

氏名(本籍)	飯島沙幸(茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第3448号		
学位授与年月日	平成16年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	Role of HIV-1 accessory gene product Vpr in viral replication (HIV-1のウイルス増殖におけるアクセサリ-遺伝子産物Vprの役割)		
主査	筑波大学教授	医学博士	松井陽
副査	筑波大学併任教授 (国立感染症研究所)	医学博士	倉根一郎
副査	筑波大学助教授	医学博士	内田和彦
副査	筑波大学講師	医学博士	竹内薫

論文の内容の要旨

(目的)

ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)のアクセサリ-遺伝子産物の一つVprは、ウイルス遺伝子とウイルス蛋白からなるインテグレーション前複合体の構成因子の一つであり、また、細胞周期のG₂期停止、アポトーシスの誘導、核移行能等の多様な機能が報告されている。さらに、T細胞株におけるウイルス複製に関して、VprのG₂期停止能が効率を上昇させることが明らかとなっている。しかし*in vivo*での感染対象であるprimaryなCD4陽性T細胞における知見はなく、Vprの機能とHIV-1の複製について詳細な解析は行われていない。本研究ではVprのHIV-1の複製における役割を明確にするために、G₂期停止、アポトーシス、核移行を減弱したVpr変異体を組み込んだウイルスを作製し、それらのCD4陽性T細胞における複製能を比較検討した。

(対象と方法)

(1) Vpr変異体の作成とその機能解析: HIV-1感染性分子クローンであるNL432(CD4陽性T細胞指向性)よりPCRでVpr遺伝子を増幅したものを、N末にFlag-tagをつけて発現ベクターpME18Neoにクローニングした。Vpr変異体作成はsite-directed mutagenesis法により作成し、各々のN末側にFlag-tagをつけて発現ベクターpME18Neoにクローニングした。作成したプラスミドを子宮頸癌細胞HeLaにエレクトロポレーションで導入し、抗-Flag抗体を用いたウエスタンブロット法(抗-Flag抗体)を行い、発現を確認した。局在については免疫染色法、細胞周期解析についてはフローサイトメトリーを用いた細胞DNA contentsの検出、及びアポトーシス誘導能については、カスパーゼ3活性の測定を行った。核移行能は細胞質画分を用いて*in vitro* nuclear import assayにより解析した。

(2) Vpr変異株を用いた感染実験: Vpr変異体を導入した感染性分子クローンをsite-directed mutagenesis法により構築した。これをアフリカミドリザル腎由来細胞COS-1に導入してウイルスを産生させ、HIV-1Vpr変異株を得た。Gagp24 ELISA法によりウイルス量を決定し、MAGIC-5細胞に感染させ、ウイルスの感染性を確認した。感染実験には、健康なドナーから採取したCD4陽性T細胞を用いた。採取した末血か

ら CD4 分子を指標にナイーブ T 細胞を回収し、その後 OKT, CD28, IL-2 を添加した培養液で培養し、活性化 T 細胞を得た。ウイルス感染後、3～4 週間培養を継続し、経時的にウイルスを回収、p24 抗原検出 ELISA 法によりウイルス産生量の変化を測定した。

(結果)

まず Vpr の点変異体を作成し、機能解析を行った結果、核局在の減弱した α LAL67P, G₂ 期停止能の減弱した R8788EA, アポトーシス誘導能の減弱した L67A を得た。

次に、野生株、Vpr 変異株および Vpr 欠損株を CD4 陽性 T 細胞に感染させ、ウイルス複製能を解析した。野生株および L67A 株は同程度のウイルス増殖が見られた。また R8788EA 株、HI4546WA、及び Vpr 欠損株は野生型より少ないがウイルス増殖が見られたが、 α LAL67P 株ではウイルス増殖がほとんど見られなかった。さらに、核局在の減弱した Vpr 変異体をいくつか選択し、その精製蛋白の核移行能を、CD4 陽性細胞の細胞質画分を用いた *in vitro* nuclear import assay によって解析した。Vpr に 3 つ存在する α -helix の内、1 あるいは 3 に変異を導入した α LA, L67P および α LAL67P では核移行は認められなかったが、2 に変異を導入した HI4546WA では核移行が確認された。これらの核移行能が減弱した Vpr 変異株をもちいて感染実験を行った結果、HI4546WA 変異株ではウイルス増殖が見られたが、他の変異株ではウイルス増殖が確認されなかった。

(考察)

感染実験の結果から、Vpr の G₂ 期停止能と核局在が重要であることが示唆された。また、核移行能が減弱した変異株ではそのウイルス増殖能がほとんど消失したことから、Vpr の核移行とウイルスの感染性の相関が認められた。さらに、核移行能を減弱した変異株のウイルス増殖は、Vpr 欠損株よりも減少していたことから、核移行を阻害する阻害因子の存在が推定された。

(結論)

primary CD4 陽性 T 細胞における HIV-1 複製に関する Vpr の役割は、現在までの知見で言われているように、細胞周期を G₂ 期で停止しウイルスの複製効率を上昇させるだけでなく、さらにウイルス感染初期に機能しその核移行能によって感染を成立させることであると考えられる。また、Vpr の核移行能は細胞側因子との相互作用が重要であり、そのため細胞種の違いで核移行能が変化する。この Vpr の核移行に関する因子（促進また阻害）をターゲットとした新規の抗 HIV-1 薬の可能性が考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は primary CD4 陽性 T 細胞における HIV-1 複製に関する Vpr の役割に新知見を加え、新規の HIV-1 薬の可能性を示唆した価値あるものである。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。