京都大学	博士（医学）	氏　名	芳田　剛
論文題目	A CD63 Mutant Inhibits T-cell Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry by Disrupting CXCR4 Trafficking to the Plasma Membrane （CD63 遺伝子の変異体は、CXCR4 分子の細胞質膜への輸送を阻害することにより、T 細胞指向性ヒト免疫不全ウイルスの侵入を抑制する）		

（論文内容の要旨）

後天性免疫不全症候群（エイズ）の原因ウイルスである human immunodeficiency virus（HIV）は、その感染の成立のために種々の細胞性因子を巧妙に利用する。それとともに、細胞にはウイルス感染に対して抑制的に働く因子の存在も知られている。そこで、ヒト白血球の cDNA ライブラリ発現 HIV 改良レンチウイルスベクターを用いて、HIV 感染に対して抑制的に働く細胞性因子の探索実験を行った。このウイルスベクターを用いることにより、高力価の cDNA ライブラリ（$>2\times10^7$ クローン）をヒト T 細胞株へ導入することが可能となった（参考論文 1)。このライブラリ導入細胞を HIV 感染暴露したところ、大半の細胞は死滅したが、ごく少数の細胞が cDNA を発現しながら生存した。それらの細胞に導入されていた cDNA を単離したところ、それはテトラスパニン分子のひとつである CD63 分子の N 末端領域を欠損する変異体（1-82 アミノ酸領域を欠損、以後 CD63ΔN と表記）であった。CD63ΔN の導入により、CXCR4 を補受容体に使う X4 HIV の感染は強力に抑制されたが、CCR5 を補受容体として用いる R5 HIV の感染には変化がなかった。そのため、CD63ΔN は補受容体である CXCR4 分子の発現に影響を与えることが考えられた。実際、その発現をフローサイトメトリー法により検討したところ、CD63ΔN の導入により細胞膜上 CXCR4 は、ほぼ消失した。一方、HIV の主受容体である CD4、もうひとつの HIV 補受容体 CCR5、トランスフェリン受容体、IL−2 受容体α鎖の発現量はほとんど変化がなかったため、この遺伝子によるダウンレギュレーション活性は CXCR4 特異的であることがわかった。この活性機序を明らかにするため、CD63ΔN 導入細胞における CXCR4 分子の局在解析を行い、その多くがゴルジ体と後期エンドソームに分布することをつきとめた。また、CD63ΔN 導入細胞を抗 CXCR4 抗体存在下に培養しても、細胞表面上の CXCR4 を検出しないことから、この細胞において CXCR4 は細胞膜にほとんど到達していないことがわかった。すなわち、CD63ΔN は CXCR4 の細胞膜への輸送を阻害することにより、X4 HIV の侵入過程を阻止していた。次に、small interfering RNA 法（siRNA 法）を用いた内在性 CD63 の発現抑制の結果細胞表面の CXCR4 発現が増加すること、CD63ΔN ほどの活性はないものの全長 CD63 遺伝子も CXCR4 ダウンレギュレーション活性を有することから、CD63 分子自体が細胞膜上 CXCR4 の発現量調節に関わっている可能性が示唆された。また、免疫染色実験により CXCR4 と CD63ΔN は細胞内で共局在すること、免疫沈降実験により CXCR4 と CD63ΔN が相互作用することが示された。最後に、CXCR4 の C 末端 6 アミノ酸を欠失すると（以下、その欠失変異体を CXCR4Δ6 と表記）、CD63ΔN 誘導性ダウンレギュレーションは起きず細胞表面に到達することが示された。しかし全長 CXCR4 と同様、CXCR4Δ6 においても CD63ΔN との相互作用がみられたため、この C 末端 6 アミノ酸は局在変化には重要であるが、CD63ΔN との結合に関与するわけでないことがわかった。

これらの結果から、ある特定の膜タンパク質は、その相互作用する別種の膜タンパク質の本来の細胞内輸送過程に影響を与え、その膜タンパク質の局在を決定していることが示唆された。この細胞内輸送変換機構の解明は、細胞生物学的な意義を有するだけでなく、ウイルス感染阻止法としても効果的であると考える。

（論文審査の結果の要旨）

エイズの原因ウイルスである human immunodeficiency virus（HIV）は、その感染の成立のために種々の細胞性因子を巧妙に利用する。それとともに、細胞にはウイルス感染に対して抑制的に働く因子の存在も知られている。本論文では、ヒト白血球の cDNA ライブラリ発現レンチウイルスベクターを用いて、HIV 感染に対して抑制的に働く細胞性因子を新たに単離した。それはテトラスパニン分子のひとつである CD63 分子の変異体（1-82 アミノ酸領域を欠損、以後 CD63ΔN と表記）であった。CD63ΔN はゴルジ体内で HIV 補受容体である CXCR4 と相互作用し、CXCR4 の細胞膜への輸送を阻害していた。その結果、CXCR4 の細胞膜上の発現は消失し、HIV の侵入過程は阻止されていた。以上の研究は、新規ウイルス感染阻止法の確立の可能性を示すとともに、ある特定の膜タンパク質がその相互作用する別種の膜タンパク質の細胞内輸送過程に影響を与える新しい機構を示し、膜タンパク質の細胞内輸送機構の解明に貢献した。すなわち、本論文はウイルス学の進展をすすめる意義を有するだけでなく、細胞生物学の新たな理解に寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文としての価値があるものとみとめる。なお、本学位授与申請者は、平成 21 年 1 月 27 日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降