

学位論文題名

新しいヒト内在性レトロウイルスの分子生物学的解析

学位論文内容の要旨

I はじめに

すべての脊椎動物の染色体上には、レトロウイルス様構造を持つ遺伝子が多数存在し、これらは内在性レトロウイルスと呼ばれている。内在性レトロウイルスはプロウイルス DNA の形で通常の遺伝子と同様、生殖細胞を通じて親から子へメンデルの法則に従い、宿主の遺伝子として安定な形で継代される。この内在性レトロウイルスの研究は、マウスなどの系で研究が進み、内在性プロウイルスと感染性レトロウイルスとの組み換えにより発癌性を獲得した例や変異誘発因子として働く例が知られており、癌化における1つの要因になっている。さらにある種のマウスにおいては自己免疫疾患への病因的関与も指摘されている。しかし、ヒトの場合、内在性レトロウイルスが癌や自己免疫疾患などの病因に関与しているという直接的証拠はまだ見つかっていない。また、ヒト内在性レトロウイルスは、今までのところごく少数しか、その遺伝子クローニングがなされていないのが現状である。本研究では、ヒト内在性レトロウイルス ERV 3 とクロスハイブリダイズする新しいヒト内在性レトロウイルスの存在を見出し、そのいくつかの遺伝子断片を単離することに成功した。ERV 3 はチンパンジーの内在性プロウイルス (CH 2) の pol 領域をプローブとしてヒトの全染色体ライブラリーより単離された C 型レトロウイルス関連のプロウイルスであり、ヒト genome 中にハプロイドあたり 1 コピー存在している。この env 領域をプローブに用いてヒト genomic ライブラリーより、4 個の新しい内在性レトロウイルス遺伝子断片を単離し、部分的に塩基配列を決定したので報告する。

II 材料、方法および結果

1) サザンブロッティング解析

約30人の同一家計の日本人末梢血リンパ球から、常法に従って高分子 DNA を抽出した。そのうち12 μ g を制限酵素 (EcoRI または BamHI) で消化したものを0.9%アガロースゲルにて、25V, 36時間泳動し、ナイロンメンブレンにブロッティングした。プローブには1コピー形ヒト

内在性レトロウイルス ERV 3 の env 領域1.7kb を用いた。この25ng を random primer 法により、 ^{32}P で標識し、常法に従ってサザンハイブリダイゼーションを行った。wash の条件は 2 xSSPE, 0.1%SDS で室温10分 2 回, 1 xSSPE, 0.1%SDS で65°C15分 1 回(low stringency), さらに, high stringency の場合は0.1xSSPE, 0.1%SDS で65°C15分 1 回行った。high stringency の条件で行った RFLP 解析では、白人同様、BamHI-20kb, EcoRI-5 kb の単一のバンドが認められた。一方, low stringency の条件で同様に行った RFLP 解析では、ERV 3 とクロスハイブリダイズする多数のバンドが観察された。しかも、これら多数のバンドの一部には個体間で多型が存在し、BamHI を使用した場合には、6.0kb, 5.0kb の位置に、EcoRI では、4.3kb, 4.0kb の位置に多型が観察された。また、多型を示すバンドのうち、BamHI-6.0kb, EcoRI-4.3kb, 4.0kb のバンドは、検索したすべての男性にのみ存在し、Y 染色体上にあることが明らかとなった。

2) 遺伝子ライブラリーの作製とスクリーニング

ヒト男性末梢血リンパ球由来の genomic DNA を、制限酵素 EcoRI を使用して完全消化し、7.0 kb ~1.5kb の大きさの DNA fraction を λ gt10 にライゲーションさせ、in vitro packaging を行い、遺伝子ライブラリーを作製した。ERV 3 env1.7kb をプローブとして、常法に従って plaque hybridization を行い、陽性 signal をいくつか確認した。さらに二次、三次スクリーニングを続けて行い、4 種類の純粋な遺伝子断片を単離した。これらの4個のクローンを SY-1, SY-2, SY-3, SY-4 と名づけた。

3) クローン化プロウイルス genome の存在様式

ヒト男性および女性の末梢血リンパ球から抽出した DNA を EcoRI で消化し、1) と同様に作製したメンブレンに対し、上記の SY-1, 2, 3, 4 のクローン化遺伝子断片をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行い、その存在様式を確認した。SY-1 では、EcoRI-4.0kb の1本のバンドが男性においてのみ認められ、Y 染色体上にマップされた。SY-2 では、EcoRI-4.4kb の1本のバンドが男性、女性ともに認められ、常染色体上に存在することが明らかになった。SY-3 では、EcoRI-2.1kb の1本のバンドが男性、女性ともに認められるとともに、それとクロスハイブリダイズするいくつかのバンドも認められた。またこれらのクロスするバンドは、ERV 3 env 領域とクロスするバンドの存在様式と異なっていた。SY-4 では、多数のバンドが認められマルチコピー型の内在性レトロウイルスであるとともにいくつかの多型も存在した。

4) 単離したプロウイルス genome 塩基配列の決定とその解析

単離した遺伝子断片をM13mp18, 19にサブクローニングし, single strand DNA を回収して, シーケンス時の template DNA に用いた。シーケンス反応は, Sequenase Ver. 2.0を使用し, Sanger 法に従って行った。単離したプロウイルス遺伝子断片の DNA 塩基配列の連結や相同性検索, および制限酵素地図作製は DNASIS ソフトウェアを使用して行った。SY-1, SY-2, SY-4 は, 部分的にそれぞれ約200bp について sense strand のみをシーケンスし, 同時に相同性検索も行った。Y染色体上にある SY-1 については, ERV3 の env (1650bp-1820bp) と72.6%相同性を有していた。また, ヒトで唯一発見されているY染色体上の内在性レトロウイルス NP-2 の env 領域 (430bp-600bp) と55.1%の相同性を有していた。SY-2 では, ERV3pol 領域 (1bp-170bp) (71.9%) の他に Chimpanzee endogenous retrovirus pol 領域 (3pb-170bp) (77.9%), Baboon endogenous retrovirus pol 領域 (4880-5050bp) (61.0%), Moloney murine leukemia virus pol 領域 (320bp-490bp) (57.3%) 等と相同性を有していた。SY-4 は, レチノイン酸で転写が誘導されることが知られているマルチコピー型内在性レトロウイルス RRHERV-1 の pol 領域 (2105bp-2270bp) と高い相同性 (83.8%) を示した。SY-3 については, その1.8kb について, sense および anti-sense strand の両方向からシーケンスを行い, その塩基配列を決定した。SY-3 の各部分について, 相同性を有するレトロウイルスを検索したところ, ERV3 pol, env の領域, マルチコピー型ヒト内在性レトロウイルス λ 4-1 の pol 領域, 非ウイルス型レトロポゾンである U3 small nuclear RNA (U3 snRNA) の regulatory elements との相同性が認められ, 部位によってその相同性を有する既知の遺伝子が異なっており, 内在性レトロウイルスと非ウイルス型レトロポゾンからなるキメラ DNA であった。このウイルス genome 中には長い open reading frame は存在せず, またヒト胎盤や各種の培養細胞株を用いたノーザン解析でもその転写活性は認められなかった。

5) Zoo blot を用いた進化遺伝学的解析

各種の哺乳動物 (human, rhesus monkey, Splague-Dawley rat, BALB/c mouse, dog, cow, rabbit) および chicken, yeast の genomic DNA 各々 8 μ g を EcoRI で消化し, 1) と同様にして電気泳動後, プロッティングしたメンブレンに対し, 単離したプロウイルス遺伝子断片の SY-3 をプローブとしてサザン解析を行ったところ, human と Rhesus Monkey において, SY-3 もしくは, それと近縁の内在性レトロウイルス genome が存在したが, それより下等の動物には存在しなかった。

Ⅲ 考 察

本研究では、1コピー型ヒト内在性レトロウイルス ERV 3 を使用して、これと相同性を示す新しいヒト内在性レトロウイルスの断片をクローニングし検討した結果、以下のことが明らかになった。

1. 1コピー型ヒト内在性レトロウイルス ERV 3 とクロスハイブリダイズする多くの内在性レトロウイルスの存在を確認した。ERV 3 と近縁のこれらのレトロウイルスの一部は個体間で多型性を有していた。この内在性レトロウイルスの多型性を利用して RFLP 解析を行い、自己免疫疾患などの患者集団と健常人集団でのその存在様式の違いを検索することにより、疾患に関与している内在性レトロウイルスをつきとめるというアプローチも有効であると考えられた。

2. 上記の内在性レトロウイルスのうち4種類について、その遺伝子断片のクローニングに成功した。SY-1 はY染色体上にのみ存在し、他の染色体上には存在しなかった。また、同じY染色体上に存在する内在性レトロウイルス NP-2 と相同性を有し、他の染色体上には、両者とも組み込まれてはいないということは、Y染色体の起源を考える上で興味もたれる。マウスの場合にもY染色体上にマップされたレトロウイルスの報告がいくつかあるが、それらは他の染色体上にも分散しており、Y染色体にのみ存在する例は、ヒトのSY-1 と NP-2 のみである。SY-2 は、その相同性の検索から、Chimpanzee や Baboon などの霊長類の他にマウスの内在性レトロウイルスの塩基配列とも相同性を有しており、このウイルスが進化における比較的初期の段階で哺乳動物の genome に組み込まれたものと推測される。

3. SY-3 は内在性レトロウイルスと非ウイルス型レトロポゾンからなるキメラ DNA であった。このようなキメラ DNA が genome 内に存在していたということは、内在性レトロウイルスと非ウイルス型のレトロポゾンが連続した1つの RNA 分子として転写され、内在性レトロウイルスの持つ逆転写酵素を利用して、genome 中をトランスポジションする分子の存在も予想される。また、SY-3 には、さらに近縁の内在性レトロウイルスが存在することが確認できたことから、SY-3 をプローブとして、遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることにより、未知の内在性レトロウイルスをクローニングできると考えられる。その中には、タンパク質まで翻訳され、機能分子として作用している内在性レトロウイルスの存在も十分あり得ると思われる。

4. SY-3、あるいはそれと近縁のレトロウイルスが、ヒトとサルのゲノムの中にのみ存在し、それより下等な動物には存在しなかった。SY-3 は進化の比較的最近になって、霊長類の genome 中に内在化したのであろう。またこのことはウイルスのもつ種特異的感染性を示唆すると同時に、SY-3 がかつては感染性のレトロウイルスであったことをも示していると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 柿 沼 光 明

内在性レトロウイルスは進化の過程における外来性レトロウイルス感染を示す証拠と考えられている。またその構造から考え、内在化後も、自己の持つ逆転写酵素を利用してのレトロトランスポジションによる宿主遺伝子の破壊や、LTRをプロモーターとしての下流にある宿主細胞遺伝子の発現異常、さらには、プロウイルスの構造タンパクである gag や env に対しての抗体出現による自己免疫疾患の発症など、ヒトの発癌や奇形、自己免疫疾患などと結びつくのではないかと推測される。

しかしヒトにおいては、内在性レトロウイルスが何らかの疾患の原因に直接的に関与しているかどうかは不明であり、また現時点においてクローニングされている内在性レトロウイルスの数も限られている。その様なレトロウイルスと疾患との関係を探し出すことは、現時点において論理的思考で行うことは困難であり、各々の疾患について、数多くの内在性レトロウイルスをランダムに検索していかざるを得ない。本研究は、上記のプロジェクトの一環として、新しいヒト内在性レトロウイルスの遺伝子クローニングをその目的として行った。

その結果、1コピー型ヒト内在性レトロウイルス ERV 3 を使用して、これと相同性を示す新しいヒト内在性レトロウイルスの断片をクローニングし、その存在様式、塩基配列等の解析から以下のことが明らかとなった。

1. 1コピー型ヒト内在性レトロウイルス ERV 3 とクロスハイブリダイズする多くの内在性レトロウイルスの存在を確認した。ERV 3 と近縁のこれらのレトロウイルスの一部は個体間で多型性を有していた。この内在性レトロウイルスの多型性を利用して RFLP 解析を行い、自己免疫疾患などの患者集団と健常人集団でのその存在様式の違いを検索することにより、疾患に関与している内在性レトロウイルスをつきとめるというアプローチも有効であると考えられた。
2. 上記の内在性レトロウイルスのうち4種類について、その遺伝子断片のクローニングに成功した。SY-1 はY染色体上にのみ存在し、他の染色体上には存在しなかった。また、同じY染色体上に存在する内在性レトロウイルス NP-2 と相同性を有し、他の染色体上には、両者とも組み込まれていない。このことは、Y染色体の起源を考える上で興味もたれる。マウスの場合

にもY染色体上にマップされたレトロウイルスの報告がいくつかあるが、それらは他の染色体上にも分散しており、Y染色体にのみ存在する例は、ヒトのSY-1とNP-2のみである。SY-2は、その相同性の検索から、ChimpanzeeやBaboonなどの霊長類の他にマウスの内在性レトロウイルスの塩基配列とも相同性を有しており、このウイルスが進化における比較的初期の段階で哺乳動物のgenomeに組み込まれたものと推測される。

3. SY-3はそのenv遺伝子中に非ウイルス型レトロポゾン様配列の挿入された内在性レトロウイルスであった。SY-3ではまだ確認できていないが、このような構造の塩基配列がgenome内に存在していたということから、ヒトのgenomeの中には内在性レトロウイルスと非ウイルス型のレトロポゾンが連続した1つのRNA分子として転写され、内在性レトロウイルスの持つ逆転写酵素を利用して、genome中をトランスポジションする分子が存在するという可能性も否定できない。また、SY-3には、さらに近縁の内在性レトロウイルスが存在していることが確認できたことから、SY-3をプローブとして、遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることにより、未知の内在性レトロウイルスをクローニングできると考えられる。その中には、タンパク質まで翻訳され、機能分子として作用している内在性レトロウイルスの存在も十分あり得ると思われる。

4. SY-3、あるいはそれと近縁のレトロウイルスは、ヒトとサルゲノムの中にのみ存在し、それより下等な動物には存在しなかった。SY-3は進化の比較的最近になって、霊長類のgenome中に内在化した可能性がある。またこのことはウイルスのもつ種特異的感染性を示唆していると考えられた。

ヒト内在性レトロウイルスはこれまでのところごく少数しかその遺伝子クローニングがなされていないのが現状であり、本研究において新たにクローニングされた上記のヒト内在性レトロウイルスが加わったことは、内在性レトロウイルスの癌や自己免疫疾患などへの病因的関与を検索する上で有意義なものと考えられる。

この口頭発表に対し、3人の教授より以下のような質問がなされた。葛巻教授からは、1) 内在性レトロウイルスの転写活性の有無、2) RFLPを示した内在性レトロウイルスの病因的意義、3) 内在性レトロウイルスの起源について、柿沼教授からは、内在性レトロウイルスのホモロジーについて、細川教授から、HTLV-1、HIV等の外来性レトロウイルスと内在性レトロウイルスとのヒトにおける相互関係についての質問がなされたが、発表者は概ね適当な回答を行った。また、その後、副査の柿沼、葛巻両教授との口頭試問においても、概ね適切な回答がなされ、合格と判定された。

本研究は、ヒト原因不明の自己免疫疾患や脱髄疾患などにおける病因的役割の注目されているヒト内在性レトロウイルスについて、1コピー型内在性レトロウイルス ERV 3 と相同性を有する新しい4つの内在性レトロウイルス遺伝子断片をクローニングし、その存在様式、塩基配列を決定したもので、今後、自己免疫疾患や脱髄疾患の原因追求に資するところ大なるものがあり、博士（医学）の学位を授与するに値すると思う。