

氏名	小野岳史
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2219号
学位授与の日付	平成12年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科病理系専攻
学位論文題目	Functional association between the <i>nef</i> gene product and <i>gag-pol</i> region of HIV-1. (HIV-1 <i>nef</i> 遺伝子産物と <i>gag-pol</i> 領域の機能的相互作用に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 松岡雅雄 教授 速水正憲 教授 石本秋稔

### 論文内容の要旨

ヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus; HIV) の Nef 蛋白質はアクセサリ-遺伝子産物の一つで、ウイルス粒子中にはほとんど検出されないが *in vivo* においては AIDS 発症に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。また *in vitro* においては CD4 などのダウンレギュレーションや、種々のキナーゼと結合しシグナル伝達系に影響を与えることでウイルス増加の修飾を行っていることが示唆されているが、その詳細な作用機序は明らかではない。本研究では HIV の感染性分子クローンである NL432 と LAI の *nef* 欠損変異体においてウイルス増殖に差が認められること、その違いが Nef と *gag-pol* 領域との機能的な相互作用に基づくことを示した。

NL432 と LAI の *nef* 欠損変異体を作製し、ウイルス増殖を逆転写酵素活性で比較したところ、NL432 は *nef* を欠損することによる影響、すなわち *nef* のウイルス増殖促進効果が LAI に比べ大きいことが明らかになった。両クローンの Nef には 4 アミノ酸の違いが認められるが、NL432 の *nef* 欠損変異体 DNA に NL432 か LAI の *nef* のみの発現ベクターを共導入して作製したウイルスの再感染性を比較測定したところ差が認められなかったため、これらウイルスの増殖促進効果は両クローンの Nef 自体の差ではないことが示された。さらに両クローンの組換え体である Lain1, 3 を作製しウイルス増殖実験を行ったところ、*nef* のウイルス増殖促進効果は *gag-pol*, *vif* と *Vpr* の 5' 末端を含むウイルスゲノムの 5' 側と関連があることが明らかになった。Nef の作用に関係する領域を明らかにするためにウイルスゲノムの 5' 側についてさらに 7 種の組換え体を作製したところ、NL432 の *Apal-Bst* 1107 I 領域を持つ Lain5, 9, 12 では NL432 型のウイルス増殖がみられたのに対して、LAI の *Apal-Bst* 1107 I 領域を持つ Lain6, 10 では LAI 型のウイルス増殖を示した。この組換え体の *nef* 領域にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を挿入し、さらに *rev* 遺伝子を *trans* に補うことでシングルラウンドの感染により感染効率を測定する系を確立した。このレポーターウイルスを用いて *nef* の増殖促進効果を測定したところ、*gag-pol* にまたがる *Apal-Bst* 1107 I 領域が NL432 由来の場合に *nef* の感染性増強効果が大きく表れることが明らかになった。この領域には *gag* にコードされるヌクレオキャプシドと P6, *pol* にコードされるプロテアーゼ、逆転写酵素の N 末側が含まれており、Nef と *gag-pol* との機能的な相互作用が示唆された。今回明らかになった *nef* を介したウイルス増殖促進効果が、ウイルス増殖のどの段階において機能するのかを逆転写酵素活性、侵入効率、逆転写効率、挿入効率の各段階で比較したところ、侵入後から逆転写の過程で差が認められることが明らかになった。

*gag-pol* にまたがる *Apal-Bst* 1107 I 領域が *nef* の感染性増強効果に関連する領域として重要であることが示唆されたことから、Nef は粒子に取り込まれる前の Gag-Pol と何らかの形で相互作用をしていることが示唆される。これまでの報告にあるように Nef は種々のキナーゼと結合することが知られている。また、Gag のリン酸化が標的細胞への侵入後重要であるとの報告があることから、Nef とキナーゼの複合体が、Gag-Pol 前駆体と結合するモデルが想定される。

## 論文審査の結果の要旨

ヒト免疫不全ウイルス HIV の *nef* はアクセサリ遺伝子の一つで、AIDS 発症に重要な役割を果たしていることが知られている。*nef* の詳細な作用機序を明らかにすることは、ウイルス増殖における調節遺伝子の必要性のみならず、HIV の病原性の理解の一助となる。本研究では、まずいろいろな HIV 感染性クローンより NL 432 と LAI 株が *nef* 欠損によりその増殖性に顕著な差のみられることを明らかにした。次に対立形質を持つこのウイルス株間のキメラウイルスを作製し、*nef* 欠損による増殖性の差に関与する遺伝子を同定したところ、両株の *nef* には機能上の差は無く、*gag-pol* 領域にまたがる ApaI-SnaI 間の 867 bp 内に *nef* の作用点が存在することが明らかになった。同様の結果がルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポーターウイルスを用いた一過性の感染実験によっても得られた。*gag-pol* にまたがる領域が *nef* の感染性増強効果に関連する領域として重要であることが示唆されたことから、Nef は粒子に取り込まれる前の Gag-Pol と何らかの形で相互作用をしていることが示唆された。

以上の研究は HIV アクセサリ遺伝子 *nef* と構造遺伝子 *gag-pol* との機能的相互作用による感染性増強機構の解明に貢献し AIDS 発症の理解に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 12 年 2 月 7 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。