

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	山嵜 大智
論文題目	HIV-1 感染抑制因子N4BP1の同定		
(論文内容の要旨)			
<p>病原体感染に際して、宿主自然免疫細胞は炎症性サイトカインや I 型インターフェロンを産生することにより防御応答を誘導する。近年、この炎症性サイトカイン応答が、RNA 結合タンパク質を介した転写後段階での制御を受けることが明らかになってきた。例えば、RNA 分解酵素である Regnase-1 は、インターロイキン-6 をコードする宿主 mRNA に結合し、その分解を促進することにより免疫応答を制御する。本研究においては、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 感染をモデルとして、ウイルス RNA の転写後段階での制御を担う宿主 RNA 結合タンパク質の同定を試みた。</p> <p>はじめに、HIV-感染性クローンである NL4-3 と Mammalian Gene Collection から選んだ 62 種類の RNA 結合領域を有するタンパク質を HEK293T 細胞において強制発現させ、培養上清に産生される HIV-1 の感染性を TZM-bl レポーター細胞を用いて評価した。その結果、HIV-1 の感染性を強く抑制する因子として Nedd4 Binding Protein 1 (N4BP1) をみいだした。N4BP1 を欠損したヒト Jurkat T 細胞株を作製し HIV-1 を感染させたところ、感染性の著しい増加が認められた。また、HEK293T 細胞において N4BP1 と NL4-3 を同時強制発現させ、ウイルス RNA を RT-qPCR 法によって検出したところ、N4BP1 の強制発現により HIV-1 ウイルス RNA が減少した。一方、RNA 分解酵素活性を欠損した N4BP1 D623N 変異体にはこのウイルス RNA 抑制効果を認めなかった。</p> <p>ヒト CD4 陽性 T 細胞に潜伏感染した HIV-1 は T 細胞受容体刺激により再活性化し、ウイルス mRNA が発現することが知られている。そこで CD4 陽性 T 細胞における N4BP1 の発現量をウエスタンブロットで検討したところ、T 細胞受容体刺激により N4BP1 発現が消失することをみいだした。この T 細胞活性化に伴う N4BP1 の消失はプロテアーゼ MALT1 の阻害薬によって完全に抑制された。また、N4BP1 R509A 変異体は MALT1 による分解を受けなかった。そこで N4BP1 R509A 変異体もしくは N4BP1 野生型を導入した HIV-1 潜伏感染細胞株 JNLGFP を作製し、T 細胞刺激後の HIV-1 の再活性化レベルを培養上清中の p24 量を指標に検討したところ、変異体発現細胞では p24 産生量の低下が認められた。</p> <p>本研究により、N4BP1 は CD4 陽性 T 細胞において HIV-1 のウイルス RNA を分解する RNA 結合タンパク質として機能するが、T 細胞の活性化に伴って MALT1 による分解を受けた結果、潜伏感染した HIV-1 の再活性化が効率よく起こり得ることが明らかとなった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

HIV-1は、宿主免疫細胞であるCD4陽性T細胞やマクロファージに感染し、後天性免疫不全症候群(AIDS)発症の原因となる。一方、ヒト細胞にはHIV-1感染を抑制する多くの制御因子が存在することが知られている。これまで明らかとなっている宿主因子は、HIV-1感染の初期ステップやウイルス遊離を抑制するものがほとんどである。しかし、ウイルスタンパク質産生やウイルス粒子形成の起点となるウイルスRNAを標的とした感染制御因子はほとんど不明である。そこで申請者は、ウイルスRNAに結合しHIV-1感染を抑制する新たな宿主因子の同定を目的として研究を展開した。

まず、62種類のRNA結合領域を有するタンパク質を選定し、HIV-1感染性クローンNL4-3とともにHEK293T細胞に強制発現させ、培養上清中のウイルス価を測定するスクリーニングを実施した。その結果、HIV-1の感染性を強く抑制する因子としてNedd4 Binding Protein 1 (N4BP1)を同定した。さらにN4BP1欠損ヒトT細胞株において、HIV-1感染性が著しい増加することを確認するとともに、N4BP1がRNA分解酵素としてHIV-1 RNAに結合しこれを分解することによってHIV-1感染を抑制することを明らかにした。これらの実証を通して、N4BP1は新たな抗HIV-1宿主因子であると結論づけた。

さらに、ヒトCD4陽性T細胞に潜伏感染したHIV-1の再活性化機構に着目し、T細胞受容体シグナル伝達に重要な役割を担うプロテアーゼMALT1がN4BP1を切断することをみいだした。また、MALT1が認識するN4BP1のアミノ酸配列を決定し、その変異体(R509A)はMALT1による切断を受けないことを示した。さらに、R509A変異N4BP1を発現させたHIV-1潜伏感染細胞株では、ウイルスの再活性化が抑制されることを実証した。

したがって本研究は、新たなHIV-1抑制因子N4BP1を同定することに成功し、さらには宿主CD4陽性T細胞において潜伏感染したHIV-1の再活性化の分子機構を解明した点で高く評価できる。

本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、ウイルス学および免疫学分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。更に、令和2年1月27日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日