

## 論文の内容の要旨

論文題目 牛白血病ウイルスの生活環における  
Envタンパク質gp30のYXXL配列の機能解析

氏名 松浦 遼介

### <背景>

免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) は cluster of differentiation (CD) 3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD79 $\alpha$ , CD79 $\beta$ , Fc $\epsilon$ RI $\beta$ などの免疫細胞に発現するタンパク質が有する特徴的な YXX[L/I]-X<sub>6-8</sub>-YXX[L/I]からなる配列である。この配列中のチロシンは細胞外からのレセプターへの刺激によりリン酸化され、spleen tyrosine kinase (Syk) などのチロシンキナーゼをリクルートし、細胞の分化、成熟、免疫応答を制御している。ゲノム中に ITAM 配列を有する Epstein-Barr ウイルス、ヒトヘルペスウイルス 8 型、マウス乳がんウイルスは全て B 細胞に感染することができ、その ITAM 配列が細胞の形質転換、がん化に関与していることが報告されている。

ITAM 配列をもつウイルスの一つに牛白血病ウイルス (BLV) がある。BLV はヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV) に近縁なレトロウイルスであり、その膜糖タンパク質 (Env) の膜貫通サブユニット (gp30) の C'末端には 3 つの YXXL 配列からなる二組の ITAM が存在する。BLV の ITAM 配列は CD8 とのキメラタンパク質を用いた実験において、インターロイキン 2 の産生などの免疫応答を引き起こすことが報告されている。また、BLV によるリンパ球増多症の牛において、Syk の messenger ribonucleic acid が増えているとの報告もされている。しかし、*in vivo* および *in vitro* の実験において、gp30 のリン酸化は確認されていない。このため、BLV の生活環における ITAM 配列の機能はいまだ不明な点が多い。

一方で、3 つの YXXL 配列はエンドサイトーシスに重要な AP2 タンパク質の結合モチーフである YXX $\Phi$ モチーフにも合致する。ヒト免疫不全ウイルス (HIV) や HTLV などの多くのレトロウイルスの Env はただ一つの YXX $\Phi$ モチーフを有する。HIV において、この配列が Env のエンドサイトーシスに関与することが報告されている。これまでに BLV では、三つある YXXL 配列のうち N 末端に存在する二つが CD8 とのキメラタンパク質において膜局在を制御すること、また *in vitro* および *in vivo* の実験において、ウイルスの感染性を制御することが明らかにされている。

### <目的>

BLV の YXXL 配列が ITAM 配列として、あるいは YXX $\Phi$ モチーフとしてウイルスの生活環に関与していることは疑いようもない。しかし、YXXL 配列がどのように BLV の生活環を制御しているかはいまだ不明なままである。本研究においては、BLV の病原性および感染性に密接に関係するシンシチウム形成能に注目をして、三つすべての YXXL 配列のウイルスの生活環における役割を明らかにすることを目的とした。

## <材料と方法>

BLV の感染性分子クローンである pBLV-IF2 の gp30 の三つの YXXL 配列 (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> YXXL) のチロシンとロイシンをアラニンに置換し、Y487A、L490A、Y498A、L501A、Y508A、L511A の六つの変異株を作成した (図 1)。また、pBLV-IF2 およびその変異株の *Env* 領域を pME-18neo ベクターに組み込み、pEnv-WT、pEnv-Y487A、pEnv-L490A、pEnv-Y498A、pEnv-L501A、pEnv-Y508A、pEnv-L511A を作成した。これらのプラスミドを COS-1 細胞に導入することで、タンパク質の発現やウイルス粒子の放出、ウイルス粒子への *Env* の取り込みを解析した。また、CC81-GREMG 細胞あるいは CC81 細胞に導入し、シンシチウムの形成能を解析した。さらに、HeLa 細胞に導入することで *Env* の局在を解析した。

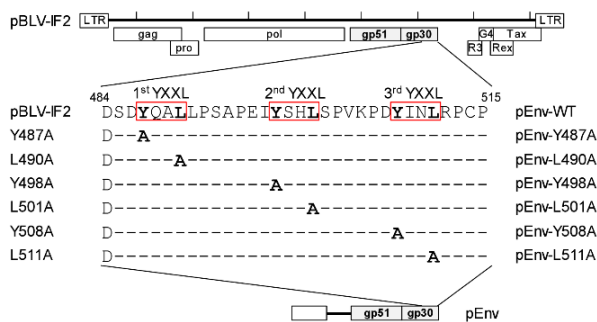


図 1 YXXL 変異体の作製

これらのプラスミドを COS-1 細胞に導入することで、タンパク質の発現やウイルス粒子の放出、ウイルス粒子への *Env* の取り込みを解析した。また、CC81-GREMG 細胞あるいは CC81 細胞に導入し、シンシチウムの形成能を解析した。さらに、HeLa 細胞に導入することで *Env* の局在を解析した。

## <結果>

### 1. YXXL 変異株の発現解析

各感染性分子クローンの発現およびウイルス粒子の放出を解析したところ、変異を導入した gp30 および他の構造タンパク質の発現が確認されたが、その発現量に大きな差は認められなかった。また、RNA の培養上清への放出についても、すべての変異株において pBLV-IF2 と比較して顕著な差は認められなかった。同様に、*Env* 発現プラスミドにおける *Env* の発現を確認したところ、*Env* の細胞表面サブユニット (gp51) の発現が確認され、その発現量に変化は認められなかった。このことから、YXXL 配列への変異はウイルスタンパク質の発現およびウイルス粒子の放出に影響を与えないことが明らかとなった。

### 2. YXXL 配列のシンシチウム形成における役割の解析

シンシチウム形成における YXXL 配列の機能を解析した結果、全てのチロシン変異株において、pBLV-IF2 よりも有意に多くのシンシチウムが形成されたが、ロイシン変異株においては、変化は認められなかった (図 2A)。*Env* 発現プラスミドにおいても同様に Y487A、Y498A 変異株において有意にシンシチウム形成能が増強された (図 2B)。また、Y508A 変異株も有意ではないが、高いシンシチウム形成能を示した。このことから、このシンシチウム形成能の変化が *Env* 単独で引き起こされたものであると考えられた。また、YXXL 配列はシンシチウム形成能をそれぞれ独立して制御していることが示唆された。

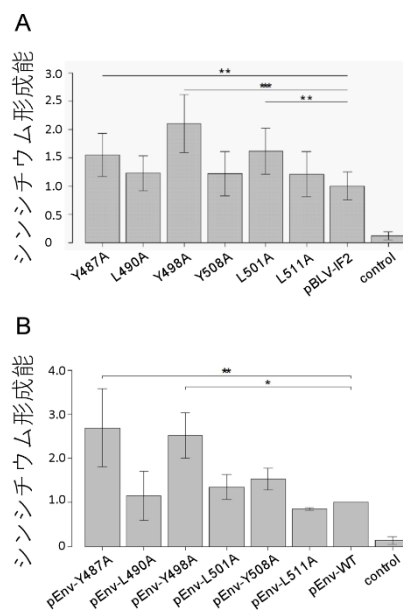


図 2 シンシチウム形成における YXXL 変異の機能解析  
A. 感染性分子クローン  
B. *Env* 発現プラスミド

### 3. YXXL 配列の Env の局在における役割の解析

HIV において、細胞膜表面上の Env が Cell-Cell fusion に重要であると報告されている。そこで、チロシン変異によるシンシチウム形成能の増強のメカニズムを明らかにするために、Env の細胞膜表面での局在を観察した。その結果、全てのチロシン変異導入細胞において pBLV-IF2 やロイシン変異導入細胞と比較して、細胞膜表面上に Env が多く局在していた (図 3A)。さらに、透過処理条件下では、pBLV-IF2 および全ての変異株において Env は核周辺部に斑点状に集積し、Y498A 変異株導入細胞においてのみ、細胞膜に多く局在しており、Y498A 由来の Env が界面活性剤耐性膜に局在している可能性が示された (図 3B)。これらの結果は Env 発現プラスミドを用いた実験でも同様であり、YXXL 配列は他のウイルスタンパク質から独立して、Env の局在を制御していることが示唆された。

Env の細胞内での斑点状の集積は細胞内小器官への局在を示唆し、Env の局在する細胞内小器官を調べることは、YXXL 配列の細胞内局在の制御メカニズムの解明につながる。そこでトランスゴルジネットワークと初期エンドソームのマーカーである TGN46 および EEA1 と Env の共局在を解析した。その結果、TGN46 と共局在する Env の割合に各変異株間における差はなかったが、EEA1 と共局在する Env の割合はチロシン変異株において有意に減少した。この結果から、野生株とロイシン変異 Env は合成された後にトランスゴルジネットワークを経由し、細胞膜表面に運ばれ、その後、エンドサイトーシスで細胞内へと取り込まれることが示唆された。一方、チロシン変異株では、細胞内へのエンドサイトーシスが阻害されたために細胞膜表面上に Env が留まり、細胞膜表面上の Env の量の増加した結果、シンシチウム形成能の増強につながったのではないかと考えられた。

### 4. YXXL 配列のウイルス粒子中への Env の取り込みにおける役割の解析

Env がウイルス粒子に取り込まれるためには、budding site への輸送が必須であり、Env の局在の変化はウイルス粒子への Env の取り込みを阻害する可能性がある。そこで、Western blot により、ウイルス粒子中の gp51 および p24 を検出した。全ての変異株由来のウイルスにおいて p24 が検出された。しかし、Y498A および L511A のみで、gp51 が検出されなかった (図 4)。これは Y498A および L511A 変異がウイルス粒子中への Env の取り込みを阻害していることを示している。

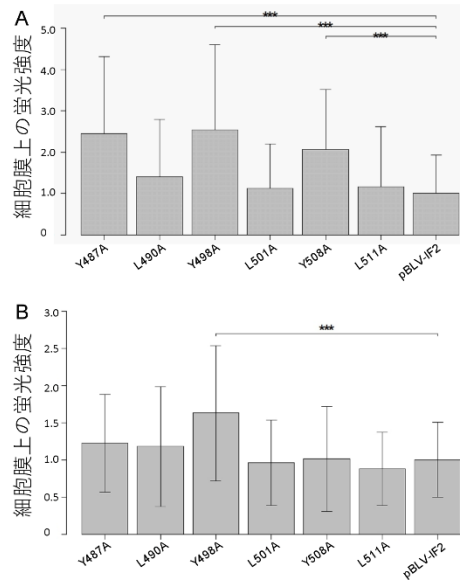


図 3 Env タンパク質の細胞膜局在における YXXL 変異の機能解析  
透過処理なし (A) とあり (B)

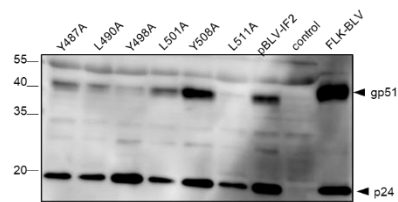


図 4 Env タンパク質 gp51 のウイルス粒子への取り込みにおける YXXL 変異の影響

<考察および今後の展望>

本研究では 3 つの YXXL 配列が BLV の生活環において、独立してシンシチウムの形成能とウイルス粒子への Env の取り込みを制御していることを初めて明らかにした。図 5 で示すように 1<sup>st</sup> YXXL 配列はチロシン残基によって、Env の局在を制御することで、シンシチウムの形成を制御した。同様に 2<sup>nd</sup> YXXL 配列はチロシン残基によって、Env の局在とシンシチウムの形成を制御していることに

加えて、チロシン残基によって、ウイルス粒子への Env の取り込みを制御していた。また、3<sup>rd</sup> YXXL 配列も 1<sup>st</sup>、 2<sup>nd</sup> YXXL 配列と同様のチロシン残基による Env の局在とシンシチウムの形成の制御に加えて、ロイシン残基によって Env の取り込みを制御していた。

上記の三つの YXXL 配列の機能の違いは YXXL 配列がそれぞれ独立して異なる機能を持ち、ウイルスの生活環を制御していることを示唆する。他のレトロウイルスが一つの特異的な配列によって粒子形成の制御をしているが、BLV は 3 つの配列によって制御していることは、BLV と他のレトロウイルスの明瞭な相違である。また、本研究で明らかとなった Env の細胞膜表面上での発現の抑制は、宿主の Env 特異的な抗体から逃避するためと考えられる。そして、これらの BLV の生活環における YXXL 配列の独立した制御がおそらく BLV が 3 つの YXXL 配列を完全に保存している理由である。

本研究の結果から、3 つの YXXL 配列は異なる宿主因子と相互作用して働き、ウイルスの生活環を制御していると考えられる。つまり、YXXL 配列と直接あるいは間接的に結合する宿主因子の同定はウイルスの生活環のより深い理解につながると同時に、BLV に対する新規薬剤の開発の第一歩となることは間違いない。プロテオミクス解析などによる宿主因子の同定は世界中に蔓延し、大きな被害をもたらしている BLV の制御に必要不可欠である。

484 1<sup>st</sup> YXXL 2<sup>nd</sup> YXXL 3<sup>rd</sup> YXXL 515  
 DSDYQAL LPSAPEIYSHLSPVKPDYINLRPCP

YXXL 配列	機能
1 <sup>st</sup> YXXL	① チロシンによるシンシチウムの形成の制御 ② チロシンによるエンドサイトーシスの制御
2 <sup>nd</sup> YXXL	① チロシンによるシンシチウムの形成の制御 ② チロシンによるエンドサイトーシスの制御 ③ チロシンによる Env のウイルス粒子への取り込みの制御 ④ チロシンによる膜局在の制御
3 <sup>rd</sup> YXXL	① チロシンによるシンシチウムの形成の制御 ② チロシンによるエンドサイトーシスの制御 ③ ロイシンによる Env のウイルス粒子への取り込みの制御

図 5 YXXL 配列(A)と本研究で明らかになった機能(B)