

# 審査の結果の要旨

氏名 松浦 遼介

本論文は、牛白血病ウイルスの Env タンパク質 gp30 の YXXL 配列の機能について述べられている。

免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) は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、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 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 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 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 I 型 (HTLV-1) 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 は CD8 とのキメラタンパク質を用いた実験において、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 mRNA 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* の研究において、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 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 YXXΦモチーフにも合致する。ヒト免疫不全ウイルス (HIV) や HTLV-1 などの多くのレトロウイルスの Env はただ一つの YXXΦモチーフを有する。HIV においては、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* の研究において、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。

このように、BLV の YXXL 配列が ITAM 配列として、あるいは YXXΦ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指した。

YXXL 配列の BLV の生活環における役割を明らかにするために、BLV の感染性分子クローンである pBLV-IF2 の gp30 中の三つの YXXL 配列 (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> および 3<sup>rd</sup> YXXL) のそれぞれのチロシンとロイシンをアラニンに置換した六つの変異株を作成した。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、Wild type および六つの YXXL 変異 Env 発現ベクターを作成した。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、ウイルス粒子の放出およびウイルス粒子への 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。

感染性分子クローンおよび Env 発現ベクターを用いて行った本研究において、次の三つの主要な結論を得た。一つ目は、1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> および 3<sup>rd</sup> YXXL の全てのチロシン残基が独立して、Env によるシンシチウム形成を負に制御していることを発見したことである。このシンシチウム形成の抑制には、Env の局在が関与していることが明らかになった。二つ目の主要な結論は、三つの YXXL 配列中のチロシン残基がそれぞれ独立して Env の細胞内輸送、特にエンドサイトーシスを制御していることである。また、この YXXL 配列による Env の局在の制御は他のウイルスタンパク質は関与しないことが明らかとなった。さらに、2<sup>nd</sup> YXXL 配列はエンドサイトーシスだけでなく、Env の細胞膜ドメインにおける局在も制御している可能性が示唆された。この細胞膜ドメインにおける局在の変化は、Env のウイルス粒子への取り込みの阻害に関与している可能性も示された。三つ目は、2<sup>nd</sup> YXXL 配列中のチロシンと 3<sup>rd</sup> YXXL 配列中のロイシンが Env タンパク質のウイルス粒子への取り込みを制御していることである。これらの結果から、三つの YXXL 配列が独立して BLV の生活環において重要な役割を担っていることが明らかとなった。

本研究において、三つの YXXL 配列がそれぞれ独立して宿主因子と相互作用する可能性が示された。今後のプロテオミクス解析などによる、YXXL 配列と相互作用する宿主因子の同定は BLV の生活環に対する大きな知見になるとともに、世界中に蔓延し、大きな経済被害をもたらしている BLV に対する創薬とワクチン開発の第一歩となると考えられる。

なお、論文は井鍋一則、大附寛幸、黒川量雄、堂前直、間陽子との共同研究であるが、論文提出者本人が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

よって本論文は博士（医科学）の学位請求論文として合格と認められる。

以上 1958 字