

[別紙 1]

論文内容の要旨

Identification of Brm protein as a host factor maintaining proviral gene expression and design of retroviral vectors that achieve long-term transgene expression.

レトロウイルスの発現維持に必要な宿主蛋白質、Brm の同定と
長期発現型レトロウイルスベクターの設計

指導教官 伊庭 英夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

博士課程

病因・病理学専攻

氏名 水谷 壮利

背景と目的

レトロウイルスは宿主細胞に感染後、自身の持つ逆転写酵素の働きにより、ウイルスゲノムを RNA から DNA 型にし、宿主染色体内に組み込むことによりプロウイルスとなる。そしてこのプロウイルスからの遺伝子発現は宿主の細胞分裂を経ても維持される。このようなレトロウイルスの長所をヒト遺伝子治療や再生医療に利用するためにいくつかのベクターが開発されてきたが、一つの問題点としてレトロウイルスの発現が動物個体内ではもとより培養細胞においても次第に抑制されていく現象(ジーンサイレンシング; gene silencing)が知られている。特にこの現象が胚性幹 (ES) 細胞や造血幹 (HS) 細胞で顕著に見られるために、遺伝子治療、再生医療へのレトロウイルスベクターの応用を大きく制限している。このジーンサイレンシングの分子機構として LTR のエンハンサー領域が幹細胞などでは働きにくいことが知られている。DNA のメチル化も報じられているが、これがサイレンシング

の主要原因かどうかは未だはっきりしていない。

本研究では、レトロウイルスベクターの発現維持に関わる宿主側因子を同定し、ジーンサイレンシングの主たるメカニズムを解明することにより、レトロウイルスベクターの問題点であるジーンサイレンシングを克服できるようなウイルスベクターを設計することを目的として研究を行なった。

結果および考察

VSV-G pseudotyped retrovirus vector はそのエンベロープの特性により導入効率が高く、種々の細胞株に対し一回の導入でほぼ全 Population に遺伝子導入可能なウイルスベクターである。外来遺伝子として LacZ 遺伝子を持った VSV-G pseudotyped retrovirus vector を細胞株に感染後、感染細胞を薄くまき直しシングルコロニーを形成させてみたところ、30 種類近くの細胞株のうちほとんどの細胞株では、形成する一つ一つの細胞すべてが LacZ で染まるコロニーとなる。ところが SW13、C33A 細胞株ではほとんどのコロニーが LacZ で染まる細胞と染まらない細胞の混合（モザイクコロニー）となり、これらの細胞株では感染後に不連続で偶発的にジーンサイレンシングが起きているのではないかと考えた。このようなモザイクコロニーの出現頻度を他の細胞株でも検討したところ、SW13、C33A 以外に Saos2、G401 のあわせて 4 種類の細胞株でモザイクコロニーの出現頻度が高いことが明らかとなった。この原因を考えてみたところ、SW13、C33A の両細胞株はともにクロマチンリモデリング複合体の構成成分の一つ Brm の発現が見られないという報告があるため、このことがジーンサイレンシングに関係があるのではないかと考えた。これらモザイクコロニーの出現頻度の高い細胞株において RT-PCR、Western Blotting を行なってみたところ、これら 4 種類の細胞株には共通して Brm の発現が見られないということがわかり、Brm の発現がないことと、急激なジーンサイレンシングを起こすことの間に関係が見られた。

これまで *Drosophira* の遺伝学から遺伝子の発現維持には大別して Polycomb-Group (Pc-G) と trithorax-Group (trx-G) の 2 つの遺伝子群による制御が必須であることが知られている。抑制状態の維持に関わるのが Pc-G であり、活性化遺伝子の発現維持に関わるのが trx-G である。これらはその遺伝子の転写開始には関わらないが、両者は互いに拮抗して働き、それ以前に確立した染色体上の各ドメインの活性化の状況を細胞分裂を経ても長

期間維持することにより、細胞の個体発生の記憶を担っているものと考えられている。これらの遺伝子のホモログはマウスやヒトからも単離されており、Brmは *trx-G* に属する Brahma (ショウジョウバエ) の哺乳動物の homologue であり、DNA 依存性 ATPase サブユニットとして SWI/SNF というクロマチン構造変換をひきおこす複合体を構成していることが明らかにされている。この複合体は Brm または同じくコアサブユニットである BRG1 を含む 2 種類の複合体があり、両者が共存する複合体は存在しない。

これらの知見を踏まえ、以下のような仮説を立てた。レトロウイルスの LTR からの発現の維持には *trx-G* として転写を正に制御する Brm を含む SWI/SNF 複合体が必要で、Brm の発現が無い細胞株のように機能的な複合体の非存在下では発現維持が不安定となり、急激なジーンサイレンシングが誘導される。そこで Brm 遺伝子を持ったレトロウイルスベクターならば、このような状況下においても自ら Brm を発現し、Brm を補い、機能的な SWI/SNF 複合体を作り出すことにより LTR からの発現を維持しつづけることが出来るのではないかと考えた。Brm を発現するレトロウイルスベクターを C33A 細胞株に導入後、薄くまきなおしシングルコロニーを形成させ、7 日後にレトロウイルスの mRNA の発現を *in situ hybridization* によって検出した。その結果、外来遺伝子を持たないコントロールベクターではジーンサイレンシングを起こしているのに対し、Brm ベクターではレトロウイルスの発現維持の顕著な回復がみられた。ところが BRG1 発現ベクターでは回復がみられない事から、レトロウイルスの発現維持には Brm を含む SWI/SNF 複合体が重要な役割を果たしていることが示された。また、このジーンサイレンシングはウイルスベクターを感染後、HDAC の阻害剤を添加して培養することによりかなり解除されるが、DNA メチル化の阻害剤によっては全く解除されないことから、このジーンサイレンシングにはメチル化非依存的に起きている事が考えられる。

次に Brm ベクターの LTR 上に動員されてくる宿主因子群やヌクレオソームの構成タンパク質をクロマチン免疫沈降法によってコントロールベクターと比較したところ、Brm ベクター導入細胞では転写を負に制御する YY1、HDAC1/2 といった因子やリンカーヒストンの H1 タンパク質の 5' LTR への動員が減少していた。さらに 5' LTR 近傍に存在するヌクレオソーム中にあるヒストン H4 の Lys5, Lys8 のアセチル化を特異的に増強していた。これらの結果を総括すると『プロウイルスからの転写が開始した後、それが維持されるために

は、一般にこれを正に制御している「Brm を含む SWI/SNF 複合体」 (trx-G) が、負に制御している「YY1 を含む Pc-G 複合体」と拮抗する必要がある。』というモデルが考えられた。両複合体は 5' -LTR の U3 領域への結合をめぐって競合し、それぞれヒストンアセチル化酵素 (HAT) と HDAC を直接的または間接的に動員し、クロマチン構造変換やヒストンのアセチル化・脱アセチル化を介して転写の ON、OFF の制御に関わるものと考えられる。

レトロウイルスによるジーンサイレンシングは胚性幹 (ES) 細胞でよくみられる現象であるが、近年興味深いことにマウス ES 細胞において、Brm の発現が見られないという報告がされた。そこでヒトの Embryonic Carcinoma である PA-1 細胞株を用い Brm の発現の検証をしたところ、RT-PCR、Western blotting 共に検出限界以下であった。また上述してきた方法により、PA-1 細胞株におけるレトロウイルスベクターの発現の維持効果を調べたところ、この細胞株においても高頻度にモザイク状のコロニーを形成することを確認した。この結果より ES 細胞においても上述してきたようなメカニズムでジーンサイレンシングが起きていることが示唆された。これらの考察を踏まえ、幹細胞などの未分化な細胞においても長期的に発現を維持するウイルスベクターの開発を目的として、この問題を克服できるようなウイルスベクターの設計を試みた。転写を負に制御する因子が優勢であると考えられるこのような細胞内の環境下においてはレトロウイルスの発現を長期的に維持する為には転写を負に制御する因子群を LTR に動員させないようにすることが重要であると考えた。そこで MLV の LTR 中にある YY1 結合配列を壊した Δ YY1 ベクターを構築し、Pc-G による発現抑制を受けにくいベクターの作成を行なった。このベクターに外来遺伝子として LacZ 遺伝子を乗せ、Brm の発現が見られない癌細胞株や PA-1 細胞株に導入しその発現維持効果を検討したところ、改良前のベクターに比べ完全な回復は得られないものの、顕著な発現維持の回復が見られた。

以上の結果から EC 細胞において Δ YY1 ベクターが顕著な発現回復を示すことから上述してきたような概念に基づくベクターは今後、長期的な発現維持を担うベクター開発の一助となることが期待される。この機構はこれまで指摘されてきた DNA メチル化に依存した機構とは異なる新規のものであり、このように宿主細胞のエピジェネティクスの機構の解明によりさらに新しい概念に基づく新しいベクターが開発されるものと考えている。