

論文の内容の要旨

論文題目：HIV-1 ゲノム核移行に於ける LEDGF/p75 の役割
(Transgenic expression of the human LEDGF/p75 gene can overcome the nuclear transport host-range barrier in mouse cells)

東京大学大学院理学系研究科
生物化学専攻
多田 卓哉

要旨本文

抗 HIV-1 (HIV) 薬の開発に適したモデル動物の一つとしてマウスが考えられる。しかし、マウスでは宿主間障壁となる宿主因子が存在しているため HIV は感染しない。最近、HIV preintegration complex (PIC) の構成因子の一つである HIV インテグラーゼ (IN) の核移行に、宿主因子である LEDGF/p75 (Lens Epithelium-Derived Growth Factor p75) が関与すると共に、染色体の転写が活発な領域への HIV ゲノム組込みを促進することが報告された。我々は先に IN の核移行過程がマウスで抑制されている事を見いだしており、LEDGF/p75 がヒト/マウス間の宿主障壁に関与している事を示唆する結果を得ている。

本研究では LEDGF/p75 が宿主間障壁となっている可能性を検討するため、ヒト LEDGF/p75 を発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、HIV 感染効率を検討した。まず、CAGGS プロモーター制御下でヒト LEDGF/p75 を発現させるコンストラクトを作製し (図 1)、マウス (C3H/HeN) 受精卵にマイクロインジェクションすることにより遺伝子の導入を行った。

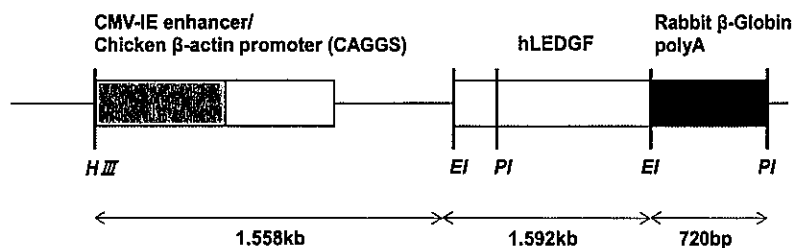


図 1 ヒト LEDGF/p75 Tg 作製のためのコンストラクト。HIII; Hind III サイト、EI; EcoRI サイト、PI; PstI サイト。

その結果、計 9 匹の Founder が誕生し、その内、1 系統 (No.7 Tg) において胸腺・脾臓・リンパ節・Mφ での遺伝子の発現が、2 系統 (No.8、No.10 Tg) において胸腺・脾臓での遺伝子の発現が確認できた。発現が確認できたヒト LEDGF/p75 Tg (No.7、No.8、No.10) より MEF (mouse embryonic fibroblasts : MEF) を調製し、GFP-IN 遺伝子を transfect した後 GFP の細胞内分布を検討したところ、WT MEF では 3% の細胞 (核局在 3 個/全 GFP 陽性細胞 107 個) において GFP-IN の核局在が見られたのに対し、No.7 Tg MEF では 70% (80 個/113 個)、No.8 Tg MEF では 49% (50 個/101 個)、No.10 Tg MEF では 67% (67 個/102 個) の細胞において GFP-IN の核局在が見られた (図 2)。

このように、ヒト LEDGF/p75 の過剰発現により、マウス細胞における非効率的な GFP-IN の核移行効率が上昇したことから、LEDGF/p75 はマウスに対する HIV 感染の宿主間障壁の一つであり、ヒト LEDGF/p75 Tg では HIV の感染効率が高くなる可能性が示唆された (図 3)。

本研究ではマウス細胞に特徴的な、HIV 感染時の核移行過程における障壁を LEDGF/p75 の機能差という質的な問題に原因を求めた。想定しうる機能差としては、IN に対する結合親和性、LEDGF/p75 自体の核移行効率などが考えられるが、ヒト LEDGF/p75 とマウス LEDGF/p75 のアミノ酸配列は 92.6% という極めて高い相同性を保持している。さらに LEDGF/p75 中の IN が結合するとして特定されたドメインである IBD、核移行シグナル (NLS)、染色体が結合するドメイン (PWWP、AT hook) などとは全く同じ配列を保持していることなどから、マウス LEDGF/p75 の HIV 感染に関係する機能の低下は、LEDGF/p75 の核移行機能の低下によるものではなく、IN とマウス LEDGF/p75 の結合親和性の低下による可能性が高い。その原因として、マウス LEDGF/p75 にも IBD が存在するものの、高次構造を形成した際の IN との結合親和性が低い可能性が考えられる。

また、HIV の組み込み部位の選択に LEDGF/p75 が関与している可能性が報告されていることから、ヒト LEDGF/p75 は核移行過程だけでなく、宿主ゲノム中のより転写が活発な領域 (プロモーター、CpG 島) への組み込みを促進することが示唆され、これらの過程においてもヒト、マウス LEDGF/p75 の機能差が存在する可能性が考えられる。

本研究で作製したヒト LEDGF/p75 Tg は他の遺伝子改変マウスと交配することが可能である。特に、HIV 侵入時に必須であるレセプターを発現したヒト CD4/CXCR4/LEDGF Tg、ヒト CD4/CCR5/LEDGF Tg を作製することで、実際のウイルスを使用して HIV 感染が評価できると考えている。これらのマウスは分子生物学的解析が容易に行える利点があり、今後は病態形成に関与する因子との相互作用を個体レベルで解析できることが考えられる。

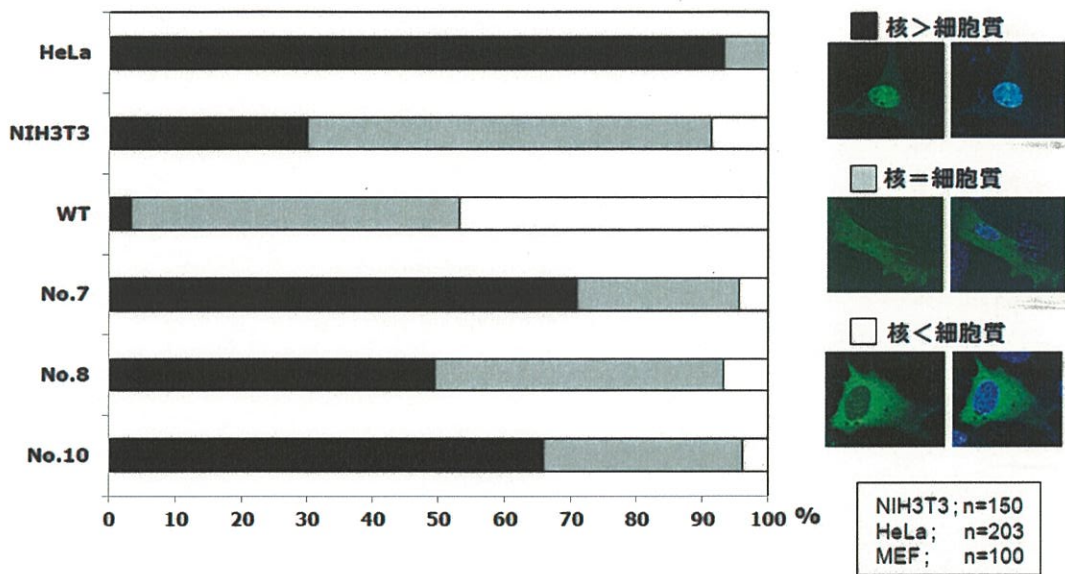


図2 HeLa細胞、NIH3T3細胞、WT MEF、Tg MEF (No.7、8、10)におけるGFP-IN核移行効率の評価。各細胞におけるGFP-INの細胞内局在を右図のように分類した。WT; WT MEF、No.7、8、10; Tg MEF。

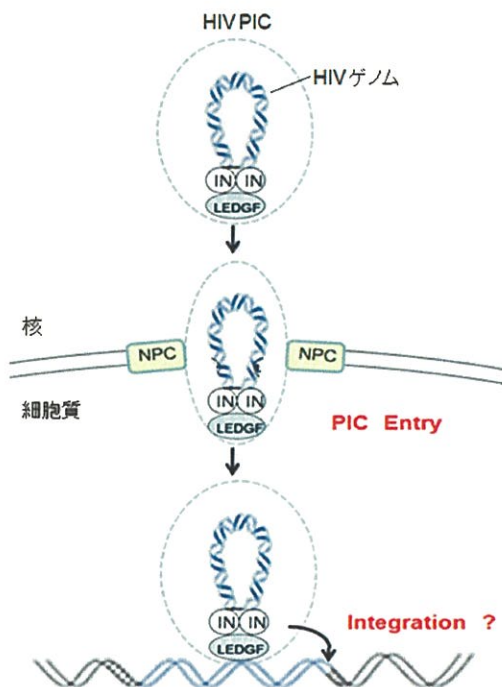


図3 LEDGF/p75がINの核移行における種間障壁となる宿主因子である事が示された。PIC; preintegration complex、NPC; nuclear pore complex。