

京都大学	博士 (医学)	氏名	白川 康太郎
論文題目	Phosphorylation of APOBEC3G by protein kinase A regulates its interaction with HIV-1 Vif (プロテインキナーゼ A による APOBEC3G のリン酸化は、APOBEC3G と HIV-1 Vif との相互作用を調節する)		
(論文内容の要旨)			
<p>Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G, A3G) は近年同定された抗 HIV-1 宿主因子である。A3G はシチジン脱アミノ化酵素活性を有し、HIV-1 複製における逆転写の際にマイナス鎖 DNA に作用しウイルスの感染性を阻害する。一方、HIV-1 virion infectivity factor (Vif) は A3G をユビキチン・プロテアソーム経路で分解することでウイルス複製を助けている。同じ APOBEC ファミリーに属する activation-induced deaminase(AID)は免疫グロブリン遺伝子のクラススイッチ組み換えに関わっているが、この過程に protein kinase A (PKA)による AID のリン酸化が必要である。A3G にも同様の PKA モチーフが保存されていることから、PKA が A3G をリン酸化するかを検討し、抗ウイルス活性への影響を解析した。まず過剰発現させた HA-A3G と Flag-PKA が結合することを免疫沈降法により証明した。次にバキュロウイルス発現系を用いて精製した A3G とリコンビナント PKA を用いて <i>in vitro</i> リン酸化アッセイにより PKA が A3G をリン酸化することを証明した。A3G には PKA モチーフが Thr32 と Thr218 の二ヶ所にあるため、アラニン置換変異体 (T32A, T218A) を作成し <i>in vivo</i> リン酸化アッセイを行い、Thr32 が特異的にリン酸化を受けることを証明した。次にルシフェラーゼレポーターを持つ NL43 ウイルスを PKA と A3G および変異体との共発現下にて作成し、その抗ウイルス活性を検討したところ、PKA を共発現させた場合のみ T32A に比べ野生型 A3G の野生型 NL43 に対する抗ウイルス活性が増強していた。さらにアスパラギン酸置換/偽リン酸化変異体 (T32D, T218D) は PKA を共発現させなくても野生型 A3G に比べ野生型 NL43 に対する抗ウイルス活性が強いことを示した。T32D は免疫沈降法において野生型 A3G に比べ Vif 親和性が低下しており、ユビキチンアッセイにおいては野生型 A3G に比べユビキチン化の程度が減弱していた。以上の結果はリン酸化 A3G が Vif との結合能が弱く Vif 抵抗性であることを示しているが、従来指摘されていた Vif との結合に重要なリンカー領域と Thr32 は一次構造上離れている。そこで APOBEC2 の結晶構造を鋳型としホモロジーモデリングにより A3G N 端のコンピューター構造解析を行ったところ、Thr32 はリンカー領域と同じ分子表面を形成すること、リン酸化により Thr32 と相互作用している Arg24 との水素結合数が増加することが予測された。Thr32 と Arg24 の相互作用が Vif 抵抗性に関与していることが予想されたため、T32D に R24A 変異を導入した R24AT32D 変異体を作成し Vif 結合能および Vif 感受性を検討したところ、R24AT32D では Vif 結合能および Vif 感受性は回復していた。以上の結果から、PKA は A3G に結合し Thr32 を特異的にリン酸化すること、このリン酸化は A3G の Vif 感受性を低下させること、そのメカニズムとして Thr32 と Arg24 の相互作用が重要であることが示された。A3G と HIV-1 Vif は新たな治療戦略の標的として近年注目されているが、本研究の成果は今後新たな治療戦略の開発に役立つと考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G(APOBEC3G, A3G)は近年同定された抗 HIV-1 宿主因子であり、シチジン脱アミノ化酵素活性を有し HIV-1 マイナス鎖 DNA に変異を導入しその感染性を阻害する。一方、HIV-1 virion infectivity factor(Vif)は A3G をユビキチン・プロテアソーム経路で分解することでウイルス複製を助けている。本論文で protein kinase A(PKA)が A3G に結合し Thr32 を特異的にリン酸化すること、リン酸化 A3G および偽リン酸化変異体(T32D)が Vif 抵抗性で野生型 HIV-1 に対しても抗ウイルス活性を示すことを明らかにした。さらに APOBEC2 の結晶構造を鋳型とした A3G N 端のコンピューターモデル解析、および変異体を用いた実験結果より、Thr32、Arg24 間の相互作用が Vif との結合に重要な役割を果たしており、PKA による Thr32 のリン酸化はこの相互作用に影響を与えることにより、A3G に Vif 抵抗性を付与すると考えられた。以上の研究は Vif と A3G の結合部位の解明に貢献し、新たな抗 HIV-1 薬の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。  
なお、本学位授与申請者は、平成 20 年 12 月 12 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降