

クローン化プロウイルスゲノムの ヒトリンパ球系細胞における遺伝子発現

岡山大学医学部附属癌源研究施設生化学部門（指導：小田琢三教授）

秋 山 公 祐

（昭和63年3月23日受稿）

Key words: レトロウイルス, プロウイルスゲノム, ヒトリンパ球系細胞
DNA トランスフェクション, 遺伝子発現

緒 言

レトロウイルスは動物界に広く分布するウイルスで、細胞に感染すると RNA ゲノムを鋳型としてウイルス内の逆転写酵素の働きで DNA が合成され、2 重鎖 DNA のプロウイルスの形で宿主細胞染色体 DNA に組込まれる。そのプロウイルスゲノムの遺伝子発現によってウイルスが産生される¹⁾。最近、数種のヒトのレトロウイルス (HTLV-I^{2),3)}, HTLV-II^{4),5)}, HIV (LAV/HTLV-III/ARV)^{6),7)}, HIV-2⁸⁾) が発見され、HTLV-I は成人 T 細胞白血病の原因ウイルスであることが明らかにされた^{9)~11)}。HTLV-II は Hairy 細胞白血病患者から分離された^{12),13)}。未だ特定の疾患との病因関係は明らかでない。HIV は獲得性免疫不全症候群 (AIDS) 患者より分離され、同疾患の原因ウイルスであることが確定した^{14),15)}。これらのウイルスはヒト T リンパ球に特異的に感染し障害をもたらす¹⁶⁾。また、サルにおいても、これらヒト T リンパ球親和性レトロウイルスに近縁なレトロウイルス (STLV-I¹⁷⁾, SIV¹⁸⁾, SRV-1^{19),20)}, SRV-2²¹⁾ など) が見いだされている。SIV や SRV は、サルの獲得性免疫不全症候群 (SAIDS)²²⁾ の原因ウイルスとみなされ、その研究はヒトの疫患研究における有用なモデルになるものと期待されている。

最近、Oda らはヒトリンパ芽球様株化細胞の一種より産生されるレトロウイルスを見いだした²³⁾。このレトロウイルスは主構造蛋白質として分子量 34 キロダルトン (kDa) の蛋白質 p34 と

Mg²⁺により活性化される逆転写酵素を有しており、種々なヒト T および B リンパ球系細胞に感染することが示されている。本ウイルスはその主構造蛋白質 p34 の N 末端領域アミノ酸配列と既知レトロウイルスのそれとの比較において、いずれとも相同性が示されなかった²⁴⁾。しかし、最近、本ウイルスの cDNA クローニング²⁵⁾、およびプロウイルス DNA のクローニング²⁶⁾が行われ、初めてその全塩基配列と遺伝子構造が決定された結果^{27)~29)}、その塩基配列の一部がリスザルの内在性レトロウイルス SMRV の塩基配列の一部^{30),31)}と高い相同性を示していることがわかった。本ウイルスはヒト由来細胞から分離されたことを考慮して SMRV-H と仮称されている^{23)~25)}。しかし、SMRV の塩基配列は LTR 領域と pol 遺伝子の一部の領域しか知られていないので、本ウイルスと SMRV との詳細な関係は未だ明らかでない。

HTLV-I はその感染細胞と T-細胞との混合培養によってのみ T-細胞に感染、トランスフォームする³²⁾。プロウイルス DNA のトランスフェクションによるウイルスの産生は知られていない。それに反して、HIV は混合培養によってもプロウイルス DNA のトランスフェクションによっても感染が成立する³³⁾。本研究は分子クローニングされた SMRV-H プロウイルスゲノムの生物学的活性の解析を目的として、プロウイルスゲノムのイヌ胸腺由来細胞およびヒトリンパ球系細胞への導入による一時的 (transient) および安定 (stable) な遺伝子の発現を行い、転写

および翻訳産物である RNA と蛋白質を解析した。

材 料 と 方 法

1. 細胞, DNA, 酵素, 抗体

イヌ胸腺由来細胞 (Cf2Th) とヒトリンパ球系株化細胞 (Jurkat) を DNA トランスフェクションの受容細胞として用いた。クローニングされた SMRV-H の完全なプロウイルスゲノムが含まれるプラスミドとして pSMH (図 1) を用いた。また、真核細胞における選択マーカーとして、pSV2neo²⁹⁾ に含まれるネオマイシン耐性 (neo^r) 遺伝子を用いた。合成リンカーと制限酵素、大腸菌アルカリ・フォスファターゼ (BAP) は東洋紡績株式会社より購入し、ライゲーションには宝酒造株式会社のライゲーションキットを用いた。酵素反応はそれぞれの至適条件下で行った。免疫学的検出に用いた抗 SMRV-H 血清と抗 p34 血清は各々精製ウイルス粒子または精製 p34 をラットに免疫して作成した。ペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG ウサギ抗体はカッペル社より購入した。

2. プラスミドの作成

pSMH に neo^r 遺伝子を導入した (図 1)。pSMH の Sal I 部位に組込むことができる neo^r 遺伝子断片を作成するために pSV2neo の Acc I 部位を Sal I 部位に、Eco R I 部位を Xho I 部位に変更した。まず、pSV2neo を Acc I で切断、クローフラグメントで平滑末端とした後、合成 Sal I リンカーをライゲーションした。次に Eco R I で切断、クローフラグメントで平滑末端とした後、合成 Xho I リンカーをライゲーションした。このプラスミドを Sal I と Xho I で切断した後、電気泳動により neo^r 遺伝子を含む Sal I-Xho I 断片 (3608 塩基対 (kb)) を分離・精製した。これに Sal I による切断と BAP による脱リン酸化を行った pSMH を加え、ライゲーション反応を行った。反応後、この組換え DNA で大腸菌 HB 101 株の形質転換を行い³⁰⁾、カナマイシン耐性のコロニーを選択した。得られたクローンから DNA を抽出し³¹⁾、制限酵素切断とアガロースゲル電気泳動³¹⁾で pSMH に neo^r 遺伝子が導入されているかどうかを確認した。

3. DNA トランスフェクション

Cf2Th 細胞にはリン酸カルシウム法³²⁾を、Jurkat 細胞には DEAE-デキストラン法^{33), 34)}を用いた。

1) リン酸カルシウム法

Cf2Th 細胞は 7% 牛胎児血清 (FCS) を含む DMEM 培地 (日水製薬) で培養した。10 μ g の pSMH または 10 μ g の pBR322 を 0.5ml のリン酸

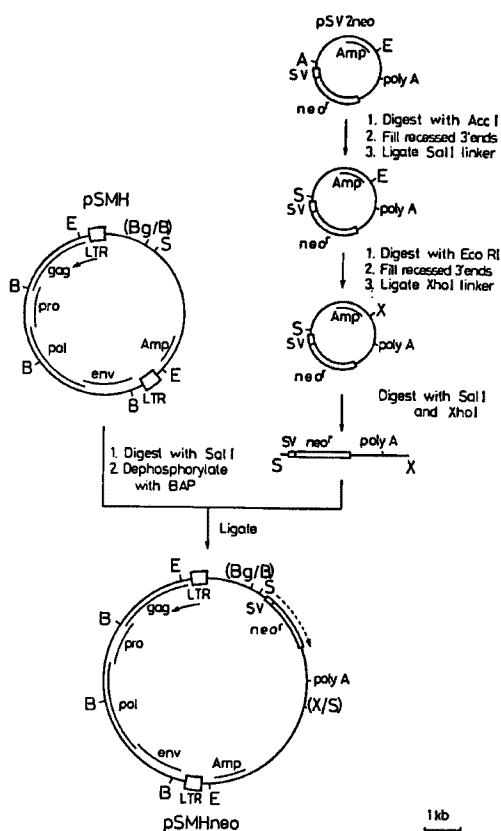


図 1 プロウイルスゲノムを含むプラスミド DNA の調製方法や組換えプラスミドの作成方法は本文中に記載した。 *gag*, *pro*, *pol*, *env* はウイルスがコードする遺伝子, LTR はウイルスの Long Terminal Repeat, 矢印→はウイルスゲノムの転写方向を示す。また, SV は SV40 ウイルス初期遺伝子プロモーター, *neo^r* はネオマイシン耐性遺伝子, 矢印→はその転写方向を示す。制限酵素の切断部位は下記の様に略記した。A : *Acc I*, B : *Bam HI*, Bg : *Bgl II*, E : *Eco RI*, S : *Sal I*, X : *Xho I*

カルシウム溶液 (0.7mM Na_2HPO_4 , 0.7mM NaH_2PO_4 , 21mM N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-ethanesulfonic acid (HEPES), 120 mM CaCl_2 , 137mM NaCl , pH7.12) のなかで沈澱させ、この沈澱物を直径5cmのシャーレにまいた 5×10^6 個の細胞と 4 時間接触させた。15% グリセロールを含む PBS (137mM NaCl , 27mM KCl , 11mM Na_2HPO_4 , 15mM KH_2PO_4) で 1 分間処理した後、血清を含む培地で 48 時間培養した。

2) DEAE-デキストラン法による形質転換細胞の樹立 (図 2)

Jurkat 細胞は 10% FCS を含む RPMI 1640 培地 (日水製薬) で培養した。対数増殖期にある 1×10^7 個の Jurkat 細胞を血清を含まない DMEM 培地で一度洗浄した後、250 μg の DEAE-デキストラン (diethylaminoethyl-dextran, SIGMA) を含む 1 ml の DMEM 培地に懸濁した。Sal I で線状化した 25 μg の pSMHneo を加え 37°C で 1 時間加温した。培地で一度洗浄後 10% FCS を含む RPMI 1640 培地で培養した。48 時間後、96 ウェルのマイクロ・タイター・プレートに 1 ウェルあたり 2×10^4 個の細胞密度で接種するとともに、G-418 sulfate²⁹⁾ (Geneticin[®], GIBCO) を 1 mg/ml になるように加え選択を開始

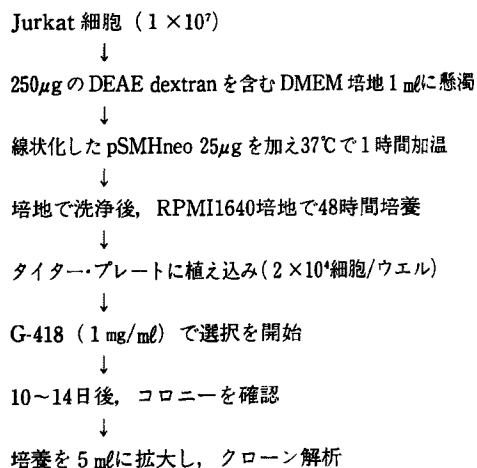


図 2 プロウイルス DNA のヒトリンパ球系細胞へのトランスフェクションによる形質転換細胞の樹立方法

した。10~14 日後、増殖可能な細胞を確認し、培養を 5 ml に拡大した。

4. 間接酵素抗体法³⁵⁾

スライドガラス上に増殖した Cf2Th 細胞に、リン酸カルシウム法により pSMH または pBR322 を導入し、48 時間後細胞をアセトンにより固定した。一次抗体として 50 倍希釈した抗 SMRV-H 血清、二次抗体として 160 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG ウサギ抗体を室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、0.2mg/ml 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) と 0.005% H_2O_2 , 50mM Tris · HCl (pH7.5) を含む溶液中で発色反応を行った。

5. 核酸の抽出

細胞からの高分子 DNA の抽出は Proteinase K 法³¹⁾で行った。

RNA の抽出は LiCl/Urea 法³⁰⁾で行った。まず、 5×10^6 個の細胞を遠心して集め、1.4ml の 3 M LiCl と 6 M Urea を含む溶液に懸濁し、ボルテックス・ミキサーにて強く攪はんした後、水中に一昼夜おいた。遠心により RNA を集め、150 μl の 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) と 10mM Tris · HCl (pH7.6) を含む溶液に溶解した。等量のクロロホルムを加え攪はんした後、水層の RNA をエタノールで沈澱し、10 μl の水に溶解した。

6. ハイブリダイゼーション

1) サザン・ハイブリダイゼーション法³¹⁾

細胞から抽出した 10 μg の高分子 DNA を、Eco RI または Hind III で切断した後、0.8% アガロースゲル電気泳動した³¹⁾。DNA を変性溶液 (0.5 M NaOH, 1.5M NaCl) で処理した後、トランスファー溶液³⁷⁾ (0.25M NaOH, 1.5M NaCl) でナイロン・メンブラン (Hybond-N, Amersham) にトランスファーした。ニックトランスレーション法³⁸⁾により (α -³²P) dCTP で標識したプローブ (図 4. (A)) とハイブリダイゼーション用溶液 (6 × SSC (900mM NaCl, 90mM sodium citrate, pH7.0), 0.5% SDS, 5 × BFP (0.1% Ficoll 400, 0.1% polyvinyl pyrrolidone, 0.1% bovine serum albumin (BSA)), 10mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, pH8.0), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ salmon sperm DNA) の中

で、68℃の条件で18時間ハイブリダイズした。メンブランを6×SSCと0.1% SDSを含む溶液中で、次に、2×SSCと0.1% SDSを含む溶液中で、68℃の条件で洗浄しオートラジオグラフィを行った。

2) ノザン・ハイブリダイゼーション法³¹⁾

細胞から抽出した15μgのRNAを660mM formaldehydeを含む1%アガロースゲル中でMOPS溶液(200mM 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid(MOPS, pH7.0), 50mM sodium acetate, 10mM EDTA)を緩衝液として電気泳動した。RNAを10×SSCにてナイロン・メンブランにトランスファーした後、上記のプロープ(図4.(A))とハイブリダイゼーション用溶液(50% formamide, 5×SSC, 50mM sodium phosphate (pH6.8), 1×BFP, 1% glycine, 100μg/ml salmon sperm DNA)中で、45℃の条件で14時間ハイブリダイズした。メンブランを2×SSCと0.2% SDSを含む溶液で室温で洗浄後、0.1×SSCと0.2% SDSを含む溶液で50℃で洗浄し、オートラジオグラフィを行った。

7. 蛋白質の電気泳動とp34の免疫学的検出

10⁷個の細胞を200μlの10mM Tris・HCl (pH8.0), 140mM NaCl, 3mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (DTT), 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.5% Nonidet P-40を含む溶液に懸濁し、ボルテックス・ミキサーにて強く攪はんした。水中に20分間放置した後、12,000×g, 4℃で、5分間遠心し、得られた上清に67μlの1 M sucrose, 8% SDS, 250 mM Tris・HCl (pH6.8), 0.01% bromophenol blue, 5% 2-mercaptoethanolを含む溶液を加えた。沸騰水中で3分間処理した後、蛋白質を12.5%のゲル濃度のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)³⁹⁾を行って分離し、ニトロセルロース・メンブラン(TM-2, 0.45μm, 東洋科学産業株式会社)上へウエスタン・プロットした⁴⁰⁾。プロットは12.5mM Tris・HClと96mM glycineを含む溶液中でトランスプロット装置(Bio-Rad)を用い、48V, 4℃の条件で12時間行った。プロット後ニトロセルロース・メンブランを3% BSA, 10%正常

ウサギ血清を含むTBS (10mM Tris・HCl (pH7.5), 150mM NaCl)のなかに移し、室温で3時間振とうした。一次抗体として50倍希釈した抗p34血清、二次抗体として100倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ラットIgGウサギ抗体を37℃で1時間反応させた。0.05% Tween20を含むTBS (TTBS)で洗浄後、0.5mg/ml 4-chloro-1-naphtholと0.165% H₂O₂を含むTBS中でペルオキシダーゼによる発色反応を行った。

結 果

1. プラスミドの作成

pSMHは、本ウイルスの完全なプロウイルスゲノム(LTR-gag-pro-pol-env-LTR, 8785bp)を含むほか、5'LTRに隣接して約1280bp, 3'LTRに隣接して約200bpのヒトリンパ芽球様株化細胞由来DNAを含む。プラスミド全体としては14.3 kbの大きさとなる。pSMHに真核細胞内における選択マーカーとして働くpSV2neo由来のneo^r遺伝子を図1に示すような方法で導入した。この遺伝子(aminoglycoside phosphotransferase 3' (II))は真核細胞内においてSV-40初期遺伝子プロモーターより転写されることにより発現される。本来G-418は真核細胞に対し毒性を示すが、neo^r遺伝子が発現されるとこの遺伝子産物の作用により細胞はG-418耐性となる²⁹⁾。pSMHのSal I部位に導入できると共に構築されたプラスミドのSal I部位が1カ所となるよう、neo^r遺伝子断片の両端を合成リンカーによりSal I部位とXho I部位とに変更した。得られたpSMHとneo^r遺伝子とによる組換え体を制限酵素により分析したところ、pSMHにneo^r遺伝子がひとつ導入されたプラスミドが得られた。neo^r遺伝子の転写方向がウイルスゲノムの転写方向と逆向きのものをpSMHneoとした(図1)。pSMHneoの大きさは17.8kbである。

2. 間接酵素抗体法によるウイルス抗原の検出

pSMHを細胞にトランスフェクションし、48時間後ウイルス抗原の発現を調べた。用いたCf2 Th細胞は本ウイルスの感受性細胞であることが示されている。トランスフェクトされたプラスミドDNAの大部分は核内で染色体に組込まれる

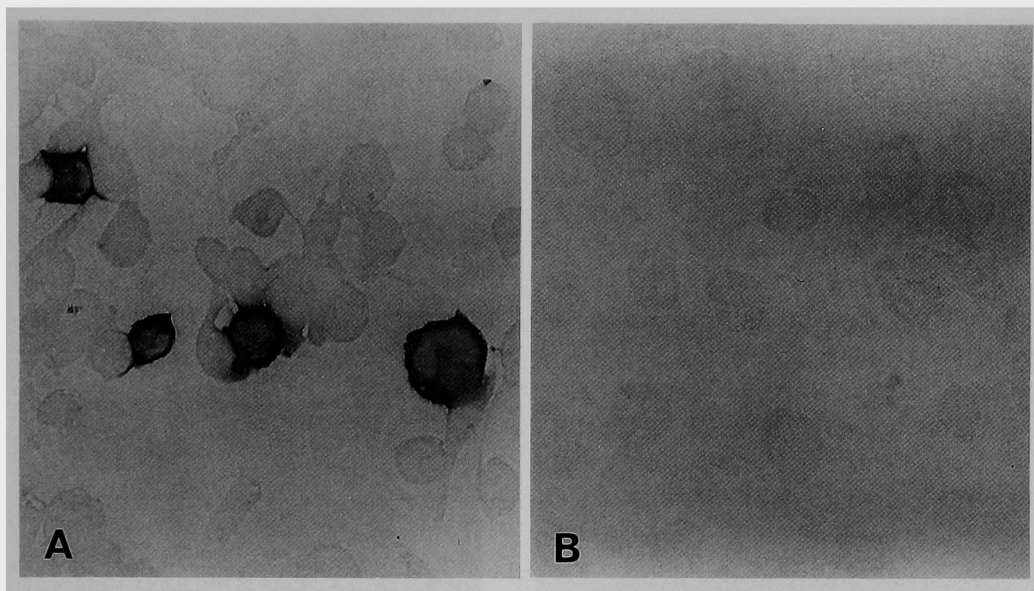


図3 間接酵素抗体法によるウイルス関連抗原の検出

イヌ胸腺由来細胞 (C2Th) に pSMH (A), または pBR322 (B) をトランスフェクションし抗 SMRV-H 血清を用いた間接酵素抗体法で検出した。(A) には抗原陽性細胞が検出され、(B) には検出されない。

ことなくミニクロモソームとして存在し⁴¹⁾, 数日で消失すると考えられている。この間導入された遺伝子は、一時的(transient)に mRNA に転写・発現されることが期待される。抗 SMRV-H 血清を用いて免疫学的に染色したところ pSMH をトランスフェクトした細胞では、その1.1%の細胞において細胞質が染色された(図3 (A))。染色の程度は各々の細胞において異なった。また、抗原陽性細胞と陰性細胞の形態的差異は認められなかった。対照として pBR322 をトランスフェクトしたものではどの細胞も染色されなかった(図3 (B))。以上から、pSMH に含まれるプロウイルスゲノムは感受性細胞内においてウイルス抗原を発現しうることが示された。

3. DNA トランスフェクションによる

形質転換細胞の樹立

DNA トランスフェクション法によりプロウイルスゲノムが細胞内で安定に保持されている形質転換細胞の樹立をヒトリンパ球系細胞である Jurkat 細胞を用いて試みた。本ウイルスはヒトリンパ芽球様株化細胞より分離されたウイルスであり、また、Jurkat 細胞に感染することがで

きることから、DNA の受容細胞として Jurkat 細胞を選んだ。供与 DNA としてはプロウイルスゲノム並びに選択マーカーとなる neo^r遺伝子を含む pSMHneo を Sal I で線状化したものを用いた。DNA トランスフェクション後、pSMHneo が安定に保持されている形質転換細胞だけが G-418を含む培地で増殖することができる。選択に用いた G-418濃度 (1 mg/ml) は、トランスフェクションを行っていない Jurkat 細胞が10日間で死滅する量として予め決定した。

まず、リン酸カルシウム法により pSMHneo をトランスフェクションし、形質転換細胞の樹立を試みたが、G-418耐性形質転換細胞は得られなかった。次に DEAE-デキストラン法によりトランスフェクションした(図2)。DEAE-デキストランの濃度は、トランスフェクション48時間後の細胞の生存率(トリパンブルーで染色後算定)が41%となる250 μ g/mlを採用した。選択を開始してから10~14日後、G-418耐性細胞がコロニーとして観察された。形質転換細胞の形態はもとの Jurkat 細胞と同じもの、細胞の大きさが巨大化したもの、大きさは変わらないが細胞どうし

が密接して全体で房状となったものの3種類に分けることができた。形質転換細胞の出現頻度は 9.6×10^5 個の細胞あたり1個の割合であった。得られた形質転換細胞をG-418非存在下で2ヵ月間培養した後、G-418存在下に戻しても全ての細胞において増殖は可能であった。これは形質転換細胞においてpSMHneoが安定に保持されていることを示すものである。

4. 形質転換細胞におけるプロウイルスゲノムの存在様式の解析

形質転換細胞におけるプロウイルスゲノムの存在様式をサザン・ブロッティング法により解析した(図4)。プロウイルスゲノムがその内部で組換えを起こさず完全な形で存在しているときには図4(A)に示すごとく、Eco RI切断では8.3kb, Hind III切断では5.0kbのサブゲノムフラグメントが認められるはずである。実際、細胞より抽出した高分子DNAについて調べたところ、得られた15個の形質転換細胞のうち3F9と4H1とを除き全ての細胞においてウイルス産生ヒトリンパ芽球様株化細胞と同様、プローブと特異的にハイブリダイズするバンドが見いだされた。また、バンドの大きさはEco RI切断では8.3kb Hind III切断では5.0kbとなっていた(図4(B), (C))。従って、これらの形質転換細胞においては完全なプロウイルスゲノムが存在していることが示された。また、細胞によりバンドの濃さが異なることから含まれるゲノムのコピー数が異なることがわかった。コピー数が最も多い細胞(4B10)には最も少ない細胞(4F3)に比べて10数倍の数のコピーが含まれている。3F9と4H1においてはJurkat細胞と同様、いかなるバンドも見いだされなかった。また、4A4においてはEco RI切断で4.8kb, Hind III切断で5.2kbのバンドも認められるのでプロウイルスゲノム内部においても組換えが起こったことがわかった。

5. 形質転換細胞におけるウイルスRNAの発現

形質転換細胞におけるウイルスRNAの発現の有無、並びにその大きさを調べるために、抽出した全RNAをホルムアルデヒド・アガロースゲル電気泳動した後、ノザン・ブロッティングし、

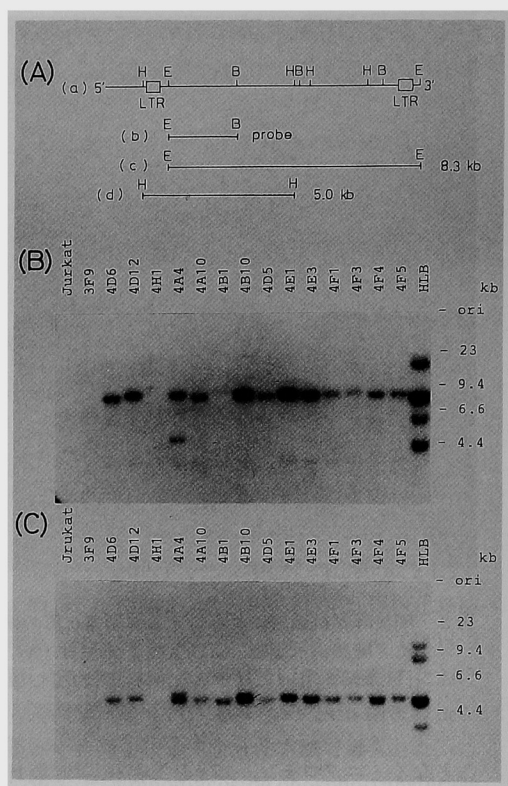


図4 形質転換細胞におけるプロウイルス DNA のサザン・ブロッティング法による解析

(A)プロウイルスゲノムの制限酵素地図(a), ハイブリダイゼーションに用いたプローブの位置(b), および、完全なウイルスゲノムが組込まれたとき検出されるサブゲノム Eco RI フラグメントおよびサブゲノム Hind III フラグメントを示す(cおよびd)。制限酵素の切断部位は次のように略した。

B: Bam HI, E: Eco RI, H: Hind III

(B), (C) 形質転換細胞より調製した高分子DNAをEco RI (B) または、Hind III (c) で完全に切断した。電気泳動後サザン・ブロットしハイブリダイゼーションを行った。各レーンの記号は各々の形質転換細胞の名前を示す。

ウイルスに特異的なDNA(図4(A))をプローブとして解析した(図5)ウイルス産生ヒトリンパ芽球様株化細胞においては35Sの大きさのRNAが発現していることが知られているが、完全なプロウイルスゲノムを保持している形質転換細胞においても35S RNAが発現していることが示された(図5)。その発現量は形質転換細胞

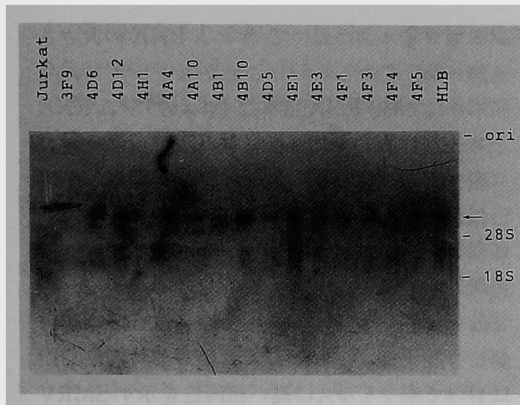


図5 形質転換細胞におけるウイルス RNA のノザン・プロット法による解析
形質転換細胞から抽出した RNA を電気泳動後、ノザン・プロットし、図4 (A) で示したプローブとハイブリダイゼーションを行った。矢印←は35S の位置を示す。各レーンの記号は各々の形質転換細胞の名前を示す。

に保持されているプロウイルスのコピー数に相関していた。プロウイルスゲノムが存在していない形質転換細胞(3F9, 4H1)においては Jurkat 細胞と同様、ウイルスに特異的な RNA の発現はみられなかった。

6. 形質転換細胞におけるウイルス蛋白質の発現

形質転換細胞におけるウイルス蛋白質の発現を調べるために抽出した蛋白質を SDS-PAGE で分離後、ウェスタン・プロットしたものを抗 p34 血清を用いて解析した(図6)。この抗血清はウイルス産生ヒトリンパ芽球様株化細胞において、主に p34 を認識するが²¹⁾、約75kDa の蛋白質とも反応する。完全なプロウイルスゲノムが保持されている形質転換細胞においては、抗体に特異的に反応するバンドとして、p34に相当する34kDa のもの以外に75kDa, 47kDa, 37kDa の大きさの蛋白質のバンドが認められた。特異的な蛋白質全体としての発現量はウイルスのコピー数(図4)と、RNA の発現量(図5)とに相関していた。各々の蛋白質の発現状態は細胞により異なるが、75kDa の蛋白質のみ発現されているもの(4D6, 4D12)、75kDa と47kDa の蛋白質が発現されているもの(4F4, 4F5)、47kDa, 37kDa, 34kDa の3種類の蛋白質が発現されているもの

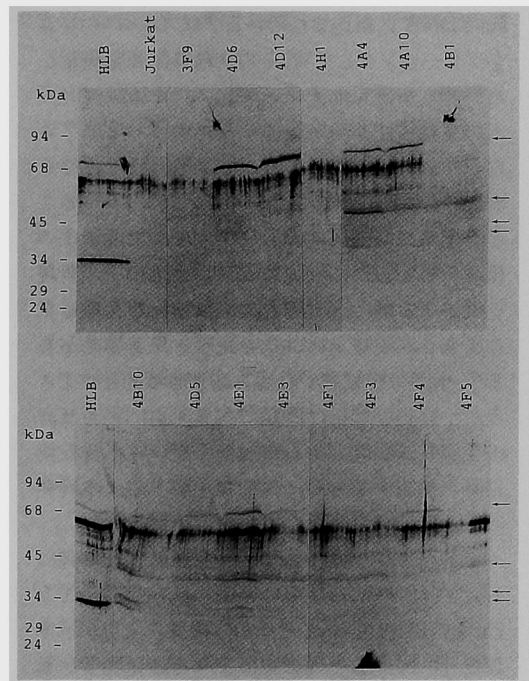


図6 形質転換細胞におけるウイルス蛋白質のウェスタン・プロット法による解析
形質転換細胞から抽出した蛋白質を電気泳動後、ウェスタン・プロットし抗 p34血清を用いて解析した。各レーンの記号は各々の形質転換細胞の名前を示す。抗血清に特異的に反応する蛋白質を矢印←で示す。

(4B1, 4F1, 4F3)、全ての蛋白質が発現されているもの(4A4, 4A10, 4B10, 4D5, 4E1, 4E3)に分類できる。プロウイルスゲノムが存在していない細胞(3F9, 4H1)においては Jurkat 細胞と同様、抗血清に特異的に反応する蛋白質は認められなかった。

考 察

最近、数種のヒトレトロウイルスが発見され、HTLV - I ^{2),3)}および HIV (LAV/HTLV - III/ARV) ^{6),7)}はそれぞれ成人T細胞白血病^{9)~11)}および獲得性免疫不全症候群(AIDS) ^{6),7),12)}の原因ウイルスであることが確定され、それらの発症機序の解明と治療法の開発が強く望まれている。Oda らはヒトリンパ芽球様株化細胞の一種より産生されるレトロウイルスを見だし²⁰⁾、その細

胞内 DNA に組込まれているプロウイルスゲノムをクローニングして²³⁾, その全塩基配列を決定した^{23)~25)}. 本研究はクローン化プロウイルスゲノムの生物活性を明らかにするために, そのプロウイルスゲノムをヒトリンパ球系株化細胞やその他の細胞へ DNA トランスフェクションすることによって細胞内に導入し, ウイルス遺伝子の発現を解析した. 細胞に導入した遺伝子の発現を観察する時, 一時的 (transient) な発現を見る場合と, 安定 (stable) な発現を見る場合がある³⁵⁾. 前者は短期間で発現を観察することができるが, 詳細な解析は困難である. 逆に後者は詳細な解析は可能であるが解析に用いる形質転換細胞を樹立するために長期間を要する. 本研究においては両者の場合について検討した.

まず, プロウイルスゲノムを導入した細胞において, 一時的な抗原の発現を観察したところ 1.1% の細胞においてウイルス抗原の発現が示された (図 3). 各々の細胞によりその発現量が異なるのは導入されたプロウイルスゲノムのコピー数が異なるためと考えられる. また, 抗原陽性細胞の割合が 1.1% と他の遺伝子導入例⁴²⁾ と大差がないことと時間的経過を考慮して, この抗原は導入されたプロウイルスゲノムから一次的に発現されたものであり, レトロウイルスの二次的感染によるものではないと考えられる.

次に, プロウイルス DNA を安定に保持した形質転換細胞を樹立するため, クローン化プロウイルスゲノムとネオマイシン耐性遺伝子を含む組換え分子を構築し, これを DEAE-デキストラン法で細胞に導入した後, G-418 で選択を行った²⁹⁾ (図 2). 樹立された形質転換細胞の DNA をサザン・ブロッティング法により解析したところ, いろいろなコピー数のプロウイルス DNA が細胞内に存在していることがわかった (図 4). 用いた DNA の抽出はプロウイルス DNA の導入後 2 ヶ月たって行ったものである. 従って, プロウイルス DNA が細胞内で安定に複製・保存されていることが強く示唆される.

完全なプロウイルスゲノムが存在する形質転換細胞においては, ウイルス産生ヒトリンパ芽球株化細胞と同様に 35S RNA が発現されていることが示された (図 5). 今まで知られている

レトロウイルスにおいて, ゲノム RNA の大きさは 34~38S であるということから^{1), 11), 43)~45)}, 今回示された 35S RNA は本ウイルスのゲノム RNA と考えられる. また, 蛋白質に関してはウイルス産生ヒトリンパ芽球株化細胞と同様, 主構造蛋白質である p34 の発現がみられたが, それ以外に 75kDa, 47kDa, 37kDa の p34 関連蛋白質の発現が示された (図 6). レトロウイルスにおいては gag 蛋白質前駆体として 63~78kDa の蛋白質が存在すること^{1), 46)~49)}, 特に一部の塩基配列において本ウイルスに高い相同性を示す SMRV では 72kDa の gag 蛋白質前駆体が存在すること⁵⁰⁾, また, ウイルス産生ヒトリンパ芽球株化細胞において p34 関連蛋白質として 75kDa の蛋白質が発現されていることから, 今回示された 75kDa の蛋白質は gag 蛋白質前駆体と考えられる. さらに SMRV においては, gag 蛋白質前駆体の中間分解産物として 47kDa の蛋白質が同定されているということから⁵⁰⁾, 今回示された 47kDa の蛋白質は前駆体の中間分解産物の可能性が高い. しかし, 37kDa の蛋白質に関しては中間分解産物かどうかは推定しがたい.

以上の結果から, ウイルス遺伝子産物の転写, 翻訳, およびその修飾は本プロウイルスゲノムのトランスフェクションにより樹立された形質転換細胞内においても行われていると考えられる. しかし, 電子顕微鏡により観察したところ, どの形質転換細胞においてもウイルス粒子の産生はみられなかった. ウイルス遺伝子産物と考えられる p34 関連蛋白質全体としての発現量はウイルス産生ヒトリンパ芽球株化細胞とあまり差がないにもかかわらず, ウイルス粒子形成が認められない原因は現在のところ不明である. HTLV-I においてもプロウイルス DNA のトランスフェクションによるウイルスの産生は知られていない. その原因追求はウイルス形成の機序の解明にも大きく関わることなので, 今後の研究に委ねたい.

マウスやニワトリのレトロウイルスにおいては, 分子生物学的手法を用いてプロテアーゼ領域の意味付け⁵¹⁾, エンドヌクレアーゼ領域の同定⁵²⁾, ゲノム RNA のパッケージングに必要な領域の同定⁵³⁾ など, ウイルスの生物活性に関する多

くの研究がなされてきた。さらに、クローン化されたウイルス DNA を利用してレトロウイルスベクターが開発され⁵⁴⁾、その応用が遺伝子治療の面でも高く評価されている。本研究においてはヒトリンパ芽球様株化細胞の産生するレトロウイルスの性状解析のひとつとして分子クローニングされたプロウイルスのヒトリンパ球系細胞内における遺伝子発現を調べたところ、クローン化プロウイルスゲノムが RNA ならびに蛋白質の生成において生物活性を有しているということが示された。このことは、本ウイルスがレトロウイルスベクター、特にヒトリンパ球系細胞へ遺伝子導入のできるベクターとして応用できる可能性を示唆している。

結 語

1. 分子クローニングされた SMRV-H プロウイルスゲノムの生物学的活性を調べるために、本プロウイルスを含む組換えプラスミドクローン (pSMH) およびさらにそれにネオマイシン耐性遺伝子を組込んだ組換えプラスミドクローン (pSMHneo) を DNA トランスフェクション法によりそれぞれイヌ胸腺由来株化細胞 (Cf2Th) とヒトリンパ球系株化細胞 (Jurkat) に導入し、ウイルス蛋白質の発現、および本プロウイルスゲノムの細胞 DNA への組込みとその遺伝子発現による mRNA と蛋白質の生成を調べた。
2. Cf2Th 細胞に pSMH をトランスフェクションし、間接酵素抗体法により蛋白質の一時的

(transient) な発現を調べたところ SMRV-H 関連抗原の発現が示された。

3. Jurkat 細胞に DEAE-デキストラン法により pSMHneo をトランスフェクションし、G-418 で選択することによりプロウイルス DNA が安定に保持された形質転換細胞を樹立した。さらにサザン・ブロット法によりプロウイルス DNA の細胞 DNA への組込みを証明し、その存在形式を解析した。
4. 完全なプロウイルスゲノムが保持されている形質転換細胞についてノザン・ブロット法により RNA を解析したところ、ウイルスゲノムに相当する 35S RNA の発現が示された。また、ウェスタン・ブロット法により蛋白質を解析したところ、ウイルス主構造蛋白質 p34 並びに p34 関連蛋白質の産生が示された。
5. 従って、イヌおよびヒト細胞へ導入されたクローン化プロウイルスゲノムはウイルスの RNA と蛋白質の発現において、生物学的活性を有していることが示された。さらに、本プロウイルスは、ヒトリンパ球系細胞へ遺伝子導入のできるベクターとして応用できる可能性が示唆された。

本研究の遂行および論文の作成にあたり終始、御指導と御校閲を賜りました恩師、小田琢三教授に深く感謝いたします。また、実験遂行、論文作成にあたり終始快く御協力いただきました教室の皆様から御礼申し上げます。

文 献

- 1) Weiss R, Teich N, Varmus H and Coffin J : Molecular Biology of Tumor Viruses, 2nd Ed, RNA Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982).
- 2) Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD and Gallo RC : Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA (1980) 77, 7415-7419.
- 3) Poiesz BJ, Ruscetti FW, Reitz MS, Kalyanaraman VS and Gallo RC : Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sézary T-cell leukaemia. Nature (1981) 294, 268-271.
- 4) Gallo RC and Reitz MS : Human retroviruses and adult T-cell leukemia-lymphoma. J Natl Cancer Inst (1982) 69, 1209-1214.

- 5) Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Blayney D, Golde D and Gallo RC : A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* (1982) **218**, 571—573.
- 6) Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axlar-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W and Montagnier L : Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* (1983) **220**, 868—871.
- 7) Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, White G, Foster P and Markham PD : Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* (1984) **224**, 500—503.
- 8) Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, Klatzmann D, Champalimaud JL and Montagnier L : Isolation of a new human retrovirus from west african patients with AIDS. *Science* (1986) **233**, 343—346.
- 9) Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita KI, Shirakawa S and Miyoshi I : Adult T-cell leukemia : Antigen in an ATL cell line detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci USA* (1981) **78**, 6476—6480.
- 10) Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraishi Y, Nagata K and Hinuma Y : Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T-cells. *Nature* (1981) **294**, 770—771.
- 11) Yoshida M, Miyoshi I and Hinuma Y : Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA* (1982) **79**, 2031—2035.
- 12) Ratner L, Gallo RC and Wong-Staal F : HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. *Nature* (1985) **313**, 636—637.
- 13) Wong-Staal F and Gallo RC : Human T-lymphotropic retroviruses. *Nature* (1985) **317**, 395—403.
- 14) Miyoshi I, Yoshimoto S, Fujishita M, Taguchi H, Kubonishi I, Niiya K and Minezawa M : Natural adult T-cell leukaemia virus infection in Japanese monkeys. *Lancet* (1982) **ii**, 658.
- 15) Daniel MD, Letvin NL, King NW, Kannagi M, Sehgal PK, Hunt RD, Kanki PJ, Essex M and Desrosiers RC : Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* (1985) **228**, 1201—1204.
- 16) Marx PA, Maul DH, Osborn KG, Lerche NW, Moody P, Lowenstine LJ, Henrickson RV, Arthur LO, Gilden RV, Gravell M, London WT, Sever JL, Levy JA, Munn RJ and Gardner MB : Simian AIDS : Isolation of a type D retrovirus and transmission of the disease. *Science* (1984) **223**, 1083—1086.
- 17) Power MD, Marx PA, Bryant ML, Gardner MB, Barr PJ and Luciw PA : Nucleotide sequence of SRV-1, a type D simian acquired immune deficiency syndrome retrovirus. *Science* (1986) **231**, 1567—1572.
- 18) Marx PA, Bryant ML, Osborn KG, Maul DH, Lerche NW, Lowenstine LJ, Kluge JD, Zaiss CP, Henrickson RV, Shiigi SM, Wilson BJ, Malley A, Olson LC, McNulty WP, Arthur LO, Gilden RV, Barker CB, Hunter E, Munn RJ, Heidecker G and Gardner MB : Isolation of a new serotype of simian acquired immune deficiency syndrome type D retrovirus from celebes black macaques (*Macaca nigra*) with immune deficiency and retroperitoneal fibromatosis. *J Virol* (1985) **56**, 571

—578.

- 19) Letvin NL, Eaton KA, Aldrich WR, Sehgal PK, Blake BJ, Schlossman SF, King NW and Hunt RD : Acquired immunodeficiency syndrome in a colony of macaque monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* (1983) **80**, 2718—2722.
- 20) Oda T, Hatsushika M, Watanabe S, Ikeda S, Sumii H, Arakaki Y, Nakamura T, Tsutsui K, Seki S, Akiyama K, Wada T, Nakashima A, Suma F and Murakami M : Immunoelectron microscopic and immunoblotting analyses of a retrovirus produced in a human lymphoblastoid cell line with a monoclonal antibody. *Cell Mol Biol* (1986) **32**, 343—350.
- 21) 初鹿雅男 : ヒトリンパ芽球様株化細胞産生レトロウイルスの主構造蛋白質の解析 : モノクローナル抗体の作成とN末端領域アミノ酸配列の分析. *岡山医誌* (1987) **99**, 1117—1129.
- 22) 池田正五, 秋山公祐, 和田 務, 光延文裕, 初鹿雅男, 渡辺晰子, 小田琢三 : 発現ベクターによるレトロウイルス構成タンパク質遺伝子のクローニング. *生化学* (昭和61年) **58**, 432.
- 23) Oda T, Ikeda S, Watanabe S, Hatsushika M, Akiyama K, Mitsunobu F and Wada T : Molecular cloning and genetic structure of proviral DNA of a retrovirus produced in a human lymphoblastoid cell line : in *Proceedings of the Seventh Seminar on Science and Technology "Molecular Biology"*, Okayama, 1987, The Interchange Association, Tokyo, in press.
- 24) Oda T, Ikeda S, Watanabe S, Akiyama K, Mitsunobu F and Hatsushika M : Molecular cloning and genetic structure of the proviral DNA of a retrovirus produced in a human lymphoblastoid cell line. *日本癌学会総会記事第46回* (昭和62年) 97頁.
- 25) 小田琢三, 池田正五, 渡辺晰子, 初鹿雅男, 秋山公祐, 光延文裕, 和田 務 : ヒトリンパ芽球様株化細胞産生レトロウイルスの遺伝子構造解析. *生化学* (1987) **59**, 950.
- 26) Chiu IM, Callahan R, Tronick SR, Schlom J and Aaronson SA : Major *pol* gene progenitors in the evolution of oncoviruses. *Science* (1984) **223**, 364—370.
- 27) Chiu IM and Skuntz SF : Nucleotide sequence analysis of squirrel monkey retrovirus reveals a novel primer-binding site for tRNA_{Lys}³. *J Virol* (1986) **58**, 983—987.
- 28) Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A and Martin MA : Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* (1986) **59**, 284—291.
- 29) Southern PJ and Berg P : Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* (1982) **1**, 327—341.
- 30) Hanahan D : Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* (1983) **166**, 557—580.
- 31) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J : Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982).
- 32) Graham R and Van der Eb A : A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* (1973) **52**, 456—467.
- 33) Sompayrac LM and Danna KJ : Efficient infection of monkey cells with DNA of simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci USA* (1981) **78**, 7575—7578.
- 34) Kondo S, Shimizu A, Maeda M, Tagaya Y, Yodoi J and Honjo T : Expression of functional human interleukin-2 receptor in mouse T cells by cDNA transfection. *Nature* (1986) **320**, 75—77.
- 35) Glover DM : DNA cloning, vol II, a practical approach, IRL press, Oxford (1985) pp 143—190.
- 36) Auffray C and Rougeon F : Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs

- from total myeloma tumor RNA. *Eur J Biochem* (1980) **107**, 303—314.
- 37) Reed KC and Mann DA : Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Res* (1985) **13**, 7207—7221.
- 38) Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C and Berg P : Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* (1977) **113**, 237—251.
- 39) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) **227**, 680—685.
- 40) Towbin H, Staehelin T and Gordon J : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* (1979) **76**, 4350—4354.
- 41) Reeves R, Gorman CM and Howard B : Minichromosome assembly of nonintegrated plasmid DNA transfected into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* (1985) **13**, 3599—3615.
- 42) Gorman CM, Merlino GT, Willingham MC, Pastan I and Howard BH : The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* (1982) **79**, 6777—6781.
- 43) Weiss SR, Varmus HE and Bishop JM : The size and genetic composition of virus-specific RNAs in the cytoplasm of cells producing avian sarcoma-leukosis viruses. *Cell* (1977) **12**, 983—992.
- 44) Mueller-Lantzsch N and Fan H : Monospecific immunoprecipitation of murine leukemia virus polyribosomes : Identification of p30 protein-specific messenger RNA. *Cell* (1976) **9**, 579—588.
- 45) Manzari V, Wong-Staal F, Franchini G, Colombini S, Gelmann EP, Oroszlan S, Staal S and Gallo RC : Human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV) : Cloning of an integrated defective provirus and flanking cellular sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* (1983) **80**, 1574—1578.
- 46) Vogt VM and Eisenman R : Identification of a large polypeptide precursor of avian oncornavirus proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* (1973) **70**, 1734—1738.
- 47) Jamjoom GA, Naso RB and Arlinghaus RB : Further characterization of intracellular precursor polyproteins of Rauscher leukemia virus. *Virology* (1977) **78**, 11—34.
- 48) Dickson C and Atterwill M : Polyproteins related to the major core protein of mouse mammary tumor virus. *J Virol* (1978) **26**, 660—672.
- 49) Sacks TL, Devare SG, Blennerhassett GT and Stephenson JR : Nonconditional replication mutants of type C and type D retroviruses defective in *gag* gene-coded polyprotein post-translational processing. *Virology* (1978) **91**, 352—363.
- 50) Devare SG and Stephenson JR : Primate retroviruses : Intracistronic mapping of type D viral *gag* gene by use of nonconditional replication mutants. *J Virol* (1979) **29**, 1035—1043.
- 51) Crawford S and Goff SP : A deletion mutation in the 5'part of the *pol* gene of Moloney murine leukemia virus blocks proteolytic processing of the *gag* and *pol* polyproteins. *J Virol* (1985) **53**, 899—907.
- 52) Schwartzberg P, Colicelli J and Goff SP : Construction and analysis of deletion mutations in the *pol* gene of Moloney murine leukemia virus : A new viral function required for productive infection. *Cell* (1984) **37**, 1043—1052.
- 53) Mann R and Baltimore D : Varying the position of a retrovirus packaging sequence results in the encapsidation of both unspliced and spliced RNAs. *J Virol* (1985) **54**, 401—407.
- 54) Mann R, Mulligan RC and Baltimore D : Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* (1983) **33**, 153—159.

**Gene expression of a cloned provirus genome transfected
in a human lymphoblastoid cell line**

Kosuke AKIYAMA

Department of Biochemistry, Cancer Institute,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. T. Oda)

To clarify the biological activity of the cloned provirus genome of a retrovirus produced in a human lymphoblastoid cell line, the cloned genome was introduced into cultured cell lines by DNA transfection techniques, and the viral gene products were analyzed. The transient expression of virus-related antigens was detected immunocytochemically in a canine thymus cell line two days after the introduction of the cloned provirus genome. Stable transfectants of a human lymphoblastoid cell line (Jurkat) were established by introducing recombinant molecules constructed with the provirus genome and neomycin resistance gene and by selecting with G-418. Southern blotting analysis showed that the full-length provirus genome was integrated into these cellular DNA. The provirus genome-containing transfectants were shown to express 35S RNA, which was thought to be viral genome RNA, by Northern blotting analysis. Western blotting analysis showed that the viral major structural protein p34 and p34-related proteins were expressed in these transfectants. These data indicate that this cloned provirus genome encodes viral RNA and proteins and suggest that this provirus genome could be useful for the introduction of various genes and the analysis of their expression in human lymphoblastoid cell lines.