

氏 名	張 曉 燕
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2071 号
学位授与の日付	平 成 11 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 内 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Phosphorothioate hammerhead ribozymes targeting a conserved sequence in V3 loop region inhibit HIV-1 infection (V3ループの保存領域を標的にするホスフォチオエート化ハンマーヘッド型リボザイムは HIV-1 の感染を阻止する) (主査)
論 文 調 査 委 員	教 授 石 本 秋 稔 教 授 速 水 正 憲 教 授 内 山 卓

論 文 内 容 の 要 旨

1. リボザイムの合成と標的：予防・治療に問題の山積するHIV感染症に於いて、標的RNAを配列特異的に切断するリボザイムの応用を検討した。ハンマーヘッド型リボザイムの活性に影響を与えない個所をDNAにし、更にチオリン酸結合を導入した安定型リボザイム (RzV3-T) と、全てがRNAよりなる野生型 (RzV3-W) を使用した。合成にあたり 5'末端を蛍光標識した。HIV-1 の外膜糖蛋白 (env) に存在する第三番目の可変領域 (V3 領域) 内のループ構造 (V3 ループ) 中に最も効率よく切断される配列 (GUAとAUA) を7個発見した。それぞれの標的に対してリボザイムを合成し、RzV3-nT, -nWとした (n=1-7)。

2. 試験管内での切断効果の検討：HXB2株のV3領域を含む412塩基のRNA転写産物をリボザイムと37℃で反応させ試験管内で切断実験をした。すべての野生型リボザイムと2個の安定型リボザイム (RzV3-1Tと-3T) が高い切断活性を有した。RzV3-1の標的はN側のシステインを中心とする保存領域であったので、以後の実験に供した。RzV3-1T, RzV3-1Wともに標的領域の塩基配列が一つ異なるSF162由来RNAも切断した。これらの株も含めるとクレードBの80%のウイルスに有効であると思われた。

3. 細胞内での安定性：標識リボザイムを細胞内に導入して共焦点顕微鏡で観察すると蛍光シグナルは野生型リボザイム導入細胞では12時間で消退したが、安定型リボザイムの場合は24時間以上経過しても強く存在した。

4. ウイルス増殖抑制：補受容体であるCXCR4またはCCR5を発現しているCD4抗原陽性U87細胞を用いてX4好性ウイルスNL432 (標的配列はHXB2株と同じ) とR5好性ウイルスSF162による感染に対する効果を検討した。リボザイムは標的細胞にリポフェクタミンを用いて導入した。RzV3-1TはNL432に対して最も強い抑制活性 (77%) を示し、またSF162の感染も50%抑制した。

5. pseudotypeを用いた測定法：リボザイムの抑制活性をより高感度に評価するため、V3領域を除去したHIV-1由来env不活化luciferaseベクターと様々なHIV-1株由来のenv発現ベクターを293T細胞に共導入し、pseudotypeを作成した。得られたウイルスを補受容体発現U87細胞に感染させ、感染量はluciferase活性により得た。HXB2とADAは感染の際の補受容体は異なっていたが、安定化リボザイムで処理した293T細胞より得られたpseudotypeの感染力は非常に低下した。リボザイム処理した293T細胞で産生される遊離pseudotypeと細胞溶解液のenv蛋白発現量を比較すると、リボザイムで処理し

た群ではenvの発現が著しく減少した。これらの結果からリボザイム処理細胞に由来するpseudotypeの低い感染効率はenv発現の低下によることが明らかになった。

6. 結論：感染に重要な役割をするenv蛋白の、可変領域内の保存部位に対する安定化リボザイムがenv発現を特異的に抑制し、感染阻止効果を示した。本リボザイムの安定性と細胞内への導入法の改良により、感染予防効果のあるリボザイムが開発できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

AIDSの治療には難問が山積している。原因ウイルスはレトロウイルスであるHIVであり、その遺伝子（RNA）を予防・治療の標的とする可能性が指摘されている。本研究はgp120のV3 loopに対するホスフォチオエート化ハンマーヘッド型リボザイム（RzV3-nT, n=1 to 7）を合成して、その抗HIV活性を検討したものである。

In vitro切断実験により保存領域を効率よく切断するRzV3-1が得られた。RzV3-1 Tは細胞内での安定性が野生型より高く、gp120/CD4を介する細胞融合、X4株NL432（標的配列と完全に一致する）とR5株SF162（末端の1個塩基配列が異なる）のウイルス感染を効率よく抑制した。この抑制活性は偽ウイルスを用いた高感度遊離ウイルス侵入測定法を開発することにより定量化された。またRzV3-1 Tはgp120のmRNAのみならず蛋白の発現も抑制したことを証明した。

本研究は安定化リボザイムの抗HIV-1活性を有効に発現する為の標的配列の解明に貢献し、AIDS遺伝子治療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10年12月14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。