

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 井 阪 圭 孝

後天性免疫不全症候群 (AIDS) 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、simian immunodeficiency virus (SIV) が分離、同定されている。HIV、SIVの逆転写酵素 (RT) の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。現在、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。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感受性SIVを作製する為、SIVmac感染性クローンのRT遺伝子に、HIV-1感染性クローンの対応するRT遺伝子の部位に置換した3種のキメラウイルスを作製した。そのうち、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に対して感受性を示す事が判明した。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。精製したキメラRT蛋白を用いて酵素学的解析を行ったところ、キメラRT蛋白はHIV-1 RT蛋白のHEPT E-EBU-dMに対する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：各ウイルスの耐性度を簡易に測定する為、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た。次に、コレセプターの使用様式を調べたところ、HIV-1 NL432、HIV-2 RODは主にCXCR4を使用し、HIV-1 NL162、HIV-2 GH-1、SIVmac MA239、SIVagm SA212はCCR5を使用する事が判明した。さらに、HIV-2 RODとHIV-2 GH-1のキメラウイルスの結果から、gp120のV3ループ部位のC末側半分がコレセプターの指向性を決定していた。この領域のアミノ酸配列の比較により、数アミノ酸の連いにより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：NNRTIであるdelavirdineとefavirenzは、SIVagmに対して阻害活性を有している事が判明した。続いて、SIVagmのdelavirdine、3TCに対する耐性SIVagmを分離し、SIVagm感染性クローンに各変異を導入し、感受性を測定した。また、SIVagmの変異に対応する部位に変異を導入したHIV-1感染性クローンを用いて薬剤感受性を測定した。この結果、これらのSIVagm RTの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、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：RTのLeu-188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、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。これらウイルスクローンを用いてNNRTI耐性ウイルスを分離し、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。

以上本論文は、NNRTI感受性なHIV-2、SIVmacを作製し、今後のSIV、サルを用いたAIDS発症モデルの開発のための基礎的な知見を与えたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）論文として価値あるものと認めた。