

論文の内容の要旨

論文題目 ヒトおよびサル免疫不全ウイルスの分子生物学的手法を用いた研究

氏名 井阪 圭 孝

後天性免疫不全症候群 (AIDS : acquired immunodeficiency syndrome) は、human immunodeficiency virus (HIV) の感染によって引き起こされるウイルス疾患である。HIV は、1型 (HIV-1) と2型 (HIV-2) のグループに二分されている。また、サルにおいても、同様のウイルス疾患が発見され、その原因ウイルスとして simian immunodeficiency virus (SIV) が分離、同定されている。これらのウイルスの感染・複製機構・感染から発症に至る機序について様々な研究がなされているが、依然として決定的な AIDS 発症予防、治療法は確立されていない。HIV、SIV の遺伝子群のうち、pol 遺伝子にコードされている蛋白、逆転写酵素 (RT) は、標的細胞に侵入した後、ウイルスゲノムを RNA 型から DNA 型へと逆転写するステップを担っている為、主要な抗 HIV 薬のターゲットとして考えられており、現在まで核酸系や非核酸系の有用な RT 阻害剤が幾つか発見されている。このうち非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) は、HIV-1 の RT を特異的に阻害し、HIV-2 および SIV に対しては阻害効果が認められない。SIV は、HIV/SIV の感染、AIDS の発症モデルとして有用であり、NNRTI に感受性をもつ HIV-2、SIV の作製は、AIDS 治療に多大な貢献が期待されるテーマとなっている。今までに、HIV-1 の RT を持つ SIVmac/HIV-1 キメラウイ

ルスの作製が報告されているが、増殖性が悪くサルに発症させるまでには至っていない。この様な背景から、NNRTI 感受性の SIV、HIV-2 を作製する為、SIVmac/HIV-1 キメラウイルスを作製したところ、RT 活性の顕著な低下により感染性は消失した。しかし、そのキメラ RT 蛋白を作製し、その NNRTI 感受性の回復は確認できた。次に、今後の検討の為には、ウイルス増殖性に影響を受けない高感度な測定系の構築が必要であると考え、レポーター遺伝子を持つ細胞を樹立し、この細胞を用いて HIV-1、HIV-2、SIV の簡易な測定系を構築した。これにより、SIV と近縁関係にある HIV-2 gp120 上にあるコレセプターの指向性を決定する部位を同定できた。さらに、NNRTI に対して感受性を示す HIV-1、SIVagm について、感受性のない HIV-2、SIVmac との違いを調べることにより、HIV-2、SIVmac の RT 蛋白の L188 が NNRTI の感受性に関与する可能性を示唆した。この変異を導入したウイルスを作製し、NNRTI に対して感受性を獲得した SIVmac や HIV-2 の作製に成功した。これらの結果は、今後の NNRTI 感受性 SIV を用いた動物モデルの作製に多いに貢献できると思われる。本研究は 4 部より構成され、得られた成果は以下のように要約される。

1) 非核酸系逆転写酵素阻害剤に感受性を持つ SIV/HIV-1 キメラ RT 蛋白の作製 : NNRTI は HIV-1 を特異的に阻害し、HIV-2 および SIV をほとんど阻害しない。そこで、NNRTI 感受性 SIV を作製する為、SIVmac 感染性クローン pMA239 の RT 遺伝子に、HIV-1 感染性クローン pNL432 の対応する RT 遺伝子の部位 (176-190, 176-383, 176-495 アミノ酸に対応する遺伝子部位) に置換した 3 種のキメラウイルスを作製した。3 種のキメラウイルスのうち、HIV-1 の 176-190 アミノ酸に置換したウイルスのみが、RT 活性を保持しており、3 種の NNRTI (nevirapine、HEPT E-EBU-dM、TIBO R82913) に対して感受性を示した。しかし、ウイルスの RT 活性は顕著に低下しており、細胞での増殖性はなかった。続いて、このウイルスのキメラ RT 蛋白の酵素学的解析を行う為、このキメラ RT を大腸菌中で発現し精製を行った。キメラ RT 蛋白と HIV-1 RT 蛋白の HEPT E-EBU-dM に対する Ki 値と阻害様式を比較したところ、キメラ RT 蛋白は HIV-1 RT 蛋白の Ki 値の 9 倍になったが、阻害様式は共に非拮抗型である事が判明し、NNRTI が同様なメカニズムで作用可能な事が確認できた。

2) HIV-2 のコレセプターCCR5、CXCR4 の選択を決定する部位の同定 : HIV-1 のコレセプターであるケモカインレセプターCCR5 と CXCR4 が発見されて以来、HIV-1、HIV-2 および SIV のコレセプターが次々と同定されてきている。そこで、我々は各ウイルスの耐性を簡易に測定する為、HIV-1 LTR- β -galactosidase のレポーター遺伝子と各ケモカインレセプター遺伝子を組み込んだ HeLa-CD4 細胞を用いる感染系を構築し、HIV-1、HIV-2 および SIV のコレセプターの使用様式を調べた。その結果、HIV-1 NL432、HIV-2 ROD はコレセプターとして主に CXCR4 を使用し、それに対して、HIV-1 NL162、HIV-2 GH-1、SIVmac MA239、SIVagm SA212 は CCR5 を使い CXCR4 を使用しない事が判明した。そこで、この HIV-2 ROD/GH-1 のコレセプターの使用様式の違いを利用する事により、コレセプターの指向性を決定する gp120 蛋白の部位を同定した。HIV-2 ROD 感染性クローン pLA317 と HIV-2 GH-1 感染性クローン pGH-123 を用いて、gp120 部位を組み換えた一連のキメラウイルスを作製した。その結果、gp120 の V3 ループ部位の C 末側半分が HIV-2 ROD と HIV-2 GH-1 のコレセプターの指向性を決定している事が判明した。この領域のアミノ酸配列の比較により、数アミノ酸の違いにより CCR5 と CXCR4 の特異性が決定している事が示唆され、V3 領域の正電荷の増加により CXCR4 への特異性が増す傾向が認められた。

3) 非核酸系逆転写酵素阻害剤に対する耐性 SIV の分離と解析 : 一般に NNRTI は HIV-1 を特異的に阻害し、HIV-2 および SIV をほとんど阻害しない。しかし、いくつかの NNRTI は、HIV-1 以外に、アフリカミドリザルから分離された SIVagm に対して阻害活性を有している事が判った。上記で作製した測定系を改良し、SIVagm の NNRTI に対する感受性を調べたところ、delavirdine と efavirenz は阻害活性を示したが、nevirapine は示さなかった。SIVagm と HIV-1 の阻害様式を比較する為、SIVagm の delavirdine、efavirenz、3TC に対する耐性 SIVagm を分離した。SIVagm の RT 遺伝子に、delavirdine 耐性は V112I と M231I の変異、3TC 耐性は M185I の変異が認められたが、efavirenz 耐性は分離できなかった。続いて、これらの変異が薬剤耐性に関与している事を証明する為、SIVagm 感染性クローン pSA212 に各変異を導入し、delavirdine と 3TC に対する感受性を測定した。また、SIVagm の M231 と M185 に対応する HIV-1 の M230 と M184 に変異を導入した感

染性クローン pNL432 を用いて薬剤感受性を測定した。この結果、これらの SIVagm RT 変異は明らかに薬剤の感受性を低下させ、同じ部位の変異により、HIV-1 も同様に感受性が低下することが判明した。これらの結果から、SIVagm は、NNRTI が作用する binding pocket を形成し、HIV-1 と同様な機構で NNRTI が作用しているものと考えられた。

4) HIV-2 と SIV の逆転写酵素の Leu-188 の置換による非核酸系逆転写酵素阻害剤に対する感受性の獲得 : SIVagm が NNRTI に感受性を保持していることから、HIV-1、HIV-2、SIVagm、SIVmac のアミノ酸配列を比較した結果、Leu-188 のアミノ酸が HIV-2 ROD と SIVmac の NNRTI の感受性に重大な影響を与えていると推察された。そこで、我々は、HIV-2 と SIVmac の 188 番目のロイシンをシステインまたはタイロシンに置換した感染性クローンを作製し、NNRTI への感受性を調べたところ、HIV-1、HIV-2、SIVmac 共に 188Y、188C、188L の順で NNRTI に感受性を示した。続いて、これらウイルスクローンをを用いて NNRTI 耐性ウイルスを分離した結果、SIVmac に I106T、V108I、HIV-2 に K103T、V111I、G112E、E219A、M230L の変異が確認された。これらの変異ウイルスを作製する事により、NNRTI への耐性度の上昇を確認し、HIV-2 と SIV の薬剤感受性に関連したアミノ酸残基を同定した。これらは、NNRTI の活性に関与する HIV-1 の耐性部位とほぼ一致した。

以上の様に、HIV、SIV の NNRTI に対する感受性の相違を分子生物学的手法を用いて解析した。新たな測定系を構築し、作製した変異ウイルスを用いて、HIV-2 と SIVmac が NNRTI 耐性である理由として、RT の 188 番目のアミノ酸のロイシンが重要である事を明らかにした。この結果、NNRTI 感受性な HIV-2、SIVmac を作製することができ、今後の SIV、サルを用いた AIDS 発症モデルの開発に多大な貢献ができるものと考えている。