

Title	Silencing of tripartite motif protein (TRIM) 5 α mediated anti-HIV-1 activity by truncated mutant of TRIM5 α
Author(s)	前川, 彦一郎
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49901
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【28】

氏 名	前 川 彦 一 郎
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 7 3 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 21 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学 位 論 文 名	Silencing of tripartite motif protein (TRIM) 5 α mediated anti-HIV-1 activity by truncated mutant of TRIM5 α (ドメイン欠失 TRIM5 α 変異体による TRIM5 α の HIV-1 抵抗性の解除)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 塩 田 達 雄 (副査) 教 授 生 田 和 良 教 授 松 浦 善 治

論文内容の要旨

[目 的]

ウイルス抵抗性因子の機能解析は、ウイルスの複製機構の解明や抗ウイルス薬開発への足がかりとなる。近年、HIV-1感染抵抗性因子としてアカゲザル (Rh) の細胞からTRIM5 α が同定された。TRIM5 α はN末端側から3つのモチーフ、RING、B-box2、coiled coilドメインを有し、さらにC末端側にSPRYドメインを持つ。一方、splicing variantの一つであるTRIM5 γ は3つのモチーフのみで、SPRYドメインを欠く。SPRYドメインはウイルスの認識に重要な役割を果たすことが報告されており、SPRYドメインを欠くTRIM5 γ はウイルス抵抗性を示さない。HIV-1感染に抵抗性を示すRhの細胞にRh-TRIM5 γ を導入するとHIV-1が感染するようになり、TRIM5 γ はTRIM5 α のドミナントネガティブとして働くことが報告されている。一方、タンパク質の機能解析にsiRNAによる標的遺伝子のノックダウンは欠かせない実験手法であるが、いくつかの問題もある。1つは、ノックダウン効果がsiRNAの配列と導入効率に影響を受けること。もう一つはノックダウンの程度によって解析の結論に影響を及ぼす点である。これらの問題に影響を受けることなくHIV-1抵抗性因子の機能解析を行うために、TRIM5 γ のドミナントネガティブ効果を応用し、TRIM5 α のHIV-1感染抵抗性を消失させた細胞の作製を試みた。

[方法ならびに成績]

アフリカミドリザル (AGM) 由来のCV1細胞にカニクイザルTRIM5 α のSPRYドメイン欠失変異体 (CM-TRIM5 α -S(-)) あるいはAGM-TRIM5 γ をセンダイウイルスベクター (SeV) により導入し、GFP発現レンチベクター (HIV-1-GFP) の感染効率を検討することにより、HIV-1抵抗性解除効果を検討した。CV1細胞及び、タンパク質発現のないSeV親株Zもしくはウイルス抵抗性のないAGM-TRIM5 α のcoiled-coilドメイン欠失変異体 (AGM-TRIM5 α -CC(-)) 発現SeV感染CV1細胞はHIV-1-GFP感染に抵抗性を示した。AGM-TRIM5 α -CC(-)はドミナントネガティブ効果のないTRIM5変異体として機能したので、以後陰性対照として用いた。一方、CM-TRIM5 α -S(-) あるいはAGM-TRIM5 γ 発現SeV感染CV1細胞では、HIV-1-GFPが感染するようになった。これらの結果はSPRYドメイン欠失TRIM5変異体がTRIM5 α のHIV-1抵抗性に対しドミナントネガティブ効果を持つことを示している。次に、ドメイン欠失TRIM5変異体が他種由来TRIM5 α のHIV-1抵抗性を解除するか検討した。CM-TRIM5 α -S(-)はヒトMT4細胞において、SeVで発現させた他種由来のTRIM5 α (Rh、CM、AGM、HIV-1抵抗性を示すヒトR332P変異体) のHIV-1抵抗性を解除した。一方、AGM-TRIM5 γ のHIV-1抵抗性解除効果は弱かった。これは、AGM-TRIM5 γ の発現量が他種由来TRIM5 α のものに比べて低いために、内在性TRIM5 α には効果を示したが、発現量の多い外来性TRIM5 α に対しては効果が弱まったものと考えられる。次に、ドメイン欠失TRIM5変異体とsiRNAのHIV-1抵抗性解除効果を比較した。siTRIM5は陰性対照のsiCont.と比較してCV1細胞のTRIM5mRNAレベルを約1/4に減少させ、CV1細胞でのHIV-1-GFP感染を3-10倍上昇させた。一方、AGM-TRIM5 α -CC(-)と比較してCM-TRIM5 α -S(-)、AGM-TRIM5 γ 導入細胞ではHIV-1-GFPの感染が8-30倍上昇した。

さらに、siTRIM5に加えてCM-TRIM5 α -S(-)もしくはAGM-TRIM5 γ 発現SeVを感染させた細胞では、siTRIM5単独時と比較し、HIV-1-GFP感染が2.7-3倍上昇した。これらの結果はCM-TRIM5 α -S(-)もしくはAGM-TRIM5 γ はsiRNAより強力にTRIM5 α のHIV-1抵抗性を解除したことを示している。

[総 括]

TRIM5 α のSPRYドメイン欠失変異体をSeVによりHIV-1抵抗性細胞に導入すると、他種由来TRIM5 α のHIV-1抵抗性を解除するだけでなく、siRNAより簡便かつ強力にHIV-1抵抗性を解除することを示した。本手法はTRIM5以外の抵抗性因子の解析、TRIM5様抵抗性因子の探索、TRIM5 α の機能解析に応用可能であり、HIV-1抵抗性因子の機能解析に有用な手法である。

論文審査の結果の要旨

TRIM5 α は旧世界ザル細胞のHIV-1抵抗性因子である。TRIM5 α のスプライシングバリエントでありSPRYドメインを欠くTRIM5 γ はHIV-1抵抗性がなく、TRIM5 α のHIV-1抵抗性にドミナントネガティブ効果を示す。本研究ではTRIM5 γ と同様にSPRYドメインを欠失させたTRIM5変異体 (S(-)) を利用して、TRIM5 α のHIV-1抵抗性を解除した旧世界サル細胞の作製を試みたものである。S(-)はアフリカミドリザルだけでなくヒト、カニクイザル、アカゲザル由来のTRIM5 α のHIV-1抵抗性も解除した。さらに、TRIM5 α を標的とするsiRNAと比較すると、S(-)はsiRNAよりHIV-1抵抗性解除効果が強力であった。siRNAはタンパク質の機能解析に汎用されるが、強力なノックダウン効果を得るには種々の検討が必要である。本研究はsiRNAより簡便にTRIM5 α の抗HIV-1作用をノックアウトし、TRIM5 α 以外のウイルス抵抗性因子を解析できる新しい手段を示したものであり博士(医学)の学位授与に値する。