

学位論文題名

バキュロウイルス発現系を用いた HTLV- II

粒子形成機構の解析

学位論文内容の要旨

I: 目的

Human T cell lymphotropic virus (HTLV) type II は atypical hairy cell leukemia より初めて分離されて以来、large granular lymphocytic leukemia、HAM (HTLV-I associated myelopathy) 様疾患等各種ヒト疾患との関連性が報告されている。レトロウイルスの粒子形成では、プリカーサー蛋白が感染細胞膜下で凝集し出芽することが粒子形成の主要な機構であると考えられている。その際、細胞膜下でのプリカーサー蛋白の重合によりプロテアーゼが活性化され、プリカーサー蛋白がプロセッシングを受けてコアを有する完全な粒子が形成される。

本研究では、HTLV-II (Human T-cell Leukemia Virus type II) ウイルス粒子形成における働きを調べるためにバキュロウイルス発現系を用いた実験系を組み、粒子形成に関与するウイルス遺伝子領域の同定を試みた。HTLV-II の Gag プリカーサー蛋白 Pr53^{gag} が、バキュロウイルス感染細胞膜で凝集、出芽し、粒子を形成することを確認した。しかし、Pr53^{gag} は、プロテアーゼをもたないので空の不完全粒子しか形成されない。そこで、次に粒子形成に関与すると考えられるすべてのウイルス遺伝子 *gag-pro-pol* 領域を含むベクターを用いてウイルス蛋白を発現させ、コアを有する完全粒子の形成も確認した。さらに *pol* 領域、*pro* 領域の遺伝子を欠損させることにより粒子形成にどのような影響を与えるかを検討した。

II: 方法

組み換えバキュロウイルスを昆虫細胞 (H5) に感染させることにより HTLV-II ウイルス粒子を発現させ、ウエスタンブロット法、シヨ糖密度勾配遠沈法、電子顕微鏡を用いてウイルス粒子の解析を行った。レトロウイルスの粒子形成に必要といわれている Gag プリカーサー蛋白 (Pr53^{gag}) をコードする発現ベクター pVLGag を作成した。また、粒子形成に関わる蛋白をすべて含む Gag-Pro-Pol 融合蛋白 (Pr160^{gag-pro-pol}) を発現し、コアを有する完全な粒子を形成すると考えられるベクター pVLPol を作成した。さらに、Pro、Pol 蛋白の粒子形成に関わる役割を検討するため pVLPol の *pol* 領域の 3'側からの欠損ミュータント (pVLR_T, pVLPro, pVLStu, pVLSma) も作成した。これらの発現ベクターをそれぞれ H5 細胞にトランスフェクションしウイルス粒子を発現させ、次に、その粒子を H5 細胞にインフェクションし、ウイルス粒子を発現させた。H5 細胞中及びその上清中のウイルス蛋白を HTLV-II キャリアー血清を用い、ウエスタンブロット法によって検出した。また、シヨ糖密度勾配遠心法を用い産生されたウイルスの密度を測定した。さらに、電子顕微鏡を用いてウイルス粒子の形態を観察し、*pol* 領域の欠損 (pVLR_T, pVLPro)、*pro* 領域の欠損 (pVLStu, pVLSma) によるウイルス粒子形成への影響を解析した。陽性コントロールとして HTLV-IIa 腫瘍細胞株 Mo-T を用いた。

III: 結果

HTLV-II においても HIV-1 と同様 Pr53^{gag} を発現させることによって粒子が形成された。しかし、Pr53^{gag} の発現により形成されるウイルスは、電子顕微鏡での観察により、コアを有しない空の不完全粒子であることが判明した。一方、pVLPol を用いて発現させたウイルスはコアを有する完全粒子であった。ウエスタンブロット法によってコアを形成する蛋白である p24 が検出され、電子顕微鏡では中心にコアを有する粒子の形成が観察された。これらはいずれも陽性コントロールである Mo-T 細胞由来のウイルス粒子と同様の所見であった。さらに、プロテアーゼの活性中心を含む pVLRT、pVLPro、pVLStu によって発現させたウイルス粒子でも同様の所見が得られた。しかし、プロテアーゼの活性中心の一つを欠損させた pVLSma を用いて発現させたウイルス粒子は、Pr53^{gag} の発現により形成されたウイルス粒子と同様、中心のコアを欠いた空の不完全粒子であった。ウエスタンブロット法によっても p24 は検出されず、Gag プリカーサー蛋白 Pr53^{gag} のみが検出された。シヨ糖密度勾配遠心法を用いてウイルス粒子の密度を測定したが、いずれも、Mo-T 細胞由来のウイルス粒子と同じく 1.15 g/cm³ であった。こうした結果から HTLV-II の Gag 蛋白 Pr53^{gag} によってウイルス粒子が形成されること、そして、同じレトロウイルスである HIV-1 とは異なり、Pol 蛋白、および Pro 蛋白の一部の欠失による粒子形成への影響はないことが示唆された。プロテアーゼの活性中心を欠損させてはじめて粒子の中心にコアを有さない不完全な空粒子が形成されることがわかった。

IV: 考察

レンチウイルスである HIV-1 では *pol* 領域を欠損させることによりプロテアーゼのダイマリゼーションが起こりにくくなり、プロテアーゼの活性が下がり、コアを有さない不完全粒子の割合が増加する。一方、オンコウイルスである HTLV-II では *pol* 領域の欠損による粒子形成への影響はみられなかった。我々はその理由として、HTLV-II では、Gag-Pro プリカーサー蛋白が作られ、そのプロテアーゼが細胞中ですでに強い活性を持ち、それだけで p24 を有する完全粒子が形成される。そのため Pol, Pro 蛋白の一部を欠失させてもプロテアーゼ活性は変化せず粒子形成には影響がないと考えられる。もう 1 点は、Gag-Pro-Pol プリカーサー蛋白がつくられるには 2 回のフレームシフトを必要とするため、Gag 蛋白の 0.05% の割合でしかつくられない。そのため、Pol 蛋白の欠失がプロテアーゼの活性に影響を与えるとしてもごくわずかであると考えた。

V: 結語

HTLV-II の粒子形成機構を解析するためバキュロウイルス発現系を用いて組み換え Pr53^{gag} を発現させると、ウイルスの粒子が形成された。従って、Gag のプリカーサー蛋白 Pr53^{gag} が粒子形成には必要であると考えられた。次に、バキュロウイルスベクターを用いて組み換え Pr160^{gag-pro-pol} を発現させると、コアを有する完全粒子が形成された。これにより、完全粒子の形成にはプロテアーゼが活性化されていることが不可欠であると結論した。さらに、*pol* 領域を欠損したバキュロウイルスベクターを作成し、*pol* 領域のウイルス粒子形成に与える影響を検討した結果、HTLV-II では、*pol* 領域はウイルス粒子形成には影響を与えないことが判明した。HIV 等のレンチウイルスと HTLV 等のとオンコウイルスでは発芽、プロセッシング機構に違いがあると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 生 田 和 良

副 査 教 授 吉 木 敬

学 位 論 文 題 名

バキュロウイルス発現系を用いた HTLV- II

粒子形成機構の解析

Human T-cell leukemia virus (HTLV) type II は atypical hairy cell leukemia 患者より初めて分離されて以来、各種ヒト疾患との関連性が報告されている。レトロウイルスの粒子形成では、プリカーサー蛋白が感染細胞膜下で凝集し出芽することが粒子形成の主要な機構であると考えられている。その際、細胞膜下でのプリカーサー蛋白どうしの重合によりプロテアーゼが活性化され、プリカーサー蛋白がプロセッシングを受けてコアを有する完全な粒子が形成される。本研究では、HTLV-II ウイルス粒子形成におけるウイルス遺伝子のはたらきを調べるためにバキュロウイルス発現系を用いた実験系を組み、粒子形成に参与するウイルス遺伝子領域の解析を試みた。まず、Gag プリカーサー蛋白 (Pr53^{gag}) をバキュロウイルス系に発現させると感染細胞膜での凝集、出芽及び粒子形成が観察された。しかし、Pr53^{gag} は、プロテアーゼ (Pro 蛋白) を含まないため、形成される粒子は中心にコアを欠いた不完全粒子であった。HTLV-II の粒子形成に参与すると考えられるすべてのウイルス遺伝子 *gag-pro-pol* 領域を含むベクターを用いてウイルス蛋白を発現させ、コアを有する完全粒子の形成を確認した。次に *pro* 領域、*pol* 領域の遺伝子を欠損させることにより粒子形成にどのような影響を与えるかを検討した。方法は組み換えバキュロウイルスを昆虫細胞 (H5) に感染させることにより HTLV-II ウイルス粒子を発現させ、ウエスタンブロット法、シヨ糖密度勾配遠心法、電子顕微鏡を用いてウイルス粒子の解析を行った。ウエスタンブロット法によってコアを形成する蛋白である p24 が検出され、電子顕微鏡では中心にコアを有する粒子の形成が観察された。しかし、プロテアーゼの活性中心の一つを欠損させたベクターを用いて発現させたウイルス粒子は、中心のコアを欠いた空の不完全粒子であった。ウエスタンブロット法によっても p24 は検出されず、Gag プリカーサー蛋白 Pr53^{gag} のみが検出された。シヨ糖密度勾配遠心法を用いたウイルス粒子密度

の測定では、いずれも、 1.15g/cm^3 で同じであった。Pol 蛋白、および Pro 蛋白の一部の欠失による粒子形成への影響はないことが示唆された。プロテアーゼの活性中心を欠損させてはじめて粒子の中心にコアを有さない不完全な空粒子が形成されることがわかった。

学位申請者高橋 礼典の学位論文公開発表は、平成 10 年 1 月 27 日午前 11 時 30 分より医学部臨床大講堂において行われた。

主査長嶋 和郎教授から紹介があった後、申請者はスライドを用いて約 15 分にわたって学位論文内容の発表を行った。その後、吉木 敬教授より粒子形成過程における Env 蛋白の関与、組換えバキュロウイルスを用いて発現させた粒子の膜構造、感染性、他の発現系を用いることの可能性、免疫電顕の必要性について、生田 和良教授からは Gag 蛋白のプロセッシングが起こるタイミングについて、感染細胞の上清中のウイルス粒子の電顕観察の必要性、HIV の Pol 蛋白が粒子形成に及ぼす影響について、質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切な回答を行った。質疑応答の時間は約 15 分であった。なお、出席者はおよそ 10 名であった。

以上、本研究は HTLV-II における粒子形成機構を解析し、このウイルス遺伝子発現と粒子形成過程の特異性を明らかにしたものである。よって、審査員一同は申請者が博士（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。