

Title	Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Exhibits Higher Transactivation Activity of Tat than Subtypes B and E
Author(s)	黒須, 剛
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43820">https://hdl.handle.net/11094/43820</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	黒 須 剛
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 7 6 4 2 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Exhibits Higher Transactivation Activity of Tat than Subtypes B and E. (HIV-1 サブタイプ C の Tat はサブタイプ B、E の Tat よりも高いトランスアクティベーション活性を示す)
論文審査委員	(主査) 教授 生田 和良  (副査) 教授 松田 道行 教授 塩田 達雄

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [ 目 的 ]

HIV-1 subtype C と E は、80 年代後半から 90 年代にかけて爆発的に広がった。本研究では、その原因について検討することを目的とした。一般に、ウイルスの病原性や流行しやすさなどとウイルスの複製能力は密接に関係していると考えられる。ウイルスの複製能力はウイルスの転写活性に強く依存しているが、HIV-1 の転写を担うウイルス側の因子として、ウイルスプロモーターである Long Terminal Repeat (LTR) と 101 アミノ酸によって構成される Transactivator である Tat が挙げられる。これら因子はウイルスの潜伏、再活性化にも強く関与している。これらの理由から、本研究ではそれぞれの Subtype から得られた LTR と Tat を対象に、サブタイプ間のそれぞれの活性を比較検討した。

#### [ 方法、成績ならびに考察 ]

下流にルシフェラーゼを含むレポーターベクターにそれぞれの Subtype から得られた 5'-LTR 全領域を挿入した。さらに、Tat の cDNA からクローニングした、exon 1 と exon 2 の Tat 全長を mammalian expression vector に挿入し、これを Effector とした。これら Plasmid を Jurkat 細胞 (human T lymphocyte cell line ; acute T cell leukemia 由来) にリポフェクション法によりトランスフェクトした。48 時間後、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を指標に転写活性を測定した。5'-LTR には基本的な転写に必要な NF- $\kappa$ B、NF-AT、SP-1 の binding site や TATA box を含まれ、これらの配列は Subtype により異なる。主として研究されている Subtype B の LTR には 2 個の NF- $\kappa$ B site が認められる。一方、Subtype C は 3 個、ないし 4 個、Subtype E では 1 個の NF- $\kappa$ B site が見られる。さらに、Subtype E では 3 つの塩基で構成される Tat の結合部位である TAR の bulge に 1 塩基の欠損が見られる。しかしながら、Tat 非存在下においてはこれらの影響はなかった。さらに、それぞれの Subtype の LTR と Tat の組み合わせ実験を行ったところ、Subtype C の LTR と Tat の組み合わせで 3 倍の高活性が認められた。この原因として、Subtype C Tat の活性が高いことに起因していることが明らかとなった。さらに、Subtype C Tat は異なる Subtype の LTR に対しても約 2 倍の高活性を示した。

次に、この原因が subtype C Tat のどの部位にあるかを検討するために Subtype B、AE、C の Tat アミノ酸配列を比較検討したところ、3つの領域に違いが認められた。第1に、P-TEFb (Positive transcription elongation factor : 正の転写伸張因子) の構成成分である Cyclin T1 との結合部位に配列の違いが認められた。この領域は、Cysteine-rich motif と呼ばれ7個の Cysteine 残基により構成され、Subtype C 以外の HIV-1、HIV-2、SIV に高率に保存されている。Tat が Cyclin T1 と結合することの重要性は以下の理由による。即ち、Tat 非存在下では HIV-1 の転写は開始するが通常 60 塩基まで RNA が合成されたところで NELF、DSIF など Negative elongation factor などの作用により止まってしまう。しかし、Tat が転写開始した RNA に結合することにより転写開始部位に P-TEFb をリクルートする。次に、P-TEFb が RNA polymerase II (RNAP II) の C-terminal domain (CTD) をリン酸化することにより効率よく転写伸張が起こる。このため、Tat が効率よく P-TEFb をリクルートすることが転写活性を高活性に維持するのに必要である。アミノ酸配列から予想すると、実験から予想される結果とは逆に、Subtype C Tat は Cyclin T1 との結合性が弱い可能性が考えられた。そこで、Subtype C Tat の Cysteine motif の影響について調べるため、Cysteine motif の変異体を構築し、ルシフェラーゼアッセイを行った。Subtype B Tat と E Tat を C タイプの motif にした変異体では顕著な活性の低下が認められた。一方、Subtype C Tat を B や AE 型にした変異体では活性に大きな変化は認められなかった。このことから、Subtype C Tat の Cysteine motif は subtype C Tat では不利にも有利にも働いていなかった。

そこで、Subtype 間で高い多様性が見られた Tat C 末端に注目した。制限酵素サイトを利用し、58 アミノ酸以降を subtype C Tat に入れ換えた subtype B/C のキメラ Tat を構築し検討したところ、予想に反して、Subtype B Tat と比較して活性に全く差は認められなかった。このことから、高い多様性が見られる Subtype C Tat の C 末端は Tat 活性に影響してしないことが確認された。さらなる検討のために、57 番目以降を Subtype C Tat 由来の配列に置換した Subtype B/C キメラ Tat を構築し、同様にアッセイしたところ、Subtype C Tat と同様の 2~3 倍の高活性を示した。このことから、Subtype C Tat アミノ酸 57 番目周囲が Subtype C Tat の高活性に影響していることが予想された。

詳細な検討のために、Point mutation をもつ Tat を用いた解析を行った。その結果、Subtype C Tat の 57 番目の Serine と 63 番目の Glutamic acid が Subtype C Tat の高活性に影響していることが判明した。57 番目の Serine は、Arginine と Lysine を中心に構成される Basic domain に位置し、63 番目のアミノ酸はその隣接する領域である。\*Tat basic domain の機能には2つある。1つは、Tat の核移行シグナルとしての働き、もう1つは TAR RNA との結合部位としての働きである。そこで、核移行能について調べるため、各 Tat を Cos-7 細胞にトランスフェクションして蛍光染色を行った。その結果、各 Tat は極めて効率よく核に存在しており、Tat 活性と異なり、核移行には関与していないことが判明した。このことから、Subtype C Tat は別の可能性、つまり TAR RNA との結合性が他の Subtype の Tat とは異なるために高活性を示すと推測される。配列から、Subtype C Tat は TAR RNA との結合が弱いと推測される。予想されるメカニズムは以下の通りである。TAR RNA と結合することで Tat は転写開始部位に P-TEFb を転写開始部位にリクルートしてくる。そして、RNA polymerase II の CTD をリン酸化した後、速やかに TAR RNA から解離する。その結果、Tat が効率よくリサイクルされか、もしくは RNAP II のリリースが効率よく行われる。これら詳細についてはより一層の解析の必要がある。

#### [ 総 括 ]

これまで、Subtype の異なる HIV-1 により病原性が異なるという可能性について疫学的、ウイルス性状学的解析が行われてきたが、明らかな回答はなされていなかった。HIV-1 の転写に焦点を絞った本研究から、Subtype C Tat が、Subtype B、C、AE のどの Subtype の LTR に対しても高い転写活性を持つことが明らかとなった。これは、Subtype C Tat の2つのアミノ酸に原因しており、報告されている17例の C Tat 配列中13例に本アミノ酸は保存されており、特にインド由来の Subtype C Tat では100%保存されている。以上、HIV-1 Subtype C の保存しているこの2アミノ酸が感染拡大の原因の1つになっている可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

HIV-1 Subtype C と E の感染拡大した原因については不明であった。本研究では、その原因について検討することを目的とした。本研究ではウイルスの病原性や流行、ウイルスの複製能力は密接に関係していると考えられている。複製能に影響を与える HIV-1 の転写能についてプロモーターである LTR と Transactivator である Tat について Subtype B と比較解析した。その結果 LTR の Subtype に影響されず、Subtype C 由来の Tat が高活性を示すことが明らかになった。

Mutation Analysis によりこの原因が C Tat の 2 つのアミノ酸、57Ser と 63E の組み合わせによることが明らかになった。この 2 つの配列は C Tat に効率に保存され、しかも他の Subtype には見られないことから、Subtype C 一般に共通する性質と考えられた。これら 2 つのアミノ酸を含む領域には機能が 2 つあり 1 つの可能性である Nuclear localization signal としての機能に影響を与えないことを明らかにした。この結果を構造解析の結果、2 つ目の可能性である Tat の TAR RNA への結合性が変化したことが推定された。

本研究は混沌としていた HIV-1 Subtype 研究の中で、Subtype の特徴を遺伝子レベルで明らかにしたという点で重要である。さらには 11 ある Subtype のうち世界の感染者の半数以上を Subtype C が占めている原因を説明する一つの鍵になると考えられる。将来性として Subtype C HIV-1 とのリコンビナント HIV-1 を含めた Subtype C HIV-1 が今後ますます流行する可能性を示唆しており、現在研究の中心である Subtype B への対策のみでなく、Subtype C 流行予防へ力点を置く必要性を認識させたという意味でも意義のある研究である。よってこれら一連の研究は学位の授与に値すると思われる。