

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                 |    |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----|-------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 博士（生命科学）                                        | 氏名 | 山元 誠司 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | レトロウイルスインテグラーゼ新規結合細胞性因子Huwe1の同定とHIV-1感染における機能解析 |    |       |
| <p>（論文内容の要旨）</p> <p>レトロウイルスの複製における特徴の一つは、逆転写酵素反応によって合成されたウイルスDNAを宿主のゲノムに組み込むこと（インテグレーション）である。インテグレーションはレトロウイルスの複製に必須の過程であり、それはウイルス蛋白質であるインテグラーゼ（integrase: IN）によって触媒される。しかし、IN領域への変異導入は、インテグレーションだけでなく、ウイルス複製の他の過程にも大きく影響することから、INがインテグレーション過程以外にもウイルス複製に関与することが示唆されている。本研究では、マウスのレトロウイルスであるMoloney murine leukemia virus（MoMLV）のINをベイト蛋白質としたtandem affinity purification（TAP）法によって、HECT型のユビキチンE3リガーゼであるHuwe1（HECT, UBA and WWD domain containing 1）をIN結合細胞性因子として同定した。そしてHuwe1はエイズの原因ウイルスであるhuman immunodeficiency virus type 1（HIV-1）のINに対しても結合活性を示し、その結合領域はN末端側4,000アミノ酸にわたる極めて広い領域であることが明らかとなった。一方、IN側の結合領域は、インテグレーションの触媒ドメインである活性中心ドメインであった。次に、Huwe1のウイルス複製過程における役割を検証するために、内在性Huwe1をノックダウンしたT細胞株を作出し、その細胞へのHIV-1感染実験をおこなった。Huwe1ノックダウン細胞におけるHIV-1インテグレーションまで（前期過程）の効率は、コントロール細胞におけるそれと同程度であった。一方、Huwe1ノックダウン細胞より産生されるHIV-1を解析したところ、粒子中のウイルス蛋白質の組成に有意な差は見い出せないながら、その感染価が1.5～3倍上昇していた。そこで、感染性ウイルス粒子の形成に必須である逆転写酵素やINの前駆体蛋白質であるGag-Polとの相互作用を検討したところ、Huwe1はGag-PolにIN領域依存的に結合することがわかった。以上の結果は、Huwe1がGag-Polとの相互作用を介して、感染性HIV-1粒子の形成を負に調節する可能性を示唆しており、IN結合細胞性因子がウイルスゲノム組み込み過程以外のウイルス粒子形成に作用するという新たな知見である。</p> |                                                 |    |       |

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、レトロウイルスのIntegrase(IN)に結合する宿主因子としてHuwe1を同定し、レトロウイルス感染におけるHuwe1の寄与について解析したものである。

レトロウイルス感染に特徴的かつ必須の複製過程であるインテグレーション反応は、ウイルス蛋白質であるINにより触媒される。一方、INの変異体実験ならびにINに結合する細胞性因子の一連の解析実験により、INはその結合細胞性因子を介して、インテグレーション以外のウイルス複製過程にも関与することは明らかにされつつある。そこで申請者は、IN結合宿主因子の新たな同定はレトロウイルス複製におけるINの多面的機能の解明に直結すると考え実験を設定した。まず、マウスレトロウイルスであるMoMLVのINをベイト蛋白質としたTAP法により、HECT型のユビキチンE3リガーゼであるHuwe1をIN結合蛋白質として同定した。そして、Huwe1がHIV-1 INにも結合すること、その結合領域がINの触媒活性ドメインならびにHuwe1のN末端約4000アミノ酸であることを見出した。次に、Huwe1ノックダウン細胞を用いた感染実験より、Huwe1はMoMLVの感染効率に影響しないが、miRNA発現レンチウイルスベクターにてHuwe1をノックダウンしたT細胞株を用いた感染実験より、Huwe1ノックダウン細胞から産生されるHIV-1粒子は、その感染性が増加することを見出した。興味深いことに、内在性Huwe1はウイルス産生量には影響を及ぼさないものの、次の標的細胞内におけるウイルス逆転写産物量を減少させることにより、ウイルス感染効率の低下をもたらすことがわかった。申請者はさらに、ウイルスの感染性獲得に特に重要なGag-Pol前駆体蛋白質とHuwe1の結合活性を検討し、Gag-Pol前駆体がC末端側のIN領域依存的にHuwe1と相互作用することも明らかにした。以上の結果より、Huwe1はHIV-1の複製過程においてウイルス形成を負に制御していることがわかった。これは、新たな細胞性ウイルス制御因子が存在する可能性を示すものと考えられる。

新規レトロウイルスIN結合細胞性因子としてHuwe1を同定し、そのHIV-1感染における機能を解明した本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。平成23年1月24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。

要旨公開可能日：                      年              月              日