

審査の結果の要旨

氏名 常 浩

本論文は、霊長類レンチウイルスのアクセサリタンパク Vpr による MCM10 の分解制御について述べられている。

ヒト免疫不全ウイルスI型 (HIV-1) は、構造遺伝子と調節遺伝子に加えて、アクセサリ一遺伝子である *vpr*, *nef*, *vif* および *vpu* を有するという特徴がある。HIV-1 はチンパンジーの免疫不全ウイルス (SIVcpz) を祖先として進化し、HIV-2 はマカク属のサル免疫不全ウイルス (SIVmac) と同じウイルスで、スーティマンガベイ由来の SIVsmm から進化してきたと推測されている。HIV-2 も構造遺伝子と調節遺伝子が存在するが、HIV-1 がコードするアクセサリタンパク質の中の *Vif*, *Vpr* および *Nef* は HIV-1 を共有しているが、*Vpu* は HIV-1 に特異的であり、*Vpx* は HIV-2 に特異的である。また、SIV の中で、SIVmac/SIVsmm は HIV-1 と同様に一つの *vpr* 遺伝子を持ち HIV-1 系列 (*Vpr+Vpx-Vpu+*) に分類され、HIV-2/SIVmac239 は *vpr* と *vpx* 遺伝子の両方を持ち HIV-2 系列 (*Vpr+Vpx-Vpu-*) に分類され、SIVdeb/SIVsyk/SIVl1st/SIVagm は prototype 系列 (*Vpr+Vpx-Vpu-*) に分類される。このように、*vpr* のみが、霊長類レンチウイルスに保存されるアクセサリ一遺伝子である。HIV-1 *Vpr* は核移行、G2期停止およびアポトーシスの誘導等、複数の機能を発揮する多機能性タンパク質である。最近、*Vpr* が Cullin4-DDB1 [*VprBP*]-DCAF1 E3 ligase 複合体との相互作用を通じて細胞周期の停止を誘導することが報告された。さらに、真核生物の染色体複製因子 MCM10 が Cullin4-DDB1 [*VprBP*]-DCAF1 E3 ligase 複合体との相互作用を通じてユビキチン化されること、この MCM10 の分解を *Vpr* が MCM10 との間接的結合を介して劇的に促進することで、G2期停止を誘導することが明らかとなった。そこで本研究では、*Vpr* タンパク質の機能における宿主特異性およびその分子細胞生物学的機序を明らかにするために、*Vpr* 機能の中の MCM10 の分解能について、霊長類レンチウイルス間での保存性について注目して解析を行った。

Gene Bank から収集した塩基配列情報に基づいて予測されるアミノ酸配列を用いて系統樹解析を行った。その結果から、Prototype 系列から SIVdeb, SIVsyk, SIVl1st, SIVagm および SIVcol *Vpr* を、HIV-1 系列から HIV-1, SIVmus および SIVmon *Vpr* を、HIV-2 系列から SIVmac および SIVrcm *Vpr* を選択して、遺伝子合成により発現ベクターを構築して、HEK293T 細胞に導入後に抗-Flag 抗体を用いて Western blot 法を行った。対照として HIV-2 *vpx* 遺伝子を用いた。各々の *Vpr* による MCM10 の分解能を解析するために、各々のバンドの強度を測定して、alpha-tubulin のバンド量で補正した。その結果、11 種類の *Vpr* または *Vpx* タンパク質の中で、HIV-1, SIVmus および SIVrcm のみが MCM10 の分解を有意に抑制した。この結果を検証するために導入する *vpr* 発現ベクター量を 0, 0.3, 0.5, 1.0 μg まで振って実験を行った結果、HIV-1, SIVmus および SIVrcm *Vpr* のみがタンパク量依存的に MCM10 の分解を抑制した。この 3 種類の *Vpr* は、HEK293T に存在する内在性 MCM10 のタンパク発現を抑制したが一方で、RNA レベルでの発現には影響を与えなかった。

上記で同定した3種類のVpr遺伝子とMCM10発現ベクターをHEK293T細胞に共導入して、MG132およびlactacystinを添加して培養後にWestern blot法を行った。これら3種類のVprによるMCM10の発現の低下はプロテアソームインヒビターにより回復できた。また、これら3種類のVprとMCM10の結合を免疫沈降およびHeLa細胞における共局在実験により立証した。以上から、VprはMCM10との結合を通じて、MCM10のプロテアソーム分解を抑制していることが明らかとなった。

VprによるMCM10のプロテアソーム分解のドメインを解明するために、874個のアミノ酸から構成されるヒトMcm10の様々な変異体を作成してHeLa細胞内で発現させた結果、3種類のVprはいずれもMcm2-7ドメインを介してMCM10のプロテアソーム分解を抑制していることが示唆された。続いて、DNA二本鎖切断のマーカーである γ -H2AXを用いて解析したところ、VprによるDNAダメージの誘導とMCM10のプロテアソーム分解には関連性が認められなかったが一方、MCM10の発現量の低下とHIV-1Vprが誘導するG2期停止が強い相関性を示すことが明らかとなった。

さらに、VprによるMCM10のプロテアソーム分解の抑制はサル細胞であるCOS細胞でも観察されたことから、このVprによるMCM10の分解制御が霊長類に保存されている機能であることが示唆された。

以上の結果から、11種類のVprまたはVpxタンパク質の中で、HIV-1、SIVmus およびSIVrcm VprのみがMcm2-7ドメインを介してMCM10のプロテアソーム分解を抑制していることが始めて明らかとなった。このVprによるMCM10の分解制御能は霊長類に保存されている機能であることが考えられる。

なお、論文はLowela Siarot, 松浦遼介, Chieh-Wen Lo, 佐藤洋隆, 大附寛幸, 間陽子との共同研究であるが、論文提出者本人が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

よって本論文は博士（医科学）の学位請求論文として合格と認められる。

以上 1799 文字