

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<sub>L</sub>*) with those of the viral homologue *E1B19K*, plasmid vectors expressing the *E1B19K*, *Bcl-2*, or *Bcl-x<sub>L</sub>* 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<sub>L</sub>* 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  $2 \times 10^{11}$  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

センサス配列を持ったクローンが12クローン中10, 9クローン得られ, 主要な2種類について合成ペプチドにより抗体とファージの反応性の阻害が認められた。すなわち, 抗D抗体とD-01ファージの反応は, PD-01ペプチドで阻害が認められた。抗E抗体とD-01ファージの反応は, PD-01, PE-01ペプチドで阻害が認められた。抗D抗体とE-01ファージの反応は, PD-01, PE-01ペプチドで阻害が認められた。抗E抗体とE-01ファージの反応は, PD-01ペプチドで阻害が認められた。

【考察】Rh血液型抗原は conformational 抗原であり, バリエーション解析や mutagenesis などによる培養細胞での発現抗原の解析によりエピトープマッピングが行われている。抗体反応性の linear peptide, すなわち mimotope 同定によるエピトープマッピングへのアプローチは, エピトープの物理化学的性状を明らかにすることが期待されるだけでなく, 臨床的にも, 自己抗体やアロ抗体の抗体特異性の新たな同定法の開発に発展することが予想される。

今回, 抗RhD抗体と抗RhE抗体と反応する linear peptide (mimotope) を7-mer ランダムペプチドライブラリーより選択すると, 微弱な反応性ではあるが, 抗体特異的で, 抗D, 抗E抗体と交差反応するペプチドが同定できた。今後, 他の抗体についても検索を進めることにより, より反応性の高い mimotope や多様な抗体反応性を示す mimotope の同定が期待される。

## 心臓における核内レセプターERR $\alpha$ に相互作用する因子の同定

内科学講座循環器内科学部門 市田 勝

### (背景・目的)

近年, 核レセプターPPAR $\gamma$ のコファクターとして核内因子(PGC-1)が同定された。PGC-1は, 高度のエネルギーを必要とする組織, 脳, 心筋, 腎臓, 褐色脂肪組織等に分布している。PGC-1は細胞呼吸, 熱産生において重要であり, 脂肪組織, 骨格筋, 線維芽細胞, 心臓においてミトコンドリア形成に関わっている。PGC-

-1の活性化は細胞エネルギーのホメオスタシスだけでなく, 酸化的リン酸化, グルコース代謝, ミトコンドリアのエネルギー産生に関わる細胞内酵素を調節している。加えて, 寒冷, 絶食, 運動等の生理的刺激はPGC-1の細胞内レベルを上昇させる。しかし, PGC-1は適度に調節されなければ多大な病理学的影響がある。心筋細胞をターゲットとしたPGC-1のトランスジェニックマウスでは, ミトコンドリアの数は増加したが, 無秩序なミトコンドリアの増加は拡張型心筋症を引き起こした。ごく最近では, 肝臓において, 飢餓によりPGC-1の発現が上昇し糖新生に寄与していることが報告され, 糖尿病との関与が示唆されている。

分子レベルでは, PGC-1は多くの核レセプター-glucocorticoid, thyroid hormone receptor, mineralcorticoid receptor, estrogen receptor と結合し遺伝子の転写を活性化することが報告されている。褐色細胞では,  $\beta$ -アドレナリンレセプター3が刺激を受けるとPKAが活性化しPGC-1の機能が上昇すること, 骨格筋細胞, 心筋細胞ではp38/MAPKの活性化がPGC-1活性を増加させることが報告されている。今回, 我々は心筋細胞におけるPGC-1調節制御メカニズムを検討した。

### (方法および結果)

PGC-1と相互作用する因子の検討のため, PGC-1をbaitとし, Yeast-two hybrid法を用いてhuman heart cDNA libraryのスクリーニングを行った。同方法により, 核内レセプターのEstrogen-related Receptor alpha (ERR $\alpha$ )がクローニングされた。Hela細胞を用いた免疫沈降法では, PGC-1とERR $\alpha$ の会合が認められた。ERR $\alpha$ によるPGC-1の転写活性への効果を, Hela細胞を用いたone-hybrid法により検討した, 興味深いことに, ERR $\alpha$ はPGC-1の転写活性を高度に抑制した。次に, PGC-1の転写活性にはある抑制因子が存在し, MAPK p38の活性化によりこの抑制が解除されるという報告がなされたため, ERR $\alpha$ によるPGC-1抑制へのp38/MAPK経路の影響を検討した。前述のone-hybrid法を用いて検討したところ, MAPK p38を活性化するMEK3bおよびMEK6はERR $\alpha$ の抑制能を解除しなかつ