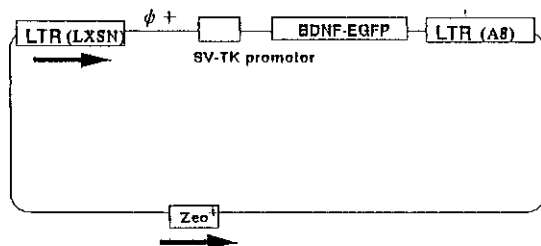


図1b

pBluescript II SK+

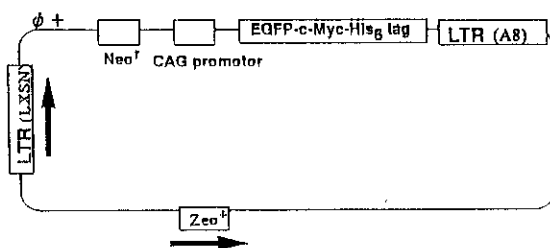
**LXSNA8 ( $\phi$ +) BDNF-EGFP**



pBluescript II SK+

図1c

**LXSNA8 ( $\phi$ +) EGFP-cMyc-His tag**



pBluescript II SK+

2. ベクター系：感染力価が下がらなかった原因の一部が、スプライシング型のポリ A シグナルによることと、発現ベクターに残存している env 遺伝子断片が影響していることが示唆された。スプライシング型ポリ A シグナルを用いた場合 env 遺伝子の約 1Kb、即ち、env 遺伝子の gp70 の中の下流領域と p15E の大部分をコードする部分約 1Kb がスプライスアウトされた形でエンベロープ蛋白 (Env 蛋白) の mRNA が形成されていた。ポリ A シグナルを非スプライス型で機能させると、このような欠損 mRNA の形成がほとんどなくなり、安定した env 遺伝子の発現が得られた。env 3' 末端に付加した SV40 のポリ A シグナル遺伝子内の長い 5' 側にあるスプライシング部位が影響するの否かを検索した結果、単純にこのサイトが異常スプライシングを引き起こしているのではなくポリ A シグナルの下流の領域の一定の長さが必要であることが明らかとなった。

D. 考察

BDNF-EGFP の蛍光がトランスフォーマントで観察されなかったことの原因として、1) BDNF-EGFP の立体的な構造が EGFP の蛍光を弱めている、2) トランスフォーマントの場合、一過性発現に比べて、細胞一個あたりの cDNA 量が少ないなどの理由が考えられる。昨年報告した、LTR の内部に 2 つのプロモーターを挟んだ場合、パッケージング細胞の増殖中に何らかの理由で前方のプロモーターが不活性化されて、 $\beta$ -gal の発現が弱められたこととあわせると、レトロウイルスベクター内での遺伝子発現制御に関する基礎的なデータの積み重ねが今後とも肝要であると考えられる。これは複合蛋白に His-tag を用いた場合でも同じで、EGFP の後方に遺伝子配列を挿入した場合、EGFP の構造の変化によって蛍光が弱められる可能性が高いことを示唆する。パッケージング細胞の改良面でも同様に、ウイルスの各構成遺伝子の安定発現を計るためには、レトロウイルスの増殖に関する基礎的なデータの積み重ねが必要であることが、あらためて明らかとなった。

## E. 結論

今回、我々は、env 遺伝子の安定発現のためにポリ A シグナルの構造の関与があることを明らかにしたが、この事実は、複雑な遺伝子発現制御に関わる因子のほんの氷山の一角であることが予想されるからである。その意味でも、ベクターの開発に関する仕事は、世界的なレベルで見て漸く入り口にたどり着いたところであるとと言える。

## F. 研究発表

### 学会発表

- 1) 高瀬 明、渡辺里仁 神経病原性マウスレトロウイルスの *in vivo* および *in vitro* の増殖に対するレセプターの関与 第2回日本神経ウイルス研究会研究集会 1998年7月24-25日(東京)
- 2) 高瀬 明、渡辺里仁 神経病原性マウスレトロウイルスのレセプター認識 第46回日本ウイルス学会総会 1998年10月12-14日(東京)
- 3) 福光秀文、高瀬(余田)明、渡辺里仁 中枢神経病原性ウイルス(A8ウイルス)感染がEAEに及ぼす病理学的変化 第12回日本神経免疫学会学術集会 2000年2月3日-4日(東京)