

氏名(本籍)	すずき たつ のり 鈴木辰徳(茨城県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第4990号		
学位授与年月日	平成21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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	The Development of a Novel Class Agent Targeting Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr (ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)アクセサリータンパク質Vprを標的とした新規抗エイズ薬の開発)		
主査	筑波大学教授 (連携大学院)	獣医学博士	間 陽子
副査	筑波大学教授	理学博士	漆原 秀子
副査	筑波大学准教授 (連携大学院)	博士(理学)	三好 好之
副査	筑波大学教授 (連携大学院)	博士(医学)	倉根 一郎

論文の内容の要旨

多剤併用療法の確立により後天性免疫不全症候群(AIDS)の発症を遅らせることが可能となったが、耐性ウイルスの出現を抑えられないことがAIDSの根治を不可能にしている。従って、新たな作用点を有するAIDS治療薬の開発が強く求められている。AIDSの原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)は、レトロウイルスに共通な構造遺伝子及び調節遺伝子の他に、*nef*, *vpu*, *vpr* 及び *vif* という4つのアクセサリー遺伝子を有している。中でも *vpr* 遺伝子産物は様々な細胞内因子との相互作用を介して、核移行、アポトーシス及び細胞周期のG2期停止などの機能を誘導し、HIV-1の複製及びAIDS発症に大きく寄与している。特に、非分裂系細胞であるマクロファージにけるHIV-1の逆転写複合体(PIC)の核移行にVprが必須であることが明らかになっている。

先行研究において、Vprの結合因子として核内輸送アダプター因子 Importin a (Imp a) が同定され、その結合がマクロファージにおけるHIV-1の複製に必須であることが見出された。この結果は、VprとImp aの結合を阻害することによって、PICの核移行を標的とした抗AIDS薬の開発の可能性を示唆している。本研究では、既存の抗AIDS薬とは異なる新たな作用点を有する薬剤の開発を目指して、VprとImp aの結合を阻害する低分子化合物を探索し、Vprの核移行及びウイルス複製を阻害するHematoxylinを同定し、その薬理機構を調べることを目的とした。また、HematoxylinのVprとの結合および発現細胞における細胞内動態をケミカルバイオロジー的手法により解析した。

最初に、VprとImp aとの結合を阻害する低分子化合物のスクリーニングを行うために、VprとImp aとの結合を検出するための酵素免疫定量法(ELISA)を構築した。確立した方法を用いて、2000種類の天然化合物ライブラリーから、候補化合物としてHematoxylinを同定した。Hematoxylinは核移行再構築系であ

る invitro nuclear import assay により, Vpr の核移行を濃度依存的に阻害した。一方, Hematoxylin は Vpr による G2 期停止, さらに一般的な細胞周期, 核移行および, アクチノマイシン誘導性アポトーシスに影響しないことが立証された。次に, Hematoxylin のウイルス複製に対する阻害効果を 2 種類の方法によって解析した。マクロファージに NL-Luc-Env- Vpr+ (VSV-G) あるいは NL-Luc-Env-Vpr- (VSV-G) を感染させ single round assay を行い, 感染 2 日後に luciferase 活性を測定した。さらに, JR-CSF を感染させ multiple round assay を行い, ELISA 法により HIV-1 構造タンパク質である p24 量を測定した。両方法において, Hematoxylin は濃度依存的及び Vpr 依存的に HIV-1 の複製を阻害した。また, Real-time PCR を用いて検証した結果, Hematoxylin は HIV-1 の生活環の中の核移行過程を標的とすることが明らかとなった。

次に, Hematoxylin が Vpr と結合することを Blue NATIVE PAGE 法によって立証した。その特性を利用し細胞内に発現した Vpr の検出方法の確立を試みた。Hematoxylin の 1 つの官能基に, 蛍光色素 (fluorescein) を共有結合させて合成し, 細胞に添加して培養後, 共焦点レーザー顕微鏡によって観察した結果, 蛍光化合物は主に細胞質および核周囲に局在した。さらに, mono-Red Fluorescein Protein (mRFP) を融合させた Vpr を HeLa 細胞に発現させ, 蛍光化合物による Vpr の検出を試みた。Vpr 発現細胞における蛍光化合物の局在は Vpr の局在する核に変化していた。以上の結果は特異的に Vpr に結合する蛍光化合物によって, 細胞内に発現した Vpr を検出できることを示唆している。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究の第一の成果は, マクロファージにおける HIV 複製に必須な Vpr と Imp a の結合に着目し, その相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発のための基礎研究を行ったことである。本研究において, 抗 HIV 薬として同定された Hematoxylin は, HIV-1 の株間で高度に保存された Vpr の領域を標的としており, 現在の多剤併用療法の問題点である耐性ウイルスの出現を軽減できる可能性がある。さらに, 本研究の成果はウイルスの核移行阻害が抗ウイルス薬の標的として有用であることを強く示している。従って, 他の核内で増殖するウイルスの核移行阻害を標的にした抗ウイルス薬開発への応用が期待される。本研究の第二の成果は, 低分子化合物による新規 Vpr の検出法の確立である。本研究で成功した蛍光低分子化合物によるウイルスタンパク質の細胞内検出法の確立は, これまで詳細な解析がなされていないウイルスの体内動態解析法の開発へ大きく貢献することが期待される。このように鈴木辰徳氏の研究は革新的であり, 科学技術, 医学, 細胞生物学およびウイルス学の発展に対して多大に貢献していると考えられる。

よって, 著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。