

審査の結果の要旨

氏名 増田万里

本研究では、レトロウイルスの宿主細胞への侵入の際の受容体との相互作用解析のため、新たな実験系の構築をエコトロピックマウス白血病ウイルス(MuLV)をモデルに用いて行った。さらにその系を使用し、受容体の発現様式や、ウイルスと受容体の相互作用について検討を行い、下記の結果を得ている。

1. エコトロピックMuLVの受容体であるカチオン型アミノ酸輸送体蛋白1 (mCAT1)のcDNAにGFPのcDNAをつなぎmCAT1-GFP融合蛋白を発現するベクターを構築し、ヒト胎児腎由来293細胞に導入した。mCAT1-GFPはN結合型糖鎖修飾を受け、主に細胞表面に発現し、細胞質内ではゴルジ体と共局在することが確認された。また、エコトロピックMuLV由来のレトロウイルスベクターの導入効率を検討した結果、mCAT1-GFPは受容体としての機能を保持していることが示された。今までmCAT1の検出や定量は困難とされてきたが、この実験系の作製により蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察、フローサイトメトリー、抗GFP抗体を用いた免疫学的検出法など様々な方法で容易に発現や局在を確認できるようになった。
2. 上記の系を用いて、ウイルス受容体機能に重要であるmCAT1の第3細胞外ドメイン(TED)をラット型、ハムスター型に改変した変異型mCAT1を持つ細胞のエコトロピックMuLVに対する感受性を検討した結果、野生型mCAT1と同等の高い受容体活性が示された。更にマウスCAT2A (mCAT2A)、ラットCAT3(rCAT3)についても同様にGFPとの融合蛋白の発現系を作製し、それらの発現様式や受容体機能の解析をおこなったところ、mCAT2Aには受容体活性が検出されず、mCAT1のTEDをmCAT2AのTEDで置換したキメラも受容体活性を失い、rCAT3は低効率ながらもエコトロピックウイルス受容体として機能することが示された。
3. ウェスタン法によりmCAT1-GFPと同様にTED変異型mCAT1や他のCAT類縁蛋白についても

発現様式を検討した結果、これらの蛋白の二量体に相当するサイズのシグナルが検出され、クロスリンカー処理によりこれらのシグナルの増強が認められた。また、インフルエンザウイルスの血球凝集素(HA)の抗原性部位で標識したmCAT2A-HAとmCAT2A-GFPをヒト293細胞にて共発現させた結果、この両者が免疫共沈することが示された。mCAT2A-GFPとmCAT1-GFPでは共沈が見られなかったため、CAT蛋白がホモの二量体を形成すると考えられた。還元条件下でも二量体形成があまり抑制されないことから、膜貫通部位の α -ヘリックスを介したSDS抵抗性の二量体を形成していると考えられた。

4. mCAT1-GFPを発現するミンクCCL64細胞にエコトロピックMuLVを感染させると、受容体が核周囲の粗面小胞体と思われる領域に集積することが蛍光顕微鏡によって観察され、また、抗GFP抗体を用いたウエスタン法では、ウイルス感染後、mCAT1-GFPの糖鎖修飾のレベルが減少することによって分子量が減少がすることが示された。

5. ウサギSIRC細胞は野生型及びTED変異型のmCAT1-GFPを効率良く安定に発現することが示された。また、それらの細胞にエコトロピックMuLVを感染させた結果、野生型とラット型では殆ど細胞融合が見られないのに対し、ハムスター型のTEDを持つmCAT1-GFPを発現する細胞では感染後早い時期に明らかな細胞融合が認められた。したがって、SIRC細胞においては、mCAT1のTEDの一次構造の差がエコトロピックMuLVによる細胞融合に対する感受性を規定しうると考えられた。

以上、本研究では新たな実験系を開発することによって、これまで困難とされてきたmCAT1及びCAT類縁蛋白の発現様式や細胞内局在を様々な手法で解析を行うことを容易にした。また、その系を用いてエコトロピックMuLVと受容体との相互作用に関して上記のような知見も得られており、これらはレトロウイルスの複製機構の解明に重要な貢献をなすと考えられる。また、レトロウイルスと受容体の相互作用の分子レベルでの解明や、レトロウイルスベクターの導入法の改良などに向けて、今後の応用も期待される。以上の理由から、本研究は学位の授与に値するものと判断した。