

京都大学	博士 (医学)	氏名	庄嶋 貴之
論文題目	Construction of characterization of an infectious molecular clone of koala retrovirus (コアラレトロウイルス感染性クローンの作製と性状解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>内在性レトロウイルス (ERV) は、レトロウイルスが生殖細胞に感染することで、メンデルの法則に従う遺伝によって垂直方向に伝播するようになったものであり、ほ乳類ゲノムの約 10% を占めるとされている。ERV の多くは、変異や欠失、あるいはエピジェネティックな発現抑制等により、ウイルスとしての複製能を失っているが、胎盤の機能的合胞体形成において ERV 由来のエンベロープ糖タンパク質 (Env) が関与する等、生体にとって重要な役割を果たすものが報告されている。ERV を含むレトロトランスポゾンにはほ乳類の進化に大きく寄与していると考えられるが、レトロウイルスの内在化の機序は不明のままである。</p> <p>レトロウイルスの内在化は、生殖細胞への感染による個体への侵入、複製能の消失やタンパク質発現レベルの低下等による個体内での安定化、および遺伝による群への伝播の過程を経るものと考えられる。コアラレトロウイルス (KoRV) は、内在化の過程の初期段階にある極めて稀なウイルスであり、レトロウイルスの内在化機構を解明する上でのモデルとして重要である。本研究では、KoRV の基本性状の理解を目的として、KoRV 感染性ウイルスクローンを作製し、その増殖効率、宿主細胞域、及び出芽機構等について詳細な解析を行った。</p> <p>KoRV 持続感染 HEK293T 細胞から抽出した DNA を鋳型とし、PCR 法によって KoRV 全長ゲノムクローン pKoRV522 を得た。pKoRV522 を HEK293T 細胞にトランスフェクションすることにより、感染性 KoRV を回収することに成功した。さらに、イムブロットアッセイにより、pKoRV522 のウイルスタンパク質の発現を確認した。以上により、pKoRV522 が KoRV 感染性ウイルスクローンであると結論し、以下の性状解析に供した。</p> <p>先行研究において、KoRV 全長ゲノム分子クローン pcindy が作製されているが、これは複製能を欠損したクローンであった。pcindy の配列情報の解析から、Env 内の特定の amino acid 配列 (CETTG モチーフ) の変異が、レトロウイルスの内在化過程で感染性を抑制する要因として報告されている。pKoRV522 はこの変異をもっていたが、高い複製能を保持していた。シュードタイプアッセイにより Env の機能を詳細に調べたところ、CETTG モチーフの変異の影響は限局的であることがわかった。</p> <p>レトロウイルスは Gag タンパク質に L-ドメインと呼ばれるウイルスの出芽に関与する重要な amino acid モチーフ (PSAP モチーフ及び PPxY モチーフ) を有している。このモチーフは Gag タンパク質自身の細胞内輸送に関わるものであり、変異が生じた場合、Gag タンパク質の細胞膜直下への輸送が阻害され、その結果としてウイルス出芽が阻害される。KoRV は、PSAP モチーフは保存されているが、その下流の PPxY モチーフに変異が生じていることが報告されている。本研究で</p>			

は、アミノ酸配列の精査によって、さらに下流に追加の PPxY モチーフが保存されていることを明らかにし、点変異導入解析によって、この PPxY モチーフが KoRV の出芽において主導的に機能していることを明らかにした。

本研究の成果は、外来性レトロウイルスから ERV への過渡期にある KoRV の性状を明らかにしたものであり、レトロウイルスの内在化機構の研究の進展において重要な役割を果たすものである。

(論文審査の結果の要旨)

内在性レトロウイルス (ERV) は疾病や進化を理解する上で重要であるが、ウイルスの内在化の機序は未だわかっていない。コアラレトロウイルス (KoRV) は、内在化の過程の初期段階にある極めて稀なウイルスであり、レトロウイルスの内在化機構を解明する上でのモデルとして重要である。本研究では、まず、KoRV 陽性コアラ末梢血と HEK293T 細胞の混合培養法により作出した KoRV 持続感染 HEK293T 細胞から PCR 法によって KoRV 全長ゲノムクローン pKoRV522 を得た。そして、このプラスミドは HEK293T 細胞に遺伝子導入すると感染性 KoRV を回収できることから、感染性プラスミドであると確定した。これまでの解析から、KoRV Env 内の CETTG モチーフの変異や Gag の L-domain 内の PPXY モチーフの変異が感染性を抑制する要因と知られていたが、pKoRV522 にもこの変異がありながら高い複製能があり、シュードタイプアッセイやウイルス出芽アッセイでも、これらの変異の影響が限局的であった。このことから内在化に伴うウイルス弱毒化にはこれらの変異以外の他の要因が関与するものと考えられた。本研究の主な成果は、ERV への過渡期にあるレトロウイルスの性状をはじめ明らかにしたものであり、レトロウイルス感染症ならびに内在性レトロウイルス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 25 年 4 月 8 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。