

学 位 論 文 題 名

牛白血病ウイルスのウイルス感染と細胞融合における
エンベロープ糖蛋白質 gp30YXXL 配列の役割に関する研究

学位論文内容の要旨

牛白血病ウイルス (BLV) は、ヒトT細胞白血病ウイルス-1および-2に最も近縁のレトロウイルスで、ウシの悪性Bリンパ腫よりなる地方病性牛白血病を引き起こす。BLVのエンベロープ糖蛋白質は、72-kDの前駆蛋白質として合成され、表面蛋白質gp51と膜貫通蛋白質gp30に分解される。gp30の細胞内領域には、3つのYXXL配列が存在する。そのN-末端側2つの配列は、TおよびB細胞抗原受容体からの情報伝達に関与するimmunoreceptor tyrosine-activation motifと同様に、TyrおよびLeuに依存した情報伝達を展開できることが明らかとなっている。また、YXXL配列は、分子を細胞表面から細胞質へ内在化させるinternalization signalとしても認識されることが知られ、BLVのYXXL配列の様々な機能に興味を持たれている。そこで、申請者はYXXL配列の*in vitro*におけるウイルス感染と細胞融合能の役割を詳細に解析した。

1つのlong terminal repeat (LTR) を持つ環状型ウイルスDNAの感染性分子クローン (pB6490) より、2つのLTRを持つ完全長BLV感染性分子クローン (pBLV-IF) を構築した。更に、このpBLV-IFを用いて、gp30に存在する3つのYXXL配列のうち、情報伝達に必須であると報告されているN-末端側2つの配列のTyrおよびLeuをsite-directed mutagenesisによりAlaに変異したウイルスDNA (Y487A、L490A、Y498A、L501AおよびY487/498A) を作製した。

これらYXXL配列変異ウイルスの発現と粒子産生を検討するため、野生体および変異型ウイルスDNAをCOS-1細胞に一過性に導入した。60時間後、細胞のSDS可溶化物を調製し、BLV感染ヒツジ血清を用いて免疫ブロットした。全ての変異型ウイルスDNA導入細胞は、野生体導入細胞と同程度にp24、Pr45_{gag}、Pr70_{gag}、gp30、gp51およびgPr72_{env}を発現することが示された。また、培養上清中のウイルス粒子を超遠心により濃縮し、逆転写酵素活性を測定した結果、全ての変異型ウイルスDNA導入細胞の培養上清は、野生体導入細胞と同程度に活性を示した。これらの結果から、いずれの変異型ウイルスDNA導入細胞も正常にBLVを発現し、粒子を産生することが明らかとなった。続いて、直線化したウイルスDNAをCOS-1細胞に安定導入し、ウイルスの安定発現細胞株を樹立した。

変異ウイルスの*in vitro*における感染性と増殖性を検討するため、BLV感受性FLK細胞にウイルスDNAを一過性に導入し、導入細胞を継代した。野生体、およびY487A、L490AおよびL501A変異ウイルスDNA導入細胞は、継代につれてBLV抗原陽性率および培養上清中の逆転写酵素活性の増加を示した。一方、Y498AおよびY487/498A変異ウイルスDNA導入細胞において、両変異ウイルスは増殖性を示さなかった。また、ウイルス

DNAの安定導入COS-1細胞の培養上清を超遠心してcell-freeウイルスを調製し、FLK細胞に接種した場合も、Y498AおよびY487/498A変異ウイルス接種細胞のBLV抗原陽性率は、野生体および他の変異型に比べ著しく低下していた。

Y498AおよびY487/498A変異ウイルスの感染性および増殖性低下の機序を明らかにするため、cell-freeウイルスをBLV感染ヒツジ血清を用いて免疫ブロットし、ウイルス粒子のエンベロープ糖蛋白質の取り込みを調べた。Y498AおよびY487/498A変異ウイルスのgp51取り込みは、野生体の約40%に減少していた。更に、変異ウイルスの標的細胞に対する、吸着と侵入について解析するため、cell-freeウイルスとFLK細胞を4℃または37℃で反応させ、相互作用したウイルス量を抗-p24モノクローナル抗体を用いた免疫ブロットにより定量した。吸着したウイルス量のみを測定するため4℃で反応させると、いずれの変異ウイルスも野生体とほぼ同等のp24が検出された。次に、37℃で反応後、細胞表面に吸着したウイルスをトリプシン処理により除去し、侵入したウイルス量を求めた。Y498AおよびY487/498A変異ウイルスは、野生体および他の変異ウイルスに比較して、極めて少量のp24しか検出されなかった。これらの結果は、YXXL配列の変異はウイルス粒子の標的細胞への吸着にはほとんど影響を及ぼさないが、その後の侵入過程においてY498AおよびY487/498A変異は、その効率を著しく抑制することを示している。つまり、Y498AおよびY487/498A変異ウイルスの細胞への侵入効率の低下の結果として、著しい感染性の低下をきたしていると考えられる。

ウイルス感染における機能に加え、エンベロープ糖蛋白質の重要な機能である細胞融合能について解析するため、変異型ウイルスDNAの安定導入COS-1細胞とFLK細胞を混合培養した。L490AおよびL501A変異型ウイルスDNA導入細胞は、野生体導入細胞とほぼ同数の多核巨細胞を形成したのに対し、Y487A、Y498AおよびY487/498A変異型導入細胞は、野生体導入細胞のそれぞれ8.8および14倍の多核巨細胞を形成した。また、ウイルスDNAあるいはエンベロープ糖蛋白質発現プラスミドの変異型を一過性にFLK細胞導入した場合も、Y487A、Y498AおよびY487/498A変異型導入細胞は、野生体導入細胞に比較して強い多核巨細胞形成能を示した。次に、ウイルスDNAの安定導入COS-1細胞表面に発現しているエンベロープ糖蛋白質について抗-gp51モノクローナル抗体を用いてFACS解析した結果、Y487A、Y498AおよびY487/498A変異ウイルスDNA導入細胞は、野生体および他の変異型ウイルスDNA導入細胞に比較して有意に発現上昇していた。また、細胞の全エンベロープ糖蛋白質の発現量は、野生体および変異型において顕著な変化がないことから、これらの変異がエンベロープ糖蛋白質の発現ではなく、細胞表面上での局在に影響していると推測される。そして、この局在変化が細胞融合能を増強したと考えられ、YXXL配列がinternalization signalとして認識されていることを示唆している。

以上の解析結果より、BLV gp30 Tyr498はウイルス感染性、特にウイルス粒子のエンベロープ糖蛋白質取り込みおよび侵入過程を保持するために重要なアミノ酸残基であることが明らかとなった。また、Tyr487およびTyr498の両アミノ酸残基はエンベロープ糖蛋白質の細胞表面発現抑制、更に、細胞融合能に関与していると考えられた。今回示した結果から、YXXL配列は情報伝達に関与するばかりでなく、ウイルスの感染、伝播、さらには白血病発症において重要であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 生 田 和 良

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 柿 沼 光 明

学 位 論 文 題 名

牛白血病ウイルスのウイルス感染と細胞融合における エンベロップ糖蛋白質 gp30YXXL 配列の役割に関する研究

牛白血病ウイルス(BLV)は、ウシの悪性Bリンパ腫よりなる地方病性牛白血病を引き起こす。BLVのEnv蛋白質gp30の細胞内領域には、3つのYXXL配列が存在する。そのN-末端側2つの配列は、情報伝達に関与するimmunoreceptor tyrosine-based activation motifと同様に情報伝達を展開できる。また、単独のYXXL配列は、分子を細胞表面から細胞質へ内在化させるsignalとしても認識され、BLVのYXXL配列の機能に興味を持たれている。そこで、申請者はYXXL配列の*in vitro*におけるウイルス感染と細胞融合能の役割を解析した。

BLV感染性分子クローンを用いて、gp30のN-末端側2つのYXXL配列のTyrおよびLeuをAlaに変異したウイルスDNA (Y487A、L490A、Y498A、L501AおよびY487/498A)を作製した。これら変異ウイルスの発現と粒子産生を検討するため、ウイルスDNAをCOS-1細胞に一過性に導入した。60時間後の、BLV感染ヒツジ血清を用いた免疫プロットと、濃縮した培養上清の逆転写酵素活性の測定から、いずれの変異型ウイルスDNA導入細胞も、正常にBLVを発現し、粒子を産生することが明らかとなった。この結果を踏まえ、COS-1細胞のウイルスDNA安定導入細胞株を樹立した。これら、ウイルスDNAの安定導入COS-1細胞の産生するウイルスを、FLK細胞にcell-freeで接種した場合、Y498AおよびY487/498A変異ウイルスの感染効率は、野生型および他の変異型に比べ著しく低下していた。

変異ウイルスの感染性低下の機序を明らかにするため、ウイルス粒子をBLV感染ヒツジ血清を用いて免疫プロットし、ウイルス粒子へのEnv蛋白質の取り込み量を調べた。Y498AおよびY487/498A変異ウイルスのgp51取り込みは、野生型の約40%に減少していた。更に、変異ウイルスの標的細胞に対する、吸着と侵入について解析するため、ウイルス粒子とFLK細胞を4℃または37℃で反応させ、相互作用したウイルス量を抗-p24 モノ

クローナル抗体を用いた免疫ブロットにより定量した。吸着したウイルス量のみを測定するため4℃で反応させると、いずれの変異ウイルスも野生型とほぼ同等のp24が検出された。次に、37℃で反応後、トリプシン処理し、侵入したウイルス量を求めた。Y498AおよびY487/498A変異ウイルスは、野生型に比較して、極めて少量のp24しか検出されなかった。これらの結果から、Y498AおよびY487/498A変異ウイルスの感染性の低下は、細胞への吸着ではなく侵入効率の低下に起因していることが明らかとなった。

Env蛋白質の細胞融合能について解析するため、ウイルスDNAの安定導入COS-1細胞と非感染のFLK細胞を混合培養した。L490AおよびL501A変異型ウイルスDNA導入細胞は、野生型導入細胞とほぼ同数の多核巨細胞を形成したのに対し、Y487A、Y498AおよびY487/498A変異型導入細胞は、野生型導入細胞のそれぞれ8.8および14倍の多核巨細胞を形成した。次に、ウイルスDNAの安定導入COS-1細胞表面に発現しているEnv蛋白質について抗-gp51モノクローナル抗体を用いてFACS解析した結果、Y487A、Y498AおよびY487/498A変異ウイルスDNA導入細胞は、野生型および他の変異型ウイルスDNA導入細胞に比較して有意に発現上昇していた。

以上の解析結果より、BLV gp30 Tyr498はウイルス感染性、特にウイルス粒子のEnv蛋白質取り込みおよび侵入過程を保持するために重要なアミノ酸残基であることが示された。また、Tyr487およびTyr498の両アミノ酸残基はEnv蛋白質の細胞表面発現抑制、更に、細胞融合能に関与していると考えられた。今回示した結果から、YXXL配列はウイルスの感染、伝播、さらには白血病発症において重要であると考えられる。

公開発表にあたり、副査の吉木教授から*in vivo*でのgp30 YXXLの役割、BLVの感染受容体、ウイルス感染とシンシチウムの関係、野外のウイルスにおけるgp30の変異の状況について、副査の柿沼教授より、導入した変異はワクチン開発を目指したものか、細胞融合活性にgp51とgp30のどちらが必要か、ロイシン変異にアラニンを用いた理由について、主査の生田教授より、導入した変異はウイルスのライフサイクルのどの段階に影響するのかと、YXXL配列の情報伝達に関する知見についての質問がなされたが申請者はおおむね妥当な回答を行った。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。