

## 論文の内容の要旨

論文題目： HIV-1 CRF01\_AE 型ウイルスのコレセプター使用能、  
および細胞指向性を規定する因子の解析

氏名 加藤 佳代子

HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1) は、後天性免疫不全症候群 (acquired immune deficiency syndrome: AIDS) の原因となるレトロウイルスである。HIV-1 には、末梢血単核球 (PBMC) とマクロファージに親和性を示し、細胞合胞体形成能に乏しい型 (M-tropic、NSI 型) と、PBMC と CD 4 陽性株化 T 細胞に親和性を示し、合胞体形成能の高い型 (T-tropic、SI 型)、および両方に親和性をもつ dual tropic 型が存在する。このような細胞指向性の違いは、HIV-1 が細胞侵入の際に使用するコレセプターの違いに起因しており、M-tropic 型は 7 回膜貫通型ケモカイン受容体の CCR5 を、T-tropic 型は同じく 7 回膜貫通型ケモカイン受容体の CXCR4 を使って吸着、侵入することから、それぞれのウイルスを R5 型、X4 型、また両者の中間の性質のものを R5/X4 型とする分類が一般的になっている。HIV-1 の細胞指向性やコレセプター使用能は、おもにウイルスの外被糖タンパク質 (Env gp120) の V3 ループに生じるアミノ酸の変化、とりわけ陽電荷をもつアミノ酸の分布に伴って変化することが、欧米の主要な流行株であるサブタイプ B のウイルスを用いた解析で示された。東南アジアに流行する CRF01\_AE 型ウイルスは、遺伝学的系統関係上異なるサブタイプに属し、V3 ループのアミノ酸配列はサブタイプ B と約 50% の相違がある。CRF01\_AE 型ウイルスにも R5 型、X4 型や R5/X4 型のウイルスが存在するが、それらの性質がサブタイプ B と同様に V3 ループによって規定されているかどうかは知られていない。ところが、CRF01\_AE ウイルスによる家族内感染例の解析において分離された、エイズ患者由来 SI 型ウイルス (NH1)、および無症候キャリアー由来 NSI 型ウイルス (NH2) の V3 ループの配列を比較すると、SI 型の V3 ループには塩基性アミノ酸変異が蓄積して総電荷が増加していた。これはサブ

タイプ B に類似した現象であり、これらの CRF01\_AE 型ウイルスにおいても V3 ループによってウイルスの性質が規定されていることが示唆された。そこで、CRF01\_AE 型 HIV-1 の V3 ループ配列がウイルスの SI/NSI 表現型やコレセプター使用能を規定する機能をもつかどうかを検討した。

CRF01\_AE 型で NSI 型の NH2、および SI 型の NH1 の V3 ループ配列を、overlap extension 法により、サブタイプ B SI 株 LAI の DNA クロンの env gp120 V3 ループ配列と置換し、組換え DNA クロンを作成した。この組換え DNA を HeLa 細胞に遺伝子導入してウイルス粒子を調製した。組換えウイルス、LAI-NH1V3 および LAI-NH2V3 の SI/NSI 表現型、およびコレセプター使用能を、PBMC、CD4 陽性株化 T 細胞 MT2、および CCR5 または CXCR4 を発現する HOS-CD4 細胞 (HOS-CD4-CCR5 または HOS-CD4-CXCR4) を用い、ウイルスを接種した培養上清の逆転写 (RT) 活性を測定して調べた。その結果、LAI-NH1V3 ウイルスは SI 型/X4 型、LAI-NH2V3 ウイルスは NSI 型/R5 型を示した。V3 を組換えたウイルスの性質が V3 ループの由来する親株の CRF01\_AE 型ウイルス (NH1 と NH2) の性質と一致したことから、CRF01\_AE 型ウイルスの V3 ループにもウイルスの SI/NSI 表現型や R5/X4 使用能を規定する能力があることが明らかになった。

NH1 と NH2 とで V3 ループ配列を比較すると、SI/X4 型株 NH1 では 8、11、および 18 番目の座位が塩基性アミノ酸 (アルギニン) に変異し、それに伴い V3 ループの総電荷が増すだけでなく、CRF01\_AE 型の NSI 型株に高度に保存されている N 結合型糖鎖付加部位が消失している。そこで、NH1 の V3 ループ配列に見られるこれらの塩基性アミノ酸変異、および N 結合型糖鎖付加部位の欠損変異のうち、どの変異がウイルスの NSI/R5 型から SI/R4 型への変換に関与しているのかを解析した。

NH2 の V3 ループをもつ組み換え体 LAI-NH2V3 を鋳型として、overlap extension 法により、SI 株 NH1 に見られる 8、11、18 番目のアルギニン変異、および N 結合型糖鎖付加部位の欠損変異を、種々の組み合わせで導入し、8つの組換え変異ウイルス LAI-NH2V3mt1~8 を作成した。PBMC、HOS-CD4-CCR5 または HOS-CD4-CXCR4 細胞、CD4 陽性株化 T 細胞、およびマクロファージにおける増殖を、各培養上清の逆転写活性により測定し、各ウイルスのコレセプター使用能や細胞指向性を検討した。その結果、変異の導入に伴ってウイルスの HOS-CD4 細胞における増殖能が変化した。

親株 LAI-NH2V3 は HOS-CD4-CCR5 で増殖し、HOS-CD4-CXCR4 では増殖しないが、

- 1) 11番残基をアルギニンに置換したもの (mt3、5、7、8) は HOS-CD4-CCR5 で増殖しなかった。
- 2) 3つの座位のうち、2つがアルギニンに置換されたもの (mt5~8) は HOS-CD4-CXCR4 で増殖するようになった。
- 3) mt5~8のうち、8番目の残基がアルギニンに置換されていない mt5 は、mt6~8より HOS-CD4-CXCR4 での増殖能が低減していた。
- 4) 11番目の残基を、中性アミノ酸であるアラニンに置換して、V3 ループの電荷を変えずに N 結合型糖鎖付加部位を欠損させた mt1 は、親株と比べて HOS-CD4-CCR5 での増殖能が低かった。

また、PBMC では、HOS-CD4-CCR5、HOS-CD4-CXCR4 のどちらでも増殖しなかった mt3 を除くすべてが増殖した。CD4 陽性株化 T 細胞では、8番と11番目にアルギニンをもつ mt7 と mt8 のみが増殖した。また、マクロファージでは、サブタイプ B の代表的な M-tropic ウイルスのひとつである AD8 の V3 との組換え体 LAI-AD8V3 を含むすべての組換えウイルスが、増殖能をもたなかった。以上より、LAI-NH2V3 の 11番目の残基を塩基性アミノ酸に置換すると一様に HOS-CD4-CCR5 での増殖能が消失することから、このアミノ酸残基が CCR5 使用能に関与していることが示された。3つのアルギニン変異のうち、少なくとも2つが導入されると CXCR4 使用能が出現することから、CRF01\_AE 型の V3 ループにおいても、電荷の上昇によってウイルスの R5 型から X4 型への変換が生じることが示唆された。一方、CD4 陽性株化 T 細胞での増殖には、8番目と11番目の塩基性アミノ酸置換が必須であり、HOS-CD4 細胞で X4 型を示すことと T 細胞指向性とは必ずしも一致しない。さらに、LAI の V3 を組換えたウイルスは、M-tropic ウイルスに由来する V3 との組換えであってもマクロファージで増殖せず、V3 ループの置換による CCR5 使用能の付与だけではマクロファージ指向性は獲得されないことが示唆された。

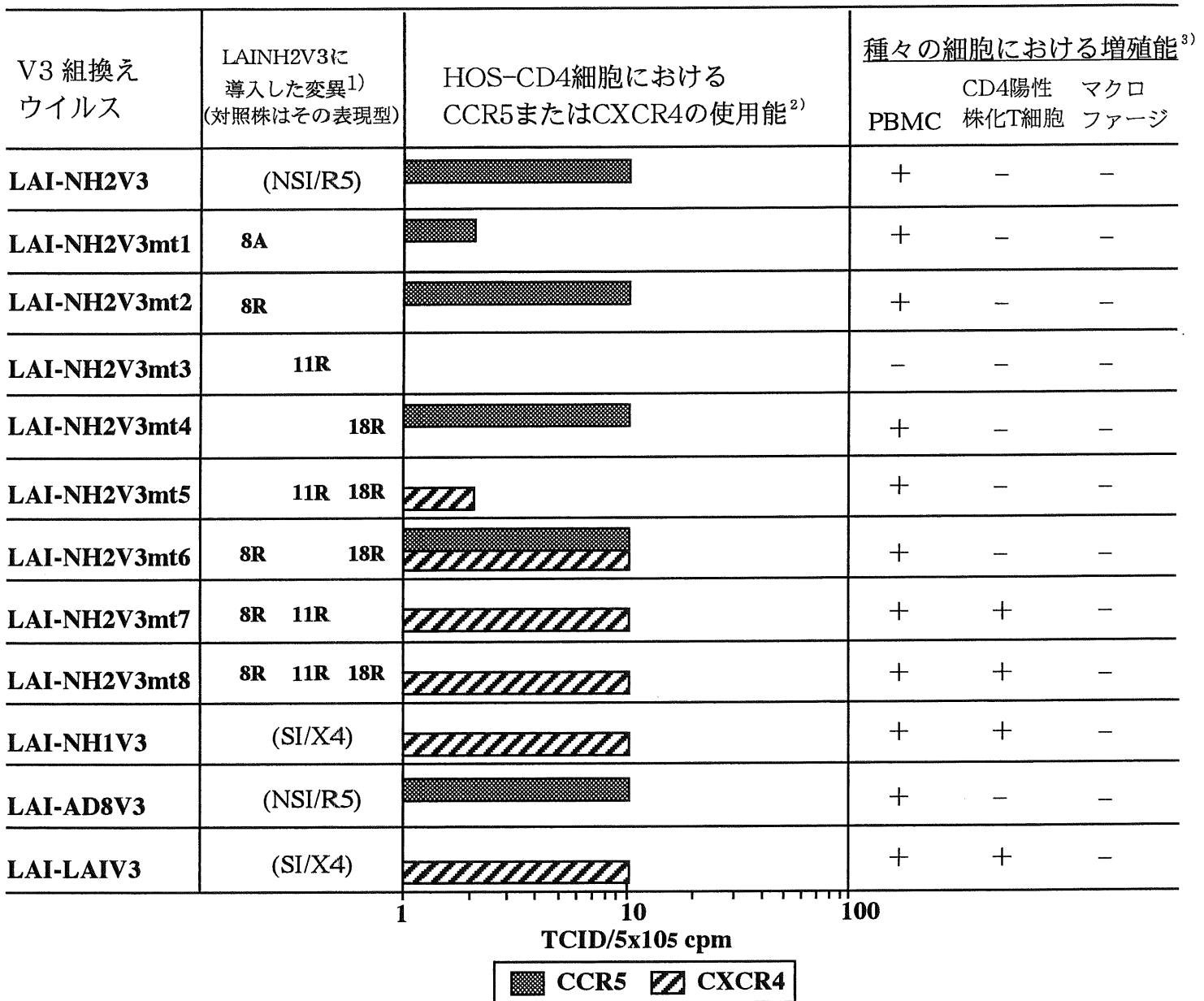


図1. CRF01-AE型ウイルスのV3ループに組み換えた組み換えウイルスのコレセプター使用能と細胞指向性

1) CRF01-AE型でNSI/R5型のウイルス、NH2のV3ループをもつ組み換えウイルスLAI-NH2V3に、SI/X4型NH1のV3ループにみられる変異を導入してLAI-NH2V3mt1~8を作成した。各々に導入した変異の位置とアミノ酸残基（一文字表記）を太字で示した。対照株についてはウイルスのSI/NSI表現型とR5/X4使用能を標記した。

2) 各組み換えウイルスのHOS-CD4-CCR5あるいはHOS-CD4-CXCR4細胞における増殖能をウイルスの感染力価（TCID；tissue culture infective doses）で示した。

3) 各組み換えウイルスの、末梢血単核球（PBMC）、CD4陽性株化T細胞、およびマクロファージにおける増殖能を+（増殖能あり）、および-（増殖能なし）で示した。