Title	Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by replacing the region including Env derived from defective particles with an ability to form particle-mediated syncytia in CD4+T cells
Author(s)	木ノ本, 正信
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45543
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

氏　　　　　名	木ノ本　正　信
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学 位 記 番 号	第　19304　号
学位授与年月日	平成 17 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	Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by replacing the region including Env derived from defective particles with an ability to form particle-mediated syncytia in $CD4^+$T cells （$CD4^+$T 細胞にシンシチウムを起こす HIV-1 の Env 領域は感染性の上昇にも関与する）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授　生田　和良 （副査） 教 授　松浦　善治　　教 授　塩田　達雄

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目　的 〕

以前、当研究室において樹立された L-2 細胞株は、CD4 陽性 T 細胞株である MT-4 に HIV-1 LAI 株を感染させた生き残り細胞から得られたものである。L-2 細胞株の培養上清には、非感染性のドーナツ様 HIV-1 粒子が産生されており、CD4 陽性 T 細胞株である MOLT-4、プライマリーの末梢血単核球（PBMC）において、非常に高率にシンシチウムを形成する。

本研究では、その高いシンシチウム形成能の責任領域を決定するために、L-2 細胞株ゲノム DNA より、Long-PCR 法を用いてプロウイルス DNA クローン（pL2）を作製し、代表的な実験室株である pNL4-3 との組換えを行い、シンシチウム形成能を決定する領域の同定を試みた。

〔 方法ならびに成績 〕

1．pL2 の構築

L-2 細胞株より抽出したゲノム DNA を鋳型に Long-PCR を行い、LTR 領域を組み込んだベクターに挿入し、pL2 を作製した。pL2 をトランスフェクションして得られたウイルスは、親株である L-2 細胞株由来ウイルスの性状および形態を反映しており、感染性がなく、高いシンシチウム形成能を保持していた。

2．シンシチウム形成能決定領域の同定

pNL4-3 との組換えプロウイルス DNA を 293T 細胞にトランスフェクションし、得られたウイルス上清を超遠心により濃縮後、段階的に希釈したものを T 細胞株である MOLT-4 clone 8（MOLT-#8）に感染させ、各ウイルスのシンシチウム形成能の比較を行った。結果は、pL2 の env を含む領域を有する pL2 および pNL-L2 由来ウイルスにおいて、高いシンシチウム形成能が観察された。また、pNL4-3 あるいは pL2 由来 Env タンパクを 293T 細胞に一過性に発現させ、MOLT-#8 と共培養を行ったところ、ウイルスと同様に pL2 でのみ細胞融合が見られた。

3．シンシチウム形成と感染性との相関

融合能の差を検討するため、ルシフェラーゼ遺伝子を持つ env 欠損プロウイルス DNA に pNL4-3 あるいは pL2 由来の Env を被せたシュードウイルスを作製し、T 細胞株である Jurkat、MOLT-#8 および PBMC に感染させ、感染2日後のルシフェラーゼ活性を測定した。結果は、pL2 由来の Env を持ったシュードウイルスは、MOLT-#8 において特に顕著な感染性の増大を示し、pNL4-3 由来 Env を持つウイルスの約9倍程度のルシフェラーゼ活性を示した。

〔総　括〕

高シンシチウム活性を有する HIV-1 産生持続感染細胞株である L-2 細胞株より、そのウイルスの性状を反映した分子クローン pL2 の構築に成功し、さらに、代表的実験室株である pNL4-3 との組換えウイルス作製により、その高いシンシチウム活性を規定する領域が env 領域に存在することが明らかとなった。また、シンシチウム活性はウイルスの感染性にも大きく関与していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本論文では、CD4 陽性 T 細胞株である MT-4 に HIV-1 LAI 株を感染させた生き残り細胞から得られた L-2 細胞株を用い、その培養上清中に産生される HIV-1 粒子の高いシンシチウム形成能を規定する責任領域の同定を試みている。HIV の融合過程については、近年、薬剤のターゲットにもなっており、その融合過程を詳細に解析することは意義のある研究と考えられる。

まず、L-2 細胞株より抽出したゲノム DNA より、Long-PCR 法を用いてプロウイルスゲノムを増幅した後、5'LTR をあらかじめ組み込んだベクターに挿入し、プロウイルスクローン（pL2）を構築した。pL2 由来 HIV-1 は、親株である L-2 細胞株由来ウイルスの性状および形態を保持していた。この pL2 と代表的な実験室株である pNL4-3 との組換えにより、シンシチウム形成能規定領域が Env を含む領域に存在すること、および融合能の上昇が感染性の上昇と相関していることを明らかにした。

木ノ本正信君の研究内容は、シンシチウム形成能の規定領域を同定し、過去に報告のない、融合能と感染性の相関について明らかにしたものであり、学位の授与に値すると考えられる。