

活性型内在性レトロウイルス遺伝子の包括的単離と多因子疾患への関わり

●小田 高也¹⁾ ◆島袋 充生²⁾

1) 琉球大学大学院医学研究科生命統御医科学分野 2) 琉球大学医学部内分泌代謝内科学

〈研究の目的と進め方〉

ヒト内在性レトロウイルス (HERV) の遺伝性疾患への関わりを明らかにすることを目的とする。広範なHERVに対応するためデータベース解析による絞り込みを行い、これをRT-PCR & sequencingで確認し、次にノーザン解析により主な発現組織と転写産物のサイズを把握してcDNA libraryのスクリーニングに進むという活性型HERV同定法を基にする。

〈2001年度の研究の当初計画〉

活性型HERV遺伝子を単離すること、および既に単離済みのHERV-E遺伝子 (ERVE1) の機能解明を進める。

〈2001年度の成果〉

1. 活性型HERV遺伝子同定およびcDNA単離 (family毎に記載)

HERV-E：膵臓組織由来のplasmid library (50万コピー) のスクリーニングをlow stringencyで行い、既に別の方法で単離済みのERVE1が膵臓では優位に発現していることを確認した。

ERV3/HERV-R：胎盤RNAの解析で専ら7q11.21 locus由来の既知の転写産物が同定された。

ERV9：胎盤で強く発現している特定のlocusは認めなかった。

HERV-H：ノーザン解析で、gag, pol, envを含むfull-lengthの約7 kbの転写産物が胎盤特異的に認められた。これは7q31.1-q31.3に座位を持つHERV-H由来であることを確認した。

2. 膵臓・甲状腺特異的新規HERV遺伝子 (ERVE1) の機能解明

膵臓および甲状腺に特異的に発現するERVE1遺伝子からの主な転写産物は3.3 kbのenvを含むスプライス型であり、その核酸塩基配列から2つのORFが予想された。in vitro解析により以下のことを明らかにした。

in vitro transcription-translationおよびflag (-fusion) 蛋白合成により、5'側に位置するORFからの25 kDaの蛋白合成を確認した。

GFP-fusion蛋白による局在解析では、細胞質内にやや顆粒状に局在するのが観察された。

N末に疎水性アミノ酸配列が存在すること及びPSORTで(細胞壁を含む)細胞外局在が予測されたが、上清からは検出されなかった。

Yeast two-hybridで膵臓組織由来のクローン (2.6x10⁶) をスクリーニングした結果、Nogo receptor 2クローンが陽性と判断された。

Nogo receptorは脳で豊富に発現していたが、次いで膵臓および肝臓での発現を確認した。

3. IDDMK1,2-22と1型糖尿病の関連研究

スーパー抗原をコードする領域にアミノ酸置換を伴う多型 (A to G transition) を見出し、77例の1型糖尿病患者と54例の対照者でIDDMK1,2-22と1型糖尿病の関連性を検討した。Gの出現頻度が患者群で多かったが有意差

は得られなかった。しかし発症様式あるいは発症時期でサブグループ化すると5才未満発症の早期型 (n=24) で弱い有意の増加 (p=0.03) が認められた。

〈国内外での成果の位置づけ〉

この研究課題はHERVの生理的機能・医学的意義を明らかにすることを最終目標としているが、これまでのHERV研究 (特に発現解析) がfamily単位で進められてきたことに対し、memberあるいはlocus特異的に記述する整備作業の役目をも果たしている。このことはHERVの制御機構を追求する上でも意義がある。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

データベース解析結果の確認実験に時間を要し、いくつかのHERVファミリーが解析途中となった。(2001年度中に成果として公表できなかった関連解析データは、2002年度以降の成果として論文リストに追加) また、データベース解析からノーザン解析まではある程度パラレルに行くことは確認しているが、スクリーニングで必ずしも予想される結果が得られない事を経験した。

〈今後の課題〉

遺伝子単離をより効率的に進める上で、library化によるバイアスを避けるためPCRベースの手法を主として用いることを検討する必要があると思われる。

〈成果公表リスト〉

論文

1. Search for active endogenous retroviruses: identification and characterization of a HERV-E gene that is expressed in the pancreas and thyroid. Shiroma T., Sugimoto J., Oda T., Jinno Y., and Kanaya F. *J Hum Genet* 46: 619-625. 2001.

2. Human endogenous retroviruses with transcriptional potential in the brain. Nakamura A., Okazaki Y., Sugimoto J., Oda T., and Jinno Y. *J Hum Genet* 48: 575-581. 2003.

3. Expression analyses of human endogenous retroviruses (HERVs): tissue-specific and developmental stage-dependent expression of HERVs. Okahara G., Matsubara S., Oda T., Sugimoto J., Jinno Y., and Kanaya F. *Genomics* 84: 982-990. 2004.