

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 13 年度博士課程 入学

氏 名 李 永仲

指導教員名 吉川 泰弘

論文題名 Molecular basic studies on the function of accessory genes
of human immunodeficiency virus (HIV)

(ヒト免疫不全ウイルス (HIV) のアクセサリー遺伝子機能に
関する分子基盤研究)

序

ヒト免疫不全ウイルス(human immunodeficiency virus: HIV)は後天性免疫不全症候群(acquired immune deficiency syndrome: AIDS)の原因ウイルスである。HIV はレトロウイルス科、レンチウイルス属に分類される primate immunodeficiency virus (霊長類免疫不全ウイルス) の一種であり、HIV-1 と HIV-2 の 2 種類が知られている。特に HIV-1 は病原性が強く、またアジア・アフリカ諸国を中心として現在も感染が拡大している。

HIV-1 遺伝子は通常のレトロウイルスと異なり、構造遺伝子 (*gag, pol, env*) のみならず調節遺伝子 (*tat, rev*) 及びアクセサリー遺伝子 (*vif, vpr, vpu, nef*)

から構成されている。特にアクセサリ遺伝子はその発見当初機能的意義が明らかでなかったことから名付けられたが、その後の研究によりウイルス複製・増殖に関与するのみならず様々な宿主細胞への調節機能を通じて持続感染や病態発現に重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。しかしながらその分子レベルでの作用機序についてはまだ多くの謎が残されている。そこで本研究では、このようなアクセサリ遺伝子の中でも近年特に注目されている *vif* 及び *nef* 遺伝子に着目し、その機能発現に関わる分子機構を明らかにすることを目的とした。

第1章 Nef 蛋白による MHC-I 発現制御機構に関する研究

nef は霊長類レンチウイルスに共通に存在する遺伝子であり、AIDS 発症に重要な役割を果たしている。アカゲザルにおける SIV 感染実験結果により、Nef を欠損させた SIV はウイルス増殖が抑制され、AIDS 発症に不可欠であることが初めて明らかとなった。また、AIDS 長期未発症者における HIV 遺伝子を解析した結果では、*nef* 遺伝子部位における変異、あるいは欠損が確認され、AIDS の病態進行に *nef* 遺伝子が関与していることが示唆されている。Nef の主な三つの機能、すなわち (1) CD4 および MHC-I の発現抑制、(2) 感染細胞のシグナル伝達制御、(3) ウイルス感染性の増強効果、のなかでも特に MHC-I 発現抑制は、ウイルス感染細胞の特異的 CD8⁺CTL からのエスケープ、つまりウイルスが宿主の細胞性免疫を回避するといった重要な役割を果たしており興味深い。しかし、その分子メカニズムは未だに不明の部分が多い。

これまでの報告では、NefのN末端側の二つの領域、すなわちMet20およびEEEE62-65がMHC-I発現抑制を規定していることが知られている。後者に関しては細胞内輸送に関わる蛋白であるPACS-1がその関連宿主因子であることが示唆されている一方、Met20についてはその詳細は不明である。NefのMet20の近傍にはアルギニンが4つ存在し(17,19,21,22位)、塩基性クラスターを形成している。Nefのようなミリスチル化蛋白では、この正電荷クラスターは細胞膜に存在する酸性リン脂質(負電荷を持つ)と相互作用することにより、ミリスチル基による膜局在を補強することが知られている。そこで、Nefが有するこの塩基性クラスターがMHC-I発現抑制機能に果たす役割を検証するため、この塩基性クラスター部位の置換変異体Nef蛋白(Arg→Ala:R4A変異体)を作成し、そのMHC-I発現抑制機能を解析した。

その結果、予想に反しR4Aは野生型Nefとほぼ同等の機能を維持している事が示され、従ってこの塩基性クラスター自体はMHC-I発現抑制に関与していない事が強く示唆された。この結果を受け、次にMet20周辺における保存性の高いアミノ酸残基の検討を行ったところ、Met20に加えてTrp13、Val16がNef機能発現に関与していた。以上のことより、MHC-I発現抑制機能の発現にはNefのN末端部位の塩基性クラスターではなく、離れた3箇所のアミノ酸残基が関与している事が明らかとなった。

この3アミノ残基の機能的意義を解析する目的で、これまで報告のあるNefのNMRデータを元に構造解析シミュレーションを行った。その結果、Val16・Met20はその側鎖でミリスチル基とその側鎖でミリスチル基と、またTrp13はTrp5の側鎖とそれぞれ疎水結合する事により、Nef蛋白がミリスチル基を

Core 構造内部に格納するという三次構造変換、いわゆるミリストイル・スイッチが MHC-I 発現抑制機能の発現に関与している可能性が初めて示された。本研究結果は、HIV による宿主細胞性免疫からの回避機構を分子レベルで解明するための重要な知見であると考えられた。

第 2 章 Vif 蛋白によるウイルス成熟過程の制御に関する研究

vif 遺伝子は EIAV を除く全てのレンチウイルスに存在し、その遺伝子産物である Vif 蛋白はウイルスの複製に必須である。近年の研究より、Vif 蛋白はリンパ球やマクロファージなどの自然宿主細胞内において、抗 HIV 因子 APOBEC3G のプロテアソーム分解を促進することにより HIV 感染性を増強することが明らかとなった。一方、Vif 蛋白は細胞内 APOBEC3G 発現量に関係なくウイルス粒子へ取り込まれる。特に、Vif 蛋白はウイルスゲノム RNA やヌクレオカプシド依存性にウイルス粒子に取り込まれ、粒子内では Core におけるウイルスゲノム RNA と共局在することから、何らかの機能的役割が予想されていた。興味深いことに、Vif を細胞内で過剰発現すると、それに相関してウイルス粒子内 Vif (v-Vif) も増加し、結果としてウイルス感染性が顕著に低下する。特に過剰量 v-Vif は Gag p2/NC プロセッシングのみを特異的に抑制することでウイルス成熟過程を阻害し、この作用は Vif N 末端側領域により規定されているとともに、この作用は permissive cell で産生されたウイルスでも認められることから、APOBEC3G と独立した新たな Vif 機能を反映しているものと考えられた。そこで本章では、v-Vif によるウイルス成熟制御作用に寄与する機能領域を明ら

かにし、もって v-Vif の生理学的な機能解明の基盤とすることを目的として研究を行った。

その結果、Vif の 10-13 アミノ酸残基を欠損した変異体 M-3 およびその欠失アミノ酸残基をアラニンに置換した M-3/4A 変異体は感染性抑制作用が失われることが明らかとなった。また、M-3 および M-3/4A 変異体の細胞内発現やウイルス粒子への取り込み効率はほとんど野生型 Vif と同程度であったこと、さらにウイルス粒子への取り込み量を増加させてもウイルスプロテアーゼによる Gag p2/NC cleavage の阻害効果および感染性抑制効果が見られなかったことから、¹⁰VWQV¹³ アミノ酸残基は v-Vif 作用を規定するドメインであることが示された。本研究結果は、v-Vif に関する機能的役割に関するこれまでの報告を実証すると共に、v-Vif のウイルス成熟制御作用に係る分子機構を解明する上で重要な知見であると考えられた。

結語

エイズウイルスは、進化過程において、通常のレトロウイルスには見られないアクセサリ遺伝子群を獲得することによって、免疫機構の中心的プレーヤーである CD4⁺T 細胞への感染性および CTL からの回避能力を獲得した。このことは、これまで多くのレトロウイルスが宿主との共存を果たしてきたのに相反し、エイズウイルスが宿主を死に至らしめる結果をもたらすこととなった。このようなウイルスの進化がもたらす人類への脅威が、僅か 20 kD 程度のアクセサリ蛋白によって規定されていることは非常に感慨深い。