

## 論文の内容の要旨

論文題目 サル免疫不全ウイルス・カプシド蛋白の分子間 N-C ドメインの機能的相互作用に重要なアミノ酸配列に関する研究

指導教員 俣野 哲朗教授  
東京大学大学院医学系研究科  
平成 19 年 4 月入学  
医学博士課程  
病因・病理学専攻  
稲垣 奈都子

後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) の原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus, HIV) およびサル免疫不全ウイルス (simian immunodeficiency virus, SIV) が分離されてから約 30 年の歳月が経つ。しかし、世界の HIV 感染者数は増加し続けており予防 AIDS ワクチン開発は国際的な課題である。また、これまでの精力的な研究により HIV 陽性者の発症阻止のための抗レトロウイルス薬が数多く開発され、多剤併用療法 (highly active antiretroviral therapy, HAART) によりウイルスの増殖を防御することが可能となってきたが、長期服用による副作用や薬剤耐性株の出現といった問題は残されており、HIV 感染を完治ならびに根絶するための新たな HIV 制御法が切望されている。これらの課題の克服には、HIV/SIV の生物学的性質、HIV/SIV と感染細胞の相互作用そして免疫系の応答について、今以上

に解明を進めることが必要である。

AIDS ワクチンならびに抗 HIV/SIV 薬の開発を困難にしている原因の一つとして、HIV/SIV が多様性に富むゲノムを有することが挙げられる。この多様性に富んだゲノムを有する HIV/SIV において、N 末端ドメイン (NTD) と C 末端ドメイン (CTD) から構成される Gag カプシドタンパク (CA) をコードするゲノム領域は比較的保存性が高いことが知られている。細胞性免疫の代表的エフェクターである細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) は、ウイルス感染細胞膜表面に発現している各個体固有の主要組織適合性遺伝子複合体 (major histocompatibility complex) クラス I (MHC-I) 分子に結合した抗原エピトープを特異的に認識し感染細胞に対し細胞傷害を起こすが、CTL の強い HIV 複製抑制作用の下では CTL の認識から逃れるような変異を有する HIV が選択されていることが知られている。一方、そのような CTL エスケープ変異により、ウイルスの複製能が低下する場合があることも知られており、タンパク質の構造上の制約を伴う CA における CTL エスケープ変異によるウイルス複製能の低下はしばしば報告されている。このようなゲノム保存性の高い CA タンパク質の構造上の制約を知ることはワクチン抗原デザインや抗 HIV 薬開発に有用であると考えている。

所属研究室では、これまで MHC-I ハプロタイプ 90-120-Ia 陽性アカゲサルを用いたワクチン接種群への SIVmac239 チャレンジ実験で、ワクチン誘導 CTL が

SIVmac239 の複製を制御しうることを報告し、その際 Gag<sub>206-216</sub> (IINEEAADWDL) エピトープ特異的 CTL 反応がその制御に重要な役割を担っていることを明らかにした。一方、MHC-I ハプロタイプ 90-120-Ia 陽性ワクチン接種サル群への別の病原性 SIV 株 SIVsmE543-3 チャレンジ実験では、感染初期の Gag<sub>206-216</sub> エピトープ特異的 CTL の二次反応は認められず、高い血中ウイルス量を維持したまま約 1 年あまりでエイズ発症に至った。SIVsmE543-3 の Gag<sub>206-216</sub> エピトープ領域のアミノ酸配列は SIVmac239 と同じ配列に保たれていたが、Gag<sub>206-216</sub> エピトープの 1 アミノ酸前に位置する Gag205 番目のアミノ酸配列の違い (SIVmac239Gag205 番目はアスパラギン酸 (D)、SIVsmE543-3Gag205 番目はグルタミン酸 (E)) に因り Gag<sub>206-216</sub> エピトープ特異的 CTL は SIVmac239 を認識するものの、SIVsmE543-3 を認識できないことが示された。

私は、Gag<sub>206-216</sub> エピトープ特異的 CTL からのエスケープに結びつく、この Gag205 番目のアミノ酸置換 (GagD205E) の SIV 複製能への影響を調べることにした。まず SIVmac239 野生型の Gag205 番目を D から SIVsmE543-3 由来の E に置換した SIVmac239Gag205E 変異体を作製し、*in vitro* での複製能を検討した。この SIVmac239Gag205E 変異体のサル T 細胞株における複製能は、野生型に比べ低下していた。更に、この SIVmac239Gag205E を継代すると新たな代償性変異 (GagV340M) が追加され複製能が回復することを見出した。興味深いことに、

ここで見出された Gag340 番目のアミノ酸変化は、SIVmac239 由来のバリニン (V) から SIVsmE543-3 由来のメチオニン (M) への変化であり、構造的な相互作用を探るため、現時点で報告されている HIV-1 の CA 構造を基に SIV CA の構造シミュレーション解析を行った。CA 単量体構造シミュレーション解析では、Gag205 は Gag がコードする CA 内の NTD に位置するのに対し、今回新たに見出された代償性変異 Gag340 は CA の CTD に位置しており分子内相互作用の可能性は低いことが示唆された。しかし、CA 六量体構造シミュレーション解析により両者のアミノ酸の分子間相互作用が示唆された。in vitro core stability assay を用いて CA コアの安定性をみたところ GagD205E 変異によりコアの安定性が低下し、GagV340M 追加変異により回復することが示され、CA 六量体での分子間相互作用を支持する結果が得られた。

また、MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a 陽性サルの SIVmac239 感染慢性期に、GagD205E + GagV340M 変異が選択されることを見出した。培養細胞での SIVmac239Gag205E 継代実験で Gag205E から野生型の Gag205D に戻るのではなく GagV340M の追加変異の出現を認めたが、同様にサル個体においても GagD205E+V340M が選択された。このことは、Gag205D-Gag340V および Gag205E-Gag340M の相互作用の存在、つまり CA NTD の Gag205 番目と CA CTD の Gag340 番目間に機能的相互作用の存在を示唆する重要な証拠と考えられる。

本研究は CA の NTD-CTD の機能的相互作用のための 構造上の制約について *in vitro* および *in vivo* の根拠を提示するものである。これまで行われた多くの研究から HIV/SIV 感染に Gag 特異的 CTL 反応が効果的であることが示されてきており、Gag は CTL 誘導ワクチンの抗原候補として期待されていることから、Gag 内の構造上の制約がある部位をワクチンデザインのターゲットとする戦略は有望である。本研究は、Gag CA の機能的相互作用の重要性を *in vitro* だけでなく *in vivo* でも示す根拠を得た点で高い意義を有し、更に、得られた CA 構造上の制約はワクチン抗原デザインに有益な情報をもたらす点で重要であると考えられる。