

Title	Defining HIV-1 Vif residues that interact with CBF by site-directed mutagenesis( Abstract_要旨 )
Author(s)	Matsui, Yusuke
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2015-03-23
URL	<a href="http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k18881">http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k18881</a>
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士 (医学)	氏 名	松井 佑亮
論文題目	Defining HIV-1 Vif residues that interact with CBF $\beta$ by site-directed mutagenesis (部位特異的変異導入による CBF $\beta$ と相互作用する HIV-1 Vif 残基の決定)		
(論文内容の要旨)			
<p>HIV-1 Vif は生理的な標的細胞であるマクロファージや T リンパ球におけるウイルス増殖に必須の因子である。APOBEC3G は DNA シトシンデアミナーゼ活性を持った抗ウイルス宿主因子であり、ウイルス DNA に変異を導入することでウイルスの複製を阻害する。Vif は宿主因子である Cullin5、ElonginB/C、RBX2 と E3 リガーゼ複合体を形成し、その基質認識サブユニットとして APOBEC3 蛋白をユビキチン・プロテアソーム系を介して分解することで、ウイルスの感染性獲得に寄与している。近年、宿主の転写調節因子である CBF<math>\beta</math> が Vif が形成する E3 リガーゼ複合体に含まれていることが報告された。CBF<math>\beta</math> は Vif の機能発現に必須であり、Vif と CBF<math>\beta</math> の相互作用は抗 HIV 療法の新しい標的と考えられる。しかし、Vif の構造学的な知見は乏しく、CBF<math>\beta</math> との結合部位は明らかにされていなかった。本研究においては部位特異的変異導入により CBF<math>\beta</math> と相互作用する HIV-1 Vif のアミノ酸残基を新たに決定した。まず、CBF<math>\beta</math> と結合するアミノ酸残基を明らかにするために、Vif で保存されているアミノ酸のアラニン置換変異体を作製し、CBF<math>\beta</math> との相互作用を免疫沈降法で解析した。野生型の Vif では CBF<math>\beta</math> の共沈が認められたが、E88A/W89A では認められなかった。次に、Vif が CBF<math>\beta</math> と相互作用しないことで APOBEC3 蛋白の分解能が損なわれるか否かを 293T 細胞に Vif と APOBEC3G あるいは APOBEC3F を共発現させ免疫ブロットングで評価した。E88A/W89A は、APOBEC3G、APOBEC3F のいずれも分解できなかった。更に、変異体がウイルスの増殖動態に与える影響を検証するために感染実験を行った。ルシフェラーゼレポーターを有する NL4-3 シュードウイルスを、APOBEC3G あるいは APOBEC3F の共発現下に作製し、その感受性を検討した。E88A/W89A では、APOBEC3G、APOBEC3F の何れの場合でも、野生型と比べて感染性が顕著に低下した。同時に、ウイルス産生細胞中及びウイルス粒子中の Vif、APOBEC3 蛋白の発現量を免疫ブロットングで検討したところ、E88A/W89A ではウイルス産生細胞中で Vif の発現が確認出来たものの、ウイルス粒子中への APOBEC3 蛋白の取り込みが野生型と比較して増加していた。最後に、NL4-3 を T 細胞株である CEM-SS 細胞、CEM 細胞に感染させ実験を行った。許容細胞である CEM-SS 細胞では、変異体は野生型と遜色なく複製したが、内在性に APOBEC3 蛋白を発現する CEM 細胞では E88A/W89A では複製が低下した。以上のことより Vif の CBF<math>\beta</math> との結合には、E88/W89 が含まれていることが示唆された。本研究により、CBF<math>\beta</math> の結合にとって重要な Vif のアミノ酸残基として新たに E88/W89 を同定した。今後、Vif と CBF<math>\beta</math> の相互作用を標的とした治療戦略への応用にも役立つと考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

APOBEC3(G)は1本鎖DNAに対するシチジンデアミナーゼ活性を持ち、HIV-1逆転写中間産物のDNAに変異を導入することでウイルスの複製を阻害する。HIV-1 Vifは宿主のユビキチンリガーゼと複合体を形成し、APOBEC3蛋白質をユビキチン化し、プロテアソーム経路での分解を誘導することで感染性獲得に寄与している。CBF $\beta$ はVifの作るE3リガーゼ複合体の一員であり、APOBEC3蛋白質の分解に必須の因子であるが、VifとCBF $\beta$ の結合に関する情報は限定的であった。本論文では、部位特異的変異導入によりCBF $\beta$ と結合するVifのアミノ酸残基としてE88/W89を新たに決定した。まず、高度に保存されているE88/W89の変異体を作製し、CBF $\beta$ と相互作用しないことを共免疫沈降法を用いて示した。次に、E88A/W89AがAPOBEC3G、APOBEC3Fを分解できないことを細胞内で共発現させることで示した。さらに、ルシフェラーゼ・レポーター解析によりE88A/W89Aの変異をもつNL4-3シュードウイルスはAPOBEC3G、APOBEC3F何れの存在下でも感染性が低下することを示した。最後に、T細胞株に複製可能なNL4-3を感染させ、E88A/W89Aは許容細胞では野生型と変わらず複製するが、多種のAPOBEC3を発現する非許容細胞では複製が低下することを示した。

以上の研究はCBF $\beta$ とHIV-1 Vifとの結合に重要なアミノ酸残基を明らかにし、その機能的相互作用の解明に寄与するところが多い。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、本学位授与申請者は、平成27年2月9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