

# 厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「静止細胞への非ウイルス性ベクターシステムの開発」に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 石坂幸人

平成14(2002)年3月

## 目 次

|   |          |
|---|----------|
| I 総括研究報告書                                   |          |
| 「静止細胞への非ウイルス性遺伝子導入ベクターの開発」に関する研究<br>石坂幸人    | ----- 1  |
| II. 分担研究報告                                  |          |
| 1. 「静止細胞への非ウイルス性遺伝子導入ベクターの開発」に関する研究<br>石坂幸人 | ----- 4  |
| 2. 「Vpr に相同性を示す蛋白質の精製と機能解析」に関する研究<br>志村まり   | ----- 6  |
| 3. 「Vpr 由来ペプチドを用いた細胞形質転換法の開発」に関する研究<br>大沢宜明 | ----- 8  |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表                         | ----- 9  |
| IV. . 研究成果の刊行物. 別冊                          | ----- 10 |
| V. (資料) Vpr によるゲノム不安定性に関する論文                | ----- 19 |

「静止細胞への非ウイルス性遺伝子導入ベクターの開発」に関する研究

主任研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所

研究要旨 静止細胞への外来遺伝子導入を可能にする安全で簡便なベクターシステムの開発は重要であり、突破口を切り開く新しい技術として HIV 改変ベクターが期待されている。今回、HIV アクセサリー遺伝子である Vpr 蛋白質に胞体内に取り込まれる機能を見出し、その最少ドメインを決定した。また、このペプチドが静止期にある細胞にも取り込まれること、また分子約 550kDa であるβ-ガラクトシラーゼに結合させることにより、ヒト臍帯血由来単核球細胞の約 90%の細胞に同蛋白質の活性を誘導できることを明らかにした。次年度では、核酸導入の可能性を明らかにし、静止細胞に対する非ウイルス性ベクターシステムを確立したいと考えている。

石坂幸人 国立国際医療センター研究所

難治性疾患研究部長

志村まり 国立国際医療センター研究所

臨床免疫研究室

大沢宜明 国立国際医療センター研究所

難治性疾患研究部 研究員

A. 研究目的

静止細胞への外来遺伝子導入を可能にする安全で簡便なベクターシステムの開発は重要であり、突破口を切り開く新しい技術として HIV 改変ベクターが期待されている。HIV はレトロウイルスでありながら、単球細胞などの静止細胞に対しても感染することが可能で、改変 HIV ベクターが現在、静止細胞への遺伝子導入のために用いられている。しかし、ベクターの安全性や倫理的な側面から、将来的には HIV の特性を生かしながら、より安全性の高い非ウイルスベクターの開発を行うことが重要と考えられる。

HIV アクセサリー遺伝子 Vpr は HIV の静止細胞への感染様式を可能にする因子の一つと考えられており、ウイルス感染後に形成されるウイルス DNA を核内へ輸送する機能が備わっている。そして近年、Vpr のこのような機能を利用した外来遺伝子導も試みられ、Vpr による外来遺伝子発現増加も期待されるようになった (J. Virol. 74, 5424-5431, 2000)。申請者はこれまで Vpr 遺伝子の機能解析を精力的に行い (FASEB J. 13, 621-637, 1999;

Biochem. Biophys. Res. Commun. 258, 379-384, 1999; Cancer Res. 59, 2259-2264, 1999; Biochem. Biophys. Res. Commun. 261, 308-316, 1999、いずれも参考資料として掲載)、野生型 Vpr が細胞周期異常やゲノム不安定性を誘発すること、さらに Vpr を培養液中に添加するだけで細胞内に取り込まれる作用（以下、トランス作用）が備わっていることを見出してきた。さらに今回、Vpr 抗体で認識される約 10kDa の Vpr 様蛋白質（以下 VLP-1;Vpr-like protein）を牛胎児血清中に見出した。VLP は、調べた全てのロットの牛胎児血清中に検出されることから、Vpr で問題となる細胞周期異常誘発能を欠失していることが予測される。以上の知見から、本研究では VPR 及び VLP を用いた新しい静止細胞への遺伝子導入ベクター開発を目的として、以下に示す3つの事項を明らかにすることを目的とする。

1. 静止細胞への遺伝子を可能にする VPR の最少機能ドメインの同定
2. VLP (Vpr-like protein) 遺伝子のクローニングと機能解析
3. VLP を用いた静止細胞への遺伝子導入法の確立

である。本研究により、造血幹細胞や神経細胞への安全な遺伝子導入法が確立され、様々な難治性疾患、特に神経変性疾患に対する画期的な治療法の開発が期待される。

## B. 研究方法

### 1. Vpr変異体を用いた静止細胞への遺伝子導入

Vpr の C-末 4 5 アミノ酸中に遺伝子導入効率を増加させる活性が知られている。しかし、このペプチドが細胞周期異常を誘発することから、まず C 末 1 8 個のアミノ酸を欠失させたペプチド（以下 C45D18）を基本骨格として、種々の欠失変異体を作成し、胞体内に取り込まれるための最少機能ドメインを決定した。血清無し状態で3日間培養した細胞に各種ビオチン化ペプチドを 10 ug/ml で添加し、翌日、メタノールにて細胞を固定後、0.02%の Triton X-100 で処理した。そして、ストレプトアビジン結合 FITC を作用させることにより、胞体内に取り込まれたペプチドを検出した。また、ヒト臍帯血由来単核球細胞に同ペプチドを添加し、ペプチドの取り込みの有無を FACS で解析した。

### 2. 遺伝子産物に対するベクター機能の解析

市販されているβ-ガラクトシラーゼ蛋白質、ストレプトアビジン及び、マウス p53 に C45D18 を -S-S-結合を用いて複合体を作成し、ヒト臍帯血由来単核球細胞や付着系細胞に作用させた。特に p53 の取り込みを解析する際には、内在性 p53 が欠失している SaOS-2 細胞を用いた。ペプチドを作用させた後、β-ガラクトシラーゼ蛋白質については酵素活性の有無を FDG (Molecular Probe 社製) を基質として、FACS による測定を行った。また p53 については抗 p53 抗体による免疫染色により、取り込みの有無を解析した。

#### (倫理面への配慮)

ヒト臍帯血を採取する際の妊婦への説明と同意は、当センター倫理委員会が示した方法に従った。

## C. 研究結果

1. C45D18 は、付着系細胞である HT1080 細胞に効率良く取り込まれた。また、ヒト臍帯血由来単核球細胞に対しても、一晚ペプチドを作用させることにより、ほぼ 100% の細胞にペプチドが取り込まれた。
2. 種々の変異ペプチドを合成し、胞体内に取り込まれるのに必要な最少ドメインを決定した。用

いたペプチドは、C39D18、C42D18、C45D21、C45D24、C45D27 であった。この中で、C45D21 及び C45D18 は臍帯血に対して、取り込まれる傾向が認められたものの、C45D18 のそれと比較すると、究めて低い取り込みであった。

3. ヒト臍帯血由来単核球細胞に作用させる際、IL-3、IL-6 及び SCF を添加の有無により増殖刺激の効果を検定した。その結果、これらサイトカインなしでも、取り込みの程度には、差が認められなかった。
4. 蛋白質との複合体による形質転換の有無を解析した。C45D18 とβ-ガラクトシラーゼとの複合体を一晚ヒト臍帯血由来単核球細胞に作用させたところ、ほぼ 90% の細胞に同蛋白質の活性が誘導された。
5. C45D18 に結合させた p53 遺伝子産物は、SaOS-2 細胞に取り込まれた。しかし、DNA 損傷を誘導する Mitomycin C 添加によっても p53 の核内移行は検出されなかった。

## D. 考察

VPR 由来ペプチドが効率良く、細胞内に取り込まれることが明らかになった。無血清培地で4日間培養し、静止期に導入された細胞も、このペプチドを効率良く取り込むことから、このペプチドが造血幹細胞に対する新しい形質転換ベクターとして機能することが期待される。また、β-ガラクトシラーゼの分子量は、約 550 kDa であることから、C45D18 が巨大な分子をも胞体内に運搬できる究めて興味深い特性を備えていることが想像される。今回導入した p53 遺伝子産物 DNA 損傷後の核内移行は認められなかった。用いた p53 遺伝子産物は、大腸菌で発現させた GST 融合蛋白質であり、野生型 p53 としての機能を失っている可能性が考えられる。今後、バキュロウイルスで発現させた p53 遺伝子産物を用いて、同遺伝子産物の補充療法の可能性を探る。

また、C45D18 を核酸に結合させ、蛋白質と同様、胞体内に運搬し得るか否かを検討したい。NF-κB の結合配列を含む DNA にチオール基を添加し、C45D18 との -S-S- によりペプチド-核酸の複合体を作成する。また、siRNA を作用させることによ

り、内在性遺伝子の発現を修飾することを試みる。一方、核酸が導入できることが明らかになった場合には、導入する核酸の大きさを変化させ、導入し得る核酸の大きさを決定する。

現在までに VPR のようなペプチドベクターとして、3種類のウイルス由来ペプチドとショウジョウバエ由来ペプチドが知られている。即ち、ウイルス性蛋白質としては、HIV 由来遺伝子である TAT、Gag 蛋白質と SV40T 抗原核内移行シグナルペプチドのキメラ蛋白質及び、単純ヘルペスウイルスの VP22 であり、ショウジョウバエ由来蛋白質としては、アンテナペディア由来ペプチドが知られている。この中で、特に TAT は静止細胞にも取り込まれることが知られており、TAT 由来ペプチドとリコンビナント蛋白質の複合体を用いた細胞形質転換が報告されている。VPR は同様の機能を有する 5 番目の蛋白質ということが出来る。これらは、いずれもウイルス由来のペプチドであり、将来的な臨床応用においては、その抗原性が危惧される。本プロジェクトでは、VPR に相同性を示す蛋白質として、牛胎児血清中に約 10kD の蛋白質を見出した (VLP-1)。これまでの解析により、部分精製した VLP-1 を培養液に添加することにより、VPR と同様、胞体内に取り込まれることが明らかとなっている。今後、このペプチドをベクターとして用いた細胞形質転換法の開発を試みたいと考えている。

#### E. 結論

1. HIV アクセサリー遺伝子 VPR 由来ペプチドに、形質転換ベクターとしての機能が見出された。
2. このペプチドは、静止期にある細胞にも機能することが示唆された。

#### F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Mishima, T., Yuko Mishima, Y., Terui, Y., Katsuyama, M., Yamada, M., Mori, M., Ishizaka, Y., Ikeda, K., Watanabe, J., Mizunuma, N., Hayasawa, H., and Hatake, K.: Resistance mechanisms of

CD13/Aminopeptidase-N to apoptosis mediated by endothelial cells. J. Natl. Cancer Inst., in press.

2. Mori M., Terui, Y., Tanaka, M., Tomizuka, H., Mishima, Y., Ikeda, M., Kasahara, T., Uwai, M., Ueda, M., Inoue, R., Itoh, T., Yamada, M., Hayasawa, H., Furukawa, Y., Ishizaka, Y., Ozawa, K., and Hatake, K. Antitumor effect of b2-microglubulin in leukemic cell-bearing mice via apoptosis-inducing activity: activation of caspase-3 and nuclear factor-kB. Cancer Res., 61, 4414-4417, 2001.
3. Shimura, M., and Ishizaka, Y., Inhibition by quercetin of micronuclei formation via VPR, an accessory gene of HIV. Recent Res, Devel. Cancer 3, 1-5, 2001.

##### 2. 学会発表

1. Kotani, S., Shimura, M., Tanaka, H., Yasuda, H., Ishizaka, Y. : Binding to D-box Motif by Vpr, an Accessory Gene of Human Immunodeficiency Virus, Leading to Perturbation of APC Activities with Delayed Mitosis and Precocious Sister Chromatid Separation. Cell cycle meeting, 2001 May, Salk, USA.
2. 志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr による細胞分裂異常 第 60 回日本癌学会総会. 2001 年 10 月、横浜.
3. 田口 崇、志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr に相同性を示す蛋白質の同定. 第 24 回日本分子生物学会年会. 2001 年 12 月. 横浜.
4. 溝口 出、志村まり、大沢宣明、石坂幸人: RET 結合ペプチド (RBP-1) を用いた RET 発現細胞への選択的遺伝子導入 第 24 回日本分子生物学会年会. 2001 年 12 月. 横浜.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他 無

「静止細胞への非ウイルス性遺伝子導入ベクターの開発」に関する研究

分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所

A. 研究目的

HIV アクセサリー遺伝子 Vpr は HIV の静止細胞への感染様式を可能にする因子の一つと考えられており、ウイルス感染後に形成されるウイルス DNA を核内へ輸送する機能が備わっている。そして近年、Vpr のこのような機能を利用した外来遺伝子導も試みられ、Vpr による外来遺伝子発現増加も期待されるようになった (J. Virol. 74, 5424-5431, 2000)。本研究では VPR 及び VLP を用いた新しい静止細胞への遺伝子導入ベクター開発を目的としている。今年度は、胞体内に取り込まれるための、最少機能ドメインの同定を行った。

B. 研究方法

Vpr の C-末 45 アミノ酸中に遺伝子導入効率を増加させる活性が知られている。しかし、このペプチドが細胞周期異常を誘発することから、まず C 末 18 個のアミノ酸を欠失させたペプチド（以下 C45D18）を基本骨格として、種々の欠失変異体を作成し、胞体内に取り込まれるための最少機能ドメインを決定した。血清無しの状態で 3 日間培養した細胞に各種ビオチン化ペプチドを 10 ug/ml で添加し、翌日、メタノールにて細胞を固定後、0.02% の Triton X-100 で処理した。そして、ストレプトアビジン結合 FITC を作用させることにより、胞体内に取り込まれたペプチドを検出した。また、ヒト臍帯血由来単核球細胞に同ペプチドを添加し、ペプチドの取り込みの有無を FACS で解析した。

（倫理面への配慮）

ヒト臍帯血を採取する際の妊婦への説明と同意は、当センター倫理委員会が示した方法に従った。

C. 研究結果

1. C45D18 は、付着系細胞である HT1080 細胞に効率良く取り込まれた。また、ヒト臍帯血由来単核球細胞に対しても、一晚ペプチドを作用させることにより、ほぼ 100% の細胞にペプチ

ドが取り込まれた。

2. 種々の変異ペプチドを合成し、胞体内に取り込まれるのに必要な最少ドメインを決定した。用いたペプチドは、C39D18、C42D18、C45D21、C45D24、C45D27 であった。この中で、C45D21 及び C45D18 は臍帯血に対して、多少取り込まれる傾向が認められたものの、C45D18 のそれに比較すると、究めて低い取り込みであった。
3. 無血清培養後の細胞にも効率よく、ペプチドは取り込まれた。
4. IL-3、IL-6 及び SCF の有無による、ペプチド取り込みの有無を解析した。これら増殖因子の有無によるペプチドの取り込みに差は、認められなかった。

D. 考察

VPR 由来ペプチドが効率良く、細胞内に取り込まれることが明らかになった。今後は、C45D18 を核酸に結合させ、蛋白質と同様、胞体内に運搬し得るか否かを検討したい。核酸としては siRNA を用いることを考えている。約 20 塩基の二重鎖 RNA は安定で、かつ蛋白質への翻訳阻害が強力に誘導されることが知られている。NF- $\kappa$ B の結合配列を含む DNA にチオール基を添加し、C45D18 との-S-S-によりペプチド-核酸の複合体を作成する。また、siRNA を作用させることにより、内在性遺伝子の発現を修飾することを試みる。一方、核酸が導入できることが明らかになった場合には、導入する核酸の大きさを変化させ、導入し得る核酸の大きさを決定する。

E. 結論

1. HIV アクセサリー遺伝子 VPR 由来ペプチドに、形質転換ベクターとしての機能が見出された。
2. このペプチドは、静止期にある細胞にも機能することが示唆された。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Mishima, T., Yuko Mishima, Y., Terui, Y., Katsuyama, M., Yamada, M., Mori, M., Ishizaka, Y., Ikeda, K., Watanabe, J., Mizunuma, N., Hayasawa, H., and Hatake, K.: Resistance mechanisms of CD13/Aminopeptidase-N to apoptosis mediated by endothelial cells. J. Natl. Cancer Inst., in press.
2. Mori M., Terui, Y., Tanaka, M., Tomizuka, H., Mishima, Y., Ikeda, M., Kasahara, T., Uwai, M., Ueda, M., Inoue, R., Itoh, T., Yamada, M., Hayasawa, H., Furukawa, Y., Ishizaka, Y., Ozawa, K., and Hatake, K. Antitumor effect of b2-microglubulin in leukemic cell-bearing mice via apoptosis-inducing activity: activation of caspase-3 and nuclear factor-kB. Cancer Res., 61, 4414-4417, 2001.
3. Shimura, M., and Ishizaka, Y., Inhibition by quercetin of micronuclei formation via VPR, an accessory gene of HIV. Recent Res, Devel. Cancer 3, 1-5, 2001.

### 2. 学会発表

1. Kotani, S., Shimura, M., Tanaka, H., Yasuda, H., Ishizaka, Y. : Binding to D-box Motif by Vpr, an Accessory Gene of Human Immunodeficiency Virus, Leading to

Perturbation of APC Activities with Delayed Mitosis and Precocious Sister Chromatid Separation. Cell cycle meeting, 2001 May, Salk, USA

2. 志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr による細胞分裂異常 第60回日本癌学会総会. 2001年10月、横浜.
3. 田口 崇、志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr に相同性を示す蛋白質の同定. 第24回日本分子生物学会年会. 2001年12月、横浜.
4. 溝口 出、志村まり、大沢宣明、石坂幸人: RET 結合ペプチド (RBP-1) を用いた RET 発現細胞への選択的遺伝子導入 第24回日本分子生物学会年会. 2001年12月、横浜.
5. 志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr による細胞分裂異常 第24回日本分子生物学会年会. 2001年12月、横浜.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他 無

「VPR に相同性を示す蛋白質の精製と機能解析」に関する研究

分担研究者 志村まり 国立国際医療センター研究所

A. 研究目的

HIV アクセサリー遺伝子 Vpr は HIV の静止細胞への感染様式を可能にする因子の一つと考えられており、ウイルス感染後に形成されるウイルス DNA を核内へ輸送する機能が備わっている。そして近年、Vpr のこのような機能を利用した外来遺伝子導も試みられ、Vpr による外来遺伝子発現増加も期待されるようになった (J. Virol. 74, 5424-5431, 2000)。申請者らはこれまで Vpr 遺伝子の機能解析を精力的に行い、Vpr を培養液中に添加するだけで細胞内に取り込まれる作用（以下、トランス作用）が備わっていることを見出してきた。さらに今回、Vpr 抗体で認識される約 10kDa の Vpr 様蛋白質(以下 VLP-1; Vpr-like protein) を牛胎児血清中に見出した。VLP は、調べた全てのロットの牛胎児血清中に検出されることから、Vpr で問題となる細胞周期異常誘発能を欠失していることが予測される。以上の知見から、本分担研究では VLP を精製し、機能解析を行うことにより、新しい形質転換ベクターの可能性を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

VPR 抗体を用いて、種々動物由来血清について、VLP の存在の有無を調べた。検体としては、ヒト成人血清、成牛血清、家兎血清、ヤギ血清を用いた。一方、牛胎児血清中から、VLP-1 を精製した。精製方法としては、DEAE セファロースカラム、ネイティブゲルを用いた。精製蛋白質を付着系細胞である HT1080 細胞の培養液中に添加し、一晚培養した後、VPR に対する単クローン抗体 (3H4) を用いて免疫染色を行った。

C. 研究結果

種々の血清について、VLP-1 の存在の有無を調べた。VLP-1 は、牛胎児血清にのみ検出された。精製 VLP-1 を細胞培養液中に添加したところ、胞体内に取り込まれた。精製蛋白質のアミノ酸分析により、VLP-1 は、血清中に多量に存在する蛋白質の C-末側 53 アミノ酸からなる蛋白質であることが明らかになった。

D. 考察

VPR 由来ペプチドと同様、培養液に添加された VLP-1 が効率良く、細胞内に取り込まれることから、新しい形質転換ベクター機能が期待される。これまで、形質転換ベクターとして機能し得るベクターとして、4種類のペプチドが知られている。即ち、HIV アクセサリー遺伝子 TAT、単純性ヘルペス由来蛋白質である VP22、HIV 由来ペプチドと SV40T 抗原由来ペプチドのキメラ分子及び、ショウジョウバエに由来するアンテナペディヤ由来ペプチドである。将来的な臨床応用を考える場合、これらは異種蛋白質であり、その抗原性が問題になることが危惧される。今回、ヒト血清中にも存在する蛋白質の一部である VLP-1 が胞体内に取り込まれることが明らかになったことから、VLP-1 のヒト相同蛋白質の機能を明らかにすることにより、安全な形質転換ベクターの開発が可能になることが期待される。今後、リコンビナント蛋白質を調整し、胞体内への取り込みの有無を解析し、ベクターとしての機能を明らかにすることが肝要である。

E. 結論

1. VPR 相同蛋白質である VLP-1 に形質転換ベクターとして機能する可能性が見出された。
2. この蛋白質はヒトに存在し、抗原性の無い、形質転換ベクターになり得ることが期待される。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。



G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimura, M., and Ishizaka, Y., Inhibition by quercetin of micronuclei formation via VPR, an accessory gene of HIV. Recent Res, Devel. Cancer 3, 1-5, 2001.

2. 学会発表

1. Kotani, S., Shimura, M., Tanaka, H., Yasuda, H., Ishizaka, Y. : Binding to D-box Motif by Vpr, an Accessory Gene of Human Immunodeficiency Virus, Leading to Perturbation of APC Activities with Delayed Mitosis and Precocious Sister Chromatid Separation. Cell cycle meeting, 2001 May, Salk, USA.
2. 志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr による細胞分裂異常 第60回日本癌学会総会. 2001年10月、横浜.
3. 田口 崇、志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr に相同性を示す蛋白質の同定. 第24回日本分子生物学会年会. 2001年12月. 横浜.

4. 溝口 出、志村まり、大沢宣明、石坂幸人: RET 結合ペプチド (RBP-1) を用いた RET 発現細胞への選択的遺伝子導入 第24回日本分子生物学会年会. 2001年12月. 横浜.
5. 志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr による細胞分裂異常 第24回日本分子生物学会年会. 2001年12月. 横浜.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他 無

「VPR 由来ペプチドを用いた細胞形質法の開発」に関する研究  
分担研究者 大沢宜明 国立国際医療センター研究所

A. 研究目的

HIV アクセサリー遺伝子 Vpr を培養液中に添加すると、細胞内に取り込まれる作用（以下、トランス作用）が備わっていることを見出した。本研究では VPR 由来ペプチドを用いた新しい形質転換法の可能性を明らかにし、臨床応用に向けた基礎実験を行うことを目的とする。

B. 研究方法

VPR 由来ペプチドである C45D18 には、C 末端から 3 番目の位置にシステインが存在する。この SH 基を用いて、種々蛋白質に結合させ、細胞に作用させることにより形質転換を誘導することを試みる。蛋白質としては、 $\beta$ -ガラクトシラーゼ蛋白質、ストレプトアビジン及び、マウス GST-p53 を用いた。標的細胞としては、ヒト臍帯血由来単核球細胞や付着系細胞に作用させた。特に p53 の取り込みを解析する際には、内在性 p53 が欠失している SaOS-2 細胞を用いた。ペプチドを作用させた後、 $\beta$ -ガラクトシラーゼ蛋白質については酵素活性の有無を FDG (Molecular Probe 社製) を基質として、FACS による測定を行った。また p53 については抗 p53 抗体による免疫染色により、取り込みの有無を解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト臍帯血を採取する際の妊婦への説明と同意は、当センター倫理委員会が示した方法に従った。

C. 研究結果

1. 蛋白質との結合体による形質転換の有無を解析した。C45D18 と  $\beta$ -ガラクトシラーゼとの複合体を一晩ヒト臍帯血由来単核球細胞に作用させたところ、ほぼ 90% の細胞に同蛋白質の活性が誘導された。
2. C45D18 に結合させた p53 遺伝子産物は、SaOS-2 細胞に取り込まれた。しかし、DNA 損傷を誘導する Mitomycin C 添加によっても p53 の核内移行は検出されなかった。

D. 考察

VPR 由来ペプチドが造血幹細胞に対する新しい形質転換ベクターとして機能する可能性示唆された。また、 $\beta$ -ガラクトシラーゼの分子量は、約 550 kDa であることから、C45D18 が巨大な分子をも胞体内に運搬できる究めて興味深い特性を備えていることが想像される。今回導入した p53 遺伝子産物 DNA 損傷後の核内移行は認められなかった。用いた p53 遺伝子産物は、大腸菌で発現させた GST 融合蛋白質であり、野生型 p53 としての機能を失っている可能性が考えられる。今後、バキュロウイルスで発現させたヒト p53 遺伝子産物を用いて、p53 遺伝子の機能の補充療法の可能性を明らかにする。

また、C45D18 を核酸に結合させ、蛋白質と同様、胞体内に運搬する可能性を明らかにした。核酸としては siRNA を用いることを考えている。約 20 塩基の二重鎖 RNA は安定で、かつ蛋白質への翻訳阻害が強力に誘導されることが知られている。

E. 結論

HIV アクセサリー遺伝子 VPR 由来ペプチドに、形質転換ベクターとしての機能が見出された。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

G. 研究発表  
学会発表

1. 溝口 出、志村まり、大沢宜明、石坂幸人：  
RET 結合ペプチド (RBP-1) を用いた RET 発現細胞への選択的遺伝子導入 第 24 回  
日本分子生物学会年会. 2001 年 12 月. 横浜.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他 無

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 発表者氏名  | 論文タイトル   | 発表誌名                               | 巻号 | ページ           | 出版年                  |
|--|--|------------------------------------|----|---------------|----------------------|
| Mishima, T., Yuko<br>Mishima, Y., Terui,<br>Y., Katsuyama, M.,<br>Yamada, M., Mori,<br>M., <u>Ishizaka, Y.</u> ,<br>Ikeda, K.,<br>Watanabe, J.,<br>Mizunuma, N.,<br>Hayasawa, H., and<br>Hatake, K.  | Resistance mechanisms of<br>CD13/Aminopeptidase-N to apoptosis<br>mediated by endothelial cells.   | J. Natl.<br>Cancer<br>Inst.        | 61 | 4414-<br>4417 | 2001<br>in<br>press. |
| Mori M., Terui, Y.,<br>Tanaka, M., Ymizuka,<br>H., Mishima, Y., Ikeda,<br>M., Kasahara, T., Uwai,<br>M., Ueda, M., Inoue, R.,<br>Itoh, T., Yamada, M.,<br>Hayasawa, H., Furukawa,<br>Y., <u>Ishizaka, Y.</u> ,<br>Ozawa, K., and Hatake,<br>K. | Antitumor effect of b2-microglobulin<br>in leukemic cell-bearing mice via<br>apoptosis-inducing activity:<br>activation of caspase-3 and nuclear<br>factor-kB. | Cancer<br>Res.,                    | 61 | 4414-<br>4417 | 2001                 |
| Shimura, M., and<br><u>Ishizaka, Y.</u>  | Inhibition by quercetin of micronuclei<br>formation via VPR, an accessory gene of<br>HIV.  | Recent<br>Res,<br>Devel.<br>Cancer | 3  | 1-5           | 2001                 |

# Inhibition by quercetin of micronuclei formation via Vpr, an accessory gene of HIV

**Mari Shimura and Yukihiro Ishizaka\***

Department of Intractable Diseases, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan

## ABSTRACT

Development of malignant tumors is frequently observed in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Such a high incidence of AIDS-related carcinogenesis has been explained by the decreased activity of the immune system, but recent findings suggest that HIV itself has an oncogenic activity. Based on experimental data showing that Vpr, an accessory gene of HIV, induced genomic instability, we previously proposed that Vpr would be involved in the development of AIDS-related tumors. Here we report that quercetin (QCT), a flavonoid, inhibited Vpr-induced micronuclei formation, a hallmark of genomic instability. With a pretreatment of QCT, the population of micronuclei-positive cells decreased from 37% to 6.7%. The expression level of Vpr protein, however, was



Transworld  
Research Network  
T.C. 36/248(1),  
Trivandrum-695 008, India.

---

\*Corresponding author: E-mail: [zakay@ri.imcj.go.jp](mailto:zakay@ri.imcj.go.jp)

20010463

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。