

氏名（本籍）	阿部 真（北海道）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲第 179 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	レトロウイルス複製に関する宿主因子機能の解明とその応用
論文審査委員	（主査） 教授 高久 洋 （副査） 教授 滝口 泰之 教授 河合 剛太 教授 黒崎 直子 東京医科歯科大学 教授 神奈木 真理

## 学位論文の要旨

### レトロウイルス複製に関する宿主因子機能の解明とその応用

レトロウイルスの発見後、精力的な研究によりウイルス複製に不可欠な宿主因子が次々と見出されている。最近では、ウイルス複製に対し負に制御する宿主因子の存在も明らかにされてきており、既存のレトロウイルス治療に対する諸問題を克服する鍵として、ウイルス複製に関わる宿主因子の研究が注目されている。そこで本研究では、レトロウイルス複製に関する新たな宿主因子を探索し、これらの機能を解明するとともに、その知見を基に新たなレトロウイルス治療薬の研究開発につなげることを目的とした。

本論文第 2 章では、HTLV-1 にコードされる Rex が RNA silencing 機構を制御する機能を有するか否かを検討した。Rex を発現させ、siRNA または shRNA の抑制効果を解析したところ、siRNA による標的遺伝子制御機能には影響せず、ヘアピン構造を有する shRNA の標的遺伝子制御機能を低下させたことから Rex が宿主因子 Dicer の機能を阻害したことを明らかにした。Rex と Dicer の相互作用解析の結果、Rex による Dicer の阻害機構は Rex と Dicer の相互作用によること、Dicer との相互作用には Rex の多量体化が重要な役割を果たすこと、Dicer の機能を阻害するためには Rex の全領域が必要であることを見出した。また、Rex の発現の有無下で、ウイルス RNA の発現を経時的に解析したところ、Rex の発現はウイルス RNA 発現を持続させ、安定化することを確認した。さらに、Dicer を knock-down し、ウイルスタンパク質発現を解析したところ、Dicer の knock-down はウイルスタンパク質発現を上昇させたことから、ウイルス RNA が Dicer の標的となりうること、さらに宿主 miRNA による翻訳抑制という RNA silencing 機構の標的となりうることが示唆された。以上の結果より、Rex は Dicer の機能を阻害することによりウイルス RNA を RNA silencing 機構から逃避させることでウイルス複製を有利にしていることを見出した。

本論文第 3 章では、宿主因子 KRAB-Zinc finger タンパク質 ZBRK1 による HIV-1 潜伏感染の制

御について検討した。ZBRK1 の過剰発現および knock-down により LTR 転写活性を解析したところ、過剰発現下では LTR 転写活性は抑制され、knock-down により LTR 転写活性が促進されることを確認した。LTR-luc 安定発現細胞に ZBRK1 を発現させ、Tat による LTR 転写活性化を検討したところ、ZBRK1 が Tat によるクロマチンを介した LTR 転写活性化を抑制したことから、ZBRK1 は LTR 転写活性を抑制することにより HIV-1 潜伏感染を制御することを見出した。次に、LTR 欠損変異体を用いて ZBRK1 の LTR への結合領域を検討したところ、ZBRK1 の Zinc finger motif は LTR の (-245)- (-107) の領域に結合することが示唆された。また、ZBRK1 による LTR 転写活性抑制への他の宿主因子の影響を検討したところ、TRIM28 との相互作用が起らない ZBRK1-DV12,13AA 変異体により LTR 転写活性抑制が解除されることを確認した。さらに、HDAC 阻害剤、HDAC2 の knock-down によっても LTR 転写活性抑制が解除されたことから、ZBRK1 による LTR 転写活性抑制には TRIM28 との相互作用および HDAC2 によるヒストン脱アセチル化が必須因子であることを明らかにした。以上の結果より、ZBRK1 によるヒストンの脱アセチル化はプロウイルスの LTR 転写活性を抑制し、HIV-1 の潜伏感染を制御する一因となることを見出した。

本論文第4章では、Vifによる HIV-1 制御宿主因子 APOBEC3G の分解を抑制する宿主因子 Hsp70 の発現を誘導する低分子化合物の探索を行った。APOBEC3G を発現させ、Prostaglandin A1 (PGA1) 添加による HIV-1 粒子への APOBEC3G の取り込みおよび感染力価を解析したところ、PGA1 添加により HIV-1 粒子への APOBEC3G の取り込みが増加し、感染力価を抑制することを明らかにした。さらに、内在的に APOBEC3G を発現している H9 細胞および CEM 細胞における PGA1 添加による HIV-1 複製への影響を検討したところ、HIV-1 感染細胞系でも PGA1 添加により内在性の APOBEC3G の分解が抑制され、1回の添加で14日間にわたり HIV-1 複製を抑制することを見出した。以上の結果より、Hsp70 は宿主因子であることから Hsp70 の発現誘導による副作用は考えにくく、さらに本研究で明らかにした HIV-1 増殖・複製抑制機構は既存薬剤の作用点とも異なるため、Hsp70 発現を誘導する低分子化合物 PGA1 は新たな HIV-1 治療薬として期待される。

以上、HTLV-1 Rex による RNA silencing 機構の制御、ZBRK1 による HIV-1 潜伏感染制御など、新たな宿主因子とレトロウイルスの相互作用分子メカニズムを明らかにした。そして、Vif による APOBEC3G の分解を制御する宿主因子 Hsp70 を発現誘導する PGA1 を見出した。これらの知見より、レトロウイルスと宿主因子の相互関係を明らかにすることは新たなレトロウイルス治療薬の開発につながると期待される。

## 審査結果の要旨

本論文は「レトロウイルス複製に関与する宿主因子機能の解明とその応用」と題し、4章20節より構成されている。

本論文第1章では、レトロウイルス複製と宿主因子の関係について記している。レトロウイルスの発見後、精力的な研究によりウイルス複製に不可欠な宿主因子が次々に見出されている。最近では、ウイルス複製に対し負に制御する宿主因子の存在も明らかにされてきており、既存のレトロウイルス治療に対する諸問題を克服する鍵として、ウイルス複製に関わる宿主因子の研究が注目されている。そこで本研究では、レトロウイルス複製に関与する新たな宿主因子を探索し、これらの機能を解明するとともに、その知見を基に新た

なレトロウイルス治療薬の研究開発につなげることを目的としている。

本論文第2章では、HTLV-1 にコードされる Rex が RNA silencing 機構を制御する機能を有するか否か検討している。Rex を発現させ、siRNA または shRNA の抑制効果を解析したところ、siRNA による標的遺伝子制御機能には影響せず、ヘアピン構造を有する shRNA の標的遺伝子制御機能を低下させたことから Rex が宿主因子 Dicer の機能を阻害したことを明らかにしている。Rex と Dicer の相互作用解析の結果、Rex による Dicer の阻害機構は Rex と Dicer の相互作用によること、Dicer との相互作用には Rex の多量体化が重要な役割を果たすこと、また Dicer の機能を阻害するためには Rex の全領域が要求されることを見出している。一方 Rex の発現の有無下で、ウイルス RNA の発現を経時的に解析したところ、Rex の発現はウイルス RNA 発現を持続させ、安定化することを確認している。さらに Dicer を knock-down し、ウイルスタンパク質の発現を解析したところ、Dicer の knock-down 系ではウイルスタンパク質発現を上昇させたことから、ウイルス RNA が Dicer の標的となりうること、さらに宿主 miRNA による翻訳抑制という RNA silencing 機構の標的となりうることを示唆している。以上の結果より、Rex は Dicer の機能を阻害することによりウイルス RNA を RNA silencing 機構から逃避させることでウイルス複製を有利にしていることを見出している。

本論文第3章では、宿主因子KRAB-Zinc fingerタンパク質ZBRK1によるHIV-1潜伏感染の制御について検討している。ZBRK1の過剰発現およびknock-downによりLTR転写活性を解析したところ、過剰発現下ではLTR転写活性は抑制され、knock-downによりLTR転写活性が促進されることを確認している。LTR-luc 安定発現細胞に ZBRK1 を発現させ、Tat による LTR 転写活性化を検討したところ、ZBRK1 が Tat によるクロマチンを介した LTR 転写活性化を抑制したことから、ZBRK1 は LTR 転写活性を抑制することにより HIV-1 潜伏感染を制御することを見出している。次に、ゲルシフトアッセイにより ZBRK1 の LTR への結合領域を検討したところ、ZBRK1 の Zinc finger motif は LTR の (-174)-(-95) の領域に結合することを明らかにしている。また、ZBRK1 による LTR 転写活性抑制への他の宿主因子の影響を検討したところ、TRIM28 の knock-down の系、TRIM28 との相互作用が起こらない ZBRK1-DV12,13AA 変異体を用いたところ LTR 転写活性抑制が解除されることを確認している。さらに、HDAC 阻害剤、HDAC2 の knock-down によっても LTR 転写活性抑制が解除されることから、ZBRK1 による LTR 転写活性抑制には TRIM28 との相互作用および HDAC2 によるヒストン脱アセチル化が必須因子であることを明らかにしている。以上の結果より、ZBRK1 によるヒストンの脱アセチル化はプロウイルスの LTR 転写活性を抑制し、HIV-1 の潜伏感染を制御する一因となることを見出している。

本論文第4章では、Vif による HIV-1 制御宿主因子 APOBEC3G の分解を抑制する宿主因子 Hsp70 の発現を誘導する低分子化合物の探索を行っている。Prostaglandin A1 (PGA1) の細胞毒性および Hsp70 発現への影響を検討したところ、PGA1 の最適細胞毒性濃度は 4 $\mu$ g/ml で、この際の Hsp70 発現が約 1.5 倍上昇することを確認している。APOBEC3G を発現させ、PGA1 添加による HIV-1 粒子への APOBEC3G の取り込みおよび感染力価を評価したところ、PGA1 添加により HIV-1 粒子への APOBEC3G の取り込みが増加し、感染力価を抑制することを明らかにしている。さらに、内在的に APOBEC3G を発現している H9 細胞および CEM 細胞における

PGA1 添加による HIV-1 複製への影響を検討したところ、HIV-1 感染細胞系でも PGA1 添加により内在性の APOBEC3G の分解が抑制され、1 回の添加で 14 日間にわたり HIV-1 複製を抑制することを見出している。以上の結果より、Hsp70 は宿主因子であることから Hsp70 の発現誘導による副作用は考えにくく、さらに本研究で明らかにした HIV-1 増殖・複製抑制機構は既存薬剤の作用点とも異なるため、Hsp70 発現を誘導する低分子化合物 PGA1 は新たな HIV-1 治療薬として期待される。

以上、HTLV-1 Rex による RNA silencing 機構の制御、ZBRK1 による HIV-1 潜伏感染制御など、新たな宿主因子とレトロウイルスの相互作用分子メカニズムを明らかにしている。そして、ここで得られた知見を基に、新たな HIV-1 治療薬として Vif による APOBEC3G の分解を制御する宿主因子 Hsp70 を発現誘導する低分子化合物 Prostaglandin A1 の開発に成功している。本論文は新たなレトロウイルス治療法にたいして重要な知見を得たものとして価値のある集積である。従って、学位論文申請者の阿部 真は、博士 (工学) の学位を得る資格があると認める。