

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)			
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。 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。 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、イムノ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。 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内の特定のアミノ酸配列（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。 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アミノ酸モチーフ（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			

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て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。