

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	小 林 朋 子
論文題目	Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility (HIV-1 Vpu 相互作用及び感受性決定に必須な tetherin 膜貫通領域アミノ酸の同定)		
(論文内容の要旨)			
tetherin(別名 BST-2/CD317)は HIV-1 粒子の細胞外への放出を抑制する宿主因子として近年新たに同定され、注目されている。HIV-1 はアクセサリ－蛋白質である Vpu が tetherin の、この活性を拮抗することにより、効率良く複製増殖すると考えられている。しかしながら、Vpu がどのように tetherin の作用を拮抗するのか、その詳しい分子機構は未だ明らかになっていない。そこで、tetherin と Vpu の相互作用ドメインの詳細解明のために、bi-molecular fluorescent complementation(BiFC)法による Vpu と ヒ ト tetherin(hu-tetherin) の 相 互 作 用 定 量 検 出 系 を ま ず 構 築 し た 。Kusabira-Green(KG)の ORF 配列を二分割し、N 端 KG タグ(KGN)配列を Vpu に、C 端 KG タグ(KGC)配列を hu-tetherin にそれぞれ付加した蛋白質発現プラスミドを作製した。レンチウイルスベクター導入法により作製した KGN-Vpu 恒常発現細胞に、KGC-tetherin を一過性にトランスフェクションし、KGN と KGC 蛋白質の相互作用量に依存して発光する KG 蛋白質の蛍光強度の増加をフローサイトメーターにより測定できた。この定量系を用いて Vpu と結合能がないマウス tetherin と hu-tetherin のキメラ分子による相互作用解析を行ったところ、hu-tetherin の膜貫通領域(TM)が Vpu との結合に唯一必須な領域であることがわかった。次に hu-tetherin TM をアラニン置換した変異体を用いて Vpu との相互作用を検討したところ、I34、L37 および L41 が相互作用にそれぞれ必須なアミノ酸残基であることがわかった。これらの 3 つのアラニン置換変異体と、野生型 HIV-1 あるいは Vpu 欠損 HIV-1 を共発現させ、その培養上清中のウイルス感染価を測定したところ、いずれの変異体も Vpu によるウイルス放出促進作用に対して抵抗性を示すことがわかった。すなわち、これらのアミノ酸が Vpu との相互作用だけでなくその反応性の決定基であることを見出した。興味あることに、これらの 3 つのアミノ酸残基は Vpu に拮抗されない非ヒト科霊長類の tetherin TM においても広く保存されている。しかしながら、非ヒト科霊長類 tetherin では上流に 2 アミノ酸欠損があり、さらに 2 アミノ酸挿入により Vpu との結合能を獲得することがわかった。そこで、種特異的な Vpu 反応性が、TM の構造的相違に起因する可能性を考え、脂質二重膜における hu-tetherin とアフリカミドリザル tetherin(agm-tetherin) TM の立体構造予測を分子動力学計算法により解析した。その結果、hu-tetherin TM の構造は、同定されたアミノ酸がひとつのヘリックス面に集約していると予測された。さらに、Vpu に反応性のない agm-tetherin の TM は、同定されたアミノ酸がヘリックス構造の多方面に散逸することが分かった。すなわち、同定された 3 つのアミノ酸は相互作用に重要であり、その立体的な配置が Vpu に対する相互作用および反応性を決定することが明らかとなった。 本研究結果は、HIV-1Vpu による hu-tetherin の拮抗活性が、その TM 領域の 3 次元構造に HIV-1 が適応し、相互作用能を獲得した結果であることを示唆している。また、この相互作用機構の解明は、その作用阻害による新たな抗ウイルス戦略につながる点からも意義があると考ええる。			

（論文審査の結果の要旨）			
本論文は、ウイルス放出抑制宿主因子である tetherin と、この tetherin 機能を阻害する HIV-1 アクセサリ－蛋白質 Vpu の結合様式を解明したものである。生細胞における tethein と Vpu の相互作用を定量的に検出可能な bi-molecular fluorescent complementation 法を構築し、ヒト tetherin (hu-tetherin)と Vpu がそれぞれの膜貫通(TM)領域のみを介して相互作用していることをまず見出した。次に、hu-tetherin TM 領域のアミノ酸変異体を用いて、Vpu との相互作用に関与する TM 領域内の 3 アミノ酸(I34、L37、L41)を同定した。そして、ウイルス放出実験により、これらすべてに加え T45 アミノ酸が Vpu に対する感受性に必須であることを示した。TM 領域の構造情報を得るために、脂質二重膜内における tetherin TM 領域の分子動力学計算を行い、Vpu に感受性の tetherin と非感受性の変異体の予測構造を比較した。その結果、これらのアミノ酸は、Vpu 感受性の hu-tetherin ではヘリックス構造中の同一面に配座するであろうことがわかった。以上の研究は、ウイルス抑制宿主因子に対する HIV 蛋白質による拮抗作用の分子メカニズムの解明に貢献したものであり、ウイルス複製過程の解明ならびに新たな抗 HIV 薬の開発に寄与するところが大い。 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 23 年 1 月 12 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			