



Title	HIV type 1 Infection of CD4+T Cells Depends Critically on Basic Amino Acid Residues in the V3 Domain of the Envelope Glycoprotein 120
Author(s)	岡田, 猛
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39353
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	おか だ 田 猛
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 6 5 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 2 月 2 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	HIV type 1 Infection of CD4 ⁺ T Cells Depends Critically on Basic Amino Acid Residues in the V3 Domain of the Envelope Glycoprotein 120 (HIV-1 の CD4 ⁺ T 細胞への感染は, 外被糖タンパク質 gp120 の V3 ドメインに存在する塩基性アミノ酸に強く影響される)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 栗 村 敬 (副査) 教 授 上 田 重 晴 教 授 山 西 弘 一

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

後天性免疫不全症候群, すなわちエイズを引き起こすウイルスとして発見された Human Immunodeficiency Virus type 1 (以下 HIV-1 と略す) は, その塩基配列, 複製速度, シンシチューム形成能, 細胞トロピズム等の遺伝的および生物的特性において多様性を示す。この HIV-1 の phenotype の多様性は, HIV-1 感染者において無症候状態からエイズおよびエイズ関連症候群への progression に関与している。例えば, 無症候状態から CD4⁺ T 細胞数の低下に伴う発症過程において, 優勢株がマクロファージトロピック HIV-1 (複製速度が遅くシンシチューム形成能のない) から T細胞トロピック HIV-1 (複製速度が速くシンシチューム形成能のある) に変異することが知られている。このような phenotype 多様性は, 主に外被タンパク質 gp120 上にある V3 ドメイン (以下 V3 と略す) によって支配されている。

V3 は, 外被タンパク質の主要な immunodominant 部位で, ジスルフィド結合によるループ構造を取り約 35 個のアミノ酸から成る。V3 はアミノ酸の変異が起こりやすい部位にも関わらず, ループの中央部にある Gly-Pro-Gly-Arg-Ala (GPGRA) 配列やループの高プラス電荷 (換言すれば, 塩基性アミノ酸が多い) は, 本質的に多くの HIV-1 株間で保存されている。HIV-1 の感染に対する GPGRA 配列中のアミノ酸の役割については既に多くの報告があり, それらのアミノ酸の人為的変異の多くは HIV-1 の生物活性を著しく低下させる。一方, V3 中の塩基性アミノ酸の役割についてはよく理解されていないが, 最近の統計解析によると, 細胞トロピズムと V3 の塩基性アミノ酸数との間に相関がある (T細胞トロピック HIV-1の方がマクロファージトロピック HIV-1に比べ塩基性アミノ酸の数は多い) との興味ある報告がなされた。

本研究では, HIV-1 感染における V3 の塩基性アミノ酸の役割について調べるために, T細胞トロピック HIV-1 の代表株である NL4-3 株を用い, 種々の変異体を作成しその生物活性について検討した。

〔方法ならびに成績〕

(1) HIV-1 の感染力およびシンシチューム形成能に対する V3 のアミノ酸変異の影響

V3のアミノ酸の人為的変異は、two-template polymerase chain reaction 法を用いて pNL4-3 proviral DNA の V3部位に導入された。V3の全ての塩基性アミノ酸 (Arg と Lys で計8個)、GPGR 配列上にある Pro³¹¹ と Gly³¹², および Ile³¹⁸ と Asn³²³ は、各々中性あるいは酸性アミノ酸に変異された。また、2つの塩基性アミノ酸を同時に中性アミノ酸に変えたダブル変異体も作成した。変異 DNA は、CD4⁺T 細胞株である CEM 細胞にトランスフェクションした後、その細胞を2〜3日培養し上澄みを感染実験に供試した。尚、全ての変異 DNA からウイルスが産生されていることを逆転写酵素活性と p24抗原アッセイから確認した。HIV-1_{NL4-3}変異体の感染力は、種々の CD4⁺細胞培養液に変異体を加えた後、一定期間培養した感染細胞から産出される HIV-1 量を逆転写酵素活性の定量により決定された。

CD4⁺T 細胞株である MT-4 と CEM 細胞、それに末梢血から分離したリンパ球への変異体の感染力を調べた結果、Lys³⁰³, Arg³⁰⁶, Arg³⁰⁹, Arg³¹³ および Arg³²⁵ の変異は供試した全ての CD4⁺T 細胞への感染を阻害した。しかし、他のアミノ酸の変異は少なくとも一つの細胞に感染を許した。SupT 1細胞を用いたシンシチューム形成能実験で、上記5つの塩基性アミノ酸の変異だけがシンシチューム形成能の著しい低下を導いた。

次に、変異による細胞トロピズムの変化を調べるため、末梢血から分離したマクロファージを感染実験に用いた。その結果、マクロファージトロピック HIV-1 に特徴的な酸性アミノ酸、Glu³²⁰ と Asp³²³ への変換を含む単一アミノ酸の変異体はマクロファージに感染しなかった。また、2つの塩基性アミノ酸を同時に中性アミノ酸に変え、V3のプラス電荷を低下させた変異体も感染力を示さなかった。

(2) 抗 V3 抗体の結合能に対する V3 のアミノ酸変異の影響

V3 上にあるアミノ酸の変異が V3 の立体構造に影響を与えるか否かを調べるために、各変異 DNA でトランスフェクションした CEM 細胞への抗 V3 抗体 (エピトープの異なる2種類の抗体: 0.5 β, NEA 9284) の結合能をフローサイトメトリーで測定した。その結果、抗体エピトープ部分のアミノ酸変異は、当然ながら抗 V3 抗体の結合を抑制した。しかしながら、Lys³⁰³, Arg³⁰⁶, および Arg³⁰⁹ は、0.5 β 抗体のエピトープに位置しないアミノ酸にも関わらず、それらの変異は0.5 β 抗体の結合を低下させた。同様な結果は、NEA 9284のエピトープに位置しない Arg³¹³ の変異で得られた。また、両抗体のエピトープに位置しないアミノ酸 (Arg²⁹⁶, Ile³¹⁸, Lys³²⁰, Asn³²³) の変異は、両抗体の結合能に全く影響を与えなかったけれども、唯一 Arg³²⁵ の変異は各抗体の結合能を50%まで減少させた。

以上のように、HIV-1 の感染力やシンシチューム形成能に重要な役割を果たしているアミノ酸 (Lys³⁰³, Arg³⁰⁶, Arg³⁰⁹, Arg³¹³, および Arg³²⁵) の変異は、エピトープの異なる2種類の抗体の結合能に影響を及ぼしたことから、HIV-1 の生物活性と V3 の高次構造との間に密接な関係があることを示している。

(3) 中和抗体による HIV-1 の感染阻害に対する V3 のアミノ酸変異の影響

予備実験において、抗 V3 抗体の結合に対し抵抗性のある gp120 を有し、CD4⁺細胞への感染力は保持している HIV-1 変異体が見つかった。そこで、これらの変異体の感染力が、実際に中和抗体による感染阻害から逃れることができるのかを調べた。尚、実験に使用した Arg³⁰² あるいは Gly³¹² の変異は、各々 NEA 9284 と 0.5 β の結合能を低下させた。野生型 NL4-3 の感染力は両抗 V3 抗体によって強く阻害されたけれども、Arg³⁰² と Gly³¹² の変異体は各々 0.5 β と NEA 9284 による感染阻害作用から逃れた。この結果、フローサイトメトリーで得られた抗体結合能の結果とよく一致した。

[総括]

本研究、T細胞トロピック HIV-1 の生物活性における V3 の塩基性アミノ酸の役割について調べた。

(1) 野生型 NL4-3 株の感染力およびシンシチューム形成能は、5つの塩基性アミノ酸、Lys³⁰³, Arg³⁰⁶, Arg³⁰⁹, Arg³¹³ および Arg³²⁵ の変異により完全に失われた。興味あることに、これらのアミノ酸変異はエピトープの異なる2種類の抗 V3 抗体 (0.5 β と NEA 9284) の結合能を著しく低下させた。この結果、5つの塩基性アミノ酸が V3 の高次構造の維持に重要な役割を果たしていることを示しており、HIV-1 の生物活性と V3 の高次構造との間に密接な関係が示唆された。

(2) V3 中の塩基性アミノ酸を中性アミノ酸に、あるいはマクロファージトロピック HIV-1 に特徴的な酸性アミノ酸、

Glu³²⁰とAsp³²³に変異させ V3 のプラス電荷を減少させたが, NL4-3 株の細胞トロピズムは変化しなかった。
(3) V3 の一部のアミノ酸変異は, HIV-1 の感染力を失わず抗体による中和を制御させることが出来た。この現象は, HIV-1 が生体内免疫防御作用から逃れる一つの方法かもしれない。

論文審査の結果の要旨

ヒト免疫不全ウイルスは生体内において頻繁に突然変異を起こし塩基配列が同じ2つの株はあり得ない Quasispecies の呼称で呼ばれるウイルス集団を形成している。その中でも gp120 の V3 ドメインには変異が多くみられる。ウイルスとレセプター分子 (CD4) との結合にはこのドメインは関与しないがウイルス感染性の抗体による中和, CTL による感染細胞の破壊に關与するエピトープを形成している。すなわち, ウイルス吸着後の膜融合の段階で V3 ドメインの果たす役割が大きいと思われる。本論文では 35 コのアミノ酸よりなる V3 ドメインにおける塩基性アミノ酸の役割を細胞融合能, 細胞トロピズム, 抗体による中和などを総合し, CD4 + T リンパ球へのトロピズムをもつ HIV-1 (NL4-3 株) のアミノ酸の置き換えした変異体を用いて, この系における感染には V3 ドメインの塩基性アミノ酸が大きな役割を果たすことや, さらにこの部位における置換はエピトープの異なる 2 種類の抗 V3 抗体の結合能に影響を与えることを示した。

このような事実と, エイズ発症への過程で生体内の主流を占めるウイルスはマクロファージトロピックより, T リンパ球トロピックに変化する点と併せて, 今後, エイズ発症過程をウイルスの性状より解析する場合に重要な示唆を与えるものと認め学位に値するものとする。