

氏名(本籍)	かたねますみ 片根真澄(茨城県)		
学位の種類	博士(生物科学)		
学位記番号	博甲第3334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	生物科学研究科		
学位論文題目	Studies on the Receptor Specificity of the Mouse Retrovirus Envelope Protein (マウスレトロウイルスエンベロップ蛋白質の受容体特異性に関する研究)		
主査	筑波大学客員教授	理学博士	篠崎一雄
副査	筑波大学教授	理学博士	山根國男
副査	筑波大学助教授	理学博士	漆原秀子
副査	独立行政法人理化学研究所主任研究員	薬学博士	天沼宏

### 論文の内容の要旨

レトロウイルスは脊椎動物に広く分布し、腫瘍や免疫不全の発症に関与し、またウイルス性ベクターとしても知られ生物学研究や遺伝子治療臨床研究に頻繁に用いられている。レトロウイルスはエンベロップを持ち、ここにはエンベロップ蛋白質(Env)が存在する。レトロウイルスの生活環の第一段階は、Envと感染受容体との結合によって誘起されるエンベロップと細胞膜との膜融合を介したウイルスコアの細胞内侵入である。本論文は、Envが持つ感染受容体結合および膜融合の仲介という両機能間の共役の機構の解明を目指し、受容体結合特異性を遺伝子工学的に改変した改変Envと代替受容体との系の機能について検討した。

同種指向性(マウスおよびラット細胞指向性)モロニーマウス白血病ウイルスのEnvを用いた。このEnvはSUとTMとの二量体の三量体として存在する。SUとTMはそれぞれ感染受容体への結合およびエンベロップと細胞膜との膜融合の仲介を担う。SUのN末端側に位置する可変領域(VRA)が、感染受容体と直接接触する領域である。SUにリガンドを挿入することにより改変Envを作成した。

上皮成長因子(EGF)の配列を、VRA内に挿入したキメラenv遺伝子を6種類構築した。site 3(79番目のアミノ酸)へ挿入したキメラEnv(E3)だけがウイルス粒子に取り込まれた。他のキメラEnvは細胞内でゴルジ体への輸送が起らないことが示唆された。次に、site 3およびVRA外の部位(10と11番目のアミノ酸残基間)にストローマ由来因子-1 $\alpha$ (SDF-1 $\alpha$ )の配列を挿入した。SDF-1 $\alpha$ キメラEnv(S3およびSN)はウイルス粒子に取り込まれた。

キメラEnvの機能を、これらを持つレトロウイルスベクターの遺伝子導入能により調べた。E3ベクターは本来の感染受容体(mCAT1)を介した遺伝子導入を野生型Env(MO)を持つベクターとほぼ同程度に示したが、EGF受容体を介した遺伝子導入はベクターがこれに結合するにもかかわらず起こさなかった。SNベクターはmCAT1を介した遺伝子導入能を失い、またSDF-1 $\alpha$ の受容体(CXCR4)を介した遺伝子導入も起こさなかった。一方、S3ベクターはmCAT1を介した遺伝子導入能をMOベクターとほぼ同程度に示し、更に、CXCR4を強制発現させたヒト細胞および内在的高レベル発現ヒト乳癌細胞株に対して中程度に遺伝子導入を起こした。これらと阻害実験等との結果から、CXCR4との結合がS3 Envの膜融合仲介機能を活性化しており、S3 EnvとCXCR4の系はEnvと感染受容体の概念に該当する事が示された。

S3 Env において mCAT1 への結合が MO Env の場合と同じ部位において起きているか否かを知るために、MO において mCAT1 への結合能を失わせる変異 (D84K) を持つ S3 *env* 遺伝子 (S3-D84K) を構築した。S3-D84K ベクターはマウス細胞および mCAT1 発現ヒト細胞に対して遺伝子導入を起こさず、S3 ベクターと同程度で CXCR4 発現ヒト細胞に遺伝子導入した。MO Env SU の 6-9 番目のアミノ酸に位置する SPHQ モチーフはマウス白血病ウイルスのすべてのサブグループで保存されており、その His-8 が受容体結合後の膜融合仲介機能の活性化に必須である事が報告されている。感染受容体が CXCR4 へと変更された S3-D84K Env において His-8 が担う役割を解析するために、これを Arg に変異させた S3-D84K *env* 遺伝子 (S3-H8R-D84K) を構築した。S3-H8R-D84K ベクターは CXCR4 に対する親和性を保持するにもかかわらず、これを介した遺伝子導入は起こさず、His-8 が S3-D84K Env においても膜融合仲介機能の活性化に必須である事が示された。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文でとられた方法は、Env の一次構造を遺伝子工学的に改変して Env が本来の感染受容体とは別の膜蛋白質を代替感染受容体として利用するようになった時に、その Env における受容体結合と膜融合の仲介との共役が野生型と比べてどうなっているかを調べるというものである。この方法が可能になるためには、まず別の膜蛋白質を感染受容体として利用できる改変 Env を作製せねばならない。このことは、新たなレトロウイルスベクター開発の観点から過去 10 年以上におよび世界中の多数の研究者が目指していたにもかかわらず達成されていなかったことである。本論文においては、リガンド挿入部位と挿入リガンドを実験的に試すことにより、これが達成されている。そして挿入したリガンドが本来の共役機構をリクルートすることを見出した。本論文は、リガンドペプチドを用いて Env の感染受容体特異性を改変できることを実証し、その改変 Env の機能の分子機構を明らかにした。これらは新規性、重要性の高い知見であり、また、標的化ベクターの作製を可能にする波及効果の大きい発見である。

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