京都大学	博士（医学）	氏　名	泉　泰輔
論文題目	MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif (MDM2 は　HIV-1 Vif をユビキチン化する新規の E3 ligase である)		

（論文内容の要旨）

HIV-1 Vif は、レンチウイルス間において高度に保存されたアミノ酸配列を持ち、HIV-1 の感染に重要な役割を担っている。近年同定された抗 HIV-1 宿主因子 APOBEC3G (A3G) は、ウイルス DNA に G-to-A 超変異を導入する事で、ウイルスの複製を阻害する。 Vif は細胞性因子である Cullin5, ElonginB/C, Rbx1 と E3 ユビキチンリガーゼ複合体を形成し A3G をユビキチン依存的に分解する事で、 A3G の抗 HIV-1 活性を中和している。一方で、Vif 自身も転写、翻訳後急速にユビキチン化修飾をうけ、プロテアソームで分解される事でその細胞内存在量は常に低く抑えられている。この Vif をユビキチン化する E3 リガーゼとして MDM2 を同定した。 まず、Vif と MDM2 を共発現させると Vif は MDM2 濃度依存性にその発現量が減少するが、プロテアソーム阻害剤 MG132 で細胞を処理すると Vif の発現量は回復した。次に免疫沈降法および GST-pull down 法を用いて、 Vif と MDM2 の結合を調べた所、Vif は MDM2 の central domain に直接結合している事を確認した。大腸菌発現系を用いて作製した MDM2 および Vif を用いて、*in vitro* ユビキチンアッセイを行った所、MDM2 により Vif のユビキチン化が誘導された。さらに、*in vivo* ユビキチンアッセイを行った所、MDM2 を過剰発現させた際には Vif のユビキチン化が誘導される一方、MDM2 siRNA を用いて内在性 MDM2 を抑制した場合、Vif のユビキチン化は減弱した。次に、ルシフェラーゼレポーターを持つ NL43 ウイルスを A3G と MDM2 の共発現下にて作成し、ウイルス複製を検討した所、 A3G 非発現下では、MDM2 の発現の有無に関わらずその感染性は維持された。A3G 発現下では、ΔVif ウイルスは一様にその感染性が減弱していたが、野生型ウイルスでは、MDM2 共発現下で作成したウイルスのみ、その感染性が減弱した。同時に、ウイルス産生細胞中及びウイルス粒子中の A3G 及び Vif の発現量をウェスタンブロット法にて検討した所、MDM2 を共発現させた細胞中では Vif の発現が減弱する一方で A3G の発現量は回復しており、さらにウイルス中への A3G の取り込みも増加していた。以上の結果から、 MDM2 は Vif を分解する事で A3G を安定化させ、その結果、野生型ウイルスの感染性を阻害する事がわかった。さらに、MDM2 siRNA を用いてマクロファージの内在性 MDM2 の発現を抑制し、JR-FL 株を感染させ培養上清中の HIV-1 p24 を経時的に測定した。その結果、MDM2 siRNA を導入した細胞でのウイルスの増殖能は、control siRNA を導入した細胞に比べて高かった。これは、single round infection assay と同様に、MDM2 は Vif を分解する事で、 A3G のウイルス粒子中の取り込みを増やし、HIV-1 の感染性を阻害している事を示している。以上のように、MDM2 は、Vif の E3 リガーゼであり、Vif を分解することで、HIV-1 複製を負に制御していることを証明した。A3G と Vif の相互作用による HIV-1 の複製制御は、新たな抗 HIV-1 薬開発の標的として近年注目されているが、Vif のユビキチン化の分子メカニズムを示した本研究の成果は、今後の新たな治療戦略の開発にも有用であると考えられる。

（論文審査の結果の要旨）

APOBEC3G(A3G)は、シチジン脱アミノ化酵素活性を有し、HIV-1 DNAに変異を導入しその感染性を阻害する。一方、HIV-1 Vifは、A3Gをユビキチン・プロテアソーム経路で分解する事でウイルス複製を助けている。従って、HIV-1複製は、Vif/A3Gの相互作用により制御されていると言える。一方で、Vif 自身も転写、翻訳後急速にユビキチン化修飾をうけ、プロテアソームで分解される事が知られていたが、その意義や分子機構に関しては不明であった。本論文では、Vif をユビキチン化する新規E3　リガーゼとしてMDM2を同定した。まず、MDM2は用量依存性にVifの細胞内発現量を減らすが、それはプロテアソーム阻害剤であるMG132処理により抑えられる事より、プロテアソーム依存的な分解反応である事を示した。次に、MDM2がVifと直接結合し、そのユビキチン化を誘導できることを*in vitro*,及び *in vivo* ユビキチンアッセイにより証明した。さらに、MDM2の過剰発現、或いはノックダウン細胞におけるHIV-1複製を検討し、MDM2がHIV-1の複製を負に制御している事を示した。

以上の結果は、vif/A3GによるHIV-1複製制御が、Vif分子のユビキチン化という翻訳後修飾によりさらに複雑に調節されていることを示した点で非常に重要な知見であり、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21年3月5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