

## 論文の内容の要旨

論文題目 モロニーマウス白血病ウイルスにおいて  
スプライスされない mRNA の発現に必要と  
されるシス因子の同定

指導教官 滝沢 始 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 9 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 星 作男

### 要旨

モロニーマウス白血病ウイルス (moloney murine leukemia virus、以下 MLV と略) は、スプライスされない mRNA は、ゲノム RNA としてビリオン (virion) にパッケージされかつ、Gag と Pol の mRNA としても使われる。スプライスされた mRNA は Env をコードする。MLV が複製されるためには、スプライスされた mRNA とスプライスされない mRNA が、適切な比で産生されなければならない。一般に細胞では、イントロンを含んだスプライスされない mRNA は、核から細胞質に輸送されないため、細胞質には発現しない。MLV には、スプライスされない mRNA を発現するための仕組みがあると考えられる。Mason-Pfizer monkey virus や Rous sarcoma virus で、核-細胞質移行、いわゆる constitutive transport element (以下 CTE と略) が報告されているが、MLV においてはこの点は明らかにされていない。

今回、MLVのスプライスアクセプター(splice acceptor、以下 SA と略)であるヌクレオチド(nucleotide、以下 nt と略)5491の上流、nt 5119 から 5355 までの 237 塩基領域が、MLVにおいてスプライスされない mRNA の発現を促す正のシス因子であり、*gag* 領域の nt 1560 から 1906 までの 347 塩基領域はスプライスされない mRNA の発現を抑制する、負のシス因子であることを明らかにした。正のシス因子は負のシス因子が存在する時にのみ、スプライスされない mRNA の発現を促す作用を持つことより、負のシス因子は、スプライスされない mRNA の発現が正のシス因子に依存するようにさせることを明らかにした。

## 材料と方法

MLV の *pol* 領域 2.4kb を欠失して *gag* と *env* をコードする変異プロウイルス(GE6.4)、更に *pol-env* 領域をほぼ全欠失して主に *gag* 遺伝子だけをコードする変異プロウイルス(G3.6)、及び G3.6 の *gag* 遺伝子下流に SA の上流領域を種々の長さでつなげたプロウイルス、G3.6 の *gag* 遺伝子を部分欠失したプロウイルスを調製した。全てのプロウイルスの 3' LTR の下流に hygromycinB(以下 *hyg* と略)耐性遺伝子もしくは、neomycin (以下 *neo* と略)耐性遺伝子が挿入されている。これらのプロウイルスを NIH3T3 細胞にトランスフェクションし、ノーザンプロットにて mRNA の発現を解析した。ウイルス mRNA の検出には 3' LTR をプローブとして用いた。薬剤耐性遺伝子の発現量に対するウイルス mRNA の発現量の比を計算し、ウイルス mRNA の発現量を定量化し、変異プロウイルス間の mRNA 発現量を比較検討した。

## 結果

GE6.4 は、スプライスされた mRNA とスプライスされない mRNA を、野生株と同程度に発現する。一方 G3.6 は、スプライスされた mRNA は発現せず、スプライスされない mRNA も GE6.4 の 1/10 ほどであ

る。この G3.6 の *gag* の 3' 側に SA の上流 nt 4894-5481 までの 588 塩基領域をつなぐと、スプライスされない mRNA のみが GE6.4 と同程度に発現することが示された。この 588 塩基領域の 5' 側及び、3' 側領域を削って mRNA 発現に必要な領域を調べると、nt 5119-5355 までの 237 塩基領域のみをつなぐだけで、GE6.4 と同程度にスプライスされない mRNA を発現した。これよりこの 237 塩基領域は、正のシス因子であることが示された。この 237 塩基領域に塩基置換を導入すると、スプライスされない mRNA の発現が低下した。

G3.6 の *gag* 領域から、nt 1035-2120 までの 1086 塩基領域を欠損させると、スプライスされない mRNA の発現が上昇した。欠損させる領域を狭めたところ、nt 1560-1906 までの 347 塩基領域のみの欠損で、スプライスされない mRNA の発現が上昇した。これよりこの 347 塩基領域は、スプライスされない mRNA の発現を抑制する、負のシス因子であることが示された。

次に今回同定された正のシス因子と負のシス因子の相互作用について調べた。G3.6 の *gag* 領域より nt 1560-1906 までの 347 塩基領域を欠損させると、スプライスされない mRNA の発現が上昇し、再び *gag* 領域の 3' 末端に 347 塩基領域をつなぐと、スプライスされない mRNA の発現は低下した。さらに nt 5119-5355 までの 237 塩基領域をつなぐと、再び mRNA の発現は上昇した。G3.6 の *gag* 領域より負のシス因子の一部である、nt 1663-1906 までの 244 塩基領域を欠損させると、スプライスされない mRNA の発現が上昇するが、さらに正のシス因子である nt 5119-5355 までの 237 塩基領域をつないでも、さらにスプライスされない mRNA の発現は上昇することにはなかった。これより正のシス因子は負のシス因子が存在する時にのみ、負のシス因子の働きを相殺してスプライスされない mRNA の発現を促していると考えられる。

さらに今回同定した正と負のシス因子が、MLV 以外の遺伝子発現にも機能するか調べた。G3.6 の *gag* 領域を neo 耐性遺伝子に置き換えた。この neo 耐性遺伝子の下流に、さらに正の因子や負の因

子をつないでも、mRNA の発現量は変化せず、高値を示した。これより今回同定した2つのシス因子は、MLV においてのみ mRNA 発現調節機能を発揮すると考えられる。

## 考察

マウス白血病ウイルスのスプライスされない mRNA (*gag* mRNA) を高発現するために、スプライスアクセプターの 372 塩基上流から 136 塩基上流までの 237 塩基配列 (nt 5119-5355) が、正のシス因子として働いていることを示した。また *gag* 領域の nt 1560 から nt 1906 までの 347 塩基は mRNA の発現を抑制する負のシス因子として働いていることを示した。レトロウイルスの複製には、Env メッセージであるスプライスされた mRNA と、Gag/Pol のメッセージであると共にウイルスゲノムともなるスプライスされない mRNA とが、適正な量比で発現する必要がある。今回同定した *gag* 領域と *pol* 領域の遺伝子の相互作用により、mRNA の発現量調節が行われている可能性がある。これらのシス因子は、ネオマイシン耐性遺伝子の発現には影響せず、MLV にのみ特異的に働いている可能性がある (neo 耐性遺伝子自身が CTE を持っている可能性もある)。

今回調製したプロウイルスは、転写に MLV-LTR の共通のプロモーター-エンハンサーを用いており、調製されたプロウイルスのクローン間で、転写レベルはほとんど同じであるので、転写開始効率ほどの MLV 変異株でも同じであると考えられる (Odawara et al., J. Virol., 72: 54145424)。一方大島らは、SA 上流を欠損した MLV では、スプライスされない mRNA の核-細胞質輸送又は、核内での安定性が減少している可能性を示唆している (Oshima et al., J. Virol., 70:2286-2295)、237 塩基領域は CTE として働いている可能性がある。このシス因子への結合タンパク質を同定することにより、MLV 特有の核から細胞質への輸送経路を明らかにすることができると期待され、ベクターやウイルスワクチン開発への応用も期待される。