

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	櫻井 康晃
論文題目	レトロウイルス組み込み部位の塩基配列解析より明らかとなったDNA二重鎖切断修復関連因子の新たな役割		
(論文内容の要旨)			
レトロウイルスの感染過程を詳細に解明することは、後天性免疫不全症候群（AIDS）の理解や新たな治療法の開発に必要不可欠である。レトロウイルスは、自身のゲノムRNAを鋳型とした逆転写反応により二重鎖DNAを合成し、そのDNAを宿主ゲノムへと組み込むことで感染を成立させる。この一連の反応に宿主由来のDNA二重鎖切断修復関連因子が関与すると考えられているが、その詳細な分子メカニズムは不明のままである。そこで本研究では、宿主ゲノムへ組み込まれたウイルスDNA近傍の塩基配列を効率的に解析する手法を新たに確立し、宿主因子としてのDNA二重鎖切断修復関連因子の機能解析を行った。 まずヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）のプロウイルス周辺の塩基配列を解析した結果、ataxia-telangiectasia mutated（ATM）、Mre11、NBS1、及びArtemisを欠損した細胞において、ウイルスDNAと宿主DNAとの結合部位に2種類の異常な挿入塩基が多く認められた。一方は、組み込み過程の第一段階である3' -processing反応においてインテグラーゼがウイルスDNA末端から除去するはずの2塩基が残存したものであった。他方は、ランダム配列の塩基であり、組み込み前のウイルスDNA末端に付加された塩基に由来すると考えられた。これらの異常から、DNA二重鎖切断修復関連因子が3' -processing反応の制御、及びウイルスDNA末端に異常な塩基が付加されることを防ぐ役割を担っていることが分かった。Mre11欠損細胞においてはprimer binding site（PBS）の一部も残存していたことから、Mre11が逆転写反応時にPBSに結合するtransfer RNAの分解を制御している可能性が考えられた。さらに、ATM欠損細胞においては正常細胞では見られないHIV-1組み込み部位周辺の塩基指向性を認め、またMre11欠損細胞においてはMLVの組み込み領域指向性に変化があったことから、DNA二重鎖切断修復関連因子はレトロウイルスの組み込み部位の選択をも制御していることが明らかとなった。 以上より、DNA二重鎖切断修復関連因子はレトロウイルスの感染過程に複数の段階で関与していることが初めて明らかとなった。この発見はレトロウイルスの感染過程の理解と病態解明における飛躍的な一歩であると考えられる。			

(論文審査の結果の要旨)

レトロウイルスは感染後に一本鎖RNAが逆転写酵素により二本鎖DNA(プロウイルス)となりウイルスがコードするインテグラーゼによって宿主ゲノムに組み込まれる。レトロウイルスの複製過程には多くの宿主因子が関与していることが明らかになっているが、プロウイルスの組み込み過程には不明な点が多く残されている。この組み込み反応に宿主由来のDNA二重鎖切断修復関連因子が関与すると考えられているが、その詳細な機構は不明のままであった。そこで申請者はレトロウイルスの組み込み過程におけるDNA二重鎖切断修復関連因子の役割を解析した。

まずDNA二重鎖切断修復関連因子欠損株と補完株においてMLVとHIV-1の組み込み部位の塩基配列を、inverse PCR法を応用した新たな手法を用いて増幅し解析した。ATM、Mre11、NBS1、及びArtemis欠損細胞株において、プロウイルスDNAと宿主DNAとの結合部位に、組み込み過程の3'-processing反応においてインテグラーゼがウイルスDNA末端から除去する2塩基の残存やランダムな配列の挿入など、異常な挿入塩基が認められた。後者は組み込み前にプロウイルスDNA末端に塩基が付加されたものと考えられた。この結果からDNA二重鎖切断修復関連因子が3'-processing反応の制御、及びウイルスDNA末端に異常な塩基が付加されることを防ぐ役割を担っていることが分かった。特にMre11欠損細胞株においてはprimer binding site (PBS)の一部も残存していたことから、Mre11が逆転写反応時にPBSに結合するtransfer RNAの分解を制御している可能性が示唆された。

一方、レトロウイルスの組み込み部位の塩基配列に指向性があることが報告されている。HIV-1ではATM欠損細胞株において組み込み部位周辺の塩基指向性の変化を認め、またMre11欠損細胞株においてはMLVの組み込み領域指向性に变化が確認された。この結果からDNA二重鎖切断修復関連因子はレトロウイルスの組み込み部位の塩基指向性にも関与していることが明らかとなった。

以上の結果は、これまで不明であったDNA二重鎖切断修復関連因子がレトロウイルスの組み込みに関与することを示しただけでなく、DNA二重鎖切断修復関連因子が逆転写酵素反応、ウイルスDNA末端の保護にも関わることを明らかにしており、レトロウイルス複製機構の解明に繋がる研究として評価される。

以上より、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。

また、平成22年2月3日論文公聴会を開催し、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