

氏 名	しん どう けい すけ 新 堂 啓 祐
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2771 号
学位授与の日付	平 成 16 年 5 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	The Enzymatic Activity of CEM15/Apobec-3G Is Essential for the Regulation of the Infectivity of HIV-1 Virion but Not a Sole Determinant of Its Antiviral Activity (シチジン脱アミノ化酵素 CEM15/Apobec-3G 分子の酵素活性は HIV-1 ウイルス粒子の感染性制御に必須であるが、その抗ウイルス活性の唯一の決定因子ではない)
論文調査委員	(主 査) 教 授 速 水 正 憲 教 授 淀 井 淳 司 教 授 内 山 卓

論 文 内 容 の 要 旨

ヒト免疫不全ウイルス I 型 (HIV-1) のアクセサリー蛋白質のひとつである Vif は、HIV-1 ウイルス粒子の感染性制御に重要な役割を果たしている。その本態は Vif が HIV-1 ウイルス粒子の感染性を抑制する宿主因子である CEM15/Apobec3-G の作用を打ち消すように機能していると報告されていたが、しかしながら CEM15/Apobec-3G がいかにウイルス粒子の感染性を抑制しているかは不明であった。CEM15/Apobec-3G はシチジン脱アミノ化酵素に保存されたアミノ酸配列を 2 か所に持った分子であることから、HIV-1 の逆転写の際に作られるマイナス鎖 DNA に含まれるデオキシシチジンを脱アミノ化してデオキシウリジンに変換し、その結果、プラス鎖 DNA にデオキシグアノシン(G)からデオキシアデノシン(A)への高突然変異 (hypermutation) を生じさせ、ウイルス粒子の感染性を失わせることが想定されていた。本研究では本分子の 2 か所の酵素活性部位の点変異体および N 端または C 端の欠失変異体を用いて、ウイルス粒子の感染性及び影響および *in vitro* での逆転写反応における HIV-1 DNA の編集能を検討することにより、本分子の酵素活性がいかに抗ウイルス活性に関与しているかを詳細に検討した。まず、活性部位の点変異体とルシフェラーゼレポーターウイルス NL43-Luc または NL43/Δvif-Luc を共発現させて、産生されたウイルスの感染性を定量したところ、C 端活性部位の変異体 E259Q および C291A は感染性を殆ど抑制しなかったが、N 端活性部位の変異体である E67Q および C100A は NL43/Δvif-Luc の感染性を抑制した。さらに、これらのウイルスから *in vitro* での逆転写反応により生成された DNA を用いて、Env 領域の DNA 配列における G から A への変異導入を検討したところ、E67Q および E259Q のいずれも野生型 CEM15/Apobec3-G よりは少ないものの、NL43/Δvif-Luc ウイルスに G から A への変異を多数導入した。すなわち、本酵素の 2 か所の活性部位はいずれも DNA に変異を導入する活性を有するにもかかわらず、抗ウイルス活性には C 端の活性部位の酵素活性が必須であることが示唆された。一方、N 端欠失変異体 Δ(1-20)、Δ(1-40)、Δ(1-104) および C 端欠失変異体 Δ(257-384)、Δ(296-384) はウイルス粒子の感染性を全く抑制しなかった。His-Tag をつけた CEM15/Apobec3-G 野生型および EGFP-Tag をつけた CEM15/Apobec3-G の各種変異体を共発現させて、抗 EGFP モノクローナル抗体による共沈実験をしたところ、野生型および点変異体はすべて二量体を形成したが、欠失変異体はいずれも二量体を形成しなかった。すなわち、本分子の抗ウイルス作用には二量体の形成が必要であり、二量体の形成には本分子全体の構造が必要であることが示唆された。これらの結果より、CEM15/Apobec-3G 分子の抗ウイルス活性には脱アミノ化酵素としての活性が必須であるが、それ以外にも影響を与える因子の存在が考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

最近、抗 HIV-1 因子として同定された CEM15/Apobec-3G は Δvif ウイルスの感染性を抑制するが、そのメカニズムに

においては不明な点が多い。そこで、本研究は本分子の2か所の酵素活性部位の点変異体およびN端またはC端の欠失変異体を用いて、ウイルス粒子の感染性に及ぼす影響および *in vitro* での逆転写反応における HIV-1 DNA の編集能を検討することにより、本分子の酵素活性がいかに抗ウイルス活性に関与しているかを詳細に検討したものである。

点変異体を用いた解析より、N端、C端活性部位の変異体のいずれも、 Δ vif ウイルスへ G から A への変異を導入する活性を同等に保持しているにもかかわらず、抗ウイルス活性においてはC端活性部位がより重要であることが示された。これは、DNA 修飾活性と抗ウイルス活性が必ずしも相関しないことを示唆している。一方、欠失変異体を用いた実験より、すべての欠失変異体は抗ウイルス活性を消失しており、その原因として酵素として必要な二量体の形成が阻害されている可能性が示唆された。

本研究は、CEM15/Apobec-3G による HIV-1ウイルス粒子感染性制御のメカニズムの解明に貢献し、HIV-1 感染症の新たな治療薬開発にも寄与するものである。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、本学位申請者は平成16年3月2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。