

## 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 二郎

### 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、(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の同定と出芽阻害効果をもつそれらの変異体の作製を行った。

### 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切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でき、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。マウス細胞を HIV 感受性にするには、これまで明らかにされた吸着侵入・転写のステップ以外に少なくとも assembly/出芽過程でまだ種の障壁があると考えられているので、この過程で働く宿主因子について解析を進める必要がある。また、HTLV-1 がマウス・ラット細胞で増殖効率が低い原因となっている過程やその要因については未だにはっきりしていないので、それらを明らかにしなければならない。本研究では、ウイルス増殖に関わる宿主因子を同定し、種間障壁となっているかどうかを解析した後に、これらをコードする遺伝子について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。

ウイルス増殖に関わる宿主因子の同定やその作用機序の解析は、それ自体非常に重要な意味を持ち、それらを標的とした抗ウイルス療法の開発にも有益である。

### 2. 研究方法

(1) 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。以前に、M-PMV の Gag に存在する 4 アミノ酸配列 (PPxY) がウイルス粒子出芽に必要な十分な機能を担っていること (Yasuda & Hunter, 1998)、及び、この配列がレンチウイルスを除く殆どのレトロウイルス、更

には VSV、Ebola virus をはじめとする多くのウイルスで保存されていることを見出ししている  
ので、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  
ピナント蛋白質と抗体を作製し、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) この因子に様々な変異体を導入し、dominant-negative に出  
芽を抑制する変異体を探索した。(v) M-PMV の解析からウイルス出芽には E3 ユビキチンリガ  
ーゼが関与することが明らかになったので、HTLV-1 の出芽にもこれらの因子が関与するかどう  
かを同様に解析した。

(2) ヒト CRM1 遺伝子導入ラットの作製と解析：HTLV-1 の Rex の機能に関与する宿主因子とし  
てヒト CRM1 が同定され、この因子の種差がラットの細胞で Rex が機能しない原因となってい  
ることが明らかになっているので、以下のようにヒト CRM1 遺伝子導入ラットを作製した。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。トランスジェニックの導入  
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。系統化したトランスジェ  
ニックラットの胸腺細胞および脾臓から調製したリンパ球を用いて *in vitro* で HTLV-1 の感染実  
験を行い感受性を調べた。また、HTLV-1 産生細胞である MT2 をラットの腹腔に接種し、1 年  
間病態の発現などについて長期観察した。

### 3、研究成果

(1) 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、WW ドメインをもち、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。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、WW ドメインに変異を導入した変異体は Gag との結合能を失い出芽促  
進作用も失った (Yasuda et al., 2002)。

HTLV-1 の Gag に存在する PPxY 配列に変異を導入すると M-PMV の場合と同様にウイルス産生が著しく阻害されたが (図 1)、HTLV-1 の粒子産生は BUL1 ではなく Nedd4 の過剰発現により最も顕著に増加した (図 2)。また、WW ドメインのみを含む Nedd4 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も確認された。

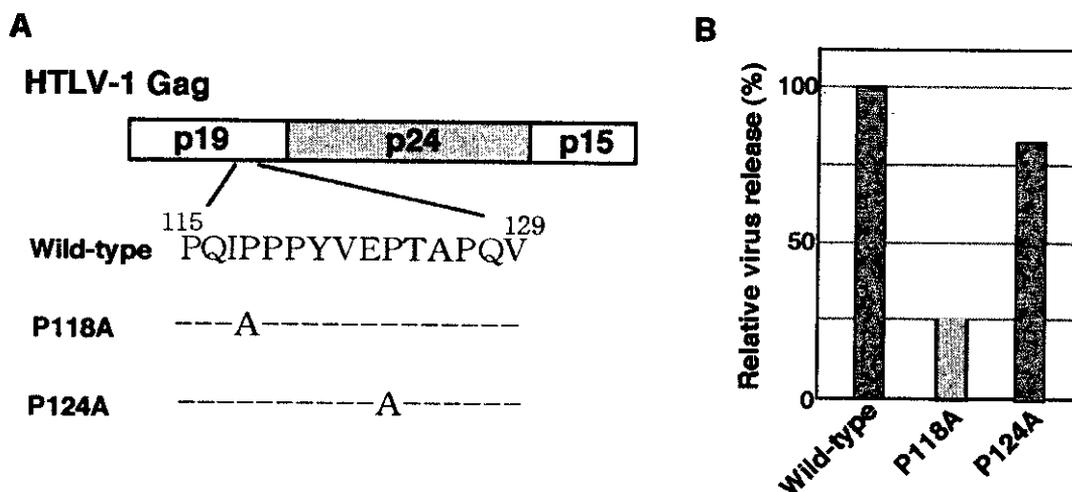


図1, HTLV-1の出芽制御配列

A, 出芽制御に関わっていると予想されるHTLV-1Gag内の配列 (L-domain) と解析に用いた変異体。

B, P118A変異体では培養上清中に放出される子孫ウイルス量が顕著に減少した。

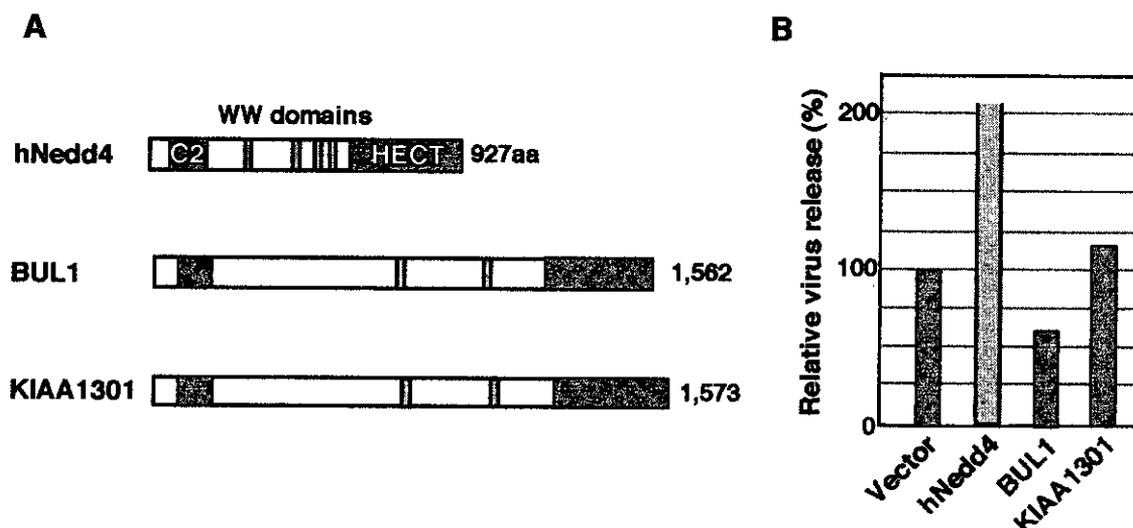


図2, ユビキチンリガーゼNedd4によるHTLV-1出芽の制御

A, 解析に用いたHECT型E3ユビキチンリガーゼ。N末にC2 domain、中央にWW domain、C末にHECT domainと呼ばれる共通の機能domainをもつ。B, HTLV-1の感染性クローンK30と各E3を共導入し、培養上清中に放出される子孫ウイルス量を比較した。

(2) ヒト CRM1 遺伝子導入ラットの作製と解析：導入遺伝子としてヒト *crm1* 遺伝子をもつ 7 匹の F0 ラットを得た。この内の 6 匹で、F1 への導入遺伝子の伝達が確認できた。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が、その発現レベルは内在性のラット *crm1* よりも著しく低く、タンパク質レベル (Western blot 法) では発現を確認できなかった。系統化したトランスジェニックラットの脾臓、胸腺から調製したリンパ球を用いて *in vitro* で HTLV-1 の感染実験を行ったが、ウイルス産生は確認できなかった。また、HTLV-1 産生細胞である MT2 をラットの腹腔に接種し、1 年間病態の発現などについて長期観察したが、遺伝子導入していないコントロールラットとの違いは認められなかった。

#### 4、 考察

(1) 共通の機能ドメインを持った E3 ユビキチンリガーゼである BUL1 と Nedd4 が、それぞれ M-PMV と HTLV-1 の出芽に宿主因子として作用することがわかった。このことは、ウイルス出芽が共通のメカニズムで起こっており、その過程においてユビキチン化が重要な役割を担っていることを示唆する。また、ウイルス種によって出芽段階で利用する E3 に特異性があることも示され、これらの宿主因子を標的とすることによりウイルス種特異的な抗ウイルス療法開発の可能性が示唆された。既に、本研究において BUL1 および Nedd4 の変異体が両ウイルスの出芽を阻害することを明らかにしているため、更に研究を進めることにより、有用な出芽阻害剤を開発できると考えている。また、これらの阻害剤の効果を動物個体レベルで解析するための動物モデルの作製にも取り組む計画である。

最近になって、HIV-1 の出芽に E2 ユビキチン結合酵素の variant である Tsg101 が関与することも報告されていることから、これら細胞内物質のユビキチン化に関わる宿主因子がどのような機序でウイルス出芽に関わるのかを今後明らかにする予定である。

HTLV-1 や HIV の出芽に関与する宿主因子として同定した Nedd4 や Tsg101 が種間障壁となっているかどうかについても検討し、もしそのような可能性が示唆された場合にはそれらの遺伝子を導入したトランスジェニックマウス・ラットを作製する。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。

(2) ヒト CRM1 を発現するトランスジェニックラットを作製したが、*in vitro*、*in vivo* のいずれにおいても HTLV-1 感受性に改善は見られなかった。これは導入したヒト *crm1* の発現レベルが低いためである可能性が高いので、高発現の系統を作製する必要がある。

## 5、まとめ

(1) M-PMV の Gag に存在する出芽に必須なモチーフ (PPPY 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。更に、HTLV-1 についても Nedd4 が出芽に関わる宿主因子であることを明らかにした。また、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も明らかにした。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の決定や高い効率で阻害効果をもつ類似体の探索を行うことにより、将来的には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。

(2) ヒト CRM1 を発現するトランスジェニックラットを作製したが、in vitro、in vivo のいずれにおいても HTLV-1 感受性に改善は見られなかった。これは導入したヒト crm1 の発現レベルが低いためである可能性が高いので、高発現の系統を再度作製する計画である。

## 6、研究発表

Tanaka, J., Ishida, T., Choi, B.-I., Yasuda, J., Watanabe, T., and Iwakura, Y.: Latent HIV-1 reactivation in transgenic mice requires cell cycle-dependent demethylation of CREB/ATF sites in the LTR. *AIDS*, **17**, 167-175 (2003).

Yasuda, J., Hunter, E., Nakao, M., and Shida, H.: Functional involvement of a novel Nedd4-like ubiquitin ligase on retrovirus budding. *EMBO Reports*, **3**, 636-640 (2002).

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).

安田二郎、Eric Hunter、中尾光善、志田壽利：[HOT PRESS] ユビキチンリガーゼ Nedd4 様タンパク質によるレトロウイルスの出芽制御、細胞工学 **21** (10)、pp1222-1223、秀潤社、東京、2002 年。

## 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 |