

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月18日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580104

研究課題名（和文）遺伝子サイレンシングを受けない万能型レトロウイルスベクターの開発

研究課題名（英文）Development of novel retroviral vectors showing no gene silencing effect

研究代表者

三宅 克英 (MIYAKE KATSUhide)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：90252254

研究成果の概要（和文）：レトロウイルスのインテグラーゼ（IN）および逆転写酵素は、ウイルス感染に必要な不可欠な酵素である。本研究では、モロニーマウス白血病ウイルスのこれらの酵素が、前骨髄性白血病(PML)タンパク質と相互作用することが明らかとなった。また、INはSUMO化を受けることが明らかとなり、PMLはSUMO化蛋白質と親和性が高いことが知られている。従って、INのSUMO化が不可欠と予想したが、PMLとの相互作用には影響を与えないことが分かった。さらに、ウイルス感染実験により、ウイルス感染におけるPMLの重要性が明らかとなった。また別のSUMO化酵素でもあり、ポリコム染色体抑制因子の一つでもあるPc2がINと結合することもわかり、そのサイレンシングへの効果も示唆された。

研究成果の概要（英文）：**Pulldown assay and coimmunoprecipitation of cell extracts in which the integrase or reverse transcriptase of Moloney murine leukemia virus was transiently expressed showed that both enzymes interacted with PML proteins. In infected cells, interaction between the integrase and PML was also observed. Transient expression of PIASy and SUMO proteins facilitated SUMOylation of the integrase but had no apparent effects on the interaction with PML. A FLAG-tagged integrase colocalized with PML protein possibly in the PML body. Knockdown of PML by small interfering RNA resulted in reduced viral cDNA levels and integration efficiency. This suggested that PML proteins activated reverse transcription. Furthermore, we discovered direct interaction between the integrase and polycomb protein, Pc2.**

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：SUMO・インテグラーゼ・レトロウイルス・PIASy・Pc2・MLV・PML

1. 研究開始当初の背景

当初、トランスジェニックニワトリの効率的な作製技術の開発というテーマで研究を展開しており、その一環として本研究課題に取り組むこととした。なぜならば、トランスジェニックニワトリの作製においては常に導入遺伝子のサイレンシングが問題となるからである。特にレトロウイルスを利用した場合にはその現象が顕著となる。我々はこの現象がレトロウイルスの DNA 組み込み酵素インテグラーゼに由来するのではないかと予想していた。それまでもインテグラーゼが普遍的な転写因子である YY1 と相互作用することを発見していた。しかし、YY1 は転写を活性化も抑制もする能力を示すため、単純に遺伝子サイレンシングと関連づけることはできなかった。真核生物における遺伝子発現は転写因子だけではなくクロマチン構造制御因子によっても影響を受ける。例えばヒストンアセチル化、メチル化、ユビキチン化、SUMO 化や DNA のメチル化などの修飾や ATP 依存的クロマチンリモデリング因子やポリコム因子などのクロマチン構造自体を変化させるものなどがある。従ってこうした染色体構造変換因子に関してもサイレンシングとの関係を調べる必要性があった。そこでこれらの因子の中で転写の抑制に関係すると思われる SUMO 化に関連する因子やポリコム因子のインテグラーゼとの相互作用を調べることにした。

2. 研究の目的

トランスジェニック鳥類を作製する際に用いられるレトロウイルスベクターを改良するために、レトロウイルスに関する基礎研究を行った。特に改良点として DNA 挿入酵素インテグラーゼに着目している。インテグラーゼの改良は DNA 挿入効率の向上や導入遺伝子のサイレンシング防止などウイルスベクターの性能向上につながるため非常に重要である。本研究ではインテグラーゼと核内 PML ボディの主要構造タンパク質 PML との相互作用、染色体抑制因子ポリコム複合体の Pc2 蛋白質との相互作用及びインテグラーゼの SUMO 化翻訳後修飾について解析した。これらの因子はすべて転写の抑制に関連していることが

報告されており、もしこの研究によりインテグラーゼとの相互作用が明らかになれば、サイレンシングにおいてその相互作用が何らかの役割を果たしていることが証明できる。さらに詳細な結合解析により、インテグラーゼのどの部位が結合に寄与しているのかを解明することも重要である。その情報を利用してインテグラーゼを改良し、上記の転写抑制因子と結合できないインテグラーゼを作製することも可能になるからである。本研究は最終的にはインテグラーゼをサイレンシング関連蛋白質と相互作用できないように改変し、サイレンシングを受けない優れたレトロウイルスを作製することを目的とした。

3. 研究の方法

サイレンシングの原因を調べるために、本研究ではまずレトロウイルスのインテグラーゼが SUMO 化修飾を受けるかどうかを調べる。材料となるインテグラーゼはマウスモロニー白血病ウイルス (MoMLV) 由来のものを用いた。培養細胞 293FT において、MLV インテグラーゼと SUMO、SUMO リガーゼとして知られる PIASy を強制発現させ、インテグラーゼの SUMO 化を調べた。

次にインテグラーゼと SUMO 化酵素 PIASy、ポリコム因子 Pc2、そして SUMO 化蛋白質と細胞内で相互作用することの多い PML 蛋白質の結合を *in vitro* 及び *in vivo* の両方で調べた。またその際、SUMO 化によってインテグラーゼと PML の相互作用が影響を受けるかどうかも検討した。さらに PML との結合に関しては、強制発現させたもの同士の実験だけでなく、実際に MLV を細胞に感染させた状況においても実験を行った。

最後に本研究で明らかにした PML や Pc2 のインテグラーゼとの相互作用がどのような役割を果たすのかを解析するために、siRNA 法によってこれらの蛋白質をノックダウンした細胞に MLV を感染させて、感染能力、ゲノムへの組み込み (インテグレーション能力)、発現 (サイレンシング) 等を検討した。

4. 研究成果

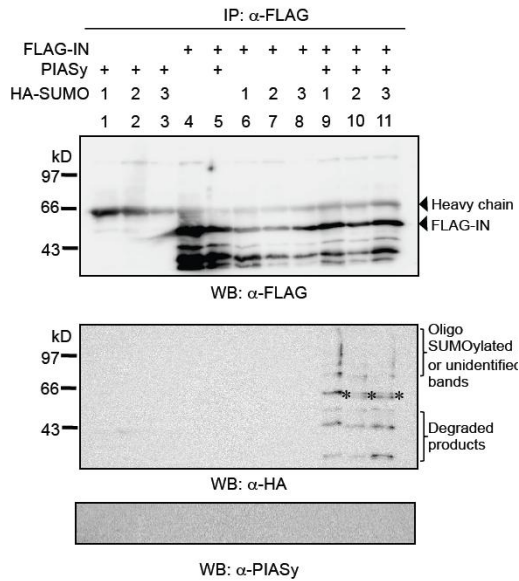


図1 インテグラーゼのSUMO化

まず、インテグラーゼのSUMO化が可能なのかを調べるために、293FT細胞にFLAGタグを付与したMLVインテグラーゼ、HAタグを付けたSUMO-1, -2, -3各因子、PIASyを発現させてインテグラーゼのSUMO化を解析した。抗FLAG抗体でインテグラーゼを免疫沈降し、そのSUMO化を抗HA抗体によるウェスタンブロットにより調べた。結果を図1に示す。FLAG抗体を用いたウェスタンブロットによるインテグラーゼの検出ではSUMO化されたものは検出できなかったが、HA抗体によりSUMO化インテグラーゼが検出できた。SUMO化はPIASy共存化でのみ起こり、またSUMO-1, -2, -3各因子間での違いは観察できなかった。この結果によるとSUMO化自体は確かに起こっているが、インテグラーゼを認識する抗体ではSUMO化インテグラーゼが検出できていないため、SUMO化の比率はそれほど高くないのではないかと考えられる。ま

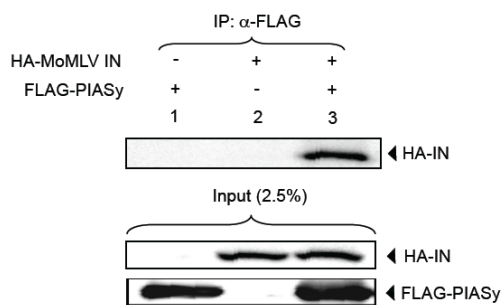


図2 インテグラーゼとPIASyの結合

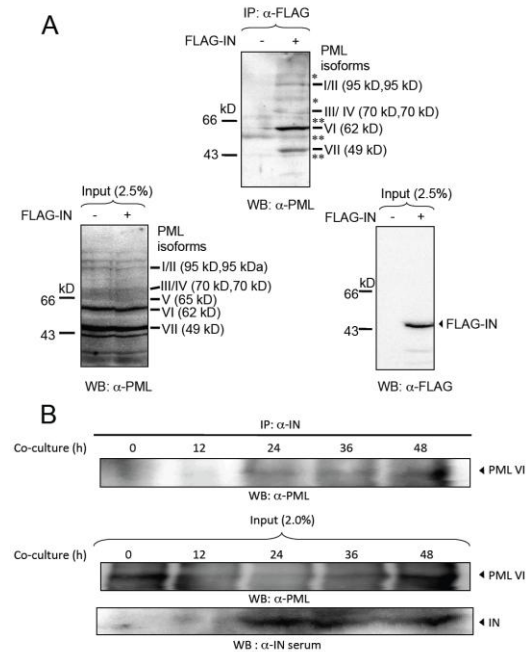


図3 インテグラーゼとPML蛋白質の相互作用

た、複数のSUMOで修飾されたインテグラーゼのバンドも見られたので、SUMO化部位はインテグラーゼの数カ所に存在しているものと予想された。本研究ではSUMO化部位の同定には至らなかったが、今後同定に成功すれば、アミノ酸置換によってSUMO化できないインテグラーゼを作製し、SUMO化の機能を解明することができる。

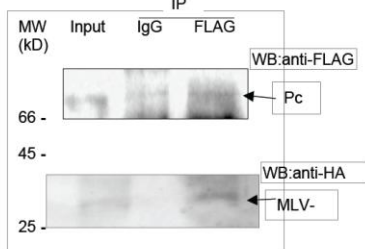
本実験でインテグラーゼのSUMO化を確認できたので、次にSUMO化関連蛋白質との相互作用を調べてみた。まずSUMO化酵素であるPIASyに関しては、293FT細胞での強制発現実験で免疫共沈を行った。図2に示すように明らかな結合を観察した。これはSUMO化反応では結合する必要があるので当然の結果と思われる。続いてSUMO化された蛋白質の集結する細胞内PML複合体の主要成分PML蛋白質との相互作用の確認を行った。インテグラーゼとPML蛋白質の相互作用を図3に示す。図3のAはFLAGタグ融合MLVインテグラーゼを293FT細胞に発現させ抗FLAG抗体で免疫沈降し、共沈してくるPML蛋白質があるか調べたものである。その結果、多くの分子種のPMLが沈殿してくることが判明した。PMLは分子量の異なる複数の分子種がスプライシングによって存在し、それらが集まってPMLボディと呼ばれる大きな構造体を形成する。検出されたPMLはPML I, II, III, IV, VI, VIIであり、インテグラーゼがPMLボディと結合していることを強く示唆するものであった。またこの結合が生理的に意味のあるものであることを示すためには実際のウイルス感染時にも結合が観察されなければなら

ない。それを確認したのが図3のBである。これは MoMLV を感染させた細胞からインテグラーゼを免疫沈降して PML との相互作用を見たものである。感染24時間以降に結合が観察されている。従って、この結合はなんらかの意味を持っている可能性が高い。

我々はまた染色体抑制因子であるポリコム複合体の構成因子とインテグラーゼの結合も解析した。HA タグを付与したインテグラーゼと FLAG タグを付与したポリコム複合体の構成因子 Pc2 と Bmi1 を 293FT 細胞に発現させて、抗 HA タグ抗体で免疫沈降したとこ

IP: HA-tagged MLV integrase + FLAG-tagged Pc2/FLAG-tagged Bmi1

I) HA-tagged MLV integrase + FLAG-tagged Pc2



II) HA-tagged MLV integrase + FLAG-tagged Bmi1

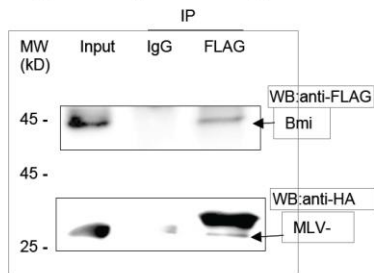


図4 インテグラーゼとポリコム因子の結合

ろ、両者とも共沈することがわかった。

ここまで記してきたようにレトロウイルスのインテグラーゼはこれまで報告があった転写因子だけでなく、いくつかの細胞内蛋白質、特に転写抑制に関連する因子に結合することが明らかとなった。その生理的な意味を解析するために、PML 蛋白質と Pc2 蛋白質の発現を siRNA によってノックダウンし、そこに MoMLV を感染させて、感染力、発現、ゲノムへの挿入を調べた。その結果、PML ノックダウン細胞においては、感染（ウイルス DNA の量、図 5 B）、核移行（図 5 C）、ゲノムへの組み込み（図 5 D）のすべてのステップで顕著な阻害が検出された。このことは PML の役割が感染のかなり初期に関係しており、それがすべてのステップでの数値の減少に現れているのではないかと予想された。そこで次にインテグラーゼが機能する前の段階で重要な働きを担う逆転写酵素（RT）に着目した。RT と PML の結合を免疫共沈で調べたところ、in vivo でも in vitro でも明らかな結合が検出された。これは PML の関与がウイルス感染前期の

初期から始まっていることを明確に示してい

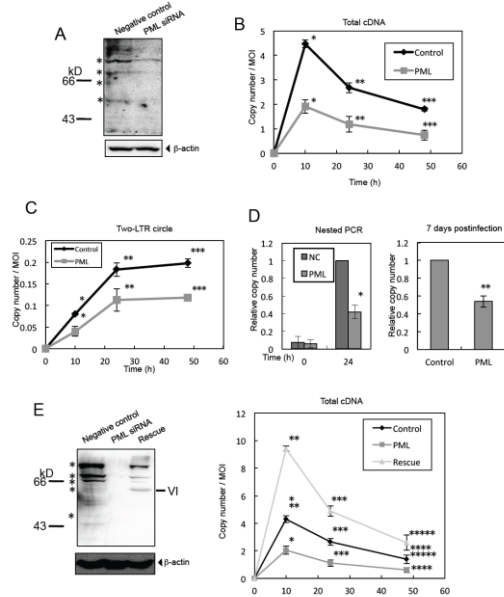


図5 PMLノックダウン時のウイルス感染

る。詳細なメカニズムを知るためには今後のさらなる解析が必要であろう。

一方、Pc2 ノックダウンの効果を図7に示した。結果を見ると Pc2 ノックダウンによってゲノムへのウイルス DNA の組み込みは変化していないにもかかわらずウイルスにコードされた GFP の発現は有意に上昇していた。これは Pc2 がレトロウイルスの遺伝子発現を抑制することを示唆するものであった。ポリコム複合体がサイレンシングに関わっていることを示している。

本研究課題の研究成果により、レトロウイルスインテグラーゼが PML や Pc2 といった核

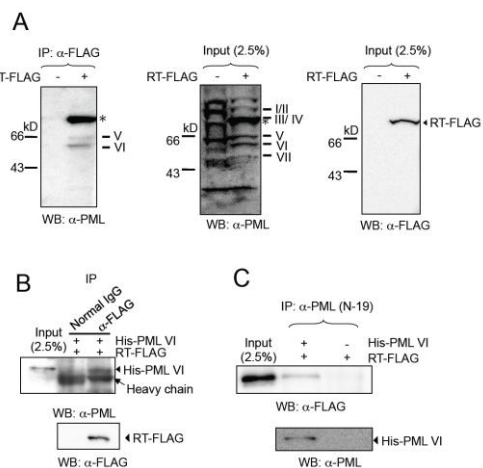


図6 逆転写酵素とPMLの相互作用

内巨大複合体と相互作用することが新たに示された。このうち PML は逆転写酵素とも結合

しており、ウイルスのサイレンシングではなく、もっと初期の感染ステップで機能しているものと思われる。ポリコム複合体の Pc2 に関しては、サイレンシングに關与する可能性が示されており、サイレンシングを受けないレトロウイルス作製のための重要な知識的基盤を作ることができたと考えている。

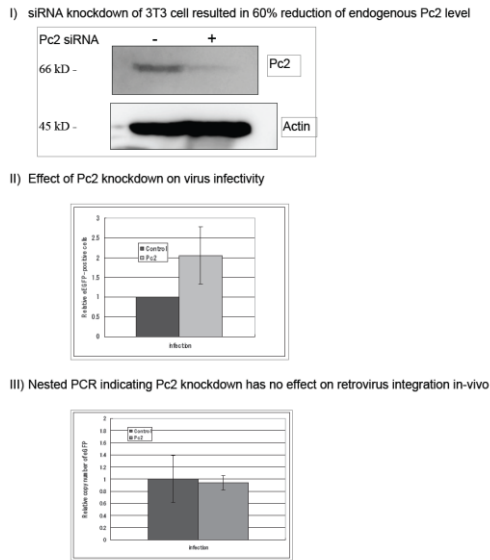


図7 Pc2 ノックダウンのウイルス感染に対する効果

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Y. Okino, Y. Inayoshi, Y. Kojima, S. Kidani, H. Kaneoka, A. Honkawa, K. Nishijima, K. Miyake, and S. Iijima. 2012. Moloney murine leukemia virus integrate and reverse transcriptase interact with PML proteins. *J. Biochem.* 152: 161-169.
- ② D. Kodama, D. Nishimiya, K. Nishijima, Y. Okino, Y. Inayoshi, Y. Kojima, K. Ono, M. Motono, K. Miyake, Y. Kawabe, K. Kyogoku, T. Yamashita, M. Kamihira, and S. Iijima. 2012. Chicken oviduct-specific expression of transgene by a hybrid ovalbumin enhancer and the Tet expression system. *J. Biosci. Bioeng.* 113: 146-153.
- ③ Akifumi Mizutani, Hiroyuki Tsunashima, Ken-ichi Nishijima, Takako Sasamoto Yuki Yamada, Yasuhiro Kojima, Makoto Motono, Jun Kojima, Yujin Inayoshi, Katsuhide Miyake, Enoch Y. Park, Shinji Iijima
Transgenic Research vol. 21, 63-75 (2012). DOI 10.1007/s11248-011-9511-0 (2011)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 三宅克英・沖野雄気・小島佑介・木溪俊介・西島謙一・飯島信司. 2012. レトロウイルスインテグラーゼと核内タンパク質PMLの相互作用とその機能. 日本農芸化学会2012年度大会. 3月22～26日. 京都女子大学.
- ② M. Tsuge, H. Kaneoka, S. Kidani, Y. Masuda, K. Miyake and S. Iijima. 2012. The new target of sumoylation on UV irradiation. The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2012). 11月27～30日. 名古屋国際会議場.
- ③ 柘植真亜沙・金岡英徳・木溪俊介・増田裕介・三宅克英・飯島信司. 2012. UV照射時における新たなSUMO化の可能性. 第35回日本分子生物学会年会. 12月11～14日. 福岡国際会議場.
- ④ 沖野雄気、木溪俊介、小島佑介、三宅克英、稲吉勇仁、西島謙一、飯島信司. 2011. レトロウイルスインテグラーゼのSUMO化とその役割. 第63回日本生物工学会大会. 9月26～28日. 東京農工大学.
- ⑤ 西島謙一、水谷昭文、元野誠、綱島裕之、山田裕貴、三宅克英、飯島信司. 2011. ニワトリ卵白蛋白質におけるN結合型糖鎖付加能の解析. 第63回日本生物工学会大会. 9月26～28日. 東京農工大学.

[図書] (計 1 件)

- ① 三宅克英・金岡英徳・西島謙一・飯島信司. 2012. トランスジェニックニワトリ作製のための新規DNA導入法の開発. Nagoya University eブックシリーズ、1: 32-35.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 克英 (MIYAKE KATSUhide)
石川県立大学・生物資源工学研究所・教授

研究者番号: 90252254