

学位論文題名

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 nef 遺伝子産物の
ウイルス複製における機能

学位論文内容の要旨

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ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus : HIV) はレトロウイルスに属しているが、従来のレトロウイルスには見られないユニークな遺伝子群「アクセサリー遺伝子」を有している。このアクセサリー遺伝子の一つである *nef* の遺伝子産物は初期の研究において negative factor であると見なされていたが、その後いくつかの研究グループによって、Nef が positive factor である可能性が示唆されてきた。特にアカゲザル由来サル免疫不全ウイルスのサルへの感染実験で、Nef が AIDS 発症に不可欠であることが示され、*in vivo* でのウイルス増殖における Nef の重要性が明らかになった。また *in vitro* においても、resting peripheral blood mononuclear cell を用いた感染実験で、更に培養細胞株でも低力価のウイルス感染によって、Nef の positive 効果が明らかにされると共に、Nef がウイルス粒子の感染性を高めている可能性が示唆された。そこで本研究では、Nef の効果がウイルス複製サイクルのどのステップで認められるかについての検討を行った。

まずプラスミド DNA をトランスフェクトしてヒト結腸癌細胞由来株 SW480 細胞より産生された pNL432 の野生型及び *nef* 変異ウイルスを、4 種類の CD4 陽性細胞株 H9、CEMx174、A3.01、M8166 に感染させた時のウイルス増殖曲線を検討した。H9 細胞に感染させた場合、野生型は 10 日でウイルス産生のピークに達するのに対し、*nef* 変異ウイルスは 4 日遅れてピークに達した。CEMx174 細胞に感染させた時、野生型も *nef* 変異ウイルスも共に感染後 9 日目にウイルス産生のピークを迎えたが、感染後 5 日目においては *nef* 変異ウイルスで明らかに増殖の遅れが認められた。A3.01 細胞を用いた場合もやはり *nef* 変異ウイルスの増殖は野生型に比べ遅れた。M8166 細胞では感染後 5 日目に *nef* 変異ウイルスは野生型の 2 倍近くのウイルス産生量を示したが、これは野生型感染により激しい細胞傷害が認められ細胞数が減少した為と思われる。ここで用いた 4 種の CD4 陽性細胞株においては、程度の差はあるが、*nef* 変異ウイルスは野生型に比べ、ウイルス増殖の遅延が認められることが明らかになった。

CD4 陽性細胞株における、野生型と *nef* 変異ウイルスのウイルス増殖速度の違いが、ウイルスの感染サイクルの後期、すなわち転写からビリオンの放出までの違いに起因する可否かを検討した。H9、CEMx174、M8166 及び A3.01 細胞に、pNL432 の野生型と *nef* 変異体のプラスミド DNA を DEAE-Dextran 法によりトランスフェクトして、48 時間後の培養上清の RT 活性を比較した。その結果、野生型と *nef* 変異ウイルスの RT 活性は用いた全ての細胞株においてほぼ等しい値を示した。このことから Nef の効果は感染後期、すなわちビリオンの放出の段階までには認められないことが明らかになった。

Nef の効果が感染サイクルの初期、すなわち吸着・侵入からインテグレーションに至る

までに認められるか否かを検討するために、pNL432の *vpu-env* 遺伝子領域にバクテリアのCAT遺伝子を挿入したpNLcCATと *env* 発現ベクター Δ BSを構築して、single-round infection assayを試みた。このsingle-round infection assayは、pNLcCAT及び Δ BSをSW480細胞にトランスフェクトして得られたpNLcCATウイルスを、H9、CEMx174またはM8166細胞に感染させた後、CAT活性を測定するという方法で行った。

このassayに用いるpNLcCATにおいてCAT遺伝子の挿入により生じた *vpu* の欠失が、野生型と *nef* 変異ウイルスの比較に影響を与えるか否かを検討した。pNLcCATの野生型に相当するpNL432-*vpu* 変異ウイルスと、pNLcCATの *nef* 変異ウイルスに相当するpNL432-*vpu-nef* 2重変異ウイルスの増殖パターンを4種のCD4陽性細胞株において比較した。その結果全ての細胞において、*nef* の有無によるウイルス増殖性の違いはより顕著に表れる結果となった。特にH9細胞とM8166細胞においては *vpu-nef* 変異ウイルスの増殖は全く観察されなかった。これは既に報告されている様に、Vpuにはウイルスの放出量を高める働きがあることから、*vpu* 遺伝子を欠失させることにより感染1サイクル当たりのウイルス産生量が減少し、結果として、前述した低力価のウイルスによる感染に類似した効果が得られるためと思われる。何れにしても、*nef* の有無によるウイルス増殖の比較においては、pNLcCATウイルスにおける *vpu* の欠損は無視できることが確認できた。

次に、single-round infectionにより、感染初期の段階においてNefの効果が認められるか否かを検討した。pNLcCATの野生型または *nef* 変異ウイルスをH9、CEMx174あるいはM8166細胞に感染させた結果、H9とCEMx174細胞では、CAT活性により示された *nef* 変異ウイルスの感染性は野生型の1/5程度にまで、またM8166細胞においては1/2程度に低下していた。先の結果を併せて考慮すると、Nefは感染後期には影響を及ぼさず、初期過程においてその効果が認められることが明らかになった。

ウイルス感染の初期過程におけるNefの作用点を更に絞り込む為に、エントリーアッセイによりpNL432の野生型と *nef* 変異ウイルスの細胞内侵入効率の比較を試みた。野生型、*nef* 変異ウイルスあるいは *env* 変異ウイルスを等力価で4種のCD4陽性細胞株にそれぞれ感染させた。トリプシン処理により細胞表面に付着しているウイルス粒子を除き、さらに頻回の洗浄を行った後、細胞溶解液に溶かしたものをp24 antigen capture ELISAにより測定した。野生株と *nef* 変異ウイルスのp24量はそれぞれ *env* 変異ウイルスの非特異的吸着による値を差し引いた分で示した。その結果、全ての細胞において、野生型に比べて *nef* 変異ウイルスの細胞内侵入効率は明らかに低下していた。ここで認められた野生型と *nef* 変異ウイルスの違いは、CAT活性で表された感染性の違いをほぼ正確に反映していた。以上の結果より、Nefの効果はウイルス感染サイクルの後期には認められず、感染初期、しかも細胞内侵入の段階で現れることが明らかになった。従って、実際の機能は、感染後期のウイルスの成熟及び放出時におけるEnvのウイルス粒子中への取り込みにある可能性が推察された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 生 田 和 良

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 柿 沼 光 明

学 位 論 文 題 名

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 nef 遺伝子産物の ウイルス複製における機能

後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスである HIV は、全てのレトロウイルスに共通してみられる構造遺伝子の他に、調節遺伝子とアクセサリー遺伝子を持っている。この内、アクセサリー遺伝子は、AIDS を引き起こすウイルスにのみ共通して認められるが、ウイルス増殖に必須ではないと考えられていた。一方、アカゲザル由来サル免疫不全ウイルスのサルへの感染実験により、アクセサリー遺伝子のひとつである *nef* 遺伝子産物が AIDS 発症に不可欠であり、その機能として高い血中ウイルスレベルを維持することが明らかになっている。しかし、この Nef タンパク質がウイルスライフサイクルのどの段階で機能しているのか不明であった。

本研究では、野生型 HIV と *nef* 変異 HIV を作製し、ウイルス量を一致させた状態で感染実験を詳細に検討した。その結果、Nef の効果は感染後期のビリオンの放出の段階までには認められず、感染初期の段階、特に細胞内へのウイルス侵入の段階で顕著な差異が認められることを明らかにした。

材料として、HIV の infectious molecular clone である pNL432 (野生型) 及びその *nef* 遺伝子内に frameshift 変異を導入した *nef* 変異体をそれぞれトランスフェクションすることにより得られたウイルスを用いた。これらを 4 種類のヒト CD4 陽性 T 細胞に感染させ、ウイルスの増殖キネティクスを検討した。その結果、急性感染の初期の段階で、野生型に比べ *nef* 変異ウイルスの増殖の遅延が観察された。そこで次に、野生型と *nef* 変異ウイルスのこの増殖性の違いがウイルスのライフサイクルのどのステップに起因するかを検討するために、両ウイルス間におけるウイルスの放出量の違いをトランスフェクション実験によって調べた。その結果、両者ともほぼ等しい値を示したことから、Nef タンパク質は感染後期のウイルスの放出機能には関わっていないことが明らかになった。そこで、感染初期における Nef の効果を検討する為に、single-round infection assay を行なった。この方法は、pNL432 の *env* 領域内に CAT 遺伝子を挿入したプラスミドの *nef* 遺伝子が正常なものと変異を導入したものを作製し、これらと *env* のみの発現ベクターとをコトランスフェクションすることにより得られたウイルスを、ヒト CD4 陽性 T 細胞に感染させ、それらのウイルス複製効率の違いを CAT 活性を測定することにより比較するものである。その結果、*nef* 変異ウイルスの感染性が明らかに野生型に比べて低下していた。従って、Nef タンパク質が存在する場合には、感染サイクルの初期、即ち

ウイルス吸着からインテグレーションに至る過程にその効果が現れると考えられた。感染初期過程におけるNefの作用点を更に絞り込む為に、エントリーアッセイを行った結果、Nefタンパク質の効果は、細胞内侵入の段階で現れることが明らかになった。

考察として、Nefタンパク質はウイルス粒子の非構成タンパク質であることを考慮すると、今回得られた結果は、Nefタンパク質は感染後期に働きEnvのウイルス粒子中への取り込みに関与し、その結果ウイルス感染初期のエントリーの段階でその効果を示す可能性が強く示唆された。

本研究は、AIDS病態と密接に関連するウイルス複製効率に、*nef*遺伝子産物がウイルス複製の侵入段階で関与していることを初めて明らかにしたものであり、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。