

甲状腺ホルモンによる成人T細胞性白血病ウイルス
プロモーター活性化の分子機構の解析

佐藤 泰 成

①

論文題目

甲状腺ホルモンによる成人T細胞性白血病ウイルス
プロモーター活性化の分子機構の解析

佐藤 泰広

略語

HTLV-1	Human T-cell Leukemia Virus type 1	成人T細胞性白血病ウイルス1型
HU	HTLV-1 Uveitis	HTLV-1 ぶどう膜炎
ATL	Adult T cell Leukemia	成人T細胞性白血病
TSP/HAM	Tropical Spastic Paraparesis HTLV-1 Associated Myelopathy	熱帯性痙性対麻痺症 HTLV-1 関連脊髄症
T3	3,3',5- Triiodo-L-Thyronine	
TRE	Thyroid Hormone Responsive Element	
HRE	Hormone Responsive element	
TR α	Thyroid Hormone Receptor- α	
DNA	Deoxyribonucleic Acid	
RNA	Ribonucleic Acid	
PCR	Polymerase Chain Reaction	
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay	
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase	
β -Gal	β -Galactosidase	
TBS	Tris Buffered Saline	
PBS	Phosphate Buffered Saline	
EDTA	Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid	
DTT	Dithiothreitol	
BAP	Bacterial Alkaline Phosphatase	

(目次)

1.序論

2.材料と方法

a) 実験材料

1) 細胞株とその培養

b) 実験方法

1) Transfection 及び CAT assay

a) DEAE Dextran 法による Transfection

b) リン酸カルシウム共沈法による Transfection

2) LTR deletion series をもつ CAT plasmid の作成

a) PCR 法による種々の LTR deletion mutants の作成の原理

b) LTR の 5' deletion series の作成

c) LTR の 3' deletion series の作成

3) 甲状腺ホルモンレセプター α (TR α) の GST fusion protein 作成

4) EMSA による TR α と LTR の結合の解析

5) LTR 領域内の Thyroid hormone responsive element (TRE) の解析

a) TR α と LTR 塩基配列との結合の解析

b) 同定された TRE の機能解析

3.結果

1) 甲状腺ホルモンによる LTR の活性化の解析

a) Jurkat 細胞を用いた解析

b) HepG2 細胞を用いた解析

2) 活性化に関与する LTR 内の領域の検索

a) 5' deletion series を用いた解析

b) 3' deletion series を用いた解析

3) 活性化に関与する LTR 内配列 (TRE) と TR α の結合

4) 活性化に関与する LTR 内塩基配列 (TRE) の解析

a) コンピューター解析

b) TR α の LTR 内 degenerate TRE との結合

c) LTR 内 TRE 配列の結合の特異性

d) TRE への変異導入によるプロモーター反応性の変化の解析

4. 考察

5. 結語

6. 参考文献

7. 図表

1. 序論

Human T-cell Leukemia Virus Type 1 (以下 HTLV-1) は、ヒトで初めて発見されたレトロウイルスで(1)、成人 T 細胞性白血病 (Adult T-cell Leukemia, 以下 ATL) の原因であることが明らかにされた(2,3,4)。のちに熱帯性痙性対麻痺症あるいは HTLV-1 関連脊髄症 (Tropical Spastic Paraparesis / HTLV-1 Associated Myelopathy, 以下 HAM/TSP) の原因ウイルスであることも報告された(5,6)。この HAM/TSP は痙性脊髄麻痺の臨床像を示す疾患で、脊髄中下部を中心病変部位とする慢性炎症性疾患である。わが国における HTLV-1 感染者は、今日九州の西南部、沖縄を中心に 200 万人にも及ぶとされる。ATL の年間発症数は約 700 例と推定され、HAM/TSP は今までに約 1000 例の患者が報告されている。

近年、HTLV-1 が原因である第 3 の疾患として HTLV-1 ぶどう膜炎 (HTLV-1 Uveitis, 以下 HU) が存在することが、血清学的、疫学的、眼科学的、そしてウイルス学的解析によって明らかにされた(7,8,9,10,11)。臨床的に HU は、亜急性の、しばしば再発を繰り返す、眼内炎症性疾患であり、その病像は、比較的軽度な虹彩炎、中等度から高度な硝子体混濁と網膜血管炎が特徴である(12)。また HU は、甲状腺機能亢進症 (Graves 病) に続発して発症する例が多く、全体で約 16%、女性患者では約 25% が Graves 病に続発することが報告されている(13)。HTLV-1 と Graves 病の間に疫学的相関は存在せず、また Graves 病と種々のぶどう膜炎の発症についても相関は報告されていない。この両者の発症の順序は常に一定で、全例で Graves 病の後に HU を発症していることが報告されている(13)。従って、甲状腺ホルモン過剰状態、または、治療が発症に関与している可能性が考えられるが、Graves 病治療で主に用いられるメチマゾールが、ぶどう膜炎を引き起こすという報告はなく、甲状腺ホルモン過剰状態が発症に関与している可能性が示唆される。

HTLV-1 は自己複製可能なレトロウイルスであり、LTR (long terminal repeat), gag, pol, env, pX と呼ばれる遺伝子領域を有する。この中で LTR はプロウイルスの両端に存在し、754 塩基対からなる。この LTR 内の U3 領域は 21 bp の繰り返し配列などのエンハンサーや TATAA ボックスが存在し遺伝子発現のためのプロモーター領域を形成する。また pX 領域がコードする遺伝子の一つである Tax はウイルスの転写活性化因子であり自らの LTR に作用して転写を活性化する(14)と同時に IL-6, TGF- β など種々のサイトカイン遺伝子を含む様々な細胞性遺伝子のプロモーターにも作用し、それらの転写を活性化することが明らかになっている(14)。一方、LTR に作用する転写因子にはその代表例として CREB, SRF などが知られている(14)。近年、AIDS の原因である Human Immunodeficiency virus (HIV) において核内レセプター群の数が LTR に作用しその転写活性を調節する事

が報告されている(15,16)。しかし、HTLV-1 の遺伝子発現調節については、甲状腺ホルモンレセプターなどを含む核内レセプターが関与するか否かについては全く明らかにされていない。

ステロイドホルモン、エストロゲン、アンドロゲンなどの性ホルモン、甲状腺ホルモン、ビタミン A、D、などの脂溶性リガンドを有する核内レセプター群は、生体内の多種多様な組織において細胞の増殖、分化や代謝調節など多くの高次生命現象の制御に重要な役割を果たしている。過去 10 年間のこれらの脂溶性リガンドを有する核内レセプター群の cDNA のクローニングの成功を契機に、これらのレセプターがリガンド誘導性転写因子として作用し、標的遺伝子群の発現を様々に制御することが明らかにされてきた(17)。標的遺伝子群は多岐にわたるがエストロゲンやアンドロゲンなどの性ホルモンではこれらのホルモン依存的な癌が知られており、これらの標的遺伝子の単離は発癌、制癌の機序を理解する上で重要である。また近年、これら標的遺伝子には各核内レセプターに固有の認識配列 (Hormone Responsive Element ; HRE) があり、これを認識してレセプターが結合し、リガンド依存性に遺伝子発現を、主に転写レベルで制御していることが知られるようになってきた(17)。この HRE は、標的遺伝子近傍に存在するプロモーター領域内に存在する。核内レセプター群はこの HRE を認識して結合し、プロモーター内に存在する RNA ポリメラーゼ II を含む基本転写装置群との相互作用を介して転写制御を行う。HRE は各レセプターに複数存在するがその基本配列は各レセプター間で高い相同性を有するものであることが分かっている。核内レセプターの標的エンハンサー配列は、今までに多数の報告があるがその DNA 塩基配列の特徴から特に二つの構造がよく知られている。一つは palindrome 構造であり、もう一つは direct repeat 構造である。前者は 2 個の HRE が互いに向き合って存在しているもので結合レセプターはホモ 2 量体構造をとって結合している。後者は 2 個以上の HRE が数個の塩基をはさんで同じ向きに反復して存在しているもので結合レセプターはホモ、ヘテロの多量体構造をとって結合している(17)。

核内レセプターがレトロウイルスの遺伝子発現に影響を及ぼするという背景と、先に述べたような HU 患者における臨床的特徴、つまり、HU の発症が高率に甲状腺機能亢進状態に続発する点、にもとづいて我々は次のような仮説をたて実験を行った。つまり、甲状腺ホルモンレセプターがリガンド依存性に HTLV-1 に対しても転写因子として作用してそのプロモーターを活性化し、HTLV-1 関連疾患発症の要因の一つとなりうるのではないかとこの可能性である。そこで、実際に甲状腺ホルモンがウイルスプロモーターである LTR に直接に作用してその転写活性を調節するか、その場合、LTR にはどのような TR α の認識配列が存在するかといった点について分子生物学的手法を用いて解析を行った。

2.材料と方法

a) 実験材料

1) 細胞株とその培養

ヒトT細胞株 Jurkat 細胞は東北大学医学部細菌学講座、菅村和夫教授より、ヒト肝細胞癌細胞株 HepG2 細胞は国立衛生試験所細胞バンク (JCRB, Tokyo, Japan) より、供与していただいたものを使用した。

Jurkat 細胞は、Kanamycin 100 μ g/ml を含む 10% 牛胎児血清 (以下 FCS) 添加 RPMI1640 (GIBCO, N.Y., USA) で 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。HepG2 細胞は Kanamycin 100 μ g/ml を含む 10% FCS 添加 Dulbecco's MEM (以下 D-MEM) (Cosmobio, Tokyo, Japan) で、37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。

FCS 中に存在する T3 を以下の方法にて除去 (T3 (-)) し、これを 10% 添加した T3 (-) RPMI 1640, T3 (-) D-MEM を作製し、それぞれを Jurkat 細胞, HepG2 細胞を用いた CAT assay 時に甲状腺ホルモン除去 medium として使用した。FCS 中の T3 除去方法は Samuels らの報告(18)に従った。つまり、FCS 1 ml 当たり 50 mg の resin (AG501-X8 Resin, Bio-Rad laboratories, Hercules, USA) を加え、室温下で 5 時間振盪する。FCS を 3000g, 10 分遠心し、沈殿した resin を除去した後に再び同量の resin を加え、さらに室温下で 18 時間振盪する。再び 10000g, 15 分遠心し、沈殿した resin を除去した後に FCS を 0.2 μ m の filter を用いて滅菌し、T3 (-) FCS として用いた。

b) 実験方法

1) Transfection 及び CAT assay

a) DEAE Dextran 法による Transfection

種々の CAT plasmid と TR α の plasmid を co-transfection し、T3 存在下、非存在下で培養し、CAT 活性を比較した。TR α の発現ベクターは東京大学医科学研究所制癌研究部、山本雅教授より供与していただいた TR α の cDNA を pRc/RSV ベクター (Invitrogen co., San Diego, USA) に挿入して作成し、pRSV/TR α と命名し使用した。また transfection 効率の

コントロールとしては p β -Gal (19) を同時に transfection し使用した。

まず、transfection の 24 時間前に medium 交換をした Jurkat 細胞を用い、その細胞数を数え、15 ml の tube に 2×10^6 個の細胞が入るように分注し、これを一度 TBS にて wash した。一つの tube 当たり 2 μ g の CAT plasmid, 3 μ g の pRSV/TR α , 1 μ g の p β -Gal の、合計 6 μ g の DNA を transfection に用いた。TBS で洗浄した Jurkat 細胞に、400 μ l の 1 x TBS、1 mg/ml DEAE Dextran 濃度の DNA 溶液を混入後、室温下で 5 分ごとに軽く振盪を加えながら 30 分間放置した。その後、5 ml の 1 x TBS を用いて洗浄した後、5 ml の T3 (-) RPMI 1640 を加え、37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。T3 (+) の dish には培養開始直後と 24 時間後の 2 回、Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt, Germany) を用いて調整した 10^{-4} M T3 solution (Sigma chemical co. St.Louis, USA) を 5 μ l 添加し、T3 濃度 10^{-7} M (100 nM) となるようにした。48 時間後に細胞を回収し、これを 1 ml の TNE buffer (40mM Tris HCl pH8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA) で洗浄後、250mM Tris HCl, pH8.0 存在下で凍結融解操作を繰り返して細胞膜を破碎し、この上清を回収して cell lysate を作製した。BIO-RAD protein assay TM (日本 Biorad co., Tokyo, Japan) を用いて蛋白定量を行い、100 μ g の蛋白を Gorman らの報告(20)に従い、CAT assay に用いた。

Transfection 効率は cell lysate 中の β -Galactosidase の活性によって補正した(19)。

CAT 活性は acetyl 化された chloramphenicol の割合を Image analyzer BA100 TM を用いて定量し、計算した。まず、薄層ゲルクロマトグラフィー上に展開した 1 レーン上の全体の ¹⁴C-chloramphenicol の radioactivity と、その中でアセチル化された部分の radioactivity を Image analyzer を用いて測定した。全体に対してのアセチル化部分の比を計算しこれを % conversion とした。さらに transfection 効率を補正するために (% conversion / β -Gal の吸光度) の値を計算しこれを甲状腺ホルモン添加群と非添加群で比較し、fold activation の値とした。¹⁴C-chloramphenicol は chloramphenicol, D-threo-dichloroacetyl-1,2-, ¹⁴C (NEC-408A NEN, DuPont, USA) を用いた。計算方法の一例を以下に示す。

甲状腺ホルモン添加群

$$\% \text{ conversion} = 2.360 \times 10^4 (\text{アセチル化部分}) / 1.032 \times 10^5 (\text{レーン全体の活性}) = 22.868 (\%)$$

$$\beta\text{-Gal の吸光度} = 0.453$$

$$\% \text{ conversion} / \beta\text{-Gal} = 50.482 = A$$

甲状腺ホルモン非添加群

$$\% \text{ conversion} = 6.778 \times 10^3 (\text{アセチル化部分}) / 9.756 \times 10^4 (\text{レーン全体の活性}) = 6.948 (\%)$$

$$\beta\text{-Gal の吸光度} = 0.498$$

$$\% \text{ conversion} / \beta\text{-Gal} = 13.952 = B$$

$$\Rightarrow \text{Fold activation (甲状腺ホルモン添加群 / 非添加群)} = A / B = 50.482 / 13.952 = 3.62$$

b) リン酸カルシウム共沈法による Transfection

transfection の前日に 60 mm の tissue culture dish に 5×10^5 個の HepG2 細胞をまき、transfection の 4 時間前に 5 ml の新鮮な D-MEM で medium 交換をした。一つの dish 当たり 3 μ g の CAT plasmid, 5 μ g の pRSV/TR α , 2 μ g の p β -Gal の合計 10 μ g の DNA を transfection に用いた。0.25 mM の塩化カルシウム、1 x HBS (HEPES-buffered saline) (pH 7.10) (HEPES; N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, Sigma, St. Louis, USA) の存在下にこれらの DNA を混入後、氷冷して沈殿を作製し、これに培養液を添加して 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。この 4 時間後に各 culture dish 当たり 2.5 ml の 20% glycerol, 1 x TBS で glycerol shock を加え、2.5 ml の 1 x TBS で洗浄した後に T3 (-) D-MEM 5 ml を加え再び培養した。T3 (+) の dish には培養開始直後と 24 時間後の 2 回、5 μ l の 10^{-4} M T3 solution を添加し、T3 濃度 10^{-7} M (100 nM) となるようにした。60 時間後に細胞を回収し、これを DEAE Dextran 法の場合と同様に凍結融解法を用いて cell lysate を作製し、蛋白量を定量した後、100 μ g の蛋白を CAT assay に用いた。Transfection 効率率は同様に cell lysate 中の β -Galactosidase の活性によって補正した。

2) LTR deletion series をもつ CAT plasmid の作成

a) PCR 法による種々の LTR deletion mutants の作成の原理

LTR のどの領域が甲状腺ホルモンによるプロモーター活性化に関与するかを検索する目的で、種々の LTR deletion mutants の series を PCR 法を用いて作製し、これらを pCAT-basic (Promega, Madison, USA)、あるいは関西医科大学微生物学講座、藤沢順一教授より供与していただいた basal promotor 領域を有する LTR-CAT ベクターを用いて種々の CAT-plasmid を作製した。

PCR 法による deletion mutants 作製にあたっては、Hind III site を 5' 側 primer に、Xba I site を 3' 側 primer にいれた種々の primer を合成した。PCR に用いた template は ramda ATK のサブクローンの plasmid で、PCR の反応条件は annealing temp. 55°C, extension temp. 70°C, denature temp. 92°C で、40 cycles の反応を行った。PCR product の一部を molecular weight marker と共に 1.5 % agarose gel で電気泳動し、サイズを確認した後、gel から ELU-QUICK (Schleicher & Schuell, New Hampshire, USA) を用いて DNA 抽出した。この抽出した DNA とベクターを Hind III と Xba I にて切断した後、これらの ligation 反応を行った。得られた plasmid は T7 sequencing kit (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いた Dideoxy chain termination 法にて sequence の確認を行った。

b) LTR の5' deletion series の作成

まず、第一段階として、図1に示した①～⑤を5'側の primer に設定し、この5'end に Hind III site (AAGCTT) を付けた oligomer を合成した。⑥を3'側の primer に設定し Xba I site (TCTAGA) を付けた oligomer を合成した。その塩基配列を次に示す。

- | | | |
|---|----------------------------------|-----------|
| ① | CTAGAAGCTTTGACAATGACCATGAGCCCCA | (1-21) |
| ② | CTAGAAGCTTCCAGACTAAGGCTCTGACGTC | (95-115) |
| ③ | CTAGAAGCTTAGGGCAGCTCAGCACCGGCTC | (125-145) |
| ④ | CTAGAAGCTTGAAGCCACCGGGAACCAACCCA | (200-220) |
| ⑤ | CTAGAAGCTTTCATGGCACGCATATGGCTCA | (287-307) |
| ⑥ | CTAGTCTAGAGCCGGCAGTCAGTCGTGAATG | (664-644) |

①/⑥、②/⑥、③/⑥、④/⑥、⑤/⑥の primer の組み合わせで上述した方法で PCR を行い 5 種類の LTR 5' end からの deletion series を作製した。このようにして活性化に関与する領域を広い範囲で同定した後に、さらに詳細な解析の為に、第二段階として、活性化の見られた領域と活性化の消失した領域の間に下記したように 3 種類の primer を設定した。

- | | | |
|---|--------------------------------|-----------|
| ⑦ | CTAGAAGCTTGAACCACCCATTTCTCCCC | (210-230) |
| ⑧ | CTAGAAGCTTATTTCTCCCCATGTTTGTC | (220-240) |
| ⑨ | CTAGAAGCTTCATGTTTGTCAGCCGTCCTC | (230-250) |

c) LTR の3' deletion series の作成

3' deletion series の作成には下記したような 3 種類の 3' 側 primer を作成して行った。5' 側の primer には上記の⑦の primer を使用した。PCR product は basal promotor 領域を有する (転写開始点より -55 bp までを有している) LTR-CAT plasmid に挿入した。

- | | | |
|---|---------------------------------|-----------|
| ⑩ | CTAGTCTAGAAAAGTTTTTGTAGGTGAGGGG | (286-266) |
| ⑪ | CTAGTCTAGAAGGGGTTGTCGTCAACGCCTG | (270-250) |
| ⑫ | CTAGTCTAGAGTCAACGCCTGAGGACGGCTT | (260-240) |

3) 甲状腺ホルモンレセプター α (TR α) の GST fusion protein 作成

甲状腺ホルモンレセプター α (TR α) 融合蛋白の作成には、Glutathione S-transferase Gene

Fusion System (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) の系を用いた。Miyajima らが cloning した TR α の cDNA 塩基配列 (21) を参考にしてその DNA 結合部位全長と ligand 結合部位の約 2/3 を含む 972 塩基 (cDNA 470~1442 bp, 21~345 アミノ酸) を Bst E2 と Rsa I を用いて切り出した後、pGEX-2TTM (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) に挿入して pGEX-2T - TR α を作成した。その塩基配列と DNA 結合部位、ligand 結合部位、そして今回 pGEX-2T に挿入した部位を図 2 に示した。

pGEX-2T - TR α の cDNA 挿入部の塩基配列を sequencing して frame shift のないことを確認し、期待されたサイズの融合蛋白の産生を SDS-PAGE で確認した。

GST 融合蛋白の発現にはこの plasmid を大腸菌株 HB101 に導入した後、1 mM IPTG を加えた 2 x YT 培地にて 37°C で 6 時間培養した。その後、菌体を回収して lysis buffer (20mM Tris, 150mM NaCl, 100mM EDTA, 1mM PMSF, 10mM β -ME, pH 7.5) 中にて sonication した後、10000 g, 4°C で 10 分遠心した上清を、Glutathione Sepharose 4BTM カラム (Pharmacia, Uppsala, Sweden) に吸着させ、洗浄後、elution buffer (50mM Tris, 5mM reduced glutathione, pH 8.0) で溶出して融合蛋白を精製した。その後、SDS-PAGE と BIO-RAD protein assayTM (日本 Biorad co., Tokyo, Japan) を用いて蛋白定量を行った。コントロールとして pGEX-2TTM 単独の場合も同様の処理にて作成し、精製した GST 蛋白および GST-TR α 融合蛋白を Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) に用いた。

4) EMSA による TR α と LTR の結合の解析

甲状腺ホルモンレセプター α (TR α) 蛋白が LTR 内の甲状腺ホルモンによるプロモーター活性化に関与する領域に直接的に結合しうるかを EMSA を用いて検討した。または、どのような Thyroid Hormone Responsive Element (TRE) が LTR に存在するのかを調べるために GST-TR α 融合蛋白を用いて下記の方法で EMSA を行った。

活性化に必須であった LTR の領域 87 bp (200-286 bp) を CAT plasmid より Hind III と Xba I の制限酵素処理によって切り出して使用した。この断片を、37°C, 1 時間 BAP 処理した後、T4 Polynucleotide kinase (New England Biolabs, Beverly, USA) を用いて末端を [γ -³²P]-ATP (NEG-035C NEN, Dupont, USA) でリン酸化標識して 6% acrylamide gel にて分離精製した。標識された LTR 断片 20000 cpm 相当に、2 μ g の poly dI-dC (Pharmacia, Uppsala, Sweden) と、GST 単独、または GST-TR α 融合蛋白 250 ng を加えて室温で 30 分間 binding reaction を行った。binding reaction の条件は 25 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 100 mM KCl, 10 μ M ZnSO₄, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, 5% glycerol 存在下で行った。これを 6% acrylamide gel で 180 V の電圧をかけて室温で電気泳動した。acrylamide gel を乾燥させた後に、Kodak

社製 X-Omat AR フィルムTMを用いて autoradiography を行った。

競合実験に用いた oligomer (competitor) は、Katz らの報告(22)にあるように既に TR α と強く結合することが明らかにされている palindromic な Thyroid Hormone Responsive Element を含む塩基配列 (TREp; CTAGAGATCTCAGGTCATGACCTGAGATCT) を合成して用いた。

5) LTR 領域内の Thyroid Hormone Responsive Element (TRE) の解析

活性化に関与する LTR の 77 bp の領域内に既知の TRE が存在しているかを データベースを用いてコンピューター解析した。

a) TR α と LTR 塩基配列との結合の解析

次に活性化に関与する LTR の 77 bp の領域内の TRE を検索するために、これを含む領域の 90 bp を断片化して下記したような各々 30 base ずつの oligomer を anti-sense oligomer と共に 3 種類 (A, B, C) 合成した。これらを前述と同様の方法で [γ -³²P] - ATP (NEG-035C NEN, Dupont, USA) でリン酸化標識してプローブとし、GST-TR α 融合蛋白 250 ng を加え、前述した方法で EMSA を行いどの領域、配列に結合性が認められるかをさらに細かく検討した。結合性が認められた配列の一部に下記に示すような変異を加えた oligomer を別に 4 種類 (mutation A, B, C2, C1C2) 合成し、同様の方法で EMSA を行い結合性にどのような変化が生じるか否かを調べた。

A	GAAGCCACCGGAACCA CCCATTTCTCT CCCC (201-230)
B	ATGTTTGTCAAGGCC CTC AGGCGTTGACG (231-260)
C	ACAACCC CTCACCT CAAAAACTTTTCATG (260-290)
mutation A	GAAGCCACCGGAACCA CCCATTTCAAGTCC (201-230)
mutation B	ATGTTTGTCAAGGCCA AGT AGGCGTTGACG (231-260)
mutation C2	ACAACCC CTCA AAAGTAAAAA CTTTTCATG (260-290)
mutation C1C2	ACAACCAAGTAAAGTAAAAA CTTTTCATG (260-290)

b) 同定された TRE の機能解析

TR α との結合性が見られた LTR 内の配列の一部に変異を加えた場合、甲状腺ホルモ

ンによるプロモーターの活性化にどのように影響するかを検討するために、変異を加えた CAT plasmid を数種類作成して CAT assay を行った。作成法は図 3 に示すようにすでに変異を組み入れた oligomer を 7 種類、変異の入っていない oligomer を 2 種類、一部オーバーラップさせこれらが annealing するように合成し、これらを様々に組み合わせて annealing 反応させた後、さらに klenow 酵素にて処理を行った。Hind III, Xba I にて両端を処理した後、CAT vector に組み込んだ。その後、sequencing し、塩基配列を確認した後、この plasmid を用いて同様に CAT assay, β -Gal assay を行った。

3. 結果

1) 甲状腺ホルモンによる LTR の活性化の解析

a) Jurkat 細胞を用いた解析

pLTR-CAT, pRSV/TR α , p β -Gal を Jurkat 細胞に co-transfection した。Transfection した Jurkat 細胞を medium に 100 nM の甲状腺ホルモンを添加した群と非添加群にわけ培養し、その後回収した細胞の cell lysate 中の CAT 活性を検討し、transfection 効率を β -Galactosidase の活性によって補正した上で、両群の比を求めた。この結果を図 4 に示す。

pRSV/TR α を co-transfection した実験では、甲状腺ホルモン非添加群に比べ添加群では約 6 倍の LTR の活性化が見られた。pRSV/TR α を co-transfection しなかった実験では、この両群の差は明らかでなかった。以上の結果から、LTR のプロモーター活性は甲状腺ホルモンの作用によって上昇すると考えられた。

b) HepG2 細胞を用いた解析

Jurkat 細胞のかわりに、HepG2 細胞を用いリン酸カルシウム共沈法で transfection を行い同様に CAT assay を行い解析した。

結果を図 5 に示す。pRSV/TR α を co-transfection した実験では、甲状腺ホルモン非添加群に比べ添加群では約 14 倍の LTR の活性化が見られた。pRSV/TR α を co-transfection しなかった実験では、この両群の差は明らかでなかった。細胞、Transfection 方法を変えた実験においても同様の結果が得られたことから上記の通り、LTR のプロモーター活性は ligand 依存性に甲状腺ホルモンレセプターによって活性化されると考えられた。

2) 活性化に関与する LTR 内の領域の検索

a) 5' deletion series を用いた解析

LTR のどの部位に活性化に関与する領域が存在するかを検索するためにまず 5' 側からの LTR の deletion series を PCR を用いて作成した。これを CAT plasmid に組み込んで種々の pLTR deletion mutant - CAT を作成し CAT assay を行った。CAT assay と β -Gal は前述の方法と同様に行った。それぞれの CAT plasmid の LTR の deletion 設定部位と得られた甲状腺ホルモン添加群 / 非添加群のプロモーター活性の比を図 6 に示す。

5' 側から 210 bp (転写開始点から -144 bp) を欠失させても LTR の活性化が観察された。しかし、さらに 10 bp 欠失させることによりこの活性化が著しく低下した。これらの結果から活性化に関与する領域の 5' 側境界は 210 base 近傍に存在することが推察された。

b) 3' deletion series を用いた解析

次に活性化に関与する領域の 3' 側境界を決定するために、すでに決定した 5' 側境界近傍に設定した primer (図 1 に示した ⑦) を使い、その下流に 3 種類の primer (図 1 に示した ⑩, ⑪, ⑫) を設定して deletion series を作成し、同様に CAT assay を行った。その結果を図 7 に示す。LTR の 286 bp (転写開始点から -68 bp) までは活性化が見られるがさらに 16 bp 欠失させると活性化が著しく低下したことから甲状腺ホルモンによる LTR プロモーター活性化に必要な LTR の領域は 210 ~ 286 base に存在する事が強く示唆された。

3) 活性化に関与する LTR 内配列 (TRE) と TR α の結合

LTR で活性化に必要な 210 ~ 286 bp 領域を含む 87 bp (200 ~ 286 bp) を probe とし EMSA 法を用いて、これが GST-TR α 融合蛋白と結合するかを検討した。この結果を図 8 に示す。Positive control として TR α と結合することがすでに報告されている(23)、rat growth hormone のプロモーター配列の一部 (転写開始点より -249 ~ +19 base) を用いて 268 bp の probe を作成し、同様の蛋白、条件で EMSA を行い、その結果も同図に示した。rat growth hormone プロモーター配列または LTR を probe として用いた場合、両者において GST-TR α 融合蛋白を加えることで複数の shift band を認めた。GST 単独ではこのような shift band は認めなかった。以上より LTR のこの 87 bp は TR α と結合することが示された。

LTR と TR α の結合が特異的であるかを検討するために TR α と強く結合することが報告(24)されている palindromic な Thyroid Hormone Responsive Element を含む oligomer を合成

し (TREp;CTAGAGATCTCAGGTCATGACCTGAGATCT) これを competitor として反応系に加えて competition assay を行った。その結果、図 9 に示すように、competitor の量をモル比で 10 倍、40 倍、100 倍、300 倍、500 倍と増やすことで shift band の濃度が漸減し、ついには 500 倍で完全に消失したことから LTR の 87 bp と TR α の結合が特異的であると考えられた。

4) 活性化に関する LTR 内塩基配列 (TRE) の解析

a) コンピューター解析

活性化に関する LTR 210 ~ 286 bp の領域に、既知の Thyroid Hormone Responsive Element (TRE) 配列が存在するか否かを コンピューター解析して検索した。Umesono らの報告(24)にあるような 6 塩基の典型的な結合配列 (AGGTCA) は存在しなかった。しかし Katz らが報告する(22) Octamer の認識配列の中で、中等度の結合強度を示す TRE の一つである (TCAGGTGA) 配列の antisense 配列に相同性を有する、あるいは全く一致する degenerate TRE (XXXCCTC(A/C)) がこの領域に 4 箇所存在していた。この配列を 5' 側から A, B, C1, C2 とし、その位置関係を模式化したものを下図に示した。C1 と C2 は重なり合って存在していた。配列の相同性は、8 塩基中、5 塩基一致が 1 箇所 (A)、6 塩基一致が 2 箇所 (B, C1)、8 塩基全く一致が 1 箇所 (C2) であった。

Katz らが報告した Octamer の TRE

	Sequence	C50 (50% competition; 結合強度)
consensus octamer	TAAGGTCA	1.5
derivative thereof	TAAGGACA	4.2
	GCAGGTCA	7.7
	TGAGGTGA	7.7
	GGAGGTAC	11.0
	CAAGGTCG	35.0

GAAGCCACCG GAACCACCCA TTTCTCCCC ATGTTTGTCAGGCCCTCA
 A B

GGCGTTGACG ACAACCCCTC ACCTCAAAAA ACTTTTC
 C1 C2

b) TR α の LTR 内 degenerate TRE との結合

次にこの 4 箇所の degenerate TRE と TR α の結合を解析するためにこれらの degenerate TRE を含む 30 bp ずつの oligomer を合成し、これを probe とした EMSA を行った。つまり下図に示すように probe A (LTR 201 ~ 230 bp), probe B (231 ~ 260 bp) は 1 箇所の degenerate TRE (A, B) を含む。probe C (261 ~ 290 bp) は 2 箇所の degenerate TRE (C1, C2) を含む。EMSA の条件は前述と同様で GST-TR α 融合蛋白は 250 ng を用いた。結果を図 10 に示す。probe A と probe B を用いた場合は 1 本の shift band を認め、probe C を用いた場合は 2 本の shift band を認めた。shift band の強度は C (C1 & C2) > B > A であった。probe A と B には 1 箇所の degenerate TRE が含まれていたのに対し、probe C には 2 箇所含まれ、しかも重なり合って配列していることからすると、この probe C の shift band のうち上方のバンドは TR α が dimer で結合したために生じたと考えられた。

probe A; 5'- AAGCCACCGG GAACCACCCA TTTCTCCCC -3' (201-230 bp)
 probe B; 5'- ATGTTTGTCAGGCCCTCAGCGTTGAC -3' (231-260 bp)
 probe C; 5'- GACAACCCCTCACCTCAAAAA AACTTTTCAT -3' (261-290 bp)

c) LTR 内 TREs 配列の結合の特異性

次に GST-TR α 融合蛋白が認識する部位が degenerate TRE であることを確認するためにこの部分だけに変異をいれた oligomer を合成しこれを probe とした EMSA を行った。変異をいれた oligomer を mutant A (m A), mutant B (m B), mutant C2 (m C2), mutant C1C2 (m C1C2) としその塩基配列を下図に示す。EMSA は同様の条件で行った。その結果を図 11 に示す。

m A, m B では 1 箇所の degenerate TRE 部分に 4 塩基置換を行った結果、shift band は全く見られなくなり結合性は失われた。m C2 では 2 箇所存在した degenerate TREs のうち 1

箇所にて4塩基置換を行った結果、shift bandは1本に減少した。さらに2箇所のモチーフに同時に4塩基置換を行ったmC1C2ではshift bandは消失した。

これらの結果からTR α のこの領域への結合にはこの4箇所のdegenerate TREsの塩基配列が重要であると考えられた。

probe m A ; 5'- AAGCCACCGG GAACCACCCA TTAAAGTCCC - 3'

probe m B ; 5'- ATGTTTGTC AAGCGTAAAGT AGGCGTTGAC - 3'

probe m C2 ; 5'- GACAACCCCT CAAAGTAAAA AACTTTTCAT - 3'

probe m C1C2 ; 5'- GACAACCAAG TAAAGTAAAA AACTTTTCAT - 3'

網掛け部分； 変異導入部分

d) TRE への変異導入によるプロモーター反応性の変化の解析

次にdegenerate TRE へのTR α の結合と甲状腺ホルモンによるLTRの活性化との関係を検討するために4箇所のdegenerate TREのいずれか、またはその複数に塩基置換を導入したCAT plasmidを作成し、プロモーター活性化の割合がどのように変化するかを解析した。

図12に4箇所のdegenerate TREsに種々の4塩基置換を導入したCAT plasmidの構築とCAT assayの結果を示した。4箇所のいずれかに変異が導入された場合は、活性化は著しく低下した。換言すれば、甲状腺ホルモンによるLTRの活性化は4箇所のdegenerate TRE全てが保存されている時のみで顕著であった。

以上より、LTRに存在する4箇所のdegenerate TREとTR α の直接的結合を介して、ligand依存性なTR α によるLTRのプロモーター活性化が生じると考えられた。

4. 考察

今回我々は、HTLV-1 LTR の甲状腺ホルモンによる活性化制御に関して、次のような点を明らかにした。まず、甲状腺ホルモンが HTLV-1 LTR のプロモーター活性を上昇させ、ウイルス遺伝子発現を誘導するという点である。さらにこの活性化が LTR と TR α の直接的結合を介して生じ、その認識配列は、過去の報告と一部配列の異なる degenerate TRE であったという点である。

プロモーター活性化に関する実験は LTR-CAT, TR α , β -Gal を transient expression させた系を用いた。この場合、T3 の添加による HTLV-1 LTR プロモーター活性化は TR α を co-transfection した時にのみ明らかに認められた。内因性の TR α の発現は Northern blot hybridization analysis にて確認した。内因性のレセプターの発現が認められているにもかかわらず、活性化には、さらに外因性の発現が必要であった訳であるがこのような例は、核内レセプターによる転写調節を解析する実験系においては稀ではない。同様の事実は実際に Adan らの T3 による Oxytocin (OT) gene のプロモーター活性化の報告(25)においても記述されている。また Farsetti らは T3 が myelin basic protein の発現を誘導することを報告(26)しているがやはり TR α を co-transfection した系を用いている。

生体内での HTLV-1 の標的細胞は主に T リンパ球であり、HTLV-1 感染個体内においても T3 によるウイルス遺伝子発現の調節が行われているとすれば、T リンパ球に TR が発現していなければならないが、実際にそのような報告(27)があり、この分子機構が生体内においても機能している可能性が考えられる。

HTLV-1 のプロモーター活性制御には種々の転写因子が関与することが知られている(14)。その代表例には LTR U3 領域に存在する 21 bp のエンハンサー配列に結合して転写を制御する CREB が挙げられる(14)。しかし、甲状腺ホルモンを含む脂溶性ホルモン群が HTLV-1 ウイルスプロモーターの制御に関与することは今までに知られていない。甲状腺ホルモンレセプターを含む核内レセプター super family は、ligand 依存性の転写因子群でありその標的遺伝子群に関しては 1980 年代半ばより種々の報告(17,25,28,29)がある。その中で、レトロウイルスプロモーターへの作用に関しては、Glucocorticoid receptor の murine mammary tumor virus (MMTV) への結合と転写活性化作用がよく知られている(30)。その他、ヒトレトロウイルスにおいては、Human Immunodeficiency Virus (HIV) においてレチノイン酸が LTR に存在する RARE (Retinoic Acid Responsive Element) に結合しプロモーター活性を上昇させるという報告(15)がある。また TR α も HIV LTR 内の NF- κ B モチー

フと Sp1 モチーフに存在する TRE に結合して転写を活性化させることが報告されている (16)。しかし、これらの作用が、感染個体内でどのような影響を生ずるかという点や疾患発症へどのように関与するかについては、今の所不明である。今までに述べたように、HTLV-1 で発症するぶどう膜炎 (HU) は非常に高頻度に甲状腺ホルモン過剰状態に続発する。この事実から考えると、甲状腺ホルモン過剰状態が HTLV-1 LTR のプロモーター活性化をもたらすウイルス遺伝子発現を誘導する結果、HU の発症要因の一つとなっている可能性が想定される。しかし、甲状腺疾患と関係なく発症している患者も多数存在しており、発症に関与する多数の要因にはまだ多くの未知の機構が存在していることが推察される。

今回我々が明らかにした LTR 内に存在する degenerate TRE は約 70 bp の中に XXXCCTC(A/C) という Octamer 配列が 4 回反復しているものであった。この中の CCTC 部分に変異を導入すると結合が消失することからこの Octamer 配列が結合配列と考えられた。TRE で最もよく知られている consensus sequence は AGGTCA であり (17)、これは他に レチノイン酸レセプター (RAR)、ビタミン D レセプター (VDR)、レチノイドレセプター (RXR) に共通である。XXXCCTC(A/C) は Katz らが報告した Octamer 配列と一部一致し degenerate form であると考えられたが、これは今までに報告されていないものであった。このモチーフの TR に対する結合強度については今後の検討を要する。一方、この 4 箇所のいずれかに変異を導入すると活性化が著しく損なわれたことからこれらの 4 箇所のモチーフが全体で一つの反応領域を形成し、Unit として機能している可能性が示唆された。今までに報告されている TRE 配列のうち反応性が高度なものの特徴として、direct repeat 配列、及び inverted repeat 配列が挙げられるがこれらは TR の homodimer、または RXR との heterodimer と結合することが知られている (17)。今回認められた配列はこれらに適合しないもので今までに報告されていない。この 4 箇所の degenerate TRE を含む配列が、どのような蛋白とどのような結合様式で相互作用し Unit として機能しうるかについて、その詳細は現時点では不明である。TR は RXR との heterodimer を形成するが、その他にも TR と heterodimer を形成して TRE に作用する未知の蛋白の存在が推定されている (17)。なぜ 4 箇所の TRE のいずれかに変異を導入することで反応性が著しく損なわれたかは不明であるが、それぞれに未知の co-activator が結合し各々が重要な役割を担う可能性、あるいは TR を含む複数の蛋白間の高次構造が core transcriptional machinery に直接的に作用する際に重要な役割を果たす可能性が考えられる。

核内レセプター群は類似の Hormone Responsive Element (HRE) を共有していることが知られている。従って、他の核内レセプターがこの領域に作用してウイルスプロモーターを活性化させる、または抑制させる可能性も考えられる。さらに LTR の他の領域にも HRE が存在している可能性もある。既知の核内レセプター群の他、いまだ ligand が不明の Orphan receptor 群の存在も知られており (31,32,33,34)、これらが HTLV-1 LTR の機能制御

にどのように関与しうるかを解析することは、生体内におけるウイルス遺伝子発現制御の分子機構を理解する上で重要である。これらの解析を通じて HTLV-1 潜伏感染のメカニズムや感染細胞のクローン性増殖の分子機構の解明、ひいては HTLV-1 が原因となる疾患の発症機構を理解する上で重要な手がかりが得られることが期待される。

我々は HTLV-1 が感染個体内において甲状腺ホルモン標的遺伝子の一つとなりうることを示した。またこの制御が HTLV-1 LTR の 210-286 bp に存在する 4 箇所の今までに知られていない degenerate TRE 配列と甲状腺ホルモンレセプターの直接的結合を介することを明らかにした。今回の報告が HU などの HTLV-1 関連炎症性疾患の発症機構の解明と治療の開発に寄与することが期待される。

5. 結語

今回の研究により次の様な結果を得た。

- 1) HTLV-1 LTR のプロモーター活性は甲状腺ホルモンによって上昇する。
- 2) この活性化に必須な領域は LTR 210 ~ 286 bp に存在する。
- 3) この LTR の領域は甲状腺ホルモンレセプター α と直接的に結合する。
- 4) この LTR の 77 bp の領域に 4ヶ所の degenerate Thyroid Hormone Responsive Elements (XXXCTCC(A/C)) が存在する。
- 5) 4ヶ所の degenerate TRE のそれぞれに甲状腺ホルモンレセプター α が結合する。
- 6) 4ヶ所の degenerate TRE の全てが保存されていなければこの活性化は著しく低下する。

謝辞

本研究を進めるにあたり貴重なご指導と多大なる助言を賜りました、東京大学医科学研究所病理学研究部、渡邊俊樹助教授ならびに森茂郎教授に深甚なる謝意を表します。また、細胞株を供与して頂きました東北大学医学部細菌学講座、菅村和夫教授、国立衛生試験所細胞バンク、CATベクターを供与して頂きました関西医科大学微生物学講座、藤沢順一教授、TR α のcDNAを供与して頂きました東京大学医科学研究所制癌研究部、山本雅教授、細胞生物学的手法につき御指導、助言を頂きました東京大学医科学研究所病理学研究部、佐藤均助手、片野晴隆先生、形態病理学的ならびに分子生物学的手法につき御指導、助言を頂きました帯刀誠先生、守山正胤助手、森下保幸氏、相澤繁美、長井正江両技官、竹内一氏、矢持忠徳氏、GST蛋白発現系について助言を頂きました黒田敏彦先生、その他諸要件につき、お世話を頂きました東京大学医科学研究所病理学研究部員各氏に深く感謝いたします。

6. 引用文献

1. Poesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D. and Gallo, R.C. (1980) Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 7415-9.
2. Yoshida, M., Miyoshi, I. and Hinuma, Y. (1982) Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 2031-5.
3. Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K. and Uchino, H. (1977) Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* 50, 481-92.
4. Yoshida, M., Seiki, M., Yamaguchi, K. and Takatsuki, K. (1984) Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 2534-7.
5. Gessain, A., Barin, F., Vernant, J.C., Gout, O., Maurs, L., Calender, A. and de, T.G. (1985) Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2, 407-10.
6. Osame, M., Usuku, K., Izumo, S., Ijichi, N., Amitani, H., Igata, A., Matsumoto, M. and Tara, M. (1986) HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity [letter]. *Lancet* 1, 1031-2.
7. Mochizuki, M., Watanabe, T., Yamaguchi, K., Takatsuki, K., Yoshimura, K., Shirao, M., Nakashima, S., Mori, S., Araki, S. and Miyata, N. (1992) HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. *Japanese Journal of Cancer Research* 83, 236-9.
8. Mochizuki, M., Yamaguchi, K., Takatsuki, K., Watanabe, T., Mori, S. and Tajima, K. (1992) HTLV-I and uveitis [letter; comment]. *Lancet* 339,
9. Mochizuki, M., Watanabe, T., Yamaguchi, K., Tajima, K., Yoshimura, K., Nakashima, S., Shirao, M., Araki, S., Miyata, N., Mori, S. and et, a.I. (1992) Uveitis associated with human T lymphotropic virus type I: seroepidemiologic, clinical, and virologic studies [letter]. *Journal of Infectious Diseases* 166, 943-4.
10. Mochizuki, M., Watanabe, T., Yamaguchi, K., Yoshimura, K., Nakashima, S., Shirao, M., Araki, S., Takatsuki, K., Mori, S. and Miyata, N. (1992) Uveitis associated with human T-cell lymphotropic virus type I. *American Journal of Ophthalmology* 114, 123-9.

11. Mochizuki, M., Tajima, K., Watanabe, T. and Yamaguchi, K. (1994) Human T lymphotropic virus type 1 uveitis. [Review]. *British Journal of Ophthalmology* 78, 149-54.
12. Yoshimura, K., Mochizuki, M., Araki, S., Miyata, N., Yamaguchi, K., Tajima, K. and Watanabe, T. (1993) Clinical and immunologic features of human T-cell lymphotropic virus type I uveitis. *American Journal of Ophthalmology* 116, 156-63.
13. Yamaguchi, K., Mochizuki, M., Watanabe, T., Yoshimura, K., Shirao, M., Araki, S., Miyata, N., Mori, S., Kiyokawa, T. and Takatsuki, K. (1994) Human T lymphotropic virus type 1 uveitis after Graves' disease [see comments]. *British Journal of Ophthalmology* 78, 163-6.
14. Yoshida, M. (1993) HTLV-1 Tax: regulation of gene expression and disease. [Review]. *Trends in Microbiology* 1, 131-5.
15. Lee, M.O., Hobbs, P.D., Zhang, X.K., Dawson, M.I. and Pfahl, M. (1994) A synthetic retinoid antagonist inhibits the human immunodeficiency virus type 1 promoter [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Nov 22;91(24):11767]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5632-6.
16. Desai, Y.V., Hadzic, E., Modlinger, P., Malhotra, S., Gechlik, G. and Samuels, H.H. (1995) Interactions of thyroid hormone receptor with the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) long terminal repeat and the HIV-1 Tat transactivator. *Journal of Virology* 69, 5103-12.
17. Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. [Review]. *Annual Review of Biochemistry* 63, 451-86.
18. Samuels, H.H., Stanley, F. and Casanova, J. (1979) Depletion of L-3,5,3'-triiodothyronine and L-thyroxine in euthyroid calf serum for use in cell culture studies of the action of thyroid hormone. *Endocrinology* 105, 80-5.
19. An G., Hidaka K., and Siminovitch L.(1982): Expression of bacterial β -galactosidase in animal cells *Molecular & Cellular Biology* 2: 1628-1632,
20. Gorman, C.M., Moffat, L.F. and Howard, B.H. (1982) Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Molecular & Cellular Biology* 2, 1044-51.
21. Miyajima, N., Horiuchi, R., Shibuya, Y., Fukushige, S., Matsubara, K., Toyoshima, K. and Yamamoto, T. (1989) Two erbA homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. *Cell* 57, 31-9.
22. Katz, R.W. and Koenig, R.J. (1993) Nonbiased identification of DNA sequences that bind thyroid hormone receptor alpha 1 with high affinity. *Journal of Biological Chemistry* 268, 19392-7.
23. Crone, D.E., Kim, H.S. and Spindler, S.R. (1990) Alpha and beta thyroid hormone receptors bind immediately adjacent to the rat growth hormone gene TATA box in a negatively hormone-

- responsive promoter region. *Journal of Biological Chemistry* 265, 10851-6.
24. Umesonu, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C. and Evans, R.M. (1991) Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65, 1255-66.
25. Adan, R.A., Cox, J.J., van, K.J. and Burbach, J.P. (1992) Thyroid hormone regulates the oxytocin gene. *Journal of Biological Chemistry* 267, 3771-7.
26. Farsetti, A., Mitsuhashi, T., Desvergne, B., Robbins, J. and Nikodem, V.M. (1991) Molecular basis of thyroid hormone regulation of myelin basic protein gene expression in rodent brain [published erratum appears in *J Biol Chem* 1992 Aug 25;267(24):17478]. *Journal of Biological Chemistry* 266, 23226-32.
27. Desai, Y.V. and Samuels, H.H. (1993) The NF-kappa B and Sp1 motifs of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat function as novel thyroid hormone response elements. *Molecular & Cellular Biology* 13, 5057-69.
28. Burnside, J., Darling, D.S., Carr, F.E. and Chin, W.W. (1989) Thyroid hormone regulation of the rat glycoprotein hormone alpha-subunit gene promoter activity. *Journal of Biological Chemistry* 264, 6886-91.
29. Carr, F.E., Burnside, J. and Chin, W.W. (1989) Thyroid hormones regulate rat thyrotropin beta gene promoter activity expressed in GH3 cells. *Molecular Endocrinology* 3, 709-16.
30. Payvar, F., DeFranco, D., Firestone, G.L., Edgar, B., Wrange, O., Okret, S., Gustafsson, J.A. and Yamamoto, K.R. (1983) Sequence-specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region. *Cell*
31. Apfel, R., Benbrook, D., Lernhardt, E., Ortiz, M.A., Salbert, G. and Pfahl, M. (1994) A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Molecular & Cellular Biology* 14, 7025-35.
32. Dumas, B., Harding, H.P., Choi, H.S., Lehmann, K.A., Chung, M., Lazar, M.A. and Moore, D.D. (1994) A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily closely related to Rev-Erb. *Molecular Endocrinology* 8, 996-1005.
33. Harding, H.P. and Lazar, M.A. (1993) The orphan receptor Rev-ErbA alpha activates transcription via a novel response element. *Molecular & Cellular Biology* 13, 3113-21.
34. Hirose, T., Apfel, R., Pfahl, M. and Jetten, A.M. (1995) The orphan receptor TAK1 acts as a repressor of RAR-, RXR- and T3R-mediated signaling pathways. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 211, 83-91.

7. 図表

図 1

LTR 塩基配列と deletion series 作成の為の Primer 設定位置

(A) LTR 塩基配列と Primer 設定位置

1 TGACAATGAC CATGAGCCCC AAATATCCCC CGGGGGCTTA GAGCCTCCCA
 ① →
 51 GTGAAAAACA TTTCCGCGAA ACAGAAGTCT GAAAAGGTCA GGGCCCAGAC
 ② —
 101 TAAGGCTCTG ACGTCTCCCT CCGGAGGGAC AGCTCAGCAC CGGCTCAGGC
 → ③ →
 151 CAGGCCCTGA CGTGTCCCCC TGAAGACAAA TCATAAGCTC AGACCTCCGG
 ④ —
 201 GAAGCCACCG GAACCACCCA TTTCTCTCCCC ATGTTTGTCA AGGCCCTCA
 ⑦ → ⑧ → ⑨ →
 251 GCGTGTGACG ACAACCCCTC ACCTCAAAAA ACTTTTCATG GCACGCATAT
 ← ⑫ ← ⑪ ← ⑤ ← ⑩ ←
 301 GGCTAAATAA ACTAACAGGA GTCTATAAAA GCGCGGAGAC AGTTCAGGAG
 →
 351 GGGGCTCGCA TCTCTCCTTC ACGCGCCCGC CGCCCTACCT GAGGCCGCCA
 401 TCCACGCCGG TTGAGTCGCG TTCTGCCGCC TCCCGCCTGT GGTGCCTCCT
 451 GAACTGCGTC CGCCGTCTAG GTAAGTTTAG AGCTCAGGTC GAGACCGGGC
 501 CTTTGTTCGG CGCTCCCTTG GAGCCTACCT AGACTCAGCC GGCTCTCCAC
 551 GCTTTGCCTG ACCCTGCTTG TTCAACTCTG CGTCTTTGTT TCGTTTCTG
 601 TTCTGCGCCG CTACAGATCG AAAGTTCCAC CCCTTTCCTT TTCAATTACG
 ←
 651 ACTGACTGCC GGCTTGCCCC ACGGCCAAGT ACCGGCGACT CCGTTGGCTC
 — ⑥ —
 701 GGAGCCACGG ACAGCCCATC CTATAGCACT CTCCAGGAGA GAAACTTAGT
 751 ACACA

(B) Primer 設定位置の模式図

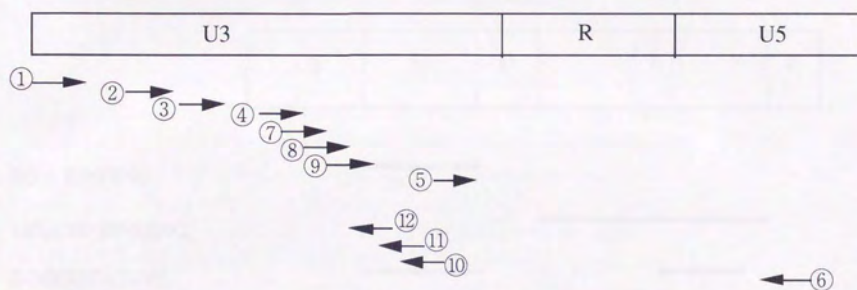
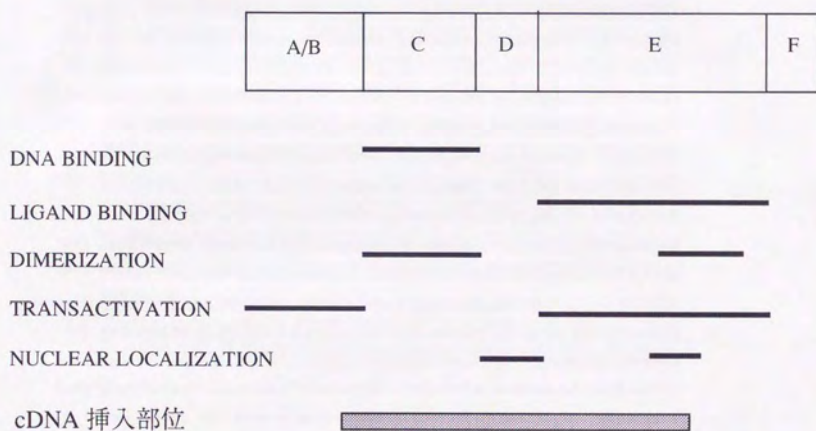


図 2

甲状腺ホルモンレセプター α の cDNA 配列

(A) TR α の機能構造



(B) TR α の cDNA 塩基配列

1 cccccggcgc agggggcggg cggcccgccc ccacggcccc cccatggacg cccccagcac
61 ggggcgctga gacccccgcg tcgctgcccc gcccggtccg gcgcgccacg ccagggatct
121 ctggacagga caagactccg aagctactcc ccagcacac agcccgaggc ccacaaaccc
181 agcttgcgcc cagccctccc acctgccact cctgggcccc tcccaccgcc cggccccctt
241 ggggcgcagg gcatggtgtg aaaggccaag tgctgaggcg ggtatcatgg gtgctgtgcc
301 ctaggggcctg ggtggcaggg ggtgggtggc ctgtgggtgt gccggggggg ccagtgtgcc
361 caccaccagtc tcttggcgtg ctggagggca tcctggatgg aattgaagtg aatggaacag
421 aagccaagca aggtggagtg tgggtcagac ccagaggaga acagtgcag gtcaccagat
481 ggaaagcgaa aaagaaagaa cggccaatgt tccctgaaaa ccagcatgtc agggatatatc
541 cctagtgtacc tggacaaaga cagagcagtg gtcgtgtgtg gggacaaggc aactggttat
601 cactaccgct gtatcacttg tgagggtgc aagggtctct ttcgccgcac aatccagaag
661 aaactccatc ccacatatc ctgcaaatat gacagctgct gtgtcattga caagatcacc
721 cgcgaatcag gccagctgtg ccgcttcaag aagtgcacg ccgtgggcat ggccatggac
781 ttggttctag atgactcgaa gcgggtggcc aagcgttaag tgattgagca gaaccgggag
841 cggcggcgga aggaggcgat gatccgatca ctgcagcagc gaccagagcc cactcctgaa
901 gagtgggata tgatccacat tgcacacagag gcccatcgca gcaccaatgc ccagggcagc
961 cattggaaac agaggcggaa attcctgccc gatgacattg gccagtcacc cattgtctcc
1021 atgcgggacg gagacaaggt ggacctggaa gccttcagcg agctttaccaa gatcatcacc
1081 ccggccatca cccgtgtggt ggactttgcc aaaaaactgc ccattgtctc cgagctgcct
1141 tgcgaagacc agatcctcct cctgaagggg tgctgcattg agatcatgtc cctgcggggc
1201 gctgtccgct acgacctga gaggcacacc ctgacgtgga gtggggagat ggctgtcaag
1261 cgggagcagc tcaagaatgg cggcctgggc gtagtctccg acgccatctt tgaactgggc
1321 aagtcaactc ctgcctttaa cctggatgac acggaagtgg ctctgctgca ggctgtgctg
1381 ctaatgtcaa cagaccgctc gggcctgctg tgtgtggaca agatcgagaa gagtccaggag
1441 gcgtacctgc tggcggttca gcaactacgc aaccaccgca aacacacat tccgacttc
1501 tggcccaagc tgctgatgaa ggagagagaa gtgcagagtt cgattctgta caagggggca
1561 gcggcagaag gccggccggg cgggtcactg ggcgtccacc cggaggaca gcagctcttc
1621 ggaatgcagt ttgttcaggg tccgcaggtc cggcagcttg agcagcagct tggtaagcg
1681 ggaagtctcc aagggccggt tcttcagcac cagagccgca agagcccgca gcagcgtctc
1741 ctggagctgc tccaccgaag cggaaattct catgcccgag cggctctgtg ggaagacgac
1801 agcagtgagg cggactcccc gagctcctct gaggaggaa cggaggtctg cgaggacctg
1861 gcaggcaatg cagctctctc ctgaagcccc ccagaaggcc gatggggaag gagaaggagt
1921 gccatacctt ctccaggccc tctgcccaaa gacagggagg tgacctgaaag ctgggagcgt
1981 gggctcagca gggctggtca cctcccatcc cgtaagacca ccttcccttc ctcagcagc
2041 caaacatggc cagactccct tgctttttgc tgtgtagtgc cctctgcctg ggaatgccct
2101 cccctttctt ctgcctggca acatcttact tgtcctttga ggccccaact caagtgtcac
2161 ctctctcccc agctccccca ggcagaaata gttgtctgtg ctctcttggt tcatgcttet
2221 actgtgacac ttatctcact gttttataat tagtcgggca tgagtctgtt tcccaagcta
2281 gactgtgtct gaatcatgtc tgatccccg

斜線部位 ; GST-TR α 融合蛋白の cDNA 挿入部位

図 3

LTR 内塩基配列の変異の導入方法

(A) 合成した Oligomer

1. sense Wild type (201-255 bp)

AAGCCACCGG GAACCACCCA TTTCCTCCCC ATGTTTGTCA AGCCGTCCTC AGGCG

2. sense Mutation A (201-255 bp (224-227bp; mutation))

AAGCCACCGG GAACCACCCA TTTAAGTCCC ATGTTTGTCA AGCCGTCCTC AGGCG

3. sense Mutation B (201-255 bp (247-250bp; mutation))

AAGCCACCGG GAACCACCCA TTTCCTCCCC ATGTTTGTCA AGCCGTAAGT AGGCG

4. sense Mutation A & B (201-255 bp (224-227bp & 247-250bp; mutation))

AAGCCACCGG GAACCACCCA TTTAAGTCCC ATGTTTGTCA AGCCGTAAGT AGGCG

5. anti-sense Wild type (290-236 bp)

ATGAAAAGTT TTTTGAGGTG AGGGGTTGTC GTCAACGCCT GAGGACGGCT TGACA

6. anti-sense Mutation C2 (290-236 bp (276-273bp; mutation))

ATGAAAAGTT TTTTACTTTG AGGGGTTGTC GTCAACGCCT GAGGACGGCT TGACA

7. anti-sense Mutation B (290-236 bp (250-247bp; mutation))

ATGAAAAGTT TTTTGAGGTG AGGGGTTGTC GTCAACGCCT ACTTACGGCT TGACA

8. anti-sense Mutation B & C2 (290-236 bp (250-247bp & 276-273bp; mutation))

ATGAAAAGTT TTTTACTTTG AGGGGTTGTC GTCAACGCCT ACTTACGGCT TGACA

9. anti-sense Mutation B,C1, & C2 (290-236 bp (276-273bp,271-268bp,& 250-247bp; mutation))

ATGAAAAGTT TTTTACTTTA CTTGGTTGTC GTCAACGCCT ACTTACGGCT TGACA

以上 9 種類の oligomer の sense, anti-sense を組み合わせて annealing させ、その後 klenow 酵素で処理し、目的とする変異を導入した 90 bp の dsDNA を作成しこれを CAT plasmid に組み込んだ。

(B) Oligomer の模式図と annealing 反応の組み合わせ

4 箇所全て (A, B, C1, C2) の degenerative TREs に変異をいれたもの;	4 & 9
3 箇所 (A, B, C2) の degenerative TREs に変異をいれたもの;	4 & 8
2 箇所の degenerative TREs に変異をいれたもの (A, B);	4 & 7
(B, C2);	3 & 8
(A, C2);	2 & 6
1 箇所の degenerative TREs に変異をいれたもの (A);	2 & 5
(B);	3 & 7
(C2);	1 & 6

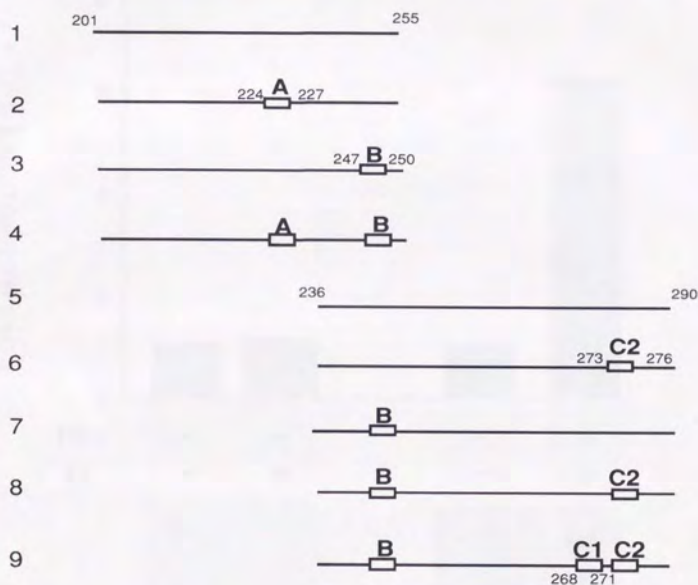
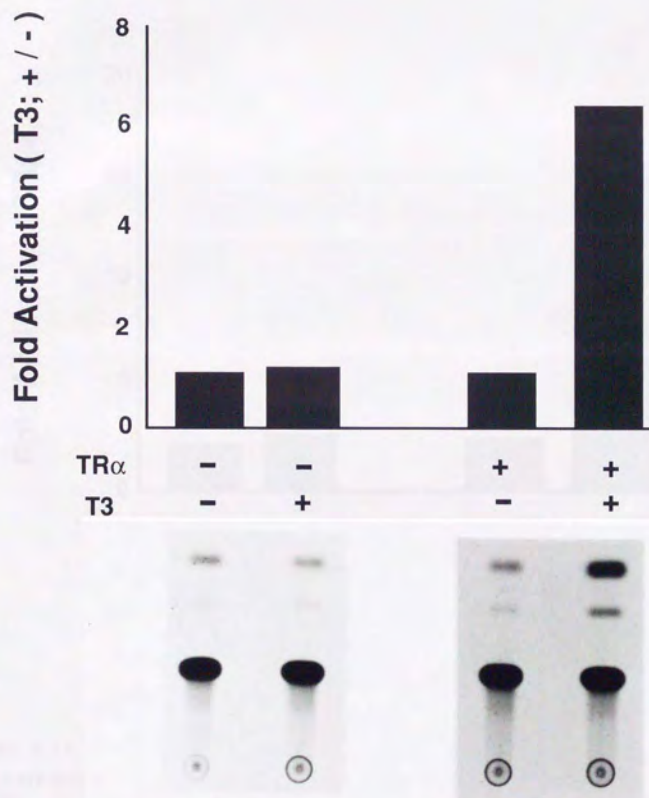


図 4

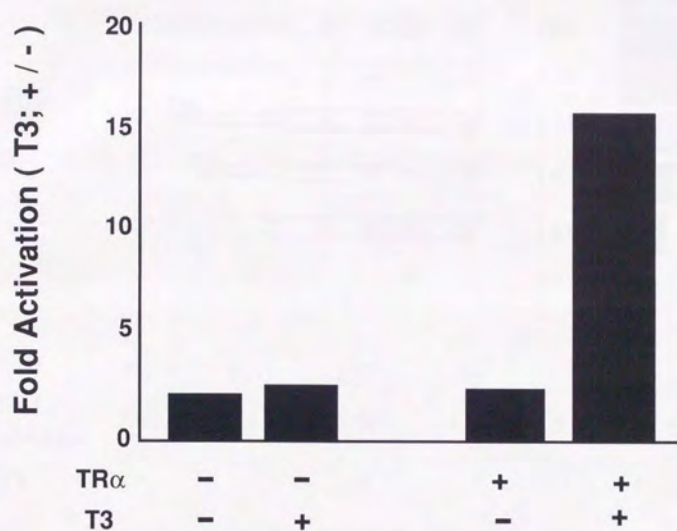
甲状腺ホルモンによる LTR の活性化
(Jurkat を用いた場合)



HTLV-1 LTR のプロモーター活性は Jurkat 細胞に甲状腺ホルモンレセプター α を co-transfection した場合、甲状腺ホルモンの添加によって約 6 倍上昇した。

図 5

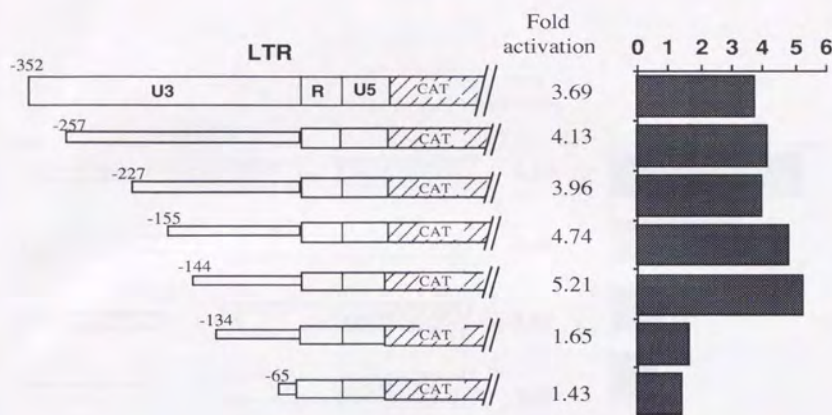
甲状腺ホルモンによる LTR の活性化
(HepG2 を用いた場合)



HTLV-1 LTR のプロモーター活性は HepG2 細胞に甲状腺ホルモンレセプター α を co-transfection した場合、甲状腺ホルモンの添加によって約15倍上昇した。

図 6

5' 側からの LTR deletion series を用いた CAT assay



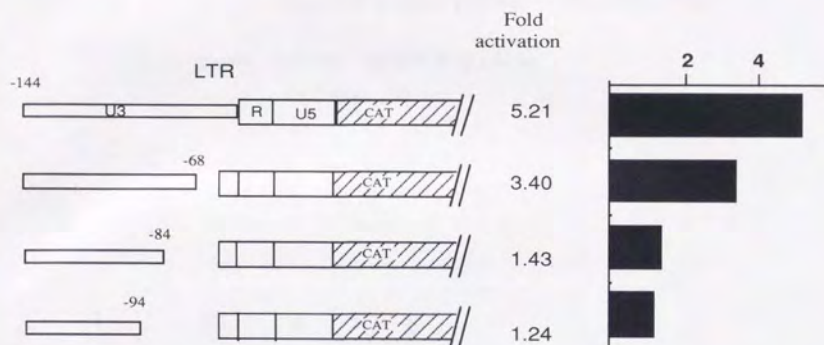
LTR	-352 ~	-257 ~	-227 ~	-155 ~	-144 ~	-134 ~	-65 ~
Fold activation	3.69	4.13	3.96	4.74	5.21	1.65	1.43
T3	- +	- +	- +	- +	- +	- +	- +



LTR 転写開始点から -144 bp (210 bp) までは甲状腺ホルモンによるプロモーター活性化が見られたがさらに 10 bp 欠失させるとこの活性化が著しく低下したことから活性化に必要な領域の5' 側境界はこの近傍に存在すると考えられた。

図 7

3' 側からの LTR deletion series を用いた CAT assay



LTR	-144 ~ 0	-144 ~ -68	-144 ~ -84	-144 ~ -94
Fold activation	5.21	3.40	1.43	1.24
T3	- +	- +	- +	- +



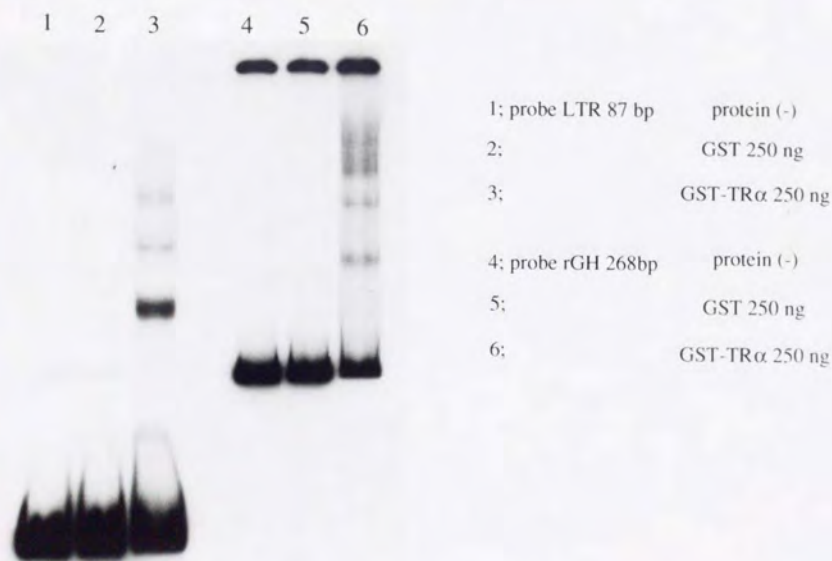
LTR 転写開始点から -68 bp (286 bp) までは甲状腺ホルモンによるプロモーター活性化が明らかであったがさらに欠失させると活性化が著しく低下したことから活性化に必要な領域の 3' 側境界はこの近傍に存在すると考えられた。

図 8

GST-TR α を用いた EMSA

probe; LTR 87 bp (200-286 bp),
rat growth hormone promotor 268 bp (-248-+19 bp)

protein; GST-TR α 融合蛋白 250 ng,
GST 蛋白 250 ng

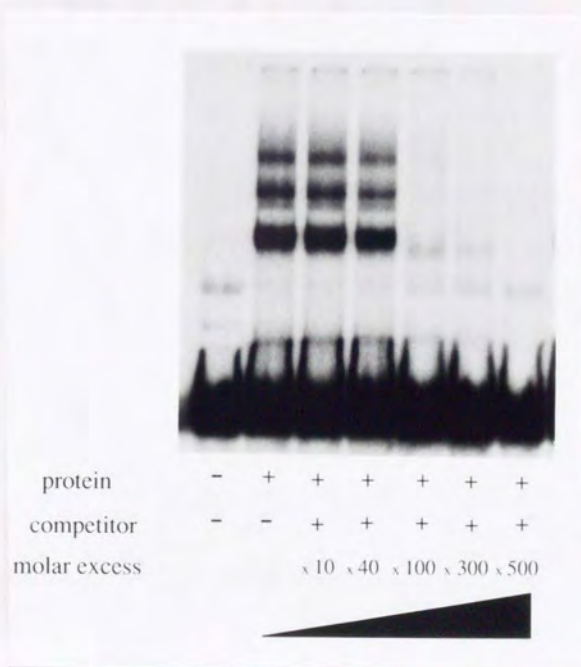


rat growth hormone プロモーター配列または LTR を probe として用いた場合、両者において GST-TR α 融合蛋白を加えることで複数の shift band を認めた。GST 単独ではこのような shift band は認めなかった。

図 9

Competitor を用いた EMSA

probe; LTR 87 bp (200-286 bp)
 protein; GST-TR α 融合蛋白 250 ng
 competitor; palindromic TRE (TREp: $\begin{matrix} \text{CTAGAGATCTCAGGTCA} \\ \text{TGACCTGAGATCT} \end{matrix}$)

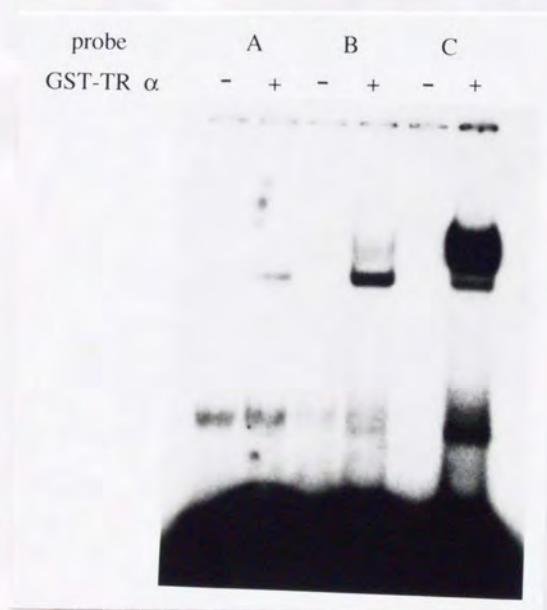


反応系の competitor の量が増加するにつれて、shift band の濃度が漸減し、ついには消失した。

図 10

甲状腺ホルモンレセプター α の LTR 内の degenerate Thyroid Hormone-Responsive Elements (TREs) に対する結合性の解析

probe; A 201-230 bp, B 231-260 bp, C 261-290 bp
protein; GST-TR α 融合蛋白 250 ng



probe A と B は 1 箇所の degenerate TRE (A, B) を含み、probe C は 2 箇所含む(C1, C2)。

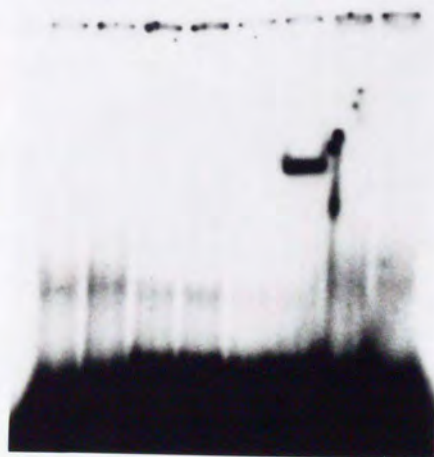
図 1 1

LTR 内の degenerate TREs の変異による
甲状腺ホルモンレセプター α の結合性の変化

probe;	mA	201-230 bp
	mB	231-260 bp
	mC2	261-290 bp
	mC1C2	261-290 bp

protein; GST-TR α 融合蛋白 250 ng

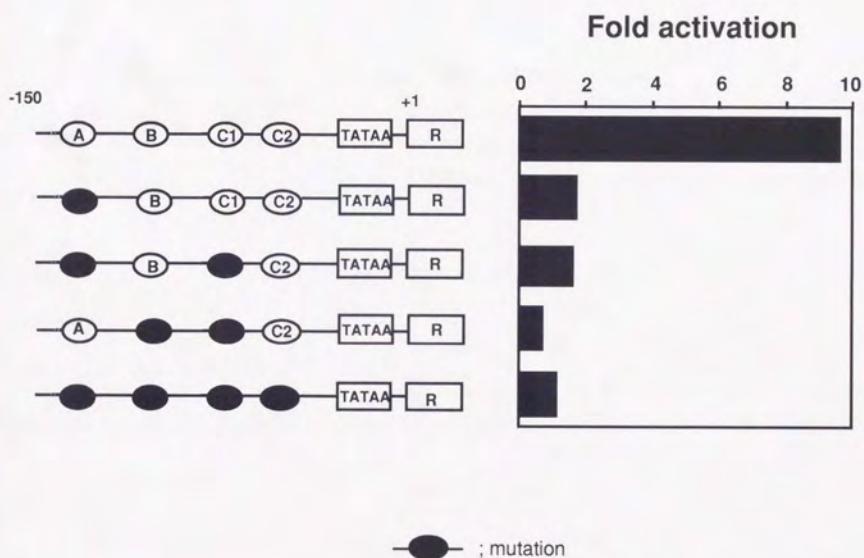
probe									
	mA	mB	mC2	mC1C2					
GST-TR α	-	+	-	+	-	+	-	+	



m A, m B では 1 箇所の degenerate TRE 部分に 4 塩基置換を行った結果、shift band は全く見られなくなり結合性は失われた。m C2 では 2 箇所存在した degenerate TREs のうち 1 箇所に 4 塩基置換を行った結果、shift band は 1 本に減少した。さらに 2 箇所両方に 4 塩基置換を行った m C1C2 では shift band は消失した。

図 1 2

LTR 内の degenerate TRE の変異によるプロモーター
活性化の変化



4 箇所の degenerate TREs のいずれかに変異が入っている場合は、活性化は著しく低下した。

