

平成13年度

若手研究者奨励研究報告書

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第1分野

抗エイズウイルス薬、エイズ付随症状
に対する治療薬の開発に関する研究

レトロウイルス性疾患を解析する為のモデル動物の開発

所 属 北海道大学 遺伝子病制御研究所

研究者 安田 二朗

要旨

レトロウイルス性疾患の制圧に有用な高感受性モデル・疾患モデル動物を開発する為、本年度は (1) ヒト CRM1 トランスジェニックラットの作製 (2) ウイルス出芽に関与する宿主因子 (BUL1) の同定と出芽阻害効果をもつその変異体の作製に成功した。

1. 研究目的

HTLV-1 及び HIV は、それぞれヒトに ATL、AIDS という重篤な疾患を引き起こすレトロウイルスであるが、どちらの感染症についてもその限られた宿主域のために未だに適当なモデル動物系が確立されていない。感染予防、発症予防/治療法の確立には、個体レベルで感染から発症に至るメカニズムを解析したり、ワクチン、薬剤等の効果を検討できる感染/疾患動物モデルの確立が必須である。

マウス、ラットは実験動物として優れた特性を備えているが、何れも HTLV-1、HIV の感染に低感受性もしくは全く感受性がない。齧歯類の細胞に感受性を付与するには、ウイルス増殖に関与するヒト由来の何らかの宿主因子すなわち種の障壁 (species barrier) を規定している因子を発現させる必要がある。本研究では、これら宿主因子を同定し、これらをコードする遺伝子を発生工学手法を用いてマウス・ラットに導入することにより、感受性動物や病態発現モデル動物を確立することを目標として研究を行う。

先ず初めに、HTLV-1 の Rex と相互作用し、種の障壁の一因となっていることが明らかになったヒト CRM1 遺伝子を導入したトランスジェニック (Tg) ラットを作製し、感染動物モデルの確立を試みる。感受性が確認されない場合でも、HTLV-1 遺伝子全長とヒト CRM1 を共発現する Tg ラットを作製することにより、ラット体内で Rex の機能が回復し、非常に効率良くウイルス蛋白発現やウイルス粒子形成が行われるはずである。その結果、これまで再現できなかった HTLV-1 関連疾患、特に ATL 様の症状がラットで再現できる可能性があり、ATL 病態の解析に利用可能な動物モデルとなることが期待される。

一方、HIV に関しては、これまで明らかにされているウイルスの吸着・侵入、転写段階以外にも、少なくとも Integration と assembly/出芽過程でまだ種の障壁があると考えられている。最近になって、出芽が proteasome 阻害剤で抑制されること及び出芽に必須なウイルス因子上のアミノ酸配列

が同定されている。そこで、本研究では出芽に関与する宿主因子を同定する為に、この配列を認識し、結合する細胞性因子を探索し、種特異性との関連を明らかにすると共に、その特異的な阻害法の確立を目指す。

2, 研究方法

(1) ヒト CRM1 遺伝子導入ラットの作製と解析：ラット (F344 系統) の 0.5 日齢胚にヒト *crm1* 遺伝子の全長を含む 155kb の BAC クローンをマイクロインジェクション法により導入し、トランスジェニックラットを作製した。トランスジーン導入は、ラットの尾から調製したゲノム DNA を用いたドットプロット解析により確認した。F1 世代への導入遺伝子の伝達も同様の方法で確認した。F1 世代のトランスジェニックラットの胸腺細胞及び肺から RNA を調製し、ヒト *crm1* の発現を RT-PCR により調べた。

(2) レトロウイルスの出芽に関与する宿主因子の同定：最近になって、鬱病との関連が示唆されている D 型レトロウイルス(M-PMV)の出芽をモデル系として解析した。このウイルスがもつ出芽に必要なモチーフ (PPxY 配列) は HTLV-1, RSV など広くレトロウイルスで保存されているので (Yasuda and Hunter, 1998)、このモチーフと相互作用する宿主因子を以下のように同定した。(i) PPxY 配列をもつ Gag とこの配列を欠失させた Gag 変異体をそれぞれ細胞に発現させ、抗 Gag 抗体で免疫沈降を行い、PPxY 配列依存性に共沈するタンパク質を解析した。(ii) この細胞性因子を M-PMV の感染系に導入し、出芽への影響を培養上清への粒子放出の差で調べた。(iii) この因子について、リコンビナント蛋白と抗体を作製し、この因子が実際に細胞内で Gag と相互作用していることを免疫沈降による共沈で確認した。(iv) この因子の様々な変異体を作製し、これらの過剰発現が dominant-negative 変異体として出芽を抑制する変異体を探索した。

3, 研究成果

(1) ヒト CRM1 遺伝子導入ラットの作製と解析：7 匹の F0 ラットが導入遺伝子としてヒト *crm1* 遺伝子をもっていた。この内の 6 匹で、F1 への導入遺伝子の伝達を確認できた。ラットの各種臓器・組織における内在性ラット CRM1 の発現を Western blot 法で検討したところ、胸腺で最も発現が高く、次いで肺でも発現が見られた。一方、末梢血単核球や脾臓では著しく低発現であった。この情報をもとに、トランスジェニックラットにおけるヒト CRM1 の発現を胸腺と肺に対して検討した。RT-PCR でヒト *crm1* mRNA の発現を調べた結果、4 系統のトランスジェニックラットで胸腺と肺の双方で発現が確認された。現在、系統化したトランスジェニックラットに対し、*in vitro* 及び *in vivo* で HTLV-1 感受性を検討中である。また、病態発現についても、HTLV-1 産生細胞である MT2 をラットの腹腔に接種し、長期観察中である。

(2) レトロウイルスの出芽に関与する宿主因子の同定：PPxY 配列依存性に Gag に結合する因子として 200kDa のタンパク質が確認された。PPxY 配列と相互作用するモチーフの 1 つとして既に WW ドメインが報告されていること、及び、PPxY 配列をもつ RSV の出芽が proteasome 阻害剤で抑え

られることから、現在、WW domain をもち、ユビキチン-プロテアソーム系でユビキチンリガーゼとして機能する Nedd4 が宿主因子として有力視されている。WW ドメインをもち、200kDa 以上のタンパク質をコードする Nedd4 様蛋白質をデータベース上で検索した結果、2 種類の機能未同定のクローンを得た [かずさ DNA 研究所長瀬博士より分与]。そのうちの 1 クローン (BUL1 と命名) は、M-PMV 感染系で過剰発現させるとウイルス粒子産生を著しく増大させた (図 1)。細胞内における相互作用を免疫沈降による共沈で調べた結果、Gag-BUL1 の相互作用が再確認された。また、WW ドメインのみを含む BUL1 変異体は dominant-negative 変異体としてウイルス粒子産生を阻害した (図 2 および 3) (Yasuda et al., 投稿中)。今後、更に詳細な解析を行い、dominant-negative 変異体として有効な最小領域を決定する。

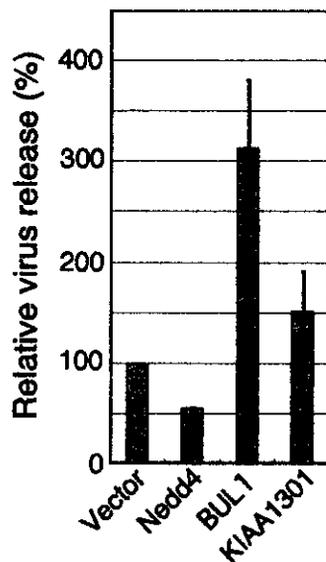


図1、M-PMV出芽に対するNedd4様ユビキチンリガーゼの効果
BUL1の発現により粒子出芽は顕著に増加した。一方、Nedd4の発現は出芽に対して抑制的に作用した。

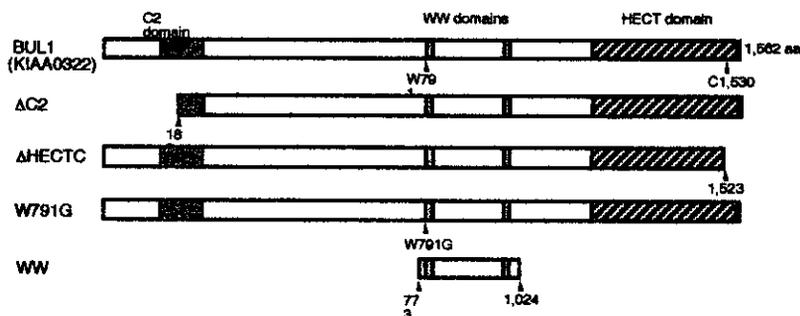


図2、解析に用いたBUL1変異体

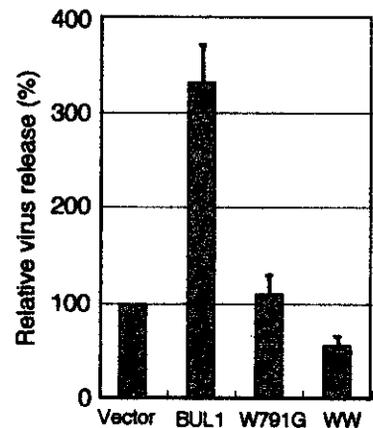


図3、M-PMV出芽に対するBUL1変異体の効果
WWドメインのみをもつWWは効果的にウイルスの出芽を阻害した。

4. 考察

(1) ヒト CRM1 を発現するトランスジェニックラットの作製に成功したので、今後このラットの HTLV-1 感受性について検討し、ラット体内における HTLV-1 の増殖亢進が見られれば、感染モデルとしての期待が持たれる。感受性が確認されない場合でも、HTLV-1 遺伝子全長とヒト CRM1 を共発現する Tg ラットを作製することにより、ラット体内で Rex の機能が回復し、非常に効率良くウイルス蛋白発現やウイルス粒子形成が行われることが予想できるので、新規のトランスジェニックマウスの作製も視野に入れて研究を進めることで有用な動物モデルを作製できると考えている。

(2) M-PMV の Gag に存在する出芽に必須なモチーフ (PPPXY 配列) と相互作用し、ウイルス出芽を正に制御する宿主因子として、Nedd4 様ユビキチンリガーゼの 1 つである BUL1 を新規に同定することが出来た。今後、BUL1 がどのような機序でウイルス出芽に関わるのかを明らかにするとともに、同様に PPxY 配列を出芽モチーフとしてもつ他のウイルスについても BUL1 が宿主因子として機能しているかどうかを検討する。WW ドメインのみからなる変異体が、dominant-negative 変異体としてウイルス粒子産生を阻害することを明らかにしたので、今後は更に高い効率で阻害効果をもつ類似体を探るとともに、細胞内で生理的に BUL1 の標的となっている因子を明らかにすることにより、細胞への影響を考慮した上で、毒性が低く効率の良いウイルス出芽阻害剤の開発が可能であると考えている。

5. まとめ

(1) ヒト CRM1 を発現するトランスジェニックラットの作製に成功した。このラットの HTLV-1 感受性と病態発現を今後詳細に解析することにより、モデル動物としての可能性を検討する。

(2) レトロウイルスの出芽に関与する宿主因子として Nedd4 様ユビキチンリガーゼである BUL1 を新規に同定した。更に、dominant-negative 変異体としてウイルス粒子産生を阻害する BUL1 変異体の存在も明らかにした。今後、この宿主因子の作用機構を始め、HTLV-1 や HIV の出芽にも関与するかどうか、種間障壁としてウイルス増殖を規定しているかなどについて検討する。多くのウイルスが共通の機構で子孫ウイルス粒子を出芽することが示唆されていることから、出芽阻害剤は HTLV-1 を始めとするレトロウイルスのみならず、他の多くのウイルス性疾患にも応用可能であると考えている。

6. 研究発表

1. Yokoyama, H., Yasuda, J., Okamoto, H., and Iwakura, Y.: Development of nephritic syndrome with severe ascites in mice transgenic for the TT virus ORF1 gene. *Journal of General Virology*, **83**, 141-150 (2002).
2. Yasuda, J., Miyao, T., Kamata, M., Aida, Y., and Iwakura, Y.: T cell apoptosis causes

peripheral T cell depletion in mice transgenic for the HIV-1 *vpr* gene. *Virology*, **285**, 181-192 (2001).

7, 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|---|
| 1) 特許取得 | 無 |
| 2) 実用新案登録 | 無 |
| 3) その他 | 無 |

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社