

ヘルペスウイルス転写調節因子の発現による小脳形成異常の分子機構の解明

富岡 幸子 [北海道大学遺伝子病制御研究所附属疾患モデル動物実験施設 / 助教]

背景・目的

仮性狂犬病ウイルス(PRV)は動物に重篤な神経症状を引き起こすヘルペスウイルスである。PRV の転写調節因子 IE180 を発現するトランジェニックマウス(TgIE180)は小脳形成異常を示すことから、ウイルスの感染・増殖という現象を伴わず IE180 が単独で生体の遺伝子発現に影響を及ぼし病原性を発揮することが示唆されている。本研究では(1)欠失変異型の IE180 を発現する Tg マウス(Tgd1)を作製し TgIE180 と比較解析し、小脳形成異常に関与する IE180 の機能領域を決定する、(2) IE180 が作用する宿主分子を特定することで、ヘルペスウイルスの転写調節因子が宿主の遺伝子発現を攪乱する分子機構を解明することを目的とした。

内容・方法

IE180 は 酸性転写活性化領域、 DNA 結合領域、核局在シグナルの三つの重要な機能領域を持つ。今回、を欠失した Tgd1N132 、とを欠失した Tgd1C629 、 ~ 全てを含むがより C 末端側のアミノ酸を欠失した Tgd1C1081 という三種類の欠失変異型 IE180 を発現するマウス(Tgd1)を作製し、 TgIE180 と比較解析した。導入遺伝子は致死性である可能性が予想されること、潜伏・再活性化を繰り返すヘルペスウイルス感染症の病態により近づけることができることから、テトラサイクリンで発現を制御する発現系を用いた。遺伝子導入の確認は PCR 法およびサザンプロット法で行った。また、発現組織および発現量を RT-PCR 法で検索した。小脳における局在については、抗 IE180 抗体および各種細胞マーカーを用いた多重免疫組織化学法にて解析した。また、ローターロッド試験によりマウスの運動機能を調べた。次に、 IE180 が作用する宿主分子を探索するため、 cyclin 等の細胞周期調節因子ならびにアポトーシスシグナルと IE180 との共局在を解析した。

結果・成果

導入遺伝子を子孫に伝達することができる Tgd1 マウスを複数系統得た(Tgd1N132;10 系統、 Tgd1C629;4 系統、 Tgd1C1081;5 系統)。これらのトランジェニックマウスの全身諸臓器について IE180 mRNA の発現を RT-PCR で調べたところ、全ての系統においてほぼ全身の組織で発現が確認された。また、小脳での IE180 mRNA の発現量には各系統間で若干の差が見られたが、 Tgd1N132 、 Tgd1C629 、 Tgd1C1081 の各々で最も高い発現量を示した系統を主に以後の形態学的解析、運動機能解析等に用いた。酸性転写活性化領域を含む N 末端の 1-132 番目のアミノ酸を欠失した

変異型 IE180 を発現する Tgd1N132 マウス、 DNA 結合領域全体と核局在シグナルの一部を含む 630 番目以降のアミノ酸を欠失した変異型 IE180 を発現する Tgd1C629 マウスでは異常は認められなかった。一方、 1-1081 番目のアミノ酸から成り、三つの重要な機能領域全てを含む変異型 IE180 を発現する Tgd1C1081 マウスでは、失調性歩行、背湾姿勢、後肢脱力、運動協調性失調といった小脳症状が認められた。これら Tgd1C1081 の症状は全長型 IE180 を発現する TgIE180 マウスよりも軽度だったが、類似していた。回転棒上での歩行持続時間を計測するローターロッド試験においても、 Tgd1N132 、 Tgd1C629 は野生型と差が無かったのに対し、 Tgd1C1081 の持続時間は野生型よりも有意に短かった。肉眼的に Tgd1N132 、 Tgd1C629 の小脳の大きさは野生型と差は無く、組織学的にも異常は認められなかった。 Tgd1C1081 の小脳は野生型よりも有意に小さく、組織学的には小脳の特徴的な層構造が菲薄化していた。 TgIE180 と比較すると Tgd1C1081 の小脳は同じくやや大きかった。また、 TgIE180 では層を構築する細胞が異所性に存在し層構造が崩壊しているのに対し、 Tgd1C1081 では各々の層が薄くなっているものの三層構造が維持されていた。また、 Tgd1C1081 では特に顆粒細胞層の菲薄化、顆粒細胞の脱落・変性が目立っていた。各種細胞マーカーとの多重免疫染色により、導入遺伝子は TgIE180 および Tgd1C629 では主にアストログリア系の細胞(星状膠細胞、バーグマングリア)に、 Tgd1C1081 では顆粒細胞と少数のバーグマングリアに発現していることが明らかになった。また、 TgIE180 と Tgd1C1081 では野生型よりも有意に多くアポトーシスが検出された。そこで、 IE180 が作用する宿主分子を探索するため、まずアポトーシスシグナルと導入遺伝子の局在を免疫組織化学的に解析したところ、二つのシグナルは近接して存在したが共局在はしていなかった。一方、細胞周期調節因子である cyclinD1 が IE180 と共に局在することが明らかになった。以上の成績より、 IE180 による小脳の病理発生には 3 つの機能領域を全て含む 1-1081 番目のアミノ酸が必要であることが示唆された。しかしながら、 TgIE180 と Tgd1C1081 では導入遺伝子発現細胞の局在や、小脳異常の組織像が異なることから、これらを規定するアミノ酸配列が 1082 番目以降の領域に含まれる可能性が示唆された。また、 IE180 は宿主のアポトーシス関連分子や細胞周期調節因子と相互作用する可能性が推察された。

今後の展望

本研究成果により、小脳形成異常をもたらす IE180 の機能領域が明らかになると同時に、病態発生に關与する宿主分子が絞り込まれてきた。今後、 IE180 の発現と病理発生の経時的な解析、および *in vitro* での蛋白機能解析を進めることで、 IE180 と相互作用する宿主分子が特定されるだろう。これにより、本トランジェニックマウスがヘルペスウイルス感染症の新規病態モデルとして確立され、分子標的薬の開発に新展開をもたらすことが期待される。また、 IE180 は小脳形成に關わる宿主分子に干渉する可能性が濃厚であり、発生学的知見の拡充や小脳形成異常疾患の新規モデルとしても有用と考えられる。