

学 位 論 文 題 名

ヒトレトロウイルス増殖後期過程の

分子生物学的機能解析

学位論文内容の要旨

本論文ではヒトレトロウイルスの生活環の解析を目的として増殖過程後期における重要な二段階を解析する実験を行った。前半章(2 から 4 章)ではウイルス RNA の核外輸送に着目し、HIV-1(Human Immunodeficiency Virus type 1)の輸送制御タンパク Rev がマウス細胞中で起こる活性阻害を中心に解析した。また後半章(5 章と 6 章)ではウイルスが宿主細胞から出芽する機構に着目し HTLV-1(human T-cell leukemia virus type 1)の Gag タンパクが出芽するために必須な因子に関しての解析を行った。

第二章では HIV-1 のウイルス RNA 輸送因子である Rev がマウス細胞中で十分な活性を有さないことを示した。Rev の RNA 輸送活性は L929 細胞、A9 細胞もしくは NIH3T3 細胞といった複数のマウス細胞において、HeLa 細胞と比較して明確に低かった。この活性の低さは Rev の宿主因子である hCRM1 を共発現させることで回復が見られた。従ってマウス細胞中で Rev の活性が低い原因は CRM1 にあると考察された。

第三章ではまず mCRM1 の単離を行った。mCRM1 は rCRM1 とアミノ酸レベルでは二カ所しか違わない 1072 アミノ酸のタンパクであった。作成した mCRM1 発現プラスミドを L929 細胞に発現させたところ、Rev の機能は回復しなかった。従って、マウス細胞で Rev の機能が低下している最大の原因は mCRM1 が Rev の機能を支持できないことにあることが示された。一方で、mCRM1 はヒト細胞中では hCRM1 と同等の Rev 機能支持能を示した。これは NES 含有タンパクを競合的に拮抗阻害する TAgRexM64 や CRM1 の特異的阻害剤 LMB を用いた実験で同様の結果が示された。更に、LMB 非感受性の CRM1 発現プラスミドを作成し、この CRM1 を用いて同様の実験を行ったが、やはり mCRM1 はヒト細胞中で十分な活性を示した。このことから mCRM1 がヒト細胞とマウス細胞での Rev 支持能力が違うことは CRM1 以外の別因子の存在を示唆する結果となった。

第四章では mCRM1 がヒト細胞とマウス細胞で活性の異なる原因を検討した。まず Two-hybrid assay でヒト細胞中とマウス細胞中で Rev-CRM1 の結合能に影響があるかどうかを検証した。しかし、ヒト細胞中とマウス細胞中の Rev-CRM1 の結合能には大きな差は見られなかった。次にヒト-マウス融合細胞中で mCRM1 が活性を持つかどうかを検討した。その結果、融合細胞中では mCRM1 は活性を示すことが出来なかった。従って mCRM1 がヒトとマウス細胞で Rev 支持能が異なる原因は、マウス細胞中に mCRM1 の阻害的制御因子が存在する事が示唆された。

第五章では HTLV-1 の粒子出芽が PPPY 配列依存的であることを示した。HTLV-1 の Gag 上に存在する PPPY 配列に点変異を入れたり、配列自体を削除したりすると HTLV-1 の出芽は抑制された。一方で、HTLV-1 の Gag は HIV-1 の出芽に関与している PTAP 配列も有しているが、この PTAP 配列に点変異を入れても配列を削除しても HTLV-1 の出芽には顕著な影響を与えなかった。これらのことは電子顕微鏡による粒子の観察によっても確認した。

第六章では HTLV-1 の出芽における宿主因子の検討を行った。Nedd4 の過剰発現は HTLV-1 の出芽を促進したが、同種の E3 である BUL1 や KIAA1301 は出芽に顕著な影響を与えることが出来なかった。また Nedd4 の WW ドメインだけを発現させることで HTLV-1 の出芽を押さえることが出来たことから、HTLV-1 出芽における宿主因子は Nedd4 もしくは Nedd4 と非常に近似した E3 であることが示唆された。また Tsg101 の過剰発現や Vps4 の活性変異体の発現により HTLV-1 の出芽が抑制されることから、HTLV-1 の出芽にも MVB 経路が関与していることが示唆された。

以上本研究では前半章において HIV-1 の RNA 輸送に関して種特異性に関連する新たな所見を明らかにした。また後半章では HTLV-1 の出芽における宿主因子とその機構に關与する有用な所見を明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 昌 則

副 査 教 授 谷 口 和 彌

副 査 教 授 菊 地 九二三

学 位 論 文 題 名

ヒトレトロウイルス増殖後期過程の

分子生物学的機能解析

本論文ではヒトレトロウイルスの生活環の解析を目的として増殖過程後期における重要な二段階を解析する実験を行った。前半章(2 から 4 章)ではウイルス RNA の核外輸送に着目し、HIV-1(Human Immunodeficiency Virus type 1)の輸送制御タンパク Rev がマウス細胞中で起こる活性阻害を中心に解析した。また後半章(5 章と 6 章)ではウイルスが宿主細胞から出芽する機構に着目し HTLV-1(human T-cell leukemia virus type 1)の Gag タンパクが出芽するために必須な因子に関しての解析を行った。

第二章では HIV-1 のウイルス RNA 輸送因子である Rev がマウス細胞中で十分な活性を有さないことを示した。Rev の RNA 輸送活性は L929 細胞、A9 細胞もしくは NIH3T3 細胞といった複数のマウス細胞において、HeLa 細胞と比較して明確に低かった。この活性の低さは Rev の宿主因子である hCRM1 を共発現させることで回復が見られた。従ってマウス細胞中で Rev の活性が低い原因は CRM1 にあると考察された。

第三章ではまず mCRM1 の単離を行った。mCRM1 は rCRM1 とアミノ酸レベルでは二カ所しか違わない 1072 アミノ酸のタンパクであった。作成した mCRM1 発現プラスミドを L929 細胞に発現させたところ、Rev の機能は回復しなかった。従って、マウス細胞で Rev の機能が低下している最大の原因は mCRM1 が Rev の機能を支持できないことにあることが示された。一方で、mCRM1 はヒト細胞中では hCRM1 と同等の Rev 機能支持能を示した。これは NES 含有タンパクを競合的に拮抗阻害する TAgRexM64 や CRM1 の特異的阻害剤 LMB を用いた実験で同様の結果が示された。更に、LMB 非感受性の CRM1 発現プラスミドを作成し、この CRM1 を用いて同様の実験を行ったが、やはり mCRM1 はヒト細胞中で十分な活性を示した。このことから mCRM1 がヒト細胞とマウス細胞での Rev 支持能力が違うことは CRM1 以外の別因子の存在を示唆する結果となった。

第四章では mCRM1 がヒト細胞とマウス細胞で活性の異なる原因を検討した。まず Two-hybrid assay でヒト細胞中とマウス細胞中で Rev-CRM1 の結合能に影響があるかどうかを検証した。しかし、ヒト細胞中とマウス細胞中の Rev-CRM1 の結合能には大きな差は見られなかった。次にヒト-マウス融合細胞中で mCRM1 が活性を持つかどうかを検討した。その結果、融合細胞中では mCRM1 は活性を示すことが出来なかった。従って mCRM1 がヒトとマウス細胞で Rev 支持能が異なる原因は、マウス細胞中に mCRM1 の阻害的制御因子が存在する事が示唆された。

第五章では HTLV-1 の粒子出芽が PPPY 配列依存的であることを示した。HTLV-1 の Gag 上に存在する PPPY 配列に点変異を入れたり、配列自体を削除したりすると HTLV-1 の出芽は抑制された。一方で、HTLV-1 の Gag は HIV-1 の出芽に関与している PTAP 配列も有しているが、この PTAP 配列に点変異を入れても配列を削除しても HTLV-1 の出芽には顕著な影響を与えなかった。これらのことは電子顕微鏡による粒子の観察によっても確認した。

第六章では HTLV-1 の出芽における宿主因子の検討を行った。Nedd4 の過剰発現は HTLV-1 の出芽を促進したが、同種の E3 である BUL1 や KIAA1301 は出芽に顕著な影響を与えることが出来なかった。また Nedd4 の WW ドメインだけを発現させることで HTLV-1 の出芽を押さえることが出来たことから、HTLV-1 出芽における宿主因子は Nedd4 もしくは Nedd4 と非常に近似した E3 であることが示唆された。また Tsg101 の過剰発現や Vps4 の活性変異体の発現により HTLV-1 の出芽が抑制されることから、HTLV-1 の出芽にも MVB 経路が関与していることが示唆された。

以上本研究では前半章において HIV-1 の RNA 輸送に関して種特異性に関連する新たな所見を明らかにした。また後半章では HTLV-1 の出芽における宿主因子とその機構に関与する有用な所見を明らかにした。

これを要するに、著者は、レトロウイルスの生活環の後期過程においての新知見を得たものであり、レトロウイルスの分子機構の解明並びに新たなウイルス治療法に対して貢献すること大なるものがある。

よって、著者は北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。