


論 文 要 旨

論 文 題 目

Search for active endogenous retroviruses: identification and characterization of a HERV-E gene that is expressed in the pancreas and thyroid

(活性型内在性レトロウイルスの探索： 膵臓および甲状腺に
発現する HERV-E 遺伝子の同定と特性について)

氏名 城 明 隆 史 

目的：ヒト内在性レトロウイルス (HERV) の生理的機能、多因子病との関わり及び進化的役割解明の第一歩として、活性型 HERV 遺伝子を単離・同定する。

方法：1. 活性型 HERV-E の同定。先に考案した方法 (RT-PCR 産物各クローンの塩基配列解析ならびに変異パターンによるグループ化) を応用した。RT-PCR には胎盤より抽出・精製した poly(A)⁺RNA を用いた。膀胱 cDNA は Marathon-Ready cDNA (Clontech) を使用した。プライマーは *env* 領域に設定した。

2. genomic clone 単離、塩基配列決定及び染色体局在決定。活性型 HERV-E (*ERVE1*) に特異的な 18-nt のアンチセンス・オリゴプローブを用いてコスミドライブラリーをスクリーニングした。単離したコスミドクローンの制限酵素地図を作製しサブクローニングして、全塩基配列を決定した。更に、Stanford G3 RH panel を用いて *ERVE1* の局在を決定した。

3. mRNA 解析：Multiple Tissue Northern blot

(Clontech)を用いて、*ERVE1* の発現を解析した。3'及び5'RACE等のRT-PCRによりcDNAを合成し、転写産物の構造解析を行った。また、*in vitro* transcription-translation法でタンパク合成能を検討した。

結果：1. 活性型 HERV-E の同定。配列解析したRT-PCR29クローンのうち、24個が同一ローカス由来と判断された。これに対し、genomic PCRでは解析した28クローンに14種類の配列（ローカス）が検出された。脾臓のcDNAでは、30クローン中29クローンが胎盤と同じローカス由来のものであった。

2. *ERVE1* 遺伝子単離及び染色体局在。単離した*ERVE1*は、全長8.8 kbで、両端を495-bpのLTRで囲まれる典型的なプロウイルスの構造を保持していた。*gag*及び*pol*領域は比較的長いopen reading frame(ORF)が存在したが、複数のstop codon変異のためintactなウイルス粒子形成は無いと推測された。*ERVE1*は17q11にマップされた。

3. ERVE1 発現解析. *env* プローブで膵臓及び甲状腺に 3.3 kb のシグナルが検出された。*pol* プローブでは膵臓に 4.1 kb の弱い発現が認められた。これらに附随して 500~600 nt 大きい弱いシグナルが検出された。*gag* プローブではシグナルは検出されなかった。LTR プローブは *env* と *pol* プローブの結果を反映するものであった。3.3 kb の cDNA には 219 アミノ酸をコードする ORF があり、予測される大きさと一致する 25 kDa の蛋白合成が *in vitro* translation で確認された。データベース上類似の蛋白は見出されなかったが、部分的に CD1C に弱い類似性を示す箇所があった。

結論・考察：膵臓及び甲状腺で発現している新規 HERV-E 遺伝子 (*ERVE1*) を見出した。3.3 kb の転写産物は 25 kDa の蛋白を合成することが予測される。この蛋白は膵臓及び甲状腺に共通した何らかの生理的機能を担っていると推察される。

報告番号	* 課程博 論文博	第 号	氏名	城間 隆史
		平成 14 年 12 月 2 日		
論文審査委員	主査教授	森 直 樹		(森)
	副査教授	岩 永 正 明		(岩永)印
	副査教授	金 澤 浩 二		(金澤)
(論文題目)				
Search for active endogenous retroviruses: identification and characterization of a HERV-E gene that is expressed in the pancreas and thyroid				
(論文審査結果の要旨)				
上記論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義と学術的水準について慎重に審査し、以下のような審査結果を得た。				
1. 研究に至る背景と目的				
ヒト内在性レトロウイルス(HERV)およびその関連遺伝子はもともと感染性レトロウイルスであったものが進化の過程で宿主胚細胞ゲノムまで組み込まれたものと考えられており、細胞性遺伝子と同様にメンデルの遺伝方式によって遺伝する。HERVは概してジャンクと考えられていたが、近年、自己免疫性疾患との関わりや、進化における重要な役割を果たしているなどの知見が得られてきている。さらに、HERV遺伝子由来のシンシチンと名付けられたタンパクが胎盤の合胞体形成に関与することを示唆するin vitroでの実験結果(Nature403,785,2000)が報告され、正常組織におけるHERV遺伝子の生理的機能への関わりも解明されつつある。				
2. 研究内容				
ヒト内在性レトロウイルス(HERV)の生理的機能、多因子病との関わり及び進化的役割解明の第一歩として、活性型HERV遺伝子を単離・同定する。				

- 備 考
- 1 用紙の規格は,A4とし縦にして左横書とすること。
 - 2 要旨は800字~1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。

RT-PCRを利用した転写活性を持つHERVの同定法を考案し、活性型HERVを同定した。そして、プローブを用いたコスミドライブラリーのスクリーニングによりこの活性型HERVを単離し、シーケンシングにより8820bpの全塩基配列を決定して*ERVE1*と名付けた。その一次配列の構造解析から、*ERVE1*は蛋白発現に十分な大きさのopen reading frame(ORF)を持つことが分かった。また、ノーザンブロット解析では膵臓および甲状腺に*env*あるいは*pol*領域を持つ4種類の転写産物が確認でき、このうち、最も発現量の多い*env*領域を持つ3.3 kbのmRNAは、25 kDの蛋白を作ること*in vitro*転写—翻訳実験で確認した。これは、一次構造配列で予測できたORFの一つと合致したものであった。

Stanford G3 panelを用いたradiation hybrid mappingにより*ERVE1*は染色体17番長腕11に局在することを確認した。しかし、データベースを用いた近傍遺伝子には疾患に関連した遺伝子は見いだせなかった。

3. 研究成果の意義と学術的水準

潜在的発現活性を持つHERVを同定する方法を考案し、この方法をHERV-Eファミリーに応用して、正常膵臓及び甲状腺で発現している*ERVE1*を同定した。これは、胎盤以外の正常組織を主たる発現の場とするHERVの最初の1例である。

*ERVE1*の最も発現量の多い*env*領域を持つ3.3 kbのmRNAは、25 kDの蛋白を作ること*in vitro*で確認した。さらに、細胞内で糖鎖付加を受けることも分かっており、この蛋白は膵臓及び甲状腺に共通した何らかの生理的機能を担っている可能性が示唆された。

現在、この方法を応用して、更に多数のHERVを同定すると同時に、HERVの発現制御機構解析および*ERVE1*蛋白の機能解析に向けた研究を行っており、これ以外の不活化されているHERV-Eとの比較解析により、HERVの発現制御機構の解明が期待できる。これら正常組織におけるHERV遺伝子の生理機能および疾患との関わりと発現メカニズムの解明は基礎医学および臨床医学上意義が大きいと思われる。

以上により、本論文は学位授与に値すると判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。
 - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。