

発生段階特異的なスプライシングバリエーションが報告され、選択的スプライシングが分化や発生過程に重要な役割を果たしていることが示唆されている。筋分化過程においては、筋芽細胞から筋管細胞への分化時に ATP 合成酵素 γ サブユニット ($F_{1\gamma}$)、 α -、 β -トロポミオシン、N-CAM など多くの遺伝子にスプライシング様式の変換が見られ、これらの分子変換が筋系の細胞機能に重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、その調節機構の詳細に関しては不明な点が多い。我々は、線維肉腫細胞を用いた酸性刺激による可逆的な筋型スプライシング誘導系を確立していることから、この系を利用して、 $F_{1\gamma}$ をモデル遺伝子とする筋特異的なスプライシング調節機構の解明を目指している。 $F_{1\gamma}$ は、心筋や骨格筋、酸性刺激下の線維肉腫細胞で、エキソン 9 が除外されるスプライシング様式をとる。これまでの解析で、エキソン 9 の除去にはエキソン 9 内のスプライシングサイレンサー配列が関与していることを明らかにした。そこで、本研究ではエキソン 9 選択に関するタンパク質性調節因子の同定を目的とした。

刺激前の線維肉腫細胞核抽出液を用いた *in vitro* 結合解析では 48kDa のタンパク質がエキソン 9 に結合することがわかった。また、酸性刺激後の核抽出液を用いた解析では 40kDa のタンパク質がエキソン 9 上のサイレンサー配列特異的に結合することがわかった。次にエキソン 9 に対するアフィニティ精製を行い、質量分析装置を用いたペプチドマスフィンガープリント法によるエキソン 9 結合タンパク質の同定を試みた。その結果、48kDa の候補因子として、RNA 結合タンパク質である La タンパク質、細胞増殖関連因子 2G4 が同定された。これら因子のスプライシングと関わりは不明であり、現在解析中である。40kDa の候補因子として heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 (hnRNP A3) と hnRNP A1 が得られた。そこで、hnRNP A3、hnRNP A1 が $F_{1\gamma}$ ミニ遺伝子のスプライシングに及ぼす影響を *in vivo* スプライシング系で検討した。残念ながら筆者らは hnRNP A3 の全長 cDNA を得ることができていない。そこで、選択的スプライシングにより 47 アミノ酸短い A3 のアイソフォームを用い

たが、 $F_{1\gamma}$ の筋型スプライシングを促進する効果は見られなかった。今後、全長の cDNA を用いて検討する必要がある。興味深いことに、hnRNP A1 には筋型スプライシングをサイレンサー配列特異的に促進する活性があることがわかった。

本研究により、 $F_{1\gamma}$ の筋特異的なスプライシングに関わる調節候補分子を同定した。A 型の hnRNP はエキソン上の特異的な配列に結合して、オリゴマーを形成し、エキソンをマスクするというスプライシング抑制モデルが提唱されている。それゆえ hnRNP A1 や A3 が $F_{1\gamma}$ のエキソン 9 の除去に関わっていることは十分考えられる。実際に、hnRNP A1 は $F_{1\gamma}$ のエキソン 9 を除去する活性を有した。しかしながら、hnRNP A1 や A3 の発現量は線維肉腫細胞を酸性刺激しても顕著な増加を示さなかった。それゆえ、酸性刺激による筋特異的なスプライシング誘導は調節因子の量的変動によるのではない可能性も考えられた。我々はプロテインキナーゼ C による活性化が筋特異的なエキソン除去に関与している結果を得ていることから、今後、hnRNP A1 や A3 の質的变化とシグナル伝達との関わりに着目し、さらに検討を進めていく予定である。

The Adenovirus E1A and E1B19K genes provide a helper function for transfection-based Adeno-associated virus vector production

Takashi Matsushita,
Department of Virology

Introduction

Adeno-associated virus (AAV) vectors have a unique set of desirable properties that make them the gene therapeutics of choice for clinical applications requiring long-term gene expression from post-mitotic tissues. For efficient AAV vector production, the adenoviral E1, E2A, E4, and VA RNA regions are required. Although it has been well established that the adenoviral E2A, E4, and VA

RNA regions mediate AAV vector production, the role of the individual E1 genes (*E1A*, *E1B19K*, *E1B55K*, and *protein IX*) in AAV vector production has not been clearly determined.

Materials and Methods

A set of expression plasmids bearing truncations and deletions of the E1 genes was constructed. These E1 mutants were analyzed for their effect on AAV vector production in HeLa or KB cells. To compare the functions of anti-apoptotic proteins (*Bcl-2* and *Bcl-x_L*) with those of the viral homologue *E1B19K*, plasmid vectors expressing the *E1B19K*, *Bcl-2*, or *Bcl-x_L* gene products were constructed. These functions also were analyzed by same method as those of E1 mutants.

Results

Elimination of the entire E1 region resulted in 2log (HeLa cells) to 3log (KB cells) reductions in vector production relative to production in the presence of pE1, a plasmid encoding the entire E1 region. Disruption of the *E1A* and *E1B19K* genes resulted in reductions of vector yield up to 10- and 100-fold, respectively, relative to the wild-type E1. Interruption of the *E1B55K* or *protein IX* gene generally resulted in little or no reduction of vector production in HeLa or KB cells. Interestingly, the expression of either *Bcl-2* or *Bcl-x_L* driven by the HSV-*tk* promoter was capable of fully complementing E1 B19K mutants for AAV vector production. But CMV promoter-driven constructs produced low vector yields in a dominant fashion and caused a substantial increase in apoptosis.

Conclusion

We found that both the *E1A* and *E1B19K*, but not the *E1B55K* genes, are necessary for

the efficient production of AAV vectors in a transfection-based system. These findings may be valuable for the development of packaging cell lines for AAV vector production.

ファージペプチドライブラリーを用いた Rh 血液型抗原レプリカの作製と抗原構造解析

法医学・人類遺伝学講座 亀崎 豊実

Rh 血液型は、新生児溶血性疾患や ABO 適合輸血時の溶血副反応などで重要な役割を担っており、自己免疫性溶血性貧血における主要な自己抗原であることも明らかになっている。Rh 血液型を担っている Rh ポリペプチドは、赤血球膜を12回貫通し、6個の細胞外ペプチドループの3次元構造の組み合わせにより、Rh 血液型を表現していると推測されている。今回、Rh 血液型抗原 epitope の解析のため、モノクローナル抗 Rh 抗体 (mAbs) と反応する linear peptide (抗原レプリカ: mimotope) 同定を試みた。

【方法】7アミノ酸ランダムペプチドライブラリー (New England Biolabs) を抗 D (OSK3)、抗 E (OSK20-1) の2種類の IgG クラスの mAbs によりバイオパンニングを行った。すなわち、ファージライブラリー 2×10^{11} pfu と mAb300ng を混合し、室温で反応後、プロテイン G 結合磁化ビーズ (Miltenyi Biotec) により抗体結合ファージを選択した。洗浄後、酸性条件下でファージを解離し、中和した後に再度磁化ビーズと反応させて、ネガティブセレクションを行った。得られたファージを増殖させた後、同様の方法により4回のバイオパンニングの後、シングルコロニーより精製したファージを用いて、挿入塩基配列の決定を、マルチキャピラリー DNA 解析システム (CEQ2000, Beckman Coulter) による direct sequence 解析で行った。

Capture ELISA により選択された2種類の 7-mer ペプチド PD-01, PE-01 を合成し (Sawady Technology, 東京), competition ELISA 法により精製ファージと mAbs との反応性を検討した。

【結果】抗 D, 抗 E 抗体それぞれにおいてコン