

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	Binbin Yi
論文題目	A zinc-finger-containing protein ZCCHC3 is an anti-retroviral host factor		
(論文内容の要旨)			
<p>Identification and functional characterization of host antiviral factors are crucial for eradicating latent human immunodeficiency virus (HIV) infections. Despite the identification of potent anti-HIV-1 host factors, HIV-1 effectively antagonizes them using its own accessory proteins. Therefore, exploring host restriction factors which are not antagonized by viral proteins has been a demanding research target for anti-viral drug development and therapy. Zinc finger CCHC domain-containing protein 3 (ZCCHC3) had been identified by interactome analyses with HIV-1 and was demonstrated to be involved in anti-viral innate immune responses. However, the anti-HIV-1 effect of ZCCHC3 has not been elucidated. In this study, the applicant examined how ZCCHC3 affects the life cycle of HIV-1 and found that it suppresses the production and infectivity of HIV-1. ZCCHC3 comprises an N-terminal disordered region, a middle folded (MF) domain, and characteristic C-terminal zinc finger motifs of CCHC type. Co-expression of the full length ZCCHC3 inhibited virion production from viral plasmids in a dose-dependent manner. Immunoblotting and live-cell imaging demonstrated that ZCCHC3 was incorporated into lentiviral particles, as well as virus-like particles made of HIV-1 Gag protein. Biochemical pull-down assay demonstrated that ZCCHC3 directly interacts with the nucleocapsid protein of HIV-1 Gag via zinc finger motifs. Furthermore, RNA pull-down assay and electrophoresis mobility-shift assay demonstrated that the MF domain of ZCCHC3 binds to the long terminal repeat (LTR) of HIV-1 genome. Extensive amino acid substitutions identified several basic residues in the MF domain (R168 and R247) involved in the RNA-binding. A reporter gene assay using various LTR-containing promoters revealed that co-expression of ZCCHC3 reduced the protein level but not the mRNA level, suggesting that it inhibits a post-transcriptional step of the viral production. To elucidate this mechanism, co-localization of ZCCHC3 in P-body, a host intracellular structure for sequestering various RNA species, was examined. Microscopic observations revealed that the full-length, as well as the MF domain, localized in P-bodies together with the viral genomic RNA. BioID analysis using TurboID-fused ZCCHC3 found that the components of P-body were enriched. Together, these results demonstrated that ZCCHC3 inhibits viral production and infectivity by at least two mechanisms: interaction with Gag to inhibit the production of infectious virion, and interaction with viral genomic RNA to sequester it in P-body. This distinct, dual-acting antiviral mechanism makes upregulation of ZCCHC3 a novel potential therapeutic strategy.</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本研究の背景には、「ウイルスタンパク質により拮抗されない宿主阻害因子の探索」という大きな課題がある。レトロウイルスに分類されるHIVは、後天性免疫不全症候群の原因ウイルスであり、現在では優れた抗ウイルス薬によりその制御が可能になりつつあるが、一度感染すると、体内からウイルスを除去するのが未だに極めて困難である。このような状況で、HIV増殖を阻害する細胞性タンパク質(宿主因子)の探索・機能解析が国内外の研究者によって進められ、これまで多数の阻害因子が同定されてきたが、HIVはVpuやNefなどの自分自身のアクセサリタンパク質を用いて、これらの阻害因子に拮抗する。よって、アクセサリタンパク質に拮抗されない阻害因子の同定は、当該分野における重要な研究課題のひとつである。このような背景の中、本研究室では、BioIDやライブイメージング等の技術を用いて、新たな宿主抑制因子を探索する研究を続けてきた。その中で得られた候補タンパク質の1つが、ZCCHC3であり、共同研究者の実験では、ZCCHC3の過剰発現が、多くのHIV-1株やサル免疫不全ウイルス、さらには他のレトロウイルスの生産と感染性を抑制すること、さらにはその抑制機能がウイルスタンパク質により拮抗されないことを示した。そこで本申請者は、ZCCHC3がHIV-1を抑制する分子メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。レンチウイルスを用いた細胞生物学的アプローチ、精製タンパク質を用いた生化学的アッセイ、等を用いて、ZCCHC3が少なくとも2つの異なるメカニズムでHIV-1の生産・感染性を阻害するという新しい知見を得た。1つのメカニズムは、ZCCHC3がC末端に持つCCHC型zinc fingerモチーフを介して、HIV-1 Gagタンパク質のヌクレオカプシドと相互作用し、ウイルスゲノムRNAのウイルス粒子への取り込み、さらにはウイルス粒子形成を阻害することである。これにより、ウイルス粒子の生産量の低下やゲノムを持たないウイルス粒子が生産され、感染性の低下につながる。もう一つの仕組みは、中央のフォールドドメインを介してウイルスRNAのLTR領域に結合し、RNAをP-bodyに封じ込める機能である。ここで明らかにされたZCCHC3の抗ウイルス作用は、これまでに報告された宿主抑制因子のいずれとも異なり、非常にユニークで強力である。またZCCHC3は、幅広い哺乳類で保存されており、両生類にも類似した遺伝子が存在することから、進化生物学的にも重要な機能を持つことが推測される。この成果は、新しい抗ウイルス薬や治療法の確立に大きく資するものであり、この抗ウイルス機能を応用したHIV制御法の開発が加速されると期待される。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、分子細胞生物学分野における優れた研究能力、そしてウイルス免疫学の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6年3月5日に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