

Title	神経病原性レトロウイルスA8-Vのenv遺伝子発現に見られた奇妙なスプライシング
Sub Title	Eccentric splicing found in env gene expression of neuropathogenic A8-V
Author	渡辺, 里仁(Watanabe, Rihito) 高瀬(余田), 明(Takase (Yoden), Sayaka) 山川, 圭(Yamakawa, Kei) 池田, 富夫(Ikeda, Tomio)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.1 (2006. 3) ,p.29- 35
JaLC DOI	
Abstract	Packaging cell lines PacNIH/A8 β and PacNIH/A8 δ , which were introduced by the DNA of expression vectors pA8(Ψ -) β and pA8(Ψ -) δ respectively, to produce pseud-retroviral particles in the retroviral vector system, were established. Both the expression vectors were constructed using the genes of A8-V, which is an isolate from Friend murine leukemia virus(F-MLV) and shows higher proliferation rates in the central nervous system(CNS) of rats and mice compared with original F-MLV. These two expression vectors utilize a different polyadenylation signal (polyA signal) for the expression of retroviral genes. The former employs a 0.85kb fragment in the SV40 early region as a polyA signal, and the latter, a 0.13kb of the same region. PacNIH/A8 β showed an unstable expression of the env gene in the A8-V genome, whereas all of the retroviral gene expressions in the PacNIH/A8 δ were perfect. An occurrence of abnormal splicing in the mRNA for the env gene in the PacNIH/A8 β cells was suggested.
Notes	原著
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060300-0029

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

原 著

神経病原性レトロウイルス A8-V の env 遺伝子発現に見られた
奇妙なスプライシング

¹⁾創価大学工学部生命情報工学科, ²⁾デンカ生研株式会社

わた なべ り ひと たか せ よ でん さやか やま かわ けい いけ だ とみ お²⁾
渡 辺 里 仁, 高 瀬 (余 田) 明, 山 川 圭, 池 田 富 夫²⁾

ABSTRACT

Eccentric splicing found in env gene expression of neuropathogenic A8-V

Rihito Watanabe¹⁾, Sayaka Takase-Yoden²⁾, Kei Yamakawa¹⁾, Tomio Ikeda²⁾

¹⁾Department of Bioinformatics, Faculty of Engineering, Soka University, Tangi-cho 1-236, Hachioji, Tokyo

²⁾Denka Seiken Co., LTD. 1-2-2 Minami Honcho, Gosen-shi, Niigata

Packaging cell lines PacNIH/A8 β and PacNIH/A8 δ , which were introduced by the DNA of expression vectors pA8(Ψ - β) and pA8(Ψ - δ), respectively, to produce pseudo-retroviral particles in the retroviral vector system, were established. Both the expression vectors were constructed using the genes of A8-V, which is an isolate from Friend murine leukemia virus (F-MLV) and shows higher proliferation rates in the central nervous system (CNS) of rats and mice compared with original F-MLV. These two expression vectors utilize a different polyadenylation signal (polyA signal) for the expression of retroviral genes. The former employs a 0.85 kb fragment in the SV40 early region as a polyA signal, and the latter, a 0.13 kb of the same region. PacNIH/A8 β showed an unstable expression of the env gene in the A8-V genome, whereas all of the retroviral gene expressions in the PacNIH/A8 δ were perfect. An occurrence of abnormal splicing in the mRNA for the env gene in the PacNIH/A8 β cells was suggested.

Key Words : ecotropic, packaging cell, histochemistry, retrovirus, CNS

緒 言

我々は、フレンド白血病マウスレトロウイルス (Friend murine leukemia virus, F-MLV) を、ラット脳内への継代接種およびラット由来グリア細胞株 C6 への継代感染を繰り返すことにより神経病原性ウイルス株 FrC6-V を樹立した¹⁾。更にこのウイルスを分子クローニングして A8-V を得た²⁾。A8-V も FrC6-V と同様に、新生仔ラットに感染させることにより、感染後 6-8 週で感染したラットの中枢神経系内に海綿状脳症を惹き起こす。病変部位は橋を中心に大脳皮質、視床、基底核、小脳、脊髄におよぶ、脊髄病変が強い場合には下肢麻痺が出現する³⁾。海綿状病変を形成する空胞は、我々の電

子顕微鏡による検索から後シナプスの部位にある神経網 (neuropil) に局在していると考えられる³⁾。病変が神経細胞に生じているにもかかわらず、ウイルスは神経細胞には感染せず、ウイルス抗原は感染したラットの中樞神経内の血管壁やグリア細胞に認められる^{3), 4), 5)}。

一般にマウスレトロウイルス (MLV) の遺伝子は、5' 末端の Long Terminal Repeat (5' LTR), gag 遺伝子, 次に pol 遺伝子領域を挟んで、ウイルスの被膜タンパク質 (envelope protein, Env タンパク質) をコードとする env 遺伝子が配列され最後に 3' 末端 LTR が付加される構造をとっている⁶⁾。この中の gag 遺伝子はウイルス粒子のコア蛋白を形成する Gag タンパク質をコードする。Gag タンパク質の発現には LTR 領域にあ

る U3 領域から始まり env 遺伝子を含む全長 8.4 kb の mRNA (full length-mRNA) が用いられる。一方, env 遺伝子の発現では, 前述の全長の mRNA からスプライシングにより gag-pol の領域が除去された 3.1 kb の mRNA (env-mRNA) が用いられる^{6, 7}。A8-V の神経病原性に関与している遺伝子がどの領域にあるかについては, 神経系であまり増殖せず, かつ神経病原性もない F-MLV の分子クローンである 57-V の遺伝子と A8-V の遺伝子の間で組換えをして作成した種々のキメラウイルスを用いた感染実験の結果から明らかになっている^{21, 22}。神経病原性を惹起し, また, ラット中枢神経系で効率よく増殖するためには, A8-V 由来の env 遺伝子 (A8/env) が必須である。この遺伝子にコードされる Env タンパク質 (A8/Env) は, 我々がラットグリア細胞株 F10 細胞から分離した MLV レセプター F10-EcoR を, 57-V 由来の Env タンパク質 (57/Env) に比べてより効率よく認識し, A8/Env を発現しているウイルス粒子の標的細胞への進入を促進させる^{81, 82}。A8-V の病原性発現および中枢神経内での高い増殖能獲得のためには上記 env 遺伝子だけではなく, LTR の U3 領域にあるエンハンサー配列や 5' LTR 下流のリーダー配列も重要であることが確かめられている^{71, 100, 113}。

我々はこれまでに, これら A8-V 遺伝子特有の配列を利用して中枢神経系内に遺伝子を導入するためのレトロウイルスベクター系を構築してきた^{121, 131, 141}。福光らは, 本研究でも使用されている, A8-V 遺伝子を用いた発現ベクターである pA8 (Ψ-) δ をラット由来グリア細胞株 C6/G に遺伝子導入してパッケージング細胞 PacC6/A8 を得た¹³¹。C6/G 細胞株は我々が C6 細胞から星状膠細胞特異抗原であるグリア線維酸性タンパク質 (GFAP) 陽性の細胞をクローニングして得た細胞株である¹¹。PacC6/A8 に更に脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) の遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターを遺伝子導入して, 持続的に BDNF 遺伝子を運ぶ偽ウイルスを産生する PacC6/A8/bmh 細胞をクローニングした。PacC6/A8/bmh 細胞をラット脳内に移植したところ, 偽ウイルスにより運ばれた BDNF 遺伝子を発現するグリア細胞がラット脳内で確認された。このとき, A8-V で誘導される神経病変は生じなかった¹³¹。海綿状脳症を誘発するためには, A8-V が感染して A8-V の遺伝子が脳内のグリア細胞または血管内皮細胞で発現しなければならないものと考えられる。

今回の我々の論文は, これまでの一連のベクター構築の実験, とりわけ pA8 (Ψ-) δ 構築の過程で A8/env

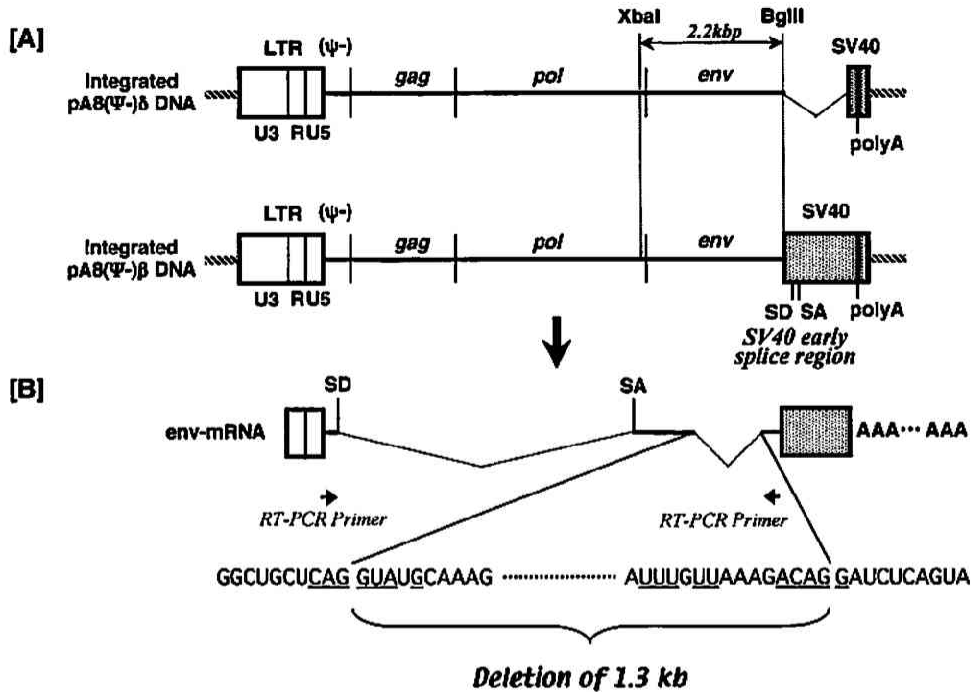
の発現が不安定になる現象が見られ, この現象の原因を解明することで, より安定なレトロウイルスベクターの開発のための知見とする目的で行った研究の結果である。

材料と方法

発現ベクターおよびパッケージング細胞の構築:すでに発表してある方法²¹により A8-V の遺伝子 (Accession No. D88386) から Ball-Pst I 断片を欠失させてパッケージングシグナルを除去した。更に 3' LTR の部位 (env 領域下流) に SV40 遺伝子 (Accession No. V01380) の 0.61 kbp Sau3AI (4710) -Sau3AI (4100) 断片と 0.24 kbp BclI (2770) -BamHI (2533) をつないだ 0.85 kbp の断片を結合させて発現ベクター pA8 (Ψ-) β を構築した¹³¹。同様に SV40 遺伝子 0.14 kbp の HpaI (2666) -BamHI (2533) 断片を env 領域 3' 末端に結合させて pA8 (Ψ-) δ を得た (第 1 図 [A])。それぞれの発現ベクターには薬剤選択のためにプラストサイジンデアミナーゼ遺伝子を導入した。これらのベクターを NIH3T3 細胞にトランスフェクトした後, 1.25 μg/ml のプラストサイジン (Invitrogene) 存在下で細胞クローニングを行い, パッケージング細胞 PacNIH/A8β 細胞と PacNIH/A8δ 細胞を得た。同様に pA8 (Ψ-) δ または pA8 (Ψ-) β を C6/G 細胞に遺伝子導入して PacC6/A8δ および PacC6/A8β を得た¹³¹。

遺伝子解析: サザンブロットにあたっては, PacNIH/A8δ, PacNIH/A8β および正常 NIH3T3 細胞から DNA を抽出した。10 μg の DNA を XbaI および BglII で消化し, アガロースゲル電気泳動を行った。DNA をメンブレンにトランスファーした後, env 遺伝子を含む BamHI-BamHI 断片 (0.8 kbp) をプローブとして, ハイブリダイゼーションを行った。RT-PCR では PacNIH/A8δ, PacNIH/A8β, A8-V 感染 NIH3T3 細胞から抽出した RNA を用いた⁷¹。オリゴ (dT) をプライマーとして, 逆転写反応を行い, 合成された cDNA をフォワードプライマー (5'-TTCTCGAGAGGGACCACCGACCCACCAC-3') およびリバースプライマー (5'-TAAGATCTTTATTGTGGGTCGTATTCTA-3') を用いて, PCR に供した。得られた遺伝子断片をクローニングした後, 遺伝子配列を決定した (第 1 図 [B] 参照)。

染色および病理検索:すでに発表した方法を用いて^{121, 131}クローニングされた細胞はスライドガラス上で 1 晩培養した後, 100%エタノールで 2 分固定し, 酵素抗体法にて Env タンパク質と Gag タンパク質の発現を



第1図 pA8(Ψ-)δ, pA8(Ψ-)βの構造および mRNA の欠損部位の遺伝子配列。

発現ベクターの基本構造を [A] に, env-mRNA の基本構造と PacNIH/A8β 細胞で作られた env-mRNA の欠損部位を [B] に示した。[A] の XbaI-BglII はサザンブロットの解析に用いた部分。[B] にある Deletion of 1.3-kb が PacNIH/A8β 細胞で作られた env-mRNA の欠損部位。この欠損部位の前後に見られたスプライシング供与部位および受容部位のコンセンサス配列に下線を付した。RT-PCR Primer の上に示した矢印は RT-PCR に用いたプライマーの設定部位, プライマーの塩基配列は材料と方法参照。Ψ: パッケージングシグナル, Ψ- はパッケージングシグナルを欠失させたことを示す。欠失部位は材料と方法参照。polyA: ポリ A 付加シグナル, SD: スプライシング供与部位, SA: スプライシング受容部位, SV40 early splice region: SV40 初期遺伝子のスプライシング部位。

確かめた。抗体は、それぞれのタンパク質に対して gost anti-Rauscher MLV gp70 と anti-AKR p30^{Gag} (Quality Biotech Incorporated Resource Laboratory) を使用した^{3), 6)}。PacC6/A8δ および PacC6/A8β は、本大学の安全規定と動物倫理規定に基づいて飼育されているルイスラットの新生仔 7 匹および 5 匹の脳内にそれぞれ 10² 細胞/匹をマイクロシリンジを用いて注入して移植した¹⁹⁾、同時に A8-V を従来の方法で^{1), 3)} 5 匹に感染させた。移植または感染後 6 週で深麻酔下で屠殺し中枢神経を取り出し 4% パラホルムアルデヒドで浸漬固定しパラフィン切片を作成した。顕微鏡による観察はヘマトキシリン-エオジン染色した後におこなった。

研究結果

パッケージング細胞における遺伝子発現: PacNIH/

A8β 細胞からはプラストサイジン存在下での細胞培養により 30 クローンの細胞を分取した。このうち Gag タンパク質または Env タンパク質を発現していたのは 24 クローンであった。この 24 クローンすべてで Gag タンパク質が発現 (Gag+) していた。しかし Gag+ で Env タンパク質を発現していた (Env+) クローンはわずか 3 クローンであった。残りの 21 クローンには Gag+ であるにもかかわらず、Env タンパク質が発現していなかった (Env-)。また、Gag タンパク質が発現しておらず (Gag-) に Env+ であったクローンはなかった (第 1 表)。一方 PacNIH/A8δ 細胞からは 24 クローンを分取し、13 の Gag+ クローンを得た。これらの Gag+ クローンすべてが Env+ であった。PacNIH/A8δ 細胞から得たクローンでも Gag-かつ Env+ のクローンは見られなかった。

DNA 解析: PacNIH/A8β 細胞で見られた Gag+,

第1表 パッケージング細胞クローンの遺伝子発現

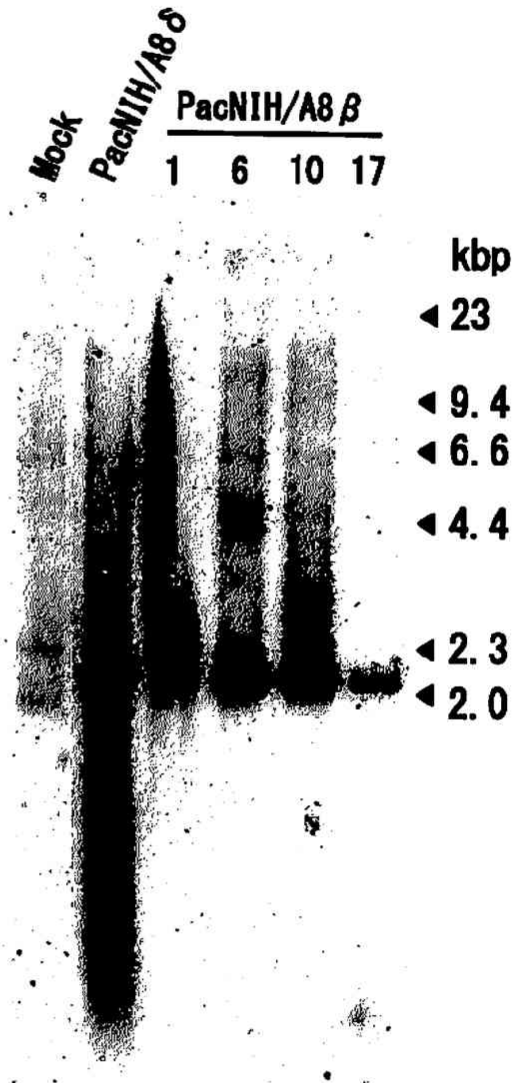
Clone No.	PacNIH/A8β		PacNIH/A8δ	
	Gag	Env	Gag	Env
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	-	-
5	+	-	-	-
6	+	-	+	++
7	+	-	+	+
8	+	-	+	+
9	+	-	+	+
10	+	-	+	+
11	+	-	-	-
12	+-	+	+	++
13	+	-	+	+
14	++	-	+	+
15	+	-	-	-
16	+	-	-	-
17	+	-	-	-
18	+	-	+	+
19	++	-	-	-
20	+	-	-	-
21	+	-	-	-
22	+	-	-	-
23	+	-	-	-
24	+	-	+	+
25-30	他6クローンで Gag-, Env-			

発現ベクター pA8 (Ψ-) β または pA8 (Ψ-) δ を NIH3T3 細胞に遺伝子導入して、パッケージング細胞 PacNIH/A8β および PacNIH/A8δ 細胞を得た。それぞれの細胞はプラストサイジン 1.25 mg 存在下でクローニングした。酵素抗体法で Gag タンパク質と Env タンパク質 (表中 Gag, Env と記載) を検出し個々のクローンについてウイルス抗原陽性 (+) と陰性 (-) を記した。(++) の表記は強い発現がさいぼうのほぼ 100% に発現していたことを示す。(+) のクローンではスライドガラス上の細胞のほぼ 70% 以上の細胞がウイルス抗原陽性として判定できた (方法の詳細については福光, 渡辺の論文参照)。

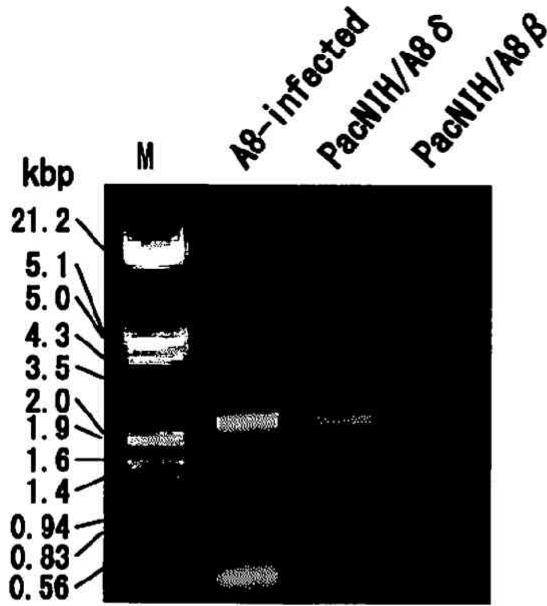
Env- の現象が導入された DNA の欠損によるものか否かをサザンプロット法により確かめた。DNA の欠損の可能性をより精密に測定するために、導入された DNA の env 領域にできるだけ近い部位を切断する制限酵素を用いた (第1図【A】で示した XbaI-BglII 領域)。PacNIH/A8β 細胞クローンから4つの Gag+, Env- のクローンを選んで解析したが、導入されていた env 遺伝子の大きさは期待通りのサイズで、PacNIH/A8δ 細胞から得られた結果と同じであった (第2図)。

mRNA 解析: それぞれのクローンについて mRNA

の env 遺伝子領域を RT-PCR にて増幅して解析した。env 遺伝子発現にはスプライシングを受けた後に生じる短い env-mRNA が用いられる。この env-mRNA 内の env 遺伝子領域を解析できるプライマーを設定し (第1図【B】で示したプライマー設定部位)、発現を確かめたところ、Gag+, Env- PacNIH/A8β 細胞クローンに

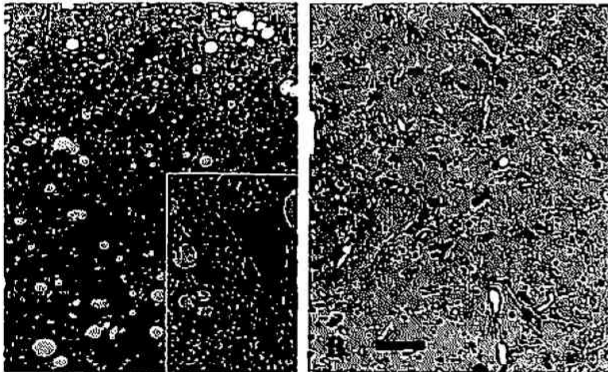


第2図 PacNIH/A8δ および PacNIH/A8β 細胞ゲノムに組込まれた env 遺伝子 PacNIH/A8δ, PacNIH/A8β および正常 NIH3T3 細胞から抽出された DNA のサザンプロットによる解析。細胞ゲノムに組込まれた発現ベクターの env 領域 (XbaI-BglII 領域, 第1図【A】参照) には大きな欠損はなく、期待された約 2 kbp のバンドが検出された。



第3図 PacNIH/A8 δ および PacNIH/A8 β 細胞で発現している env-mRNA

PacNIH/A8 δ , PacNIH/A8 β , A8-V 感染 NIH3T3 細胞から抽出した RNA を用いた RT-PCR の結果得られた電気泳動像。 PacNIH/A8 β から得られた材料からは約 1 kbp 短いバンドが検出された。プライマーの設定部位は材料と方法および、第1図【B】参照。



第4図 移植後の病原性

1×10^6 個の PacC6/A8 β 細胞をルイスラット新生仔の脳内に移植し、移植後6週目の橋の組織(写真B)と、A8-V 感染後の橋に見られた強い海綿状病変(写真A)。細胞移植群では、既に発表した PacC6/A8 δ 細胞の移植の結果¹⁾と同様、海綿状の病変もまた、それ以下の小さな病変である空胞変性も全く見られなかった。写真内の太いバーと2重線はそれぞれ $50 \mu\text{m}$ と $60 \mu\text{m}$ を示す。写真A内の白枠部分は同部位の拡大であり、海面状変性の中にある神経細胞が健全に保たれていることを示す。

において、env-mRNA の env 遺伝子領域が約 1 kb 短くなっていた(第3図)。 PacNIH/A8 δ から得た細胞クローンで作られる env-mRNA の env 遺伝子領域は期待通りの大きさであった。

塩基配列の検索： Env-PacNIH/A8 β 細胞クローンで作られる env-mRNA の塩基配列を調べたところ env-mRNA の 3' 側に 1.3 kb の欠損が確かめられた(第1図【B】)。この欠損部分は、 Env タンパク質の表面タンパク質(SU protein)である gp70 の中の下流域をコードする部分と、やはり Env タンパク質の一部で、その膜貫通部分である p15E の大部分をコードしている領域であった。この欠損した部分の下流域の配列は保たれていた(第1図【B】)。

病原性の検討： PacC6/A8 δ および PacC6/A8 β を新生仔ラット脳内に移植して病原性を確かめた。それぞれ7匹、3匹の脳内に移植し6週後に病理検索を行ったが海面状病変は認められなかった(第4図)。

考 察

異なる env-mRNA の発現を示した PacNIH/A8 δ および PacNIH/A8 β 細胞の違いは、それぞれのパッケージング細胞に遺伝子導入された発現ベクター pA8 (Ψ -) δ または pA8 (Ψ -) β のポリ A シグナルとして用いた SV40 の初期遺伝子(SV40 early region) 構造の違いのみである。 pA8 (Ψ -) β では初期遺伝子の中にあるスプライシング供与部位と受容部位の構造を含んだ 0.85 kbp 遺伝子断片をポリ A シグナルとして付加されている。この pA8 (Ψ -) β を NIH3T3 細胞または C6/G 細胞に遺伝子導入して得られたパッケージング細胞 PacNIH/A8 β 細胞および PacC6/A8 β 細胞の双方で env-mRNA の発現が不安定となったために、我々は SV40 初期遺伝子内のスプライシング供与部位と受容部位の構造が影響していると考え、この部分を含んだ大きな領域を欠失させた 0.14 kbp の遺伝子断片を A8/env の下流に付加して pA8 (Ψ -) δ を作成したのである(第1図)。期待通りに、この発現ベクターを導入した PacNIH/A8 δ 細胞では env-mRNA の発現が安定していた(第1表)。 PacNIH/A8 β 細胞で観察された不安定な env-mRNA の発現が、導入された DNA の不安定さ、または欠失が原因ではないことがサザンブロットの結果から推測されたため、次に我々は mRNA の解析を行った。 Gag タンパク質の発現は比較的安定していたため、このタンパク質発現に使われる full length mRNA の解析よりも、 Env タンパク質の発現に使われる env-

mRNA に注目した。また、本論文ではデータを記述しなかったが、RT-PCR を行う前に行ったノザンプロットの結果から PacNIH/A8 β 細胞でも、また PacNIH/A8 δ 細胞でも産生される full length mRNA の大きさは、期待通りのサイズであることが確認されている。

予測通り env-mRNA を標的とした RT-PCR の結果から PacNIH/A8 β 細胞が産生する env-mRNA に欠損が認められた。しかし、欠損部位付近の塩基配列を調べると欠損していた領域は env-mRNA の env 領域内であって、この領域内にある p15E の 3' 末端領域は保たれ、しかもその後のポリ A 付加は正常に行われていた。env-mRNA は full length mRNA から、LTR 下流のスプライシング供与部位と env 遺伝子上流のスプライシング受容部位を使ってスプライシングを受けて形成される⁶⁾。我々は A8-V 遺伝子にあるスプライシング供与部位と受容部位が SV40 初期遺伝子にあるスプライシング供与部位と供与部位が何らかの相互作用を起こして mRNA のポリ A 付加が正常に行われない可能性を予測していた。Gag タンパク質の発現が安定していること、また full length mRNA に大きな欠失が見られなかったことから、スプライシングを受けた後の env-mRNA に異常が生じたことは明らかである。普段はスプライシングで除去されない配列が、後ろにスプライシング供与部位と受容部位の構造を含んだ 0.85 kb の SV40 初期遺伝子の遺伝子断片が付加されることにより、あたかもスプライシングを受けたかのように、env-mRNA の一部が除去されてしまったのである。欠損した部位の前後の領域に異常が見られなかったことから、まずは PacNIH/A8 β 細胞で産生される env-mRNA が更にスプライシングを受けたと考えるのが妥当であろう。そこで、詳細に欠損した部位の前後の塩基配列を検討したところ、実にスプライシング供与部位と受容部位として使われるうる配列が認められたのである (第 1 図 [B] の欠損領域の前後に示した塩基配列に下線を引いた部位)。A8-V や pA8 (Ψ -) δ の遺伝子から読まれる env-mRNA ではスプライシングを受けない部位が、なぜ pA8 (Ψ -) β の遺伝子から読まれる env-mRNA ではスプライシングを受けるのかを説明できる材料をまだ我々は手にしていないが、ひとつには env-mRNA の立体構造の変化がスプライシングを受けやすくする条件の一つであることが考えられる。しかし、コンピューターによるシミュレーションで検索してみたが、今のところ我々の検索では、それを裏付ける手がかりは得られていない。SV40 初期遺伝子にあるスプライシング供与部位と供与部位が何らかの相互作用を起こしている可能性について

も否定的な結果が得られている。というのは、SV40 初期遺伝子にあるスプライシング供与部位と供与部位を含んだ領域を用いた新たな構築で発現ベクターを作成して同様の実験をしたが env-mRNA の発現は安定していた。異常なスプライシングの機構の解明のためには、今後更に種々の長さの SV40 初期遺伝子断片を付加した構築で検討を重ねる必要がある。

Env タンパク質の発現異常は通常の感染でも報告されている。MLV に属し神経病原性を有するレトロウイルスでミクログリアに感染して発現する Env タンパク質に異常が見られ、これが病原性に関与していることが示唆されている¹⁵⁾。そこで我々は PacC6/A8 β 細胞の移植実験を試みたが、神経病原性は認められなかった。

謝 辞

本研究ならびに文献に挙げた我々の論文の多くは、塚田裕三慶應義塾大学医学部名誉教授が設立に尽力した創価大学生命科学研究所で行われた実験を基にしたものです。研究環境を整え、またご助言を下された同名誉教授に感謝します。病理組織標本は創価大学生命科学研究所に勤務していた後藤かつ美技術員の卓越した技術によるものです。また、本研究の一部は文部科学省私学助成・ハイテク・リサーチ・センター整備事業・2004-2008 年の助成を受けました。

総 括

A8-V は我々がフレンド白血病マウスレトロウイルス (F-MLV) から樹立した神経病原性ウイルス株である。このウイルスは、ウイルス粒子の表層の被膜タンパク質 (Env タンパク質) とラット中枢神経系で発現している特異的なレセプターとの相互作用を利用してラット中枢神経系の標的細胞に効率よく侵入する。また、A8-V がラット中枢神経系で強い増殖能を発揮することに対しては、A8-V 遺伝子の LTR およびその下流のリーダー配列が重要な役割を担っている。A8-V が病原性や高い増殖能を中枢神経で発現するためには、ウイルス粒子のコアタンパク質である Gag タンパク質は A8-V 由来のものである必要はない。Gag タンパク質をコードする gag 遺伝子を、神経系に対して病原性がなく、しかも中枢神経系であまり増殖しない 57-V 由来の遺伝子と組換えても、A8-V の性質は変わらない。この A8-V の遺伝子を用いたパッケージング細胞を構築するための発現ベクターを作成した。A8-V の gag-pol-env 遺伝子領域の

発現のためのポリ A シグナルとして SV40 初期遺伝子の領域を利用した。ポリ A シグナルとして 3' LTR を用いなかったのは組換えによって増殖能を持ったウイルス粒子がパッケージング細胞から出現する可能性をより低く抑えるためである。gag-pol-env 遺伝子領域の下流に SV40 初期遺伝子の領域 0.85 kbp および 0.13 kbp を付加して、発現ベクター pA8 (Ψ-) β と pA8 (Ψ-) δ を得た。それぞれを NIH3T3 細胞に遺伝子導入してパッケージング細胞 PacNIH/A8β 細胞と PacNIH/A8δ 細胞を構築した。PacNIH/A8δ 細胞では gag 遺伝子と env 遺伝子の発現は安定していたが、PacNIH/A8β 細胞での env 遺伝子の発現が不安定であった。塩基配列を確かめたところ、PacNIH/A8β 細胞の env 遺伝子を発現させる mRNA の env 遺伝子領域の一部がスプライスアウトされていた。

文 献

- 1) Watanabe R, Takase-Yoden S : Gene expression of neurotropic retrovirus in the CNS. *Prog. Brain Res* 105 : 255-262 ; 1995
- 2) Takase-Yoden S, Watanabe R : Unique sequence and lesional tropism of a new variant of neuropathogenic Friend murine leukemia virus. *Virology* 233 : 411-422, 1997
- 3) Fukumitsu H, Takase-Yoden S, Watanabe R : Neuro-pathology of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis modified by Retroviral Infection. *Neuro-pathology* 22 : 280-289, 2002
- 4) Ikeda T, Takase-Yoden S, Watanabe R : Characterization of monoclonal antibodies recognizing neurotropic Friend murine leukemia virus. *Virus Research* 38 : 297-304, 1995
- 5) Nakai R, Takase-Yoden S, Watanabe R : Analysis of the distribution of neuropathogenic retroviral antigens following PVC211 or A8-V infection. *Microbiol Immunol*, 49 : 1075-1081, 2005
- 6) Coffin J : Structure of the retroviral genome. RNA tumor viruses. (Ed) Weiss R, Teich N, Varmus H, and Coffin J, Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. p. 261-368, 1984
- 7) Takase-Yoden S, Watanabe R : A 0.3 kb Fragment Containing the R-U5-5' Leader Sequence is Essential for the Induction of Spongiform Neurodegeneration by A8 Murine Leukemia Virus. *Virology* 336 : 1-10, 2005
- 8) Takase-Yoden S, Watanabe R : Contribution of virus-receptor interaction to distinct viral proliferation of neuropathogenic and nonneuropathogenic murine leukemia virus in rat glial cells. *J Virol* 73 : 4461-4464, 1999
- 9) Takase-Yoden S, Watanabe R : Distribution of Ecotropic Retrovirus Receptor Protein in Rat Brains Detected by Immunohistochemistry. *J General Virol* 82 : 1815-1820, 2001
- 10) Takase-Yoden S, Watanabe R : Identification of genetic determinants that regulate tumorigenicity of Friend murine leukemia virus in rats. *Microbiol Immunol* 46 : 885-890, 2002
- 11) Takase-Yoden S, Watanabe R : Unique three-repeat sequences containing FVa, LVb/C4, and CORE motifs in LTR-U3 of Friend murine leukemia virus clone A8 accelerate the induction of thymoma in rat. *Virology* 326, 29-40 : 2004
- 12) Ikeda T, Takase-Yoden S, Watanabe R : Retroviral pseudo-virus carrying the envelope proteins of neurotropic Friend murine leukemia virus effectively transferred retroviral vector into glial cells. *Virus Research*, 42 : 97-106, 1996
- 13) Fukumitsu H, Takase-Yoden S, Furukawa S, Nemoto K, Ikeda T, Watanabe R : Implantation of BDNF producing packaging cells into brain. *Cell Transplantation* 11 : 459-464, 2002
- 14) Watanabe R, Takase-Yoden S, Fukumitsu H, Nakajima K : Cell Transplantation to the Brain with Microglia labeled by Neuropathogenic Retroviral Vector System. *Cell Transplantation*, 11 : 471-473, 2002
- 15) Wong PK, Soong MM, MacLeod R, Gallick G. E, Yuen PH : A group of temperature-sensitive mutants of Moloney leukemia virus which is defective in cleavage of Env precursor polypeptide in infected cells also induces hind-limb paralysis in newborn CFW/D mice. *Virology* 125 : 513-518, 1983