

博士論文

論文題目 ヒト免疫不全ウイルス1型アクセサリータンパク質
Vprの機能解析

氏 名 村上 知行

目次

略語	4
要旨	6
緒論	11
1. 後天性免疫不全症候群 (AIDS)	11
2. ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1)	11
3. HIV-1 の生活環	12
4. AIDS の病態と治療	12
5. HIV-1 アクセサリータンパク質 Vpr	13
第 1 章 Vpr 発現細胞のライブイメージング	15
1-1. 緒言	15
1-2. 材料と方法	19
1-3. 結果	28
• HeLa/Fucci2 細胞における Vpr 誘導性 G2 期停止とアポトーシスの解析	
• Vpr 発現細胞における細胞周期と細胞死のライブイメージング	
• 細胞周期を同調させた細胞とアデノウイルスベクターを用いた Vpr 発現細胞のライブイメージング	
• Vpr 発現細胞におけるアポトーシスのライブイメージング	
• 短時間の Vpr 発現による G2 期停止とアポトーシスの解析	
• DD-Vpr 発現細胞における G2 期停止とアポトーシスのライブイメージング	

1-4. 考察.....	39
第 2 章 Vpr による G2 期停止関連新規宿主因子の探索.....	44
2-1. 緒言.....	44
2-2. 材料と方法.....	46
2-3. 結果.....	54
• Vpr 誘導性 G2 期停止関連因子 Huntingtin interacting protein 1 (HIP1) の同定	
• Vpr 誘導性 DNA 二本鎖切断に対する HIP1 の効果解析	
• Vpr と HIP1 の結合解析	
• Vpr 発現細胞における HIP1 の局在と細胞周期解析	
• MDM における HIV-1 感染に対する HIP1 の効果解析	
2-4. 考察.....	60
結論.....	64
謝辞.....	65
参考文献.....	67
図表.....	83

略語

AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
HIV	human immunodeficiency virus
LTR	Long terminal repeat
CD4	Cluster of Differentiation 4
CCR5	C-C Chemokine Receptor type 5
CXCR4	C-X-C Chemokine Receptor type 4
PIC	preintegration complex
SIV	simian immunodeficiency virus
MDM	monocyte derived macrophage
DCAF1	DDB1- and CUL4-associated factor-1
DDB1	damage-specific DNA binding protein 1
CUL4A	Cullin4A
SLX4	SYCP3-like X-linked 4
MUS81	mutagen-sensitive 81
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related
Mfn2	mitofusin 2
Fucci	fluorescent ubiquitination based cell-cycle indicator
Cdt1	Cdc10-dependent transcript 1
mKO2	monomeric Kusabira-Orange2
mAG1	monomeric Azami-Green1
ECFP	enhanced cyan fluorescent protein
FRET	fluorescence resonance energy transfer
DD	destabilization domain

FBS	fatal bovine serum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
PCR	polymerase chain reaction
NES	nuclear export signal
MOI	multiplicity of infection
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
PBS	Phosphate buffered saline
HRP	horseradish-peroxidase
PI	propidium iodide
Chk1	checkpoin kinase 1
HIP1	Huntingtin interacting protein 1
ANTH	AP180 N-terminal homology
THATCH	talin-HIP1/R/Sla2p actin-tethering C-terminal homology
NLS	nuclear localization signal
HIPPI	HIP1 protein interactor
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
M-CSF	macrophage-colony stimulating factor
mRFP	monomeric red fluorescent protein

要旨

【目的と意義】

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) アクセサリータンパク質の一つ **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り、HIV-1 の複製とエイズ病態に大きな役割を果たしていることが明らかになっている。中でも、HIV-1 の Long terminal repeat (LTR) の転写活性が G2 期において最も高くなることから、**Vpr** 誘導性 G2 期停止はウイルス複製に重要な働きをしていると考えられている。また、**Vpr** によるアポトーシスの誘導は CD4 陽性リンパ球の減少を惹起し、エイズの発症に寄与していると示されている。しかし、これまでに **Vpr** が誘導するこれら 2 つの機能の関連性に関する多くの報告がなされてきたが、一定の見解は得られていない。

本研究では、**Vpr** 誘導性 G2 期停止とアポトーシスの関係を解明するため、細胞周期の変化を核内蛍光の変化により解析できる fluorescent ubiquitination based cell-cycle indicator2-expressing HeLa (HeLa/Fucci2) 細胞、アポトーシスの実行因子である Caspase-3 の活性化を fluorescence resonance energy transfer 効率の変化をもとに生細胞においてモニタリングすることが可能な SCAT3.1 およびタンパク質の発現を迅速に調節できる ProteoTuner Shield System を用いて、単一の **Vpr** 発現細胞における細胞周期とアポトーシスの動態をライブセルイメージング技術により解析した。続いて、**Vpr** 誘導性 G2 期停止の機構を詳細に明らかにするために、siRNA ライブラリーを用いて G2 期停止に関与する新規宿主因子の探索を行い、**Vpr** 誘導性 G2 期停止の機構を解析した。

【材料と方法】

Vpr および SCAT3.1 を共発現するベクターを HeLa/Fucci2 細胞に導入し、

24時間後からインキュベータ付属の顕微鏡 LCV110 を用いてライブイメージングを行い、Vpr 発現細胞における細胞周期と Caspase-3 の活性の変化を解析した。また、血清飢餓により細胞周期を G1 期に同調させた HeLa/Fucci2 細胞にアデノウイルスベクターを用いて Vpr を発現させライブイメージングを行い、細胞周期の動態とアポトーシスの関係を詳細に解析した。さらに、ProteoTuner Shield System を用いて Vpr 誘導性 G2 期停止の可逆性を解析した。

HeLa 細胞に siRNA ライブラリーおよび Vpr 発現プラスミドを共導入し、Vpr 誘導性 G2 期停止を抑制する siRNA の探索を行った。同定された宿主因子の発現ベクターを構築し、蛍光抗体法、免役沈降法および GST pull-down 法を用いて、その局在や Vpr との結合を調べるとともに、マクロファージでの HIV-1 感染における役割を解析した。

【結果】

1) Vpr 発現細胞のライブイメージング

Vpr による G2 期停止とアポトーシスの関係を明らかにするため、Vpr および SCAT3.1 を共発現するベクターを HeLa/Fucci2 細胞に導入し、ライブイメージングを行った。その結果、41.5%の細胞において、G2 期停止を伴わずに G1 期で、細胞膜の突起や細胞の断片化といったアポトーシス様の形態変化および SCAT3.1 の蛍光の変化が観察された。一方、その他の細胞は全て、G2 期停止が誘導され、その後、M 期へと細胞周期が進行した。それらの細胞のうち、11.3% は M 期で、9.4%は核の不分離や異常な細胞分裂の後に、SCAT3.1 の蛍光の変化を伴ってアポトーシスが誘導された。これらの結果から、Vpr は G2 期停止を惹起するが、G2 期ではアポトーシスを誘導せず、主に G1 および M 期において Caspase-3 依存的なアポトーシスを誘導することが明らかになった。Vpr 誘

導性 G2 期停止とアポトーシスの時間的な関係性をより詳細に検証するために、細胞周期を同調させた HeLa/Fucci2 細胞に、アデノウイルスベクターを用いて Vpr を発現させ、ライブイメージングを行った。その結果、97.8%の細胞が G2 期停止を起こし、その他の細胞は G1 期においてアポトーシス様の形態変化を示した。G2 期停止を起こした細胞のうち、わずか 5.5%の細胞においてのみ G2 期でアポトーシス様の形態変化が観察され、残りの細胞は細胞周期が停止したままか、細胞周期が M 期または G1 期に進行した後にアポトーシス様の形態変化を起こしていた。以上の結果から、Vpr は G2 期停止を引き起こすにも関わらず、アポトーシスは G2 期ではなく G1 および M 期において誘導することが立証された。さらに、ProteoTuner Shield System を用いて Vpr 誘導性 G2 期停止の可逆性を解析した結果、Vpr の発現を 23 時間で停止した場合、G2 期停止およびそれに伴うアポトーシスを起こす細胞の割合は 42.7%減少した。この結果から、Vpr による G2 期停止が可逆的であること、G2 期停止後のアポトーシス誘導には Vpr の継続的な発現が重要であることが示唆された。

2) Vpr による G2 期停止関連新規宿主因子の探索

siRNA ライブラリーを用いて、Vpr 誘導性 G2 期停止関連因子の探索を行った結果、256 種類中 11 種類の siRNA を Vpr 発現ベクターと共導入にした際に G2 期停止の抑制が確認された。

その中の一つ、Huntingtin interacting protein 1 (HIP1) について解析を進めた。HIP1 はハンチントン病の原因タンパク質である Huntingtin と結合する因子として同定された 116kDa のタンパク質で、核と細胞質をシャトリングし、転写制御に関与していること等が知られている。まず、配列の異なる 2 種類の siRNA を用いて、Vpr による G2 期停止に対する効果を解析したところ、どち

らの siRNA も濃度依存的に Vpr 誘導性 G2 期停止を抑制していた。続いて、HIP1 をノックダウンした細胞に HIP1 発現ベクターを導入して HIP1 を強制発現させた場合、部分的にはあるが Vpr の G2 期停止誘導能が回復した。また、HIP1 が Vpr 誘導性 G2 期停止に特異的に関与しているかどうかを、トポイソメラーゼ II の抑制剤で DNA 二本鎖切断を介して G2 期停止を誘導するエトポシドを用いて解析した。その結果、HIP1 のノックダウンはエトポシド誘導性 G2 期停止を抑制しなかった。これらの結果から、HIP1 は Vpr 誘導性 G2 期停止に特異的に関与していることが明らかになった。

Vpr は DCAF1 等とユビキチンリガーゼ複合体を形成し DNA 二本鎖切断を誘導することで G2 期停止を誘導する。そこで、HIP1 のノックダウンが Vpr 発現細胞における DNA 二本鎖切断のマーカである γ -H2AX のフォーカス形成に与える効果を共焦点レーザー顕微鏡にて解析した結果、興味深いことに、HIP1 のノックダウンは γ -H2AX のフォーカス形成を抑制しなかった。これらの結果から、Vpr は HIP1 を介して DNA 二本鎖切断を伴わずに G2 期停止を誘導することが明らかになった。次に、Vpr と HIP1 の結合を免疫沈降法および GST pull-down 法を用いて解析した結果、Vpr は HIP1 と直接結合していることが明らかになった。続いて、HIP1 の局在に対する Vpr の効果を調べた。HeLa 細胞に Vpr および HIP1 を強制発現させ、蛍光抗体法により各々のタンパク質の局在を共焦点レーザー顕微鏡にて解析したところ、Vpr 発現細胞において、HIP1 の核局在が促進していた。HIP1 が核に局在することが G2 期停止に重要であると考え、HIP1 の核局在が細胞周期に与える効果を解析した。HIP1 強制発現細胞をジギトニンで処理し細胞質中のタンパク質を溶出させ、蛍光抗体法により核内 HIP1 のみを検出し、核内に HIP1 が局在している細胞の細胞周期を解析した結果、G2 期停止が認められた。最後に、マクロファージにおける HIV-1 感

染に対する HIP1 のノックダウンの効果を解析した。その結果、HIP1 のノックダウンにより Vpr 依存的に HIV-1 の感染性が低下した。

【考察】

Vpr 発現細胞のライブイメージングの結果から、Vpr は G2 期停止を誘導するにも関わらず G2 期にはアポトーシスを誘導せずに、細胞周期が進行した後、M または G1 期においてアポトーシスを誘導することが明らかになった。このことから Vpr は HIV-1 感染において G2 期停止を誘導することで LTR の転写活性を高めウイルス複製を最大限に促進し、M 期へと細胞周期が進行した後にアポトーシスを引き起こすと考えられる。

Vpr による G2 期停止に関与する新規宿主因子の探索の結果、HIP1 の同定に成功した。HIP1 のノックダウンは Vpr による γ -H2AX のフォーカス形成に影響を与えなかったことから、Vpr は HIP1 を介して DNA 二本鎖切断の誘導とは非依存的な新たな経路でも G2 期停止を引き起こすことが明らかになった。Vpr 発現細胞において HIP1 の核局在が促進していたこと、および HIP1 が単独で核に局在する場合にも G2 期停止が認められたことから、Vpr が HIP1 の G2 期停止誘導能を促進すると考えられる。また、HIP1 のノックダウンがマクロファージにおける HIV-1 の感染を Vpr 依存的に抑制したことから、Vpr は HIP1 の核局在の促進を介して HIV-1 感染を促進していると考えられる。

緒論

1. 後天性免疫不全症候群 (AIDS)

後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome; AIDS) は、1981 年にサンフランシスコで男性同性愛者の日和見感染症として発見された(1)。同年 6 月頃、米国防疫センターが中心となり疫学調査と疾患概念の確立がなされ、1983 年にフランスのパスツール研究所の Montagnier のグループによって、AIDS の病因ウイルスとしてヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus; HIV) が単離された(2)。その翌年には、米国の Gallo を中心とするグループによって、ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) が AIDS の病原体であるというウイルス学的にも血清学的にも確実な証拠が提示され(3)、同年 HIV-1 の約 1 万塩基からなる DNA の配列が決定された。さらに、1986 年には、西アフリカにおいてヒト免疫不全ウイルス 2 型 (HIV-2) が分離され(4)、HIV-1 および HIV-2 は CD4 陽性リンパ球およびマクロファージに感染し、長い潜伏期を経て、宿主の免疫系を破壊することが明らかになった。

2. ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1)

レトロウイルス科、レンチウイルス亜科に属する HIV-1 は、プラス鎖 single-stranded RNA ウイルスで、Long terminal repeat (LTR) をプロモーターとして持ち、センス鎖にコードされている遺伝子は 9 種類で、全てのレトロウイルスに共通してみられる構造遺伝子 *gag*、*pol*、*env*、調節遺伝子 *tat*、*rev* に加え、従来のレトロウイルスにはない遺伝子 *vpr*、*vpu*、*vif*、*nef* を有している (図 1)。この 4 種の遺伝子は、*in vitro* におけるウイルス増殖には必須でないことから、アクセサリ遺伝子と呼ばれているが、ある種の細胞およびサル

感染実験において、それぞれのタンパク質が必須であることや必須ではなくとも重要な機能を発現していることが明らかになっている。

3.HIV-1 の生活環

HIV-1 の生活環 (図 2A) は、まずレセプターである Cluster of Differentiation 4 (CD4) とコレセプターである C-C Chemokine Receptor type 5 (CCR5)、C-X-C Chemokine Receptor type 4 (CXCR4) を介して、CD4 陽性リンパ球やマクロファージ等の細胞に吸着する(5,6)ことから開始する。ウイルスと細胞の融合後、脱核した後に RNA が DNA に逆転写され、preintegration complex (PIC) を形成し、核へ移行する(7)。核移行後、宿主細胞の染色体 DNA にウイルスゲノム DNA を組み込み、プロウイルスとなる。その後、LTR のプロモーター活性の上昇によりプロウイルスからの転写が起き、子孫のウイルスが産生される。発芽したての HIV 粒子は未成熟体であるが、発芽後しばらくして成熟体と呼ばれる粒子の中に弾丸状の核様態を形成し (図 2B)、未成熟体と比較して安定に存在するようになる。

4.AIDS の病態と治療

HIV-1 に感染した直後の生体では、血中 CD4 陽性リンパ球数が劇的に減少し、発熱を伴う急性のウイルス複製が認められる。この期間は急性感染期と呼ばれている。しかし、複製されたウイルスに対する細胞傷害性 T リンパ球の出現や液性免疫の結果、急性感染期は一過性となる(8-10)。しかしながら、免疫応答後もウイルスは生体から完全には排除されずに、プロウイルスとして潜伏し、生体内に存在し続ける (無症候期) (11-13)。無症候期は数年から十数年とも考え

られており、この期間は HIV-1 と宿主免疫との戦いの期間と考えられる。長い無症候期後、潜伏感染細胞において HIV-1 の複製が再開し、新規感染により CD4 陽性リンパ球が減少すると AIDS が発症する。AIDS 発症者は日和見感染を起こした後に、ニューモシスチス肺炎やカポジ肉腫などの生命に危険が及ぶ重篤な症状を呈してくる。

図 2A に示す HIV-1 の生活環をもとに開発された逆転写酵素阻害剤 2 剤とプロテアーゼ阻害剤 1 剤の 3 剤を併用した多剤併用療法(14,15)によって AIDS 発症を遅らせることが可能となったが、副作用や耐性ウイルスの出現といった問題を抱えている。そのため、異なる作用点を標的とした抗 HIV-1 薬の開発が急務となっており、近年 CCR5 拮抗剤やウイルスと細胞の融合阻害剤、インテグラーゼ阻害剤が開発され、臨床に利用されている。

5. HIV-1 アクセサリータンパク質 Vpr

アクセサリー遺伝子の一つである *vpr* は、HIV-1、HIV-2 および多くのサル免疫不全ウイルス (simian immunodeficiency virus; SIV) などの霊長類レンチウイルスゲノム間で保存されている(16)。その遺伝子産物は 96 アミノ酸残基からなる分子量約 15 kDa のタンパク質で、ウイルス粒子内に取り込まれる(17,18)。Vpr の HIV-1 感染およびエイズ発症における意義は、ヒト末梢血単核球由来マクロファージ (monocyte derived macrophage; MDM) を用いた *in vitro* および *in vivo* 感染実験において明らかになっている。例えば、MDM を用いた HIV-1 感染においては、Vpr がウイルス複製を強く促進していることが報告されている(19-21)。さらに、アカゲザルを用いた Vpr 欠損型 SIV の感染実験やヒト化マウスを用いた HIV-1 感染実験などの *in vivo* において、Vpr が HIV-1 感染およびエイズ発症に非常に重要であることが明らかになった(22,23)。一方、

ヒト CD4 陽性リンパ球およびヒト CD4 陽性リンパ球由来の細胞株を用いた HIV-1 感染において、野性型ウイルスと比較して Vpr を欠損したウイルスは大きな増殖抑制が認められないことが知られている(24)。Vpr は核磁気共鳴分光法を用いた立体構造解析により三つの α ヘリックス構造を形成していることが示された(図3)(25)。Vpr は、 α ヘリックス3を介して DDB1- and CUL4-associated factor-1 (DCAF1)、damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1)、Cullin4A (CUL4A) 等の宿主因子と相互作用することでユビキチンリガーゼ複合体を形成する(図4)。この複合体を介して、Vpr は SYCP3-like X-linked 4 (SLX4) 複合体の活性化および mutagen-sensitive 81 (MUS81) の分解を促進し、DNA を切断する(26)。その結果として、ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR) が活性化され、Vpr は G2 期停止を誘導する(27-34)。また、ミトコンドリアに局在するタンパク質の一つ mitofusin 2 (Mfn2) を分解することでミトコンドリアの膜電位の低下を引き起こし、その結果としてアポトーシスを誘導することや(35)、MDM において RNA サイレncing に重要な RNase である Dicer を分解することで HIV-1 の感染を促進することが明らかになっている(36)。また、Vpr は spliceosome-associated protein 145 と結合することでスプライシングを制御する(37-39)。この結合には、 α ヘリックス3中の67番目のロイシン残基が重要である。一方、Vpr はカルボキシ末端において p300/CBP と結合し、p300/CBP を LTR にリクルートすることで HIV-1 LTR の転写活性を高めることが知られている(40)。さらに、Importin α と α ヘリックス1および核膜孔複合体と α ヘリックス3との相互作用を介して、マクロファージにおける PIC の核移行に関与することも報告されている(20,41-43)。

第 1 章 Vpr 発現細胞のライブイメージング

1-1. 緒言

Vpr は感染細胞において G2 期停止やアポトーシスを誘導する。HIV-1 の LTR からの転写活性が G2 期に最大となることから、Vpr 誘導性 G2 期停止はウイルス複製にとって重要であると考えられる(44,45)。事実、Vpr の G2 期停止誘導能は霊長類のレンチウイルスにおいて、高度に保存された機能であることが明らかになっている(46,47)。また、アポトーシスの誘導は免疫の抑制や CD4 陽性リンパ球の減少を惹起することから、AIDS 発症に大きな役割を果たしている(48-50)。しかし、これまでに Vpr が誘導するこれら 2 つの機能の関連性に関する多くの報告がなされてきたが、Vpr 誘導性アポトーシスが G2 期停止の結果として引き起こされるのか、または G2 期停止とは非依存的に誘導されるのか一定の見解を得られていない。

Vpr 誘導性 G2 期停止に重要な ATR に対する抑制剤であるカフェインで処理した細胞は、Vpr 誘導性 G2 期停止が抑制されるだけでなく、アポトーシスも抑制される(51)。また、チミジン処理により細胞周期を G1/S 期で停止させた細胞においても、Vpr によるアポトーシスが認められない(52)。これらの結果は、Vpr 誘導性アポトーシスが G2 期停止に依存していることを証明している。一方で、Vpr 誘導性アポトーシスが G2 期停止に依存しないことを示した報告も多くある。例えば、G2 期停止を誘導するがアポトーシスを誘導しない Vpr 変異体の存在が報告されている(53,54)。加えて、組換え Vpr がミトコンドリア外膜上のタンパク質と直接結合し、ミトコンドリアの膜電位の低下を引き起こすことで G2 期停止とは非依存的にアポトーシスを誘導することも知られている(55,56)。さらに、私の所属する研究室では、Vpr の C 末端欠損変異体 C81 が G2 期停止

ではなく G1 期停止を誘導しアポトーシスを誘導することを報告している (57-60)。このように、不明な点の多い Vpr 誘導性 G2 期停止とアポトーシスの関係性について明確にするためには、細胞周期とアポトーシスの動態を単一の細胞で経時的にイメージング解析することが望まれる。

細胞周期の進行を生細胞においてリアルタイムで可視化するために、fluorescent ubiquitination based cell-cycle indicator (Fucci) が開発された(61)。Fucci は細胞周期の特定の時期にのみ発現する Cdc10-dependent transcript 1 (Cdt1) と Geminin の切断型変異体に、それぞれオレンジ色蛍光タンパク質 (monomeric Kusabira-Orange2; mKO2) と緑色蛍光タンパク質 (monomeric Azami-Green1; mAG1) とを融合し、細胞周期の可視化を可能にした蛍光プローブである。Cdt1 は G1 期において、Geminin は S/G2/M 期において発現が認められる。この一過性な発現は、Cdt1 が S/G2/M 期において、Geminin が G1 期においてユビキチン・プロテアソーム系により分解されることに依存している。Fucci では、Cdt1 の 30 番目から 120 番目までのアミノ酸と Geminin の 1 番目から 110 番目のアミノ酸を利用している。これらの領域にはユビキチン化ドメインが含まれているため、これらの切断型変異体に蛍光タンパク質を融合し、細胞に導入すると、G1 期にオレンジ色、S/G2/M 期に緑色の蛍光が核内において観察され、生細胞において G1 期と S/G2/M 期を区別することができる。近年、Sakaue-Sawano らは赤色蛍光タンパク質 mCherry を mKO2 の代わりに、黄色蛍光タンパク質 Venus を mAG1 の代わりに用いて Fucci2 を作製した(62)。Fucci2 は蛍光タンパク質の特性上、従来の Fucci と比較して色素のコントラストがより明確であり、他の蛍光タンパク質、例えば水色蛍光タンパク質 (enhanced cyan fluorescent protein; ECFP) との組み合わせなどが可能になった。従って、ECFP を Vpr 発現細胞のマーカーとして Fucci2 と組み合わせる

ことにより、Vpr 誘導性 G2 期停止の可視化が可能になる。

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) 技術は、タンパク質間の相互作用の研究に頻繁に使用される。さらに、*in vivo* および *in vitro* におけるアポトーシスの課程で活性化される Caspase の活性を測定するためにも使用されている(63,64)。Nagai らは Caspase-3 の活性を測定する FRET 効率の高い蛍光プローブ SCAT3.1 を作製した(65)。SCAT3.1 は FRET のドナーに ECFP を、アクセプターに Venus を、2 種類の蛍光タンパク質をつなぐリンカーには活性型 Caspase-3 により認識され、切断されるアミノ酸配列 (アスパラギン酸-グルタミン酸-バリン-アスパラギン酸) を含むペプチドを使用している。通常、SCAT3.1 は全長で存在するため、ECFP の励起光を照射した場合には FRET により ECFP の蛍光が Venus を励起し、Venus の蛍光が検出される。しかし、アポトーシスの際に Caspase-3 が活性化すると、SCAT3.1 がリンカーペプチドにおいて切断され、FRET 効率が減少する。すなわち、Caspase-3 が活性化されると、ECFP の励起光の照射では Venus の蛍光が認められなくなる。このように、SCAT3.1 の蛍光の変化を観察することで単一の生細胞における Vpr 誘導性アポトーシスを解析することができる。

ProteoTuner Shield System は、細胞内の標的タンパク質の発現を特異的かつ迅速に制御するために開発された技術である(66)。本システムでは、不安定化ドメイン (destabilization domain; DD) と目的のタンパク質を融合タンパク質として発現させることに加え、750 Da の膜透過性低分子である Shield1 を利用する。Shield1 非存在下では、DD 融合標的タンパク質はプロテアソーム依存的に分解される。しかし、Shield1 存在下では Shield1 が DD と結合することで、標的タンパク質が分解されるのを抑制し、標的タンパク質の発現が安定化する。この標的タンパク質の安定化は、Shield1 添加後 15~30 分の間で起こるため、

タンパク質の迅速な発現制御が可能である。また、Shield1 による標的タンパク質の安定化・不安定化は可逆的で、Shield1 を取り除くことにより標的タンパク質を再度不安定化することができる。この系を利用し、Vpr の発現を制御することで、Vpr 誘導性 G2 期停止の可逆性を解析することができる。

本研究では、Vpr 誘導性 G2 期停止とアポトーシスの時間的な関係性の解明を目的とし、HeLa/Fucci2 細胞および SCAT3.1 を用いて、単一の Vpr 発現細胞のライブイメージングを行い、Vpr 発現細胞における細胞周期の動態とアポトーシスの時間的な関係性を解析した。また、タンパク質の発現を迅速に調節できる ProteoTuner Shield System を用いて、Vpr 誘導性 G2 期停止の可逆性をライブイメージングにて解析した。

1-2. 材料と方法

細胞培養とプラスミドの導入法

HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌由来細胞株)、HeLa/Fucci2 細胞 (Fucci2 発現 HeLa 細胞) および 293 細胞 (ヒト胎児腎細胞由来細胞株) は、10% fatal bovine serum (FBS, SIGMA 社製) および Pen-Strep Glutamine (Invitrogen 社製) 添加 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen 社製) にて培養した。細胞周期を同調させる際には、HeLa/Fucci2 細胞を 0.3% FBS 添加 DMEM にて培養した。プラスミドの導入には、FuGENE HD (Promega 社製) および Lipofectamine LTX (Invitrogen 社製) を使用した。

プラスミド

pME18Neo、pME18Neo-Flag、Flag-Vpr発現pME18Neo (pME18Neo-FVpr)、Vprの点変異体R80A発現pME18Neo (pME18Neo-R80A) (37,67)は間教授より分与していただいた。pME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1 および pME18Neo/Flag-IRES-ZsGreen1 は以下のように作製した。pRetroX-IRES-ZsGreen1 (Clontech Laboratories 社製) を鋳型とし、5'-CCCAAAGCTTAAAGCTTGGTACCGA-3' および 5'-TAGCGGCCGCTCAGGGCAAGGCGGAGCCGGAG-3' をプライマーに利用し、polymerase chain reaction (PCR) 法によりインサート配列を増幅した。PCR産物を制限酵素 *NotI* で処理し、pME18Neo-FVpr および pME18Neo-Flag に導入した。pME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ECFP および pME18Neo/Flag-IRES-ECFP は以下のように作製した。pRSET_B-ECFP(65)を鋳型とし、5'-GATGATAATATGGTGAGCAAGGGCGA-3' および 5'-AAAACGCGTTTACTTGTACAGCTCGTCCA-3' をプライマーに利用し、

PCR法によりインサートを増幅した。また、pME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1およびpME18Neo/Flag-IRES-ZsGreen1を鋳型とし、5'-AAAACGCGTTCTAGAGAAAAACCTCCCACAC-3' および5'-GTGTTTTTCAAAGGAAAACCACGT-3'をプライマーに利用し、PCR法によりZsGreen1をコードする塩基配列を取り除いた。それぞれのPCR産物を制限酵素*MluI*で処理し、T4 kinaseを用いて末端をリン酸化して2種類の断片をライゲートした。pME18Neo/Flag-Vpr-IRES-SCAT3.1 およびpME18Neo/Flag-IRES-SCAT3.1は以下のように作製した。まず、pME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ECFPおよびpME18Neo/Flag-IRES-ECFPを鋳型とし、5'-AAAACGCGTTCTAGAGAAAAACCTCCCACAC-3' および5'-AAATCTAGATTTTACGTGTTTTTCAAAGGAAAACCACGT-3'をプライマーに利用して、PCR法によりECFPをコードする塩基配列を取り除いたベクターを作製した。SCAT3.1(65)を鋳型とし、5'-GATGATAATATGAACCTGGTGGACCTCCAA-3' および5'-CATGGTACCATCGACCTCATC-3'をプライマーに利用してPCR法により核外移行シグナル (nuclear export signal; NES)、Caspase-3認識アミノ酸配列DEVD、C末端欠損ECFPをコードする塩基配列を増幅した。SCAT3.1を鋳型とし、5'-CGATGAGGTCGATGGTACCA-3' および5'-AAAACGCGTCTCTAGATGCATGCTCGAGTTA-3'をプライマーに利用してPCR法によりVenusおよびNESをコードする塩基配列を増幅した。それぞれのPCR産物を制限酵素*PmaCI*および*MluI*、*KpnI*のみ、そして*KpnI*および*MluI*により処理し、3種類の断片をライゲートした。pME18Neo/DD-Vprは以下のように作製した。pPTuner (Clontech社製)を鋳型とし、5'-AAACTCGAGATGGGAGTGCAGGTGGAAAC-3' および

5'-AAAGATATCCTTTCCGGTTTTAGAAAGCTCCACA-3'をプライマーに利用し、PCR法によりDD-tagをコードする塩基配列を増幅した。PCR産物を制限酵素*XhoI*および*EcoRV*にて処理し、pME18Neo-FVprに導入した。pME18Neo/DDは以下のように作製した。pPTunerを鋳型とし、5'-AAACTCGAGATGGGAGTGCAGGTGGAAAC-3'および5'-AAAGCGGCCGCTTATTCCGGTTTTAGAAAGCTCCAA-3'をプライマーに利用し、PCR法によりDD-tagをコードする塩基配列を増幅した。PCR産物を*XhoI*および*NotI*で処理し、pME18Neoに導入した。pME/DD-Vpr-IRES-ZsGreen1およびpME18Neo/DD-Vpr-IRES-ECFPを以下のように作製した。pME18Neo/DD-Vprを制限酵素*XhoI*および*EcoRV*で処理し、それぞれpME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1およびpME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ECFPに導入した。pME/DD-IRES-ZsGreen1は以下のように作製した。pRetroX-IRES-ZsGreen1を鋳型とし、5'-AAAGATATCATAAGCCCCTCTCCCTCCCCC-3'および5'-TAGCGGCCGCTCAGGGCAAGGCGGAGCCGGAG-3'をプライマーに利用し、PCR法によりIRES配列、ZsGreen1をコードする塩基配列を増幅した。PCR産物およびpME/DD-Vpr-IRES-ZsGreen1を制限酵素*NotI*および*EcoRV*で処理し、2種類の断片をライゲートした。

pAdeno-X/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1およびpAdeno-X/IRES-ZsGreen1は以下のように作製した。まず、pShuttle2/IRES-ZsGreen1を以下のように作製した。pRetroX-IRES-ZsGreen1を鋳型とし、5'-TAATCTAGAGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAA-3'および5'-TAGCGGCCGCTCAGGGCAAGGCGGAGCCGGAG-3'をプライマーに利用し、IRES配列、ZsGreen1をコードする塩基配列をPCR法により増幅した。PCR

産物を制限酵素 *XbaI* および *NotI* で処理し、pShuttle2に導入した。pShuttle2/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1 を以下のように作製した。pME18Neo-FVpr を 鋳 型 と し 、5'-GAAGCTAGCGACTACAAGGATGACGATGACAAAATCGAACAAGCCCCAGAAGA-3'および5'-GCACTAGACTAGGATCTACTGGCTCCAT-3'をプライマーに利用して、PCR法によりFlag-Vprをコードする塩基配列を増幅した。PCR産物を *NheI* および *XbaI* で処理し、pShuttle2/IRES-ZsGreen1に導入した。pAdeno-X/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1 およびpAdeno-X/IRES-ZsGreen1を以下のように作製した。pShuttle2/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1 およびpShuttle2/IRES-ZsGreen1を制限酵素I-*CeuI* and *PfI-SceI*で処理し、Adeno-X viral DNAに導入した。

Vpr および ZsGreen1 発現アデノウイルスの作製と感染実験

アデノウイルスは、Adeno-X™ expression system (Clontech 社製) を使用して作製した。pAdeno-X/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1 およびpAdeno-X/IRES-ZsGreen1 を制限酵素 *PacI* により処理し、継代回数の少ない293 細胞に導入した。アデノウイルスが形成されたことを、細胞傷害性およびZsGreen1 の発現により確認し、継代回数の少ない293 細胞を用いて Adeno-X™ Rapid Titer Kit (Clontech 社製) により感染力価を測定した。

標的細胞を24 穴プレート、6 穴プレート、35 mm glass-bottom dish に播種した。翌日、培地を取り除き、0.3%または10%FBS 含有 DMEM を培地として multiplicity of infection (MOI) =50 または 100 に調整したアデノウイルスを感染させた。

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) と Western blot

細胞を回収し、RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH7.4)、150 mM NaCl、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、1% Triton X-100、1% Sodium Deoxycholate、0.1% SDS] に懸濁し、氷上で 30 分間静置した。15,000 rpm, 4℃, 5 分間遠心し、上清のみを回収した後、BCA assay により上清中のタンパク質の濃度を定量した。等量のタンパク質を SDS サンプルバッファーと混和し、100 °C で 5 分間熱処理した。SDS-PAGE によりタンパク質を分離し、Western blot を行った。一次抗体には、抗 Flag M2 mouse MAb (SIGMA 社製)、抗 β -actin mouse MAb (SIGMA 社製)、抗 Cleaved-caspase-3 (Asp175) rabbit polyclonal antibody (Cell Signal Technology 社製)、抗 Caspase-3 rabbit polyclonal antibody (Cell Signal Technology 社製)、抗 EGFP mouse MAb (MBL 社製)、および抗 DD mouse MAb (Clontech 社製) を、二次抗体には、horseradish-peroxidase (HRP) 標識抗 mouse IgG 抗体 (Amersham Bioscience 社製) および HRP 標識抗 rabbit IgG 抗体 (Amersham Bioscience 社製) を用いた。シグナルの検出には SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce 社製) を使用した。

蛍光抗体法

HeLa細胞にプラスミドを導入し、24時間培養した。3.6%ホルムアルデヒドで10分間、室温で固定し、氷上で5分間、0.2% Triton X-100で透過処理した。5%スキムミルク溶液でブロッキング後、一次抗体と室温で1時間反応させた。その後、二次抗体と室温で1時間反応させ、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000D, Olympus社製) により細胞を観察した。一次抗体には、抗Flag M2 mouse MAb、

抗DD mouse MAb (Clontech社製) を、二次抗体には、Alexa fluoro594標識抗 mouse IgG抗体 (Molecular Prove社製) を使用した。

HeLa/Fucci2 細胞のライブイメージング

HeLa/Fucci2 細胞を 35 mm glass-bottom dish に播種し、プラスミドを導入した。また、HeLa/Fucci2 細胞を 35 mm glass-bottom dish に播種し、0.3%FBS 添加 DMEM にて Vpr および ZsGreen1 発現アデノウイルスベクターを感染させた。インキュベータ付属蛍光顕微鏡 LCV110 (Olympus 社製) を用いて、それぞれの細胞のライブイメージングを行った。Venus の観察には、FF02-510/10-25 excitation filter (Semrock 社製)、FF520-Di02-25x36 dichroic mirror (Semrock 社製) および FF01-542/27-25 emission filter (Semrock 社製) を使用した。mCherry の観察には FF01-562/40-25 excitation filter (Semrock 社製)、F593-Di03-25x36 dichroic mirror (Semrock 社製) および FF01-641/75-25 emission filter (Semrock 社製) を使用した。ECFP の観察には CFP2432B filter cube (Semrock 社製) を使用した。ZsGreen1 の観察には FF02-472/30-25 excitation filter (Semrock 社製)、FF495-Di03-25x36 dichroic mirror (Semrock 社製)、FF01-520/35-25 emission filter (Semrock 社製) を使用した。画像取得および画像解析には MetaMorph 7.7.4 software (Universal Imaging 社製) を、動画作製には QuickTime software を使用した。

CELAVIEW RS100 を用いた細胞周期解析

HeLa/Fucci2 細胞を 24 穴プレートに播種し、プラスミドを導入した。72 時間培養後、3.6% ホルムアルデヒドで 10 分間、室温で固定し、氷上で 5 分間、0.2% Triton X-100 で透過処理した。5% スキムミルク溶液でブロッキング後、

抗 Flag M2 mouse MAb と室温で 30 分間反応させた。その後、Alexa fluoro680 標識抗 mouse IgG 抗体 (Molecular Prove 社製) と室温で 30 分間反応させた後、Hoechst 33342 (ImmunoChemistry Technologies LLC 社製) により DNA を染色した。細胞を Phosphate buffered saline (PBS) にて 3 回洗浄後、CELAVIEW RS100 (Olympus 社製) により Flag-Vpr または Flag-R80A 陽性細胞の観察と DNA 量の定量を行った。

HeLa 細胞を 24 穴プレートに播種し、アデノウイルスベクターを感染させた。72 時間培養後、Hoechst 33342 を含む 3.6% ホルムアルデヒドで 10 分間、室温で固定および DNA を染色した。細胞を PBS にて 3 回洗浄後、CELAVIEW RS100 により ZsGreen1 陽性細胞の DNA 量の定量を行った。

フローサイトメーターを用いた細胞周期解析

HeLa 細胞に pME18Neo/DD-Vpr-IRES-ZsGreen1 または pME18Neo/DD-IRES-ZsGreen1 を導入し、24 時間培養した。終濃度 500 nM の Shield1 含有 DMEM および Shield1 非含有 DMEM で 24 時間培養後、500 nM Shield1 含有 DMEM および Shield1 非含有 DMEM に培地を交換し、24 時間培養した。それぞれの時間にて細胞を回収し、1% ホルムアルデヒドで 30 分間、氷上で固定した。その後、70% エタノールにて 2 時間、氷上で細胞を固定し、RNaseA (200 µg/ml) を添加後、37°C にて 30 分間反応させた。Propidium iodide (PI; 50 µg/ml) を添加し、37°C にて 10 分間、遮光状態で DNA を染色した。FACS Calibur (Becton Dickinson 社製) により 7,000 個以上の ZsGreen1 発現細胞を取得して、Cell Quest software (Becton Dickinson 社製) にて PI の蛍光強度を測定した。最終的に、ModFit LT Software (Verity Software House 社製) にて細胞周期の割合を解析した。

Caspase-3 活性の SCAT3.1 を用いた FRET による解析

HeLa/Fucci2 細胞を 35 mm glass-bottom dish に播種し、プラスミドを導入し、24 時間後からインキュベータ付属蛍光顕微鏡 LCV110 を用いて、細胞のライブイメージングを行った。SCAT3.1 の観察には、BP425-445HQ excitation filter (Olympus 社製)、DM450 dichroic mirror (Olympus 社製)、および FF01-542/27-25 emission filter (Semrock 社製) を使用した。ECFP の観察には CFP2432B filter cube を使用した。画像取得、画像解析および Caspase-3 の活性化を解析するための SCAT3.1/ECFP の比の算出には MetaMorph 7.7.4 software を、動画作製には QuickTime software を使用した。

アポトーシスの解析

フローサイトメーターを用いて、活性型 Caspase-3 陽性細胞を検出した。HeLa 細胞に pME18Neo/DD-Vpr-IRES-ZsGreen1 または pME18Neo/DD-IRES-ZsGreen1 を導入し、24 時間培養した。終濃度 500 nM の Shield1 含有 DMEM および Shield1 非含有 DMEM で 24 時間培養後、500 nM Shield1 含有 DMEM および Shield1 非含有 DMEM に培地を交換し、24 時間培養した。それぞれの時間にて細胞を回収し、SR-DEVD-FMK (ImmunoChemistry Technologies LLC 社製) を用いて活性型 Caspase-3 陽性細胞のみを染色した。FACS Calibur により 10,000 個以上の ZsGreen1 発現細胞を取得し、Cell Quest software にて活性型 Caspase-3 陽性細胞の割合を解析した。

統計解析

平均値の差の検定には t 検定を用いた。有意確立 $p \text{ value} < 0.05$ のとき統計学的に有意差があるものとした。

1-3. 結果

HeLa/Fucci2 細胞における Vpr 誘導性 G2 期停止とアポトーシスの解析

HeLa/Fucci2 細胞 (図 5A) を用いて Vpr 誘導性 G2 期停止およびアポトーシスのライブイメージングを行うために、まず、Vpr が HeLa/Fucci2 細胞にアポトーシスおよび G2 期停止を誘導するか否かを Western blot および CELAVIEW RS100 を用いて解析した。

HeLa/Fucci2 細胞に野性型 Vpr を発現するベクター pME18Neo-FVpr および Vpr のアポトーシス誘導能および G2 期停止誘導能を欠損した変異体 R80A(68)を発現するベクター pME18Neo-R80A を導入し、72 時間後における活性型 Caspase-3 を Western blot により検出した。Caspase-3 はアポトーシスの誘導に重要なシステインプロテアーゼで、通常は不活性化状態の全長で存在するが、アポトーシスの過程で Caspase-9 により切断されることで活性型となる。Flag-Vpr および Flag-R80A がそれぞれ単一なバンドとして検出され、活性型 Caspase-3 は pME18Neo-FVpr を導入した細胞においてのみ検出された (図 5B)。このことは、HeLa/Fucci2 細胞においても Vpr がアポトーシスを誘導することができることを示している。

続いて、Vpr が HeLa/Fucci2 細胞において G2 期停止の誘導が可能かどうかを解析した。HeLa/Fucci2 細胞に pME18Neo-FVpr または pME18Neo-R80A を導入した。72 時間後、抗 Flag M2 MAb を用いた蛍光抗体法により Flag-Vpr および Flag-R80A を、Hoechst 33342 を用いて DNA を染色し、CELAVIEW RS100 を用いて Hoechst 33342 の蛍光強度から細胞周期を解析した (図 5C and D)。CELAVIEW RS100 はフローサイトメーターと同様に DNA 量を解析することが可能で、さらに顕微鏡として画像取得も行うことができる。CELAVIEW RS100 を用いた細胞周期解析の結果、Flag-R80A 発現細胞における G2/M 期の

割合が約 22.1%であり (図 5D)、核内の蛍光は、S/G2/M 期を示す黄色であった (図 5C)。一方、Flag-Vpr 発現細胞における G2/M 期の割合は約 78.3%であり (図 5D)、その時の核内蛍光は、S/G2/M 期を示す黄色であったことから (図 5C)、Vpr は HeLa/Fucci2 細胞においても G2 期停止を誘導できることが明らかになった。

Vpr 発現細胞における細胞周期と細胞死のライブイメージング

ライブイメージングにおいて Vpr 発現細胞を選択するために、水色の蛍光タンパク質である ECFP を挿入した pME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ECFP または pME18Neo/Flag-IRES-ECFP を作製し、HeLa 細胞に導入した。24 時間後、Flag-Vpr と ECFP が単一の細胞において共発現しているかどうかを抗 Flag M2 MAb を用いた蛍光抗体法により解析したところ、全ての Flag-Vpr 発現細胞において ECFP が発現していた (図 6A)。また、それぞれのタンパク質の発現を Western blot 法により解析した結果、Flag-Vpr および ECFP が単一のバンドとして確認された (図 6B)。これらのことから、ECFP が Flag-Vpr 発現細胞を識別するための優良なマーカーとなることが示された。

HeLa/Fucci2 細胞に上記の pME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ECFP または pME18Neo/Flag-IRES-ECFP を導入し、その 24 時間後からインキュベータ付属蛍光顕微鏡 LCV110 を用いて 72 時間ライブイメージングを行った (図 6C)。その結果、pME18Neo/Flag-IRES-ECFP を導入し、ECFP のみを発現する細胞の約 27.1%において、細胞膜の突起や細胞の縮小および断片化といったアポトーシス様の形態変化が観察された (図 6C; *1)。また、そのときの Fucci2 の核内蛍光は赤色および黄色のどちらも存在していた。一方で、約 72.9%の残りの細胞は遺伝子導入後 42 時間から 43 時間において細胞分裂が、80 時間から 96

時間において Fucci2 の蛍光が赤色から黄色へと変化する、つまり細胞周期の進行が観察された (図 6C; *2)。また、Fucci2 の蛍光変化の観察を始めてからの G1 期および S/G2/M 期の長さはそれぞれ、約 12 時間と約 10 時間だった。これらのことは、Vpr を発現しない細胞の多くはこのライブイメージングの条件下において、細胞増殖が正常に進んでいることを示唆している。事実、これらの ECFP のみを発現する細胞において、ECFP 陽性細胞の顕著な減少は認められなかった (図 6D)。それとは対照的に、pME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ECFP を導入された Flag-Vpr を発現する ECFP 陽性細胞では、細胞数の劇的な減少が認められた (図 6D)。Flag-Vpr 発現細胞のうち約 38.8%は遺伝子導入後 36 時間で Fucci2 の核内の蛍光が G1 期を示す赤色の状態において (図 6C; *3)、約 6.1%は遺伝子導入後 28 時間で S/G2 期を示す黄色の状態において (図 6C; *4)、アポトーシス様の形態変化が観察された。このように、これらの細胞は G2 期停止が認められなかった。一方で、約 55.1%の Flag-Vpr 発現細胞は、Fucci2 の核内の蛍光が S/G2 期を示す黄色を少なくとも 24 時間継続していた (図 6C; *5-8)。即ち、図 5 C および D の結果を踏まえると、これらの Flag-Vpr 発現細胞は G2 期停止を起こしていたことが明らかになった。G2 期停止後、細胞の Fucci2 の核内蛍光は黄色を維持し、その形態は M 期の特徴である円形に変化したことから、細胞周期が M 期に進行したことが示された。しかし、細胞は分裂せずにその特徴を示し続け長時間の mitotic cell rounding を起こしていた。これらの細胞のうち、約 12.3%は長時間の mitotic cell rounding の後に (図 6C; *5)、約 18.4%は異常な細胞分裂後、微小核の形成が起こった後に (図 6C; *6) アポトーシス様の形態変化を起こした。また、約 8.1%の細胞が細胞分裂を起こさずに核膜の崩壊とその後のクロマチンの断片化が誘導される nuclear mis-segregation(69) を起こし、Fucci2 の核内の蛍光が黄色から赤色へと変化した

た (図 6C; *7)。約 16.3%の細胞は、ライブイメージングを行っている間、G2 期停止を継続していた (図 6C; *8)。以上の結果から、Vpr は細胞周期を G2 期で停止することができるが、S/G2 期においてほとんどアポトーシスを誘導しないことが明らかになった。

細胞周期を同調させた細胞とアデノウイルスベクターを用いた Vpr 発現細胞のライブイメージング

Vpr 誘導性 G2 期停止とアポトーシスの時間的な関係性をより詳細に検証するために、血清飢餓により細胞周期を同調させた HeLa/Fucci2 細胞とアデノウイルス感染系を使用した。

まず、Vpr 発現アデノウイルスベクター (pAdeno-X/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1) およびコントロールとして pAdeno-X/IRES-ZsGreen1 を MOI=100 で HeLa 細胞に感染させた。感染後 72 時間における活性型 Caspase-3 を Western blot を用いて、細胞周期を CELAVIEW RS100 を用いて解析した。その結果、pAdeno-X/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1 を感染させた細胞においてのみ、Western blot によって活性型 Caspase-3 が検出され (図 7A)、CELAVIEW RS100 によって G2 期停止が認められた (図 7B)。これらのことから、アデノウイルスベクターを用いて Vpr を発現させることでアポトーシスおよび G2 期停止を誘導できること、Vpr を発現しないアデノウイルスは、G2 期停止およびアポトーシスを誘導しないことが明らかになった。

次に、血清飢餓によって HeLa/Fucci2 細胞の細胞周期の同調を試みた。HeLa/Fucci2 細胞を 10% FBS 含有培地で培養した時には G0/G1 期の細胞の割合は 64.5%だったが、0.3%の FBS 含有培地で培養した時にはその割合は約 76.5%に増加していた。このことから、HeLa/Fucci2 細胞は 0.3%の FBS 含有培

地で培養した時に、約 80%の細胞が G0/G1 期に同調することが示された。

そこで、HeLa/Fucci2 細胞に 0.3% FBS 含有培地内で pAdeno-X/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1 を MOI=50 で感染させた。感染 23 時間後に、培地を 10% FBS 含有培地へと交換し、その 1 時間後からインキュベータ付属蛍光顕微鏡 LCV110 を用いて 72 時間ライブイメージングを行った (図 7C)。その結果、ライブイメージング開始の段階では、多くの細胞が Fucci2 の核内蛍光が赤色の G0/G1 期の状態で存在し、ZsGreen1 の発現はほとんど認められなかった。しかし、培地交換 36 時間後、多くの細胞において ZsGreen1 の蛍光が観察できたことから、これらの細胞において感染が成立していることが示された。約 2.2%の細胞が、培地交換後 36 時間までに G1 期においてアポトーシス様の形態変化を示したが (図 7C; a、7D; G1)、その他の全ての ZsGreen1 発現細胞は Fucci2 の核内の蛍光が赤色から黄色へと変化し、その黄色の核内蛍光を維持していたことから、G2 期停止が誘導されたことが明らかとなった (図 7C; b-f)。G2 期停止後、約 5.5%の細胞のみ、細胞周期が進行せずに G2/M 期でアポトーシス様の形態変化を起こした (図 7C; b、7D; S/G2)。約 33.6%の細胞において M 期への細胞周期の進行が観察され、長期間の mitotic cell rounding と共にその後のアポトーシス様の形態変化が認められた (図 7C; c、7D; M)。約 8.7%の細胞は細胞周期の進行後、異常な細胞分裂を起こし、その後 G1 期においてアポトーシス様の形態変化を起こした (図 7C; d、7D; G1)。約 10.7%の細胞においては、G2 期停止後アポトーシス様の形態変化は認められずに、nuclear mis-segregation が起き、核が分断化された状態のままで Fucci2 の核内蛍光が赤色から黄色に変化したことから、細胞周期が G1 期から G2 期に進行したことが示された (図 7C; e)。また、約 39.2%の細胞は G2 期停止を継続させるか (図 7C; f)、図には示さないが、細胞周期が M 期へと進行し、mitotic cell rounding

を継続していた。これらの結果から、G0/G1 期に細胞周期を同調させた細胞にアデノウイルスベクターにより Vpr を高効率に発現させた場合においても、Vpr は G2 期停止を誘導するにもかかわらずアポトーシスを S/G2 期ではほとんど誘導せず、G2 期停止後の M 期と G1 期において誘導することが示された。これらのことは、Vpr によるアポトーシスは S/G2 期には誘導されないという Vpr 発現ベクターを導入した細胞において得られた結果を指示していた。

Vpr 発現細胞におけるアポトーシスのライブイメージング

Vpr 誘導性アポトーシスが Caspase-3 依存的であるかどうかを解析するために、SCAT3.1 を用いた。SCAT3.1 は FRET 効率の変化をもとに Caspase-3 の活性を解析する蛍光プローブである。FRET のドナーに ECFP を、アクセプターに Venus を用い、活性型 Caspase-3 に認識されると切断されるリンカーペプチドにて 2 つの蛍光タンパク質が連結している。Caspase-3 が活性化すると ECFP と Venus が分断化され、FRET が起こらなくなることにより蛍光が変化するため、この蛍光の変化を観察することで生細胞内における Caspase-3 の活性を解析できる。本実験では、HeLa/Fucci2 細胞と SCAT3.1 を組み合わせて使用したが、Fucci2 および SCAT3.1 のどちらにも蛍光タンパク質 Venus が使用されているため、それらを区別できないことが本実験の限界であった。そこで、それらの蛍光を局在の違いで識別するために、NES が付加され、細胞質で発現する SCAT3.1 を使用した。

Flag-Vpr と SCAT3.1 を共発現するベクター (pME18Neo/Flag-Vpr-IRES-SCAT3.1) とコントロールベクター (pME18Neo/Flag-IRES-SCAT3.1) を構築し、HeLa 細胞に導入した。24 時間後、Flag-Vpr と SCAT3.1 が単一の細胞において共発現しているかどうかを

抗 Flag M2 MAb を用いた蛍光抗体法により解析した結果、全ての Flag-Vpr 発現細胞において細胞質に SCAT3.1 が発現していた (図 8A)。また、SCAT3.1 の ECFP および Venus の蛍光は 440 nm の励起光により細胞質に認められた。この結果は観察した細胞の Caspase-3 が不活性状態で SCAT3.1 が FRET を起こしていることを示している。次に、HeLa/Fucci2 細胞に pME18Neo/Flag-Vpr-IRES-SCAT3.1 および pME18Neo/Flag-IRES-SCAT3.1 をそれぞれ導入し、24 時間後から 96 時間後まで 24 時間間隔で細胞を回収し、タンパク質の発現を Western blot により解析した。その結果、Flag-Vpr を発現している群においてのみ導入後 24 時間から切断型 SCAT3.1 が認められた (図 8B)。このことは、Vpr は HeLa/Fucci2 細胞において Caspase-3 の活性化を介してアポトーシスを誘導していることを示している。

HeLa/Fucci2 細胞に pME18Neo/Flag-Vpr-IRES-SCAT3.1 またはコントロールとして pME18Neo/Flag-IRES-SCAT3.1 を導入し、その 24 時間後からインキュベータ付属蛍光顕微鏡 LCV110 を用いて 72 時間ライブイメージングを行った (図 8C)。その結果、pME18Neo/Flag-IRES-SCAT3.1 を導入し、SCAT3.1 のみを発現する細胞の約 28.6%において、アポトーシス様の形態変化と共に SCAT3.1 の蛍光が黄色から水色へと変化するのが観察された (図 8C; #1)。このことは、これらの細胞が Caspase-3 依存的なアポトーシスを起こしていることを示している。一方で、約 71.4%の細胞は細胞質における SCAT3.1 の蛍光が黄色のまま変化せず、細胞増殖を続けた (図 8C; #2)。それとは対照的に、pME18Neo/Flag-Vpr-IRES-SCAT3.1 を導入した細胞の中で、Flag-Vpr を発現している SCAT3.1 陽性細胞の約 62.2%が Caspase-3 依存的なアポトーシスを起こしていた (図 8C; #3-5)。約 41.5%の Flag-Vpr 発現細胞は G2 期停止を伴わずに G1 期においてアポトーシスを惹起した (図 8C; #3)。約 11.3%の Flag-Vpr

発現細胞は G2 期停止後、長期間の mitotic cell rounding を起こした後にアポトーシスが誘導された (図 8C; #4)。約 9.4% の Flag-Vpr 発現細胞は G2 期停止後、細胞周期を G1 期まで進行した後にアポトーシスを起こしていた (図 8C; #5)。また、#3 の細胞において SCAT3.1 の FRET 効率の変化を 480 nm および 530 nm の蛍光強度から算出した結果、530/480 の値の低下が、蛍光が黄色から水色に変化したプラスミド導入後 29 時間から 30 時間において認められた (図 8D)。これらの結果は、Vpr は Caspase-3 依存的なアポトーシスを M 期と G1 期に誘導できることを示している。

短時間の Vpr 発現による G2 期停止とアポトーシスの解析

Vpr が誘導する G2 期停止が可逆的かどうかを解析するため、タンパク質の発現を迅速に調節することが可能な ProteoTuner Shield System を利用した(66)。ProteoTuner Shield System は、destabilization domain (DD) -tag を目的のタンパク質、本実験では Vpr と融合タンパク質 (DD-Vpr) として発現させる。DD 融合タンパク質はプロテアソーム依存的に分解されるため、通常の培養条件では発現は認められない。しかし、750 Da の小分子 Shield1 の存在下では Shield1 が DD-tag をマスクすることで DD 融合タンパク質の分解が起らずに、発現が安定化する(66)。従って、DD-tag は Shield1 の添加・非添加によって Vpr の迅速な安定化と不安定化を可能にする。

DD-Vpr の発現、局在、G2 期停止誘導能およびアポトーシス誘導能を解析するために、DD-Vpr 発現ベクター (pME18Neo/DD-Vpr-IRES-ZsGreen1) とコントロールベクター (pME18Neo/DD-IRES-ZsGreen1) を構築した。これらのベクターを HeLa 細胞に導入し、24 時間培養後、Shield1 を終濃度 500 nM になるように添加して、さらに 24 時間培養した。培地交換により Shield1 を除去

し、Shield1 を含む条件と含まない条件でさらに 24 時間培養した (図 9A)。DD-Vpr の局在を蛍光抗体法により解析した結果、Shield1 を含まない条件で培養した場合には、DD-tag および DD-Vpr の発現は認められなかった (図 9B; i and I)。それとは対照的に、Shield1 を含む条件下で培養した細胞において DD-tag 単独では主に細胞質に局在していたが、DD-Vpr は核に局在するとともに細胞質において顆粒状に存在していた (図 9B; ii and II)。また全ての DD-Vpr 発現細胞は ZsGreen1 陽性であった (図 9B)。このことは、ZsGreen1 が DD-Vpr 発現細胞の優良なマーカーとなることを示している。Western blot を用いて DD-Vpr の発現を解析した結果、Shield1 の添加 24 時間後および 48 時間後において DD-Vpr の発現が認められたが (図 9C; II and V)、Shield1 の除去により DD-Vpr の発現が認められなくなった (図 9C; IV)。一方で、Shield1 を含まない条件化で培養し続けた細胞は DD-Vpr の発現は認められなかった (図 9C; I and III)。続いて、DD-Vpr 発現細胞の細胞周期を解析した結果、Shield1 添加 24 時間後 (G2/M 期 : 66.4%) および 48 時間後 (G2/M 期 : 60.2%) において ZsGreen1 陽性細胞に G2 期停止が認められた (図 9D; II and V)。さらに、Shield1 の除去により DD-Vpr 誘導性 G2 期停止は抑制された (G2/M 期 : 37.6%) (図 9D; IV)。これらの結果は、DD-Vpr による G2 期停止が部分的にはあるが可逆的であることを示唆している。

DD-Vpr のアポトーシス誘導能を解析した。Shield1 を含まない条件下で培養し続けた ZsGreen1 陽性細胞はアポトーシスを起こしてはいなかった (約 4.71%) (図 9E; III)。一方、Shield1 存在化において 48 時間培養した ZsGreen1 陽性細胞のうち、約 15.7% の細胞がアポトーシスを起こしていた (図 9E; V)。さらに、Shield1 を除去し、24 時間培養した場合、アポトーシスを起こす細胞の割合は約 10.7% とわずかに減少していた (図 9E; IV)。これらの結果から、継続

的に DD-Vpr を発現させたときと比較して、DD-Vpr の 24 時間のみの一過的な発現はアポトーシスを誘導するには不十分であることが示された。

DD-Vpr 発現細胞における G2 期停止とアポトーシスのライブイメージング

DD-Vpr 誘導性 G2 期停止とアポトーシスをライブイメージングにより解析するために、pME18Neo/DD-Vpr-IRES-ECFP を構築し、HeLa/Fucci2 細胞に導入した。24 時間後、終濃度 500 nM になるように Shield1 を添加し、23 時間培養（一次培養）した。Shield1 を一旦除去し、Shield1 存在下、または非存在下で細胞をさらに培養（二次培養）した（図 10A）。Western blot 解析により、Shield1 添加 49 時間後まで DD-Vpr の発現が継続していること、および Shield1 の除去後 1 時間で DD-Vpr の発現が認められなくなることが明らかになった。また、Shield1 非存在下では DD-Vpr の発現は認められなかった（図 10B）。

Vpr 誘導性 G2 期停止の可逆性を解析するために、HeLa/Fucci2 細胞に pME18Neo/DD-Vpr-IRES-ECFP を導入した。二次培養開始 1 時間後、ECFP 陽性かつ細胞周期が G2 期の細胞、つまり Fucci2 の蛍光が黄色の細胞を選択し、インキュベータ付属蛍光顕微鏡 LCV110 を用いて 48 時間ライブイメージングを行った（図 10C）。その結果、Shield1 非存在下では、ECFP 陽性細胞の細胞周期は進行し、細胞増殖しているのが観察され、細胞数は 48 時間の培養の間で増加していた（図 10C; i, 10D）。対照的に、Shield1 存在下では ECFP 陽性細胞の減少が認められた（図 10D）。ライブイメージングの結果、ECFP 陽性細胞は 4 種類に分類された：細胞周期が M 期へと進行し細胞分裂後、正常に細胞増殖するタイプ（Type I）、G2 期停止を観察中継続するタイプ（Type II）、アポトーシスを起こすタイプ（Type III）、および異常な細胞分裂を起こすタイプ（Type

IV) (図 10E)。二次培養において Shield1 存在下で培養された ECFP 陽性細胞は、約 6.9%の細胞が Type I に、約 41.4%の細胞が Type II に、約 44.8%の細胞が Type III に、約 6.9%の細胞が Type IV に分類された (図 10E; ii)。一方で、Shield1 非存在下で培養された ECFP 陽性細胞において、Type I 細胞の割合の顕著な増加が認められ、約 39.1%に増加していた。さらに、G2 期停止を継続する Type II 細胞の割合およびアポトーシスを起こす Type III 細胞の割合が減少した (Type II : 約 17.4%、Type III : 約 26.1%) (図 10E; iii)。これらの結果から、Vpr 誘導性 G2 期停止が部分的にはあるが可逆的であること、Vpr がアポトーシスを誘導するためには Vpr の継続的な発現が重要であることが明らかになった。

1-4. 考察

Vpr は G2 期停止を誘導するとともに、アポトーシスを制御する。しかし、これら 2 つの機能の関係性については諸説あり、不明な点が多い(48,51-58,70,71)。本研究では、Vpr による細胞周期とアポトーシスの制御の関係性を 4 つの新たな方法により解析した。1) CELAVIEW RS100 を用いたイメージング解析による DNA 量の測定、2) HeLa/Fucci2 細胞を用いたライブイメージング技術による Vpr 発現細胞の細胞周期の動態解析、3) SCAT3.1 を用いたライブイメージング技術による Vpr 発現細胞における Caspase-3 の活性解析、および 4) Shield1 反応性 DD-Vpr を用いたライブイメージング技術による Vpr の機能の可逆性解析を行った。その結果、3 つの主な結論が導き出された。まず、Vpr 発現ベクターを、トランスフェクションにより HeLa/Fucci2 細胞に導入した系を用いた CELAVIEW RS100 およびライブイメージング解析の結果から、Vpr は細胞周期を G2 期で停止するが、アポトーシスは S および G2 期では誘導しないことが明らかになった。この結果は細胞周期を G0/G1 期に同調させた HeLa/Fucci2 細胞に、アデノウイルスベクターを用いて Vpr を高効率に発現させた系を用いたライブイメージングの実験からも立証された。2 つ目に、HeLa/Fucci2 細胞と SCAT3.1 を組み合わせて用いたライブイメージングの結果から、Vpr 誘導性アポトーシスには Caspase-3 の活性化が必要であることが明らかになった。また、Caspase-3 の活性化は S 期および G2 期停止直後には認められず、G1 期および G2 期停止後細胞周期が進行してから M 期や G1 期において認められた。3 つ目に、DD-Vpr を用いたライブイメージングの結果から、G2 期停止が可逆的であることが示唆された。また、約 1 日間の Vpr の一過性発現は G2 期停止の継続およびその後のアポトーシスの誘導には不十分であることが示された。これらの結果は、Vpr 発現細胞の細胞周期と細胞死の動態をラ

ライブイメージングにより生細胞内で観察したことにより初めて得られたものであり、Vpr の研究に非常に大きなインパクトをもたらしたと考えられる。

Vpr 誘導性 G2 期停止とアポトーシスの時間的な関係性を図 11A に示した。Vpr 誘導性アポトーシスは全ての細胞周期において観察することができた。例えば、アポトーシスは、G1 期 (図 11A、a)、S 期または G2 期 (図 11A、b)、そして G2 期停止後細胞周期が進行した後の M 期 (図 11A、c) および nuclear mis-segregation や異常な細胞分裂後の G1 期 (図 11A、d) において観察された。しかしながら、ほとんどのアポトーシスは S 期および G2 期では認められず、主に M 期および G1 期において認められた。特に、細胞周期を同調させた細胞にアデノウイルスベクターを用いて Vpr を高効率に発現させライブイメージングを行った結果、S 期でのアポトーシスは観察されず、約 97.7%の細胞が G2 期停止を起こしたにもかかわらず、G2 期にアポトーシスを起こした細胞は約 5.5%のみであった。このことは、Vpr は S 期および G2 期にはアポトーシスを誘導しないことを強く示唆している。さらに、これらのアポトーシスが Caspase-3 依存的事であることが明らかになった。一方、アポトーシスとは対照的に、G2 期停止後、G1 期まで細胞周期が進行しても生存している細胞がわずかに認められた。これらの細胞は、nuclear mis-segregation や異常な細胞分裂の結果として、微小核を有していた。残りの細胞は、G2 期停止や mitotic cell rounding といった細胞周期が停止した状態を継続していた。これらの結果から、Vpr はアポトーシスを促進的にも抑制的にも制御している可能性が示唆された。また、G2 期停止後に認められた、mitotic cell rounding の延長、nuclear mis-segregation や異常な細胞分裂、およびその結果としての微小核の形成は、これまでも Vpr 発現細胞において観察されていた(72-74)が、本研究において初めて、これらが G2 期停止から一連の流れとして連続的に起こることが明らか

になった。

Shield1 の除去による DD-Vpr の迅速な分解によって、DD-Vpr によって既に G2 期停止を起こしていた細胞の一部において、正常に細胞周期を進行する細胞 (図 11B、a) および異常な細胞分裂を起こす細胞 (図 11B、d) が増加した。それに伴って、G2 期停止を持続する細胞 (図 11B、b) およびアポトーシスを惹起する細胞 (図 11B、c) は減少した。この結果は、Vpr 誘導性 G2 期停止が可逆的である可能性を示唆している。また、約 1 日間の Vpr の発現では、G2 期停止の継続およびその後のアポトーシスの誘導には不十分であることが明らかになった。これらのことから、G2 期停止後のアポトーシス誘導には、Vpr の継続的な発現と G2 期停止の継続が必要である可能性、および Vpr 誘導性 G2 期停止の抑制がその後のアポトーシスの誘導をも抑制する可能性を示している。この結果は、Vpr によるアポトーシスの誘導は G2 期停止を抑制することにより誘導されなくなるという以前の報告を強く支持している(51)。

HIV-1 は CD4 陽性リンパ球に感染すると G2 期停止を誘導する。この G2 期停止には Vpr だけでなく HIV-1 アクセサリータンパク質 Vif も関与している(75)。一方で、Wang らは Vif が G1 期から S 期への細胞周期の進行を促進することを報告した(76)。このことは、HIV-1 感染細胞における G1 期の長さが短くなっていることを示唆している。本研究において、一過性に発現させた Vpr が G2 期停止を起こさずに G1 期においてアポトーシスを誘導するが、S 期ではアポトーシスを誘導しないことが示された。しかし、HIV-1 感染細胞では G1 期が短縮されているため、Vpr による G1 期におけるアポトーシスの誘導が抑制され、効率的に G2 期停止が誘導される可能性がある。このことは、HIV-1 複製における G2 期の重要性からも支持される。以上のことから、HIV-1 感染細胞の細胞周期は、効率的なウイルス複製のために Vpr および Vif により最適化さ

れていると考えられる。

Vpr は DCAF1 等とユビキチンリガーゼ複合体を形成し、MUS81 の分解を介して G2 期停止を誘導する(27-32)。この複合体は、核内においてクロマチンに結合したフォーカスとして観察される(77)。Maudet らは Vpr が DCAF1 との結合により、G2 期停止依存的および非依存的に細胞の増殖を抑制することを示した(78)。さらに、Huang らは、このユビキチンリガーゼ複合体を介して、Vpr が Mfn2 を分解しアポトーシスを誘導することを報告した(35)。本実験の結果から、Vpr は G2 期停止を誘導するとともに G2 期停止後、M 期や G1 期においてアポトーシスを誘導することが明らかになった。以上のことから、Vpr の機能の変化は Vpr に結合し、ユビキチン・プロテアソーム依存的に分解される宿主因子によって決定されることが考えられる。Vpr が G2 期停止を起こさずにアポトーシスを誘導する場合、Mfn2 が Vpr 発現後、直ちにユビキチン化され分解されることが推測される。対照的に、Vpr が G2 期停止を誘導する場合、まず MUS81 が Vpr と結合し、ユビキチン化により分解されることが考えられる。一方で、細胞周期を同調させた HeLa/Fucci2 細胞に、アデノウイルスベクターを用いて Vpr を発現させライブイメージングを行った結果、S 期でのアポトーシスは認められず、約 97.7%の Vpr 発現細胞が G2 期停止を起こし、約 5.5%の細胞においてのみ G2 期においてアポトーシスが誘導された。このことから、Vpr による Mfn2 の分解は、S 期および G2 期には起こらない可能性が示唆された。今後、Vpr による細胞周期とアポトーシスの制御の分子機能的な関係を詳細に明らかにするために、Mfn2 の分解と細胞周期の動態の関係性の詳細な解析が必要であると考えられる。

なぜ、Vpr は G2 期停止を誘導し、G1 期または M 期においてアポトーシスを誘導するのだろうか？ HIV-1 感染細胞において、LTR からの転写は細胞周期の

G2 期に最大となることが知られている(44,45)。つまり、Vpr は G2 期停止を誘導することでウイルスの複製にとって、より良い細胞内環境を継続させていると考えられている。HIV-1 の mRNA の転写後、翻訳、集合、そして出芽の課程が HIV-1 粒子の放出には必要であり、G2 期停止後、直ちに Vpr によってアポトーシスが誘導された場合、ウイルス粒子の形成が不完全になってしまう可能性がある。そのため、Vpr は G2 期停止直後の G2 期ではなく、細胞周期が進行した M 期または G1 期においてアポトーシスを誘導するのではないだろうか。HIV の病原性に対する Vpr の効果をより詳細に理解するためには、HIV-1 感染細胞における Vpr 誘導性 G2 期停止とアポトーシスの直接のおよび間接的な影響を明らかにする必要がある、今後さらなる詳細な研究が望まれる。また、HIV-1 には Vpr 以外にもアポトーシスを惹起するタンパク質がコードされていることから、HIV-1 感染細胞におけるアポトーシスも Vpr 発現細胞と同様に、M 期または G1 期において誘導されるのかどうかを明らかにすることは非常に興味深い。それらを成し得るためには、Fucci を発現する CD4 陽性リンパ球由来細胞株の作製、および浮遊系細胞において長時間のライブイメージングを可能とする、新たなイメージング系の構築が必要である。

第2章 Vpr による G2 期停止関連新規宿主因子の探索

2-1. 緒言

Vpr は、ATR の活性化を介して DNA ダメージチェックポイントを活性化する(33,34)。Vpr により活性化した ATR は、細胞周期チェックポイントに必須な checkpoint kinase 1 (Chk1) をリン酸化し、結果として G2 期停止が誘導される(79)。また、Vpr による ATR の活性化には、Vpr が DCAF1 等とユビキチンリガーゼ複合体を形成する必要がある(27-32)。このユビキチンリガーゼ複合体は、G2 期停止を誘導するために、ユビキチンの 48 番目のリジン残基を介したユビキチン化により、MUS81 のプロテアソーム依存的な分解を促進していると考えられている(26,80)。事実、ユビキチンリガーゼ複合体を形成している宿主因子 DCAF1、DDB1 または CUL4A の siRNA を用いたノックダウンは、Vpr 誘導性 G2 期停止を顕著に抑制する(81)。このように、Vpr 誘導性 G2 期停止の分子機構は明らかになりつつあるが、まだ未同定の宿主因子が G2 期停止に関与している可能性が残されている。

Huntingtin interacting protein 1 (HIP1) は、主に脳に発現する、ハンチントン病の原因タンパク質である Huntingtin と結合する 116 kDa のタンパク質として同定された(82,83)。*huntingtin* 遺伝子の第 1 エキソンにはグルタミンをコードするトリプレット CAG の繰り返し配列が存在する。この繰り返し配列が病理性遺伝子の場合には増加し、結果としてグルタミンの連続が長い異常な Huntingtin が発現する(84)。この異常な Huntingtin のグルタミンの連続が長ければ長いほど HIP1 との結合は弱くなる(82)。このことから、Huntingtin と HIP1 の結合がハンチントン病の発症に関与していると考えられている。HIP1

は N 末端にエンドサイトーシス関連タンパク質に特異的な AP180 N-terminal homology (ANTH) イノシトール脂質結合ドメイン、中央にクラスリンのリクルートに関与する短いモチーフを有するコイルドコイルドメイン、および talin-HIP1/R/Sla2p actin-tethering C-terminal homology (THATCH) ドメインを持つ(85-87)。その機能は、クラスリンを介したエンドサイトーシスに関与するだけでなく、多くのがん細胞において HIP1 の高発現が認められることから、ガン化への関与も示唆されている(88)。また、C 末端には、核移行シグナル (nuclear localization signal; NLS) を有している。HIP1 はこの NLS を介して核移行する際、HIP1 protein interactor (HIPPI) を細胞質から核内へと輸送する(89)。しかし、HIP1 はシャトリングタンパク質であり、核移行に続いて核外移行し、主に細胞質に局在する。

本研究では、Vpr 誘導性 G2 期停止の分子機構の解明を目的とし、CELAVIEW RS100 を用いた、Vpr 誘導性 G2 期停止を抑制する siRNA の探索を行った。また、スクリーニングにより同定された G2 期停止関連因子について、その因子の Vpr 誘導性 G2 期停止に対する機能解析を行った。

2-2. 材料と方法

細胞培養とプラスミドおよび siRNA の導入法

HeLa 細胞および 293T 細胞（ヒト胎児腎細胞由来細胞株）は、10% FBS および Pen-Strep Glutamine 添加 DMEM にて培養した。健常人血液から遠心分離によりヒト末梢血単核球（peripheral blood mononuclear cell; PBMC）を回収し、抗ヒト CD14 mouse MAb 結合 MicroBeads（Miltenyi Biotec 社製）およびマグネティックセルソーター（MACS、Miltenyi Biotec 社製）を用いて CD14 陽性細胞を分離し、MACS buffer [PBS、2 mM EDTA、0.5% BSA]で洗浄後、CD14 陽性細胞を精製した。CD14 陽性細胞を 5% AB serum（SIGMA 社製）、10% FBS（Cell Culture Bioscience 社製）および 20 ng/ml macrophage-colony stimulating factor（M-CSF、PEPROTECH 社製）および 1x Glutamax（Invitrogen 社製）添加 RPMI にて 37°C で 1 週間培養し、MDM に分化誘導した。

プラスミドと siRNA の共導入およびプラスミド単独の導入には Lipofectamine 2000（Invitrogen 社製）を使用した。siRNA の導入には Lipofectamine RNAi MAX（Invitrogen 社製）を使用した。

プラスミド

Flag-mRFP/pCAGGS、Flag-mRFP-Flag-Vpr/pCAGGS、pCAGGS/HA および pCAGGS/HA-Vpr は間教授より分与していただいた。Flag-mRFP-Flag-R80A/pCAGGS は以下のように作製した。pME18Neo-R80A および Flag-mRFP-Flag-Vpr/pCAGGS を制限酵素 *EcoRV* および *NotI* で処理し、2 種類の断片をライゲートした。pCAGGS/HA-HIP1 は以下のように作製した。HeLa 細胞から RNA を単離・精製し、oligo-dT プライマーを用いて Reverse

Transcription Polymerase Chain Reaction により cDNA を増幅した。cDNA を 鋳 型 と し 、 5'-AAAGATATCGAAGCAGGTGCCCAACCC-3' お よ び 5'-AAAGCGGCCGCCTATTCTTTTTTCGGTTACCACTTC-3' を プ ラ イ マ ー に 利 用 し、PCR 法により HIP1 をコードしている DNA を増幅した。PCR 産物お よ び pCAGGS/HA-Vpr を制限酵素 *EcoRV* および *NotI* で処理し、2 種類 の断片を ライゲートした。siRNA により分解されないように HIP1 の塩基配列にサイレ ント変異を入れた siR-HIP1 発現ベクター (pCAGGS/HA-siR-HIP1) は以下の ように作製した。まず、3'末端を欠損させた HIP1 をコードする DNA と 5'末端 を欠損させた HIP1 をコードする DNA を pCAGGS/HA-HIP1 を鋳型とし、そ れ ぞ れ 5'-AAAGATATCGAAGCAGGTGCCCAACCC-3' お よ び 5'-TTCATGAGAGCAGACCATCAGTTCTTC-3' 、 5'-GAAGAACTGATGGTCTGCTCTCATGAA-3' お よ び 5'-AAAGCGGCCGCCTATTCTTTTTTCGGTTACCACTTC-3' をプライマーに 利用し、PCR 法により DNA を増幅した。2 種類 の断片をアニールし、末端の 平滑化を PCR 法により行った。この PCR 産物を鋳型とし、 5'-AAAGATATCGAAGCAGGTGCCCAACCC-3' お よ び 5'-AAAGCGGCCGCCTATTCTTTTTTCGGTTACCACTTC-3' をプライマーに利 用し、PCR 法により DNA を増幅した。PCR 産物および pCAGGS/HA-HIP1 を制限酵素 *EcoRV* および *NotI* にて処理し、2 種類 の断片をライゲートした。 pGEX-6P-3/HIP1 は以下のように作製した。pCAGGS/HA-HIP1 を鋳型とし、 5'-AAAGATATCTGAAGCAGGTGCCCAACCC-3' お よ び 5'-AAACTCGAGCTATTCTTTTTTCGGTTACCACTTC-3 をプライマーに利用し、 PCR 法により HIP1 をコードする DNA を増幅した。PCR 産物を制限酵素 *EcoRV* および *XhoI* にて処理し、pGEX-6P-3 に導入した。

Vpr 誘導性 G2 期停止関連因子のスクリーニング法

CELAVIEW RS100 による一次スクリーニング

HeLa 細胞を 24 穴プレートに播種し、siRNA を pME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1 と共導入するか単独導入した。48 時間後に Hoechst 33342 を含む 3.6% ホルムアルデヒドで 10 分間、室温で固定および DNA を染色し、細胞を PBS にて 3 回洗浄した。pME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1 および siRNA の共導入の際には 200 個以上の ZsGreen1 陽性細胞を、siRNA を単独導入した際には 1000 個以上の細胞を CELAVIEW RS100 により観察し、核内の DNA 量を定量した。

フローサイトメーターによる二次スクリーニング

HeLa 細胞に pME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1 または pME18Neo/Flag-IRES-ZsGreen1 および siRNA を共導入した。48 時間後に細胞を回収し、1% ホルムアルデヒドで 30 分間、氷上で固定した。その後、70% エタノールにて 2 時間、氷上で細胞を固定し、RNaseA (200 µg/ml) を添加後、37°Cにて 30 分間反応させた。PI (50 µg/ml) を添加し、37°Cにて 10 分間、遮光状態で DNA を染色した。FACS Calibur により 7,000 個以上の ZsGreen1 発現細胞を取得して、Cell Quest software にて PI の蛍光強度を測定した。最終的に、ModFit LT Software にて細胞周期の割合を解析した。

SDS-PAGE と Western blot

細胞を回収し、RIPA buffer に懸濁し氷上で 30 分間静置した。15,000 rpm, 4°C, 5 分間遠心し、上清のみを回収した後、BCA assay により上清中のタンパク質の濃度を定量した。等量のタンパク質を SDS サンプルバッファーと混和し、100 °C

で5分間熱処理した。SDS-PAGEによりタンパク質を分離し、Western blotを行った。一次抗体には、抗Flag M2 mouse MAb、抗Flag rabbit polyclonal antibody (SIGMA社製)、抗HIP1 mouse MAb (Novus Biologicals社製)、および抗 β -actin mouse MAbを、二次抗体には、HRP標識抗mouse IgG抗体およびHRP標識抗rabbit IgG抗体を用いた。シグナルの検出にはSuperSignal West Pico chemiluminescent substrateを使用した。

ZsGreen1 発現細胞の CELAVIEW RS100 を用いた細胞周期解析

HeLa 細胞を 24 穴プレートに播種し、pME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1 または pME18Neo/Flag -IRES-ZsGreen1 および HIP1 に対する siRNA を導入した。48 時間後に Hoechst 33342 を含む 3.6% ホルムアルデヒドで 10 分間、室温で固定および DNA を染色し、細胞を PBS にて 3 回洗浄した。CELAVIEW RS100 により 200 個以上の ZsGreen1 陽性細胞を観察し、DNA 量の定量を行い、G2/M:G1 の値を算出した。

蛍光抗体法およびCELAVIEW RS100を用いた細胞周期解析

全タンパク質検出法

HeLa細胞にプラスミドを導入し、48時間培養した。3.6% ホルムアルデヒドで10分間、室温で固定し、氷上で5分間、0.2% Triton X-100で透過処理した。5% スキムミルク溶液でブロッキング後、一次抗体と室温で1時間反応させた。その後、二次抗体と室温で1時間反応させ、Hoechst 33342を用いて核を染色した後、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000D) により細胞を観察した。また、CELAVIEW RS100を用いて蛍光標識抗体陽性細胞のDNA量の定量を行った。

核内タンパク質検出法

HeLa細胞にプラスミドを導入し、48時間培養した。40 $\mu\text{g/ml}$ のジギトニンで3分間、氷上で細胞膜のみ透過処理し、PBSで洗浄後、0.025% Triton X-100で5分間処理し、細胞質中のタンパク質を溶出させた。3.6% ホルムアルデヒドで10分間、室温で固定し、氷上で5分間、0.2% Triton X-100で透過処理した。5% スキムミルク溶液でブロッキング後、一次抗体と室温で1時間反応させた。その後、二次抗体と室温で1時間反応させ、Hoechst 33342を用いて核を染色した後、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000D) により細胞を観察した。また、CELAVIEW RS100を用いて蛍光標識抗体陽性細胞のDNA量の定量を行った。

一次抗体には、抗Flag rabbit polyclonal antibody、抗HA mouse MAb (MBL社製)、および抗phospho-Histone H2A.X (Ser139) mouse MAb (Millipore社製)を、二次抗体には、Alexa fluoro488標識抗rabbit IgG抗体 (Molecular Probe社製)、Alexa fluoro594標識抗mouse IgG抗体を使用した。

免疫沈降法

HeLa細胞にプラスミドを導入し、48時間培養した。細胞を回収し、Lysis Buffer [10 mM Tris-HCl (pH7.4)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% NP40] に懸濁し氷上で30分間静置した。15,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ にて5分間遠心し、上清を回収した後、BCA assayにより上清中のタンパク質の濃度を定量した。等量のタンパク質とLysis Bufferにて平衡化した抗FLAG M2 affinity gel (SIGMA社製)を4 $^{\circ}\text{C}$ にて2時間、ローテーターを用いて混和した後、6,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ にて1分間遠心し、上清を除去した。抗FLAG M2 affinity gelをLysis Bufferにて6回洗浄し、SDSサンプルバッファーと混和し、100 $^{\circ}\text{C}$ で5分間熱処理した。SDS-PAGEによりタンパク質を分離し、Western blotを行った。

タンパク質の精製

monomeric red fluorescent protein (mRFP)、mRFP 融合 Vpr および mRFP 融合 R80A は以下のように精製した。Flag-mRFP-Flag-Vpr/pCAGGS、Flag-mRFP-Flag-R80A/pCAGGS または Flag-mRFP/pCAGGS を 293T 細胞に導入し、48 時間培養後、細胞を回収した。細胞を Lysis Buffer に懸濁し、氷上にて 30 分間、静置した。15,000 rpm、4°Cにて 5 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清と Lysis Buffer にて平衡化した抗 FLAG M2 affinity gel を 4°Cにて 18 時間ローテーターにより混和した後、6,000 rpm、4°C、1 分間遠心し、上清を除去した。Wash Buffer [10 mM Tris-HCl (pH7.4)、150 mM NaCl、1% NP-40] で 5 回洗浄し、再度 6,000 rpm、4°Cにて 1 分間遠心した後、上清を除去した。Elution Buffer [10 mM Tris-HCl (pH7.4)、150 mM NaCl] 100 μ l および 3 \times Flag-peptide (SIGMA 社製) 8 μ g を添加し、4°C、1 時間ローテーターにより混和した後、6,000 rpm、4°Cにて 1 分間遠心し、上清を回収した。Western blot により、それぞれのタンパク質の精製を確認した。

GST タンパク質および GST 融合 HIP1 は以下のように精製した。大腸菌 BL21 に pGEX-6P-3 または pGEX-6P-3/HIP1 をトランスフォーメーションし、LB 培地にて培養した。isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (SIGMA 社製) を培地に添加し、17°Cにて 24 時間震盪培養した。大腸菌を回収した後、BugBuster HT Protein Extraction Reagent (Merck Millipore 社製) に懸濁し、室温、20 分間ローテーターにて混和後、6,000 rpm、4°Cにて 5 分間遠心し、上清を回収した。上清に BugBuster HT Protein Extraction Reagent にて平衡化した glutathion sepharose beads (Amersham 社製) を加え、4°C、18 時間ローテーターにより混和後、glutathion sepharose beads を BugBuster HT Protein Extraction Reagent にて 3 回洗浄した。coomassie brilliant blue 染色にて GST

タンパク質および GST 融合 HIP1 の精製を確認した。

GST pull-down

GSTまたはGST融合HIP1 を付加したglutathion sepharose beadsをBinding Buffer [10 mM Tris-HCl (pH7.4)、300 mM NaCl、1% NP-40]を用いて平衡化し、mRFP、mRFP融合VprまたはmRFP融合R80Aと4℃にて18時間ローテーターにより混和した。glutathion sepharose beadsをBinding Bufferにて6回洗浄後、SDSサンプルバッファーと混和し、100 °Cで5分間熱処理した。SDS-PAGEによりタンパク質を分離し、Western blotを行った。

VSV-G 偽 HIV-1 の作製と感染実験

pNL43 E-R+または pNL43 E-R-と pVSV-G を 293T 細胞に共導入し、24 時間後に培地交換を行い、48 時間後に細胞培養液を回収し、0.45 µm filtration 後、ウイルス液をストックした。ウイルス力価は HIV-1 p24 Antigen Assay Kit (MBL 社製) を用いて ELISA 法により p24 量を測定することで決定した。

作製したウイルスは、p24 量 4 ng/well もしくは 20 ng/well にて MDM に接種した。

ルシフェラーゼアッセイ

VSV-G 偽 HIV-1 感染 6 日後におけるルシフェラーゼの活性を Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega 社製) により測定した。細胞を PBS にて 1 回洗浄後、1× Passive Lysis Buffer を加え、室温で 15 分間震盪した。細胞可溶化液を回収し、15,000 rpm にて 5 分間遠心した後、上清を回収した。回収した上清に Luciferase Assay Substrate を添加し、TriStar

LB941 (Berthold Technologies 社製) によりルシフェラーゼの活性を測定した。

統計解析

平均値の差の検定には t 検定を用いた。有意確立 p value <0.05 のとき統計学的に有意差があるものとした。

2-3. 結果

Vpr 誘導性 G2 期停止関連因子 Huntingtin interacting protein 1 (HIP1) の同定

Vpr 誘導性 G2 期停止関連因子を探索するために、256 種類の siRNA を含む siRNA ミニライブラリーを使用してスクリーニングを行った。1 次スクリーニングとして、CELAVIEW RS100 を用いて Vpr 誘導性 G2 期停止に対する siRNA の効果と正常な細胞周期に対する siRNA の効果を解析した結果、256 種類中 36 種類の siRNA において G2 期停止が抑制され、正常な細胞周期への影響が認められなかった。2 次スクリーニングとして、フローサイトメーターを用いて Vpr 誘導性 G2 期停止に対する効果と正常な細胞周期に対する siRNA の効果を再度検討した。36 種類中 12 種類の siRNA は十分量の siRNA の確保ができなかったため、残りの 24 種類において 2 次スクリーニングを行った結果、1 次スクリーニングの結果が再現された siRNA は 11 種類だった (図 12、表 1)。その 11 種類の中の一つ、HIP1 について以後実験を行った。

まず、HIP1 に対する異なる配列を持つ 2 種類の siRNA を使用して、HIP1 のノックダウンを確認した (図 13A)。その 2 種類の siRNA を使用して、Vpr 誘導性 G2 期停止に対する効果を再度検討した結果、どちらの siRNA においても濃度依存的な G2 期停止の抑制が認められ、終濃度 10nM になるように siRNA を加えたときにそれぞれ G2/M:G1 の値が約 50% (#1) および 60% (#2) 減少した (図 13B)。以後の実験には、抑制効果の高かった #2 の siRNA を使用した。続いて、HIP1 をノックダウンした細胞に、siRNA の標的となる配列に変異を入れ、siRNA によってノックダウンされない HA-siR-HIP1 を強制発現させた結果、Vpr 誘導性 G2 期停止の抑制が部分的にはあるが認められなくなった (図 13C)。これらの結果から、HIP1 は Vpr 誘導性 G2 期停止に関与していることが

明らかになった。さらに、HIP1 をノックダウンした細胞を、トポイソメラーゼ II の抑制剤で G2 期停止を誘導するエトポシドで処理し、エトポシド誘導性 G2 期停止への HIP1 の効果を解析した。その結果、HIP1 のノックダウンはエトポシドによる G2 期停止を抑制しなかった (図 14A and B)。以上の結果から、HIP1 が Vpr 誘導性 G2 期停止特異的に関与していることが示唆された。

Vpr 誘導性 DNA 二本鎖切断に対する HIP1 の効果解析

Vpr は DNA 二本鎖切断を介して G2/M チェックポイントを活性化することが知られている(33)。そこで、HIP1 のノックダウンの Vpr 誘導性 DNA 二本鎖切断への影響を解析した。DNA 二本鎖切断のマーカーである γ -H2AX のフォーカスを蛍光抗体法により標識し、観察したところ、ネガティブコントロールの siRNA を導入した Vpr 発現細胞の約 72.8%が γ -H2AX のフォーカス数が 10 個以上であった。また、Vpr 誘導性 DNA 二本鎖切断への関与が既に知られている DCAF1 をノックダウンした細胞では、 γ -H2AX のフォーカス数が 10 個以上の細胞は約 2.2%だった。一方、興味深いことに HIP1 をノックダウンした Vpr 発現細胞における γ -H2AX のフォーカス数が 10 個以上の細胞の割合は、ネガティブコントロールの siRNA を導入した Vpr 発現細胞とほぼ同等で約 76.6%だった。さらに、HIP1 と DCAF1 の両因子をノックダウンした細胞における γ -H2AX のフォーカス数が 10 個以上の Vpr 発現細胞の割合は、約 6.3%だった (図 15A and B)。これらの結果は、HIP1 が DNA 二本鎖切断を伴わずに G2 期停止を誘導していることを示唆している。

続いて、HIP1 と DCAF1 が全くの別の経路で Vpr 誘導性 G2 期停止に関与しているかどうかを検証した。HIP1 および DCAF1 をそれぞれ単独で、または両因子をノックダウンしたときの、Vpr 発現細胞の細胞周期を CELAVIEW RS100

を用いて解析した結果、HIP1 単独のノックダウンでは Vpr 誘導性 G2 期停止が約 70%抑制されたのに対し、DCAF1 の単独、または HIP1 と DCAF1 の両因子のノックダウンは、G2 期停止をほぼ 100%抑制した (図 15C)。これらの結果から、Vpr は DNA 二本鎖切断を伴う経路と DNA 二本鎖切断を伴わずに HIP1 を利用する経路の、二つの経路を介して G2 期停止を誘導することが明らかになった。また、そのどちらの経路にも DCAF1 が必要であることが示された。

Vpr と HIP1 の結合解析

HIP1 が関与する Vpr 誘導性 G2 期停止誘導機構を解析するため、Vpr と HIP1 の結合を解析した。まず、HeLa 細胞に pME18Neo-FVpr を導入し、抗 FLAG M2 affinity gel を用いて内在性 HIP1 と Vpr の結合を解析した結果、Flag-Vpr は内在性 HIP1 と結合していた (図 16A)。さらに、Vpr と HIP1 が直接結合しているかどうかを解析した。GST-HIP1 を大腸菌で発現・精製し (図 16B; coomassie brilliant blue 染色)、mRFP 融合 Vpr および G2 期停止誘導能欠損変異体 R80A Vpr(68) (mRFP-Vpr および mRFP-R80A) を 293T 細胞で発現・精製した。GST pull-down 法にてそれらのタンパク質の結合を解析した結果、mRFP-Vpr と HIP1 の直接結合は認められたが、mRFP-R80A と HIP1 の直接結合は認められなかった (図 16B; GST pull-down)。このことから、野生型 Vpr と HIP1 は細胞内において直接結合しているが、R80A 変異体 Vpr は HIP1 と直接結合しないことが示された。

Vpr 発現細胞における HIP1 の局在と細胞周期解析

Vpr と HIP1 の結合が認められたことから、Vpr 発現細胞における HIP1 の局在を蛍光抗体法により解析した。Vpr は主に核に局在するタンパク質である。

一方、HIP1 はシャトリングタンパク質ではあるが、主に細胞質に局在している (89)。HeLa 細胞に pME18Neo、pME18Neo-FVpr または pME18Neo-R80A および pCAGGS/HA-HIP1 を共導入し、それぞれの局在を解析した結果、Vpr を発現していない細胞では、HA-HIP1 は主に細胞質に局在していたが、野性型 Vpr を発現している細胞において HA-HIP1 の核局在が認められた。一方で、R80A 変異体 Vpr を発現させた細胞では、HA-HIP1 の核局在はほとんど認められなかった。このことから、Vpr は HIP1 の核局在を促進していることが明らかになった (図 17A; (-))。

続いて、核に局在している HIP1 が Vpr 誘導性 G2 期停止には重要であると考え、核に局在している HIP1 のみを検出する系を確立した。HeLa 細胞に pME18Neo、pME18Neo-FVpr または pME18Neo-R80A および pCAGGS/HA-HIP1 を共導入し、ジギトニンおよび Triton X-100 を用いて細胞質中のタンパク質を溶出させ、核内タンパク質のみを蛍光抗体法により標識する事により、核内の HA-HIP1 のみを検出することが可能となった。その結果、R80A 変異体 Vpr を発現している細胞と比較して、野性型 Vpr を発現している細胞において HA-HIP1 の核局在が促進していた (図 17A; (+)、17B)。HA-HIP1 が核に局在している細胞の細胞周期を解析するために、同様の方法で核内 HA-HIP1 のみを検出し、CELAVIEW RS100 による細胞周期解析を行った。その結果、HA-HIP1 の核局在の有無にかかわらず細胞周期を解析した場合と比較して、野性型 Vpr と R80A 変異体 Vpr のどちらを発現させた場合でも、HA-HIP1 が核に局在している細胞は G2 期停止が促進していた (図 17C and D)。

この G2 期停止の促進が HIP1 が単独で核に局在することに由来するかどうかを解析した。pCAGGS/HA-HIP1 を HeLa 細胞に単独で導入して、ジギトニンおよび Triton X-100 処理により細胞質中のタンパク質を溶出させ、核内タンパ

ク質のみを蛍光抗体法により標識し、HA-HIP1 が核に局在している細胞の細胞周期を CELAVIEW RS100 を用いて解析した。その結果、ジギトニンおよび Triton X-100 処理を行っていない HA-HIP1 発現細胞の細胞周期を解析した場合と比較して、処理を行うことにより HA-HIP1 が核に局在している細胞のみを選択して細胞周期を解析した場合には、G2/M:G1 の値が増加していた(図 18)。以上の結果から、HIP1 は核に局在することで G2 期停止を誘導することが明らかになった。さらに、Vpr は HIP1 が核に局在する性質を促進することで、HIP1 が誘導する G2 期停止能を促進している可能性が示された。

MDM における HIV-1 感染に対する HIP1 の効果解析

HIP1 のノックダウンによる Vpr 誘導性 G2 期停止の抑制が部分的であるため、Vpr が HIP1 を介して G2 期停止を誘導する生物学的意義は明確ではない。そこで、Vpr と HIP1 の相互作用の重要性を示すために HIP1 ノックダウン細胞を用いた感染実験を行うことにした。本来ならば、同定された HIP1 が Vpr 誘導性 G2 期停止に関与する新規宿主因子であることから、細胞周期が進行している CD4 陽性リンパ球を用いて感染実験を行うべきである。しかし、これまでに CD4 陽性リンパ球を用いた HIV-1 感染では、Vpr がウイルス複製に及ぼす影響は明確では無かった(24)。一方で、MDM を用いた HIV-1 感染において、Vpr がウイルス複製を大きく促進していることやその促進に G2 期停止誘導能が関与していることが報告されている(19-21)。そこで、HIP1 をノックダウンした MDM を用いて HIV-1 感染に及ぼす HIP1 の影響を解析した。Vpr の有無で HIV-1 の感染性に差のある 2 検体から、PBMC を分画し、M-CSF を用いて MDM に分化誘導した。siRNA を用いて HIP1 をノックダウンした最終分化 MDM(図 19A)に、野性型および Vpr 欠損 VSV-G 偽ウイルスを接種した。マクロファージにお

ける VSV-G 偽ウイルスを用いた感染実験において、Vpr 依存的なルシフェラーゼ活性の増大は感染 6 日後にも認められることが報告されているため(90,91)、感染 6 日後にルシフェラーゼ活性の測定を行った。野性型 VSV-G 偽ウイルスを HIP1 をノックダウンした細胞に感染させた場合において、ルシフェラーゼ活性が Vpr 欠損 VSV-G 偽ウイルスを感染させた場合と同程度まで減少した(図 19B)。このことから、HIP1 は Vpr を介してマクロファージにおける HIV-1 感染を促進している可能性が示唆された。

2-4. 考察

本研究において、Vpr 誘導性 G2 期停止に関与する新規宿主因子として HIP1 の同定に成功した。Vpr は DCAF1 等とユビキチンリガーゼ複合体を形成し、DNA 二本鎖切断を誘導することで G2 期停止を引き起こすこと(33)が知られているが、HIP1 のノックダウンは Vpr 誘導性 DNA 二本鎖切断を抑制しなかった。しかしながら、HIP1 のノックダウンによる G2 期停止の抑制は約 70%だったのに対し、DCAF1 単独、または DCAF1 および HIP1 の両因子のノックダウンは Vpr 誘導性 G2 期停止を完全に抑制した。このことから、HIP1 を介した Vpr 誘導性 G2 期停止は、DNA 二本鎖切断を伴わないが DCAF1 に依存していることが示された。Vpr と HIP1 の結合を解析した結果、免疫沈降法により Vpr と内在性 HIP1 が結合することが、GST pull-down 法により Vpr と HIP1 が直接結合することが明らかになった。HIP1 の局在に対する Vpr の影響を調べたところ、Vpr 発現細胞において HIP1 の核局在の促進が認められた。また、HIP1 を単独で強制発現させた場合、HIP1 が核に局在する細胞において G2 期停止が認められた。これらの結果は、HIP1 が核に局在することで DNA 二本鎖切断を介さない経路で G2 期停止を誘導することを示唆している。すなわち、Vpr は HIP1 と結合することで HIP1 の核局在を促進し、HIP1 による G2 期停止誘導を惹起していると考えられる。さらに、Vpr の有無で感染性に差のある検体を用いて、MDM における HIV-1 感染に対する HIP1 のノックダウンの影響を解析した。その結果、Vpr を有するウイルスの感染性のみが HIP1 のノックダウンにより低下した。このことから、HIP1 が Vpr 特異的に MDM における HIV-1 の感染を促進している可能性が示唆された。

HIP1 のノックダウンは Vpr 誘導性 G2 期停止を部分的にしか抑制できなかった。一方で DCAF1 のノックダウンは、G2 期停止をほぼ 100%抑制した。これ

は、Vpr が HIP1 および DCAF1 を利用して G2 期停止を誘導する経路と、HIP1 を介さない経路で G2 期停止を誘導するためであると考えられる。事実、Vpr は DCAF1 等とユビキチンリガーゼ複合体を形成し、SLX4 の早期活性化を誘導し、DNA 二本鎖切断により G2 期停止を誘導する(26)。しかし、この SLX4 のノックダウンは本研究の HIP1 のデータと同様に G2 期停止を部分的にしか抑制できないことが報告された(26)。HIP1 のノックダウンが DNA 二本鎖切断を抑制せず、G2 期停止も完全には抑制できないことから、Vpr は SLX4 および HIP1 を介して、DNA 二本鎖切断に依存的な経路と非依存的な経路の 2 つの経路で G2 期停止を誘導すると考えられる。

Vpr 発現細胞において HIP1 の核局在の促進が認められた。どのような機構で HIP1 の核局在が促進されるかは明らかではないが、その可能性として次の 2 つ、1) 核移行の促進、および 2) 核外移行の抑制が、考えられる。Vpr の核移行機序については様々な報告があるが、当研究室においては、Vpr が Importin α と結合することで核移行することを報告している(20,41,42)。Vpr と HIP1 が結合することから、Importin α を介した Vpr の核移行の際に HIP1 も同時に核移行することによって、HIP1 の核局在が促進されるモデルが提唱される。一方で、Vpr は DCAF1 等と核内においてユビキチンリガーゼ複合体を形成していることが明らかになっている(77)。また、HIP1 を介した Vpr 誘導性 G2 期停止が DCAF1 に依存していること、および Vpr と HIP1 が結合していることが本研究により示された。これらのことから、核内に移行した HIP1 が Vpr と結合し、Vpr と DCAF1 により核内に停留させられることによって、核外移行が抑制され、その結果として核局在が促進される可能性も考えられる。これらの可能性を検証するためには、Vpr と HIP1 が細胞内のどこで結合するのかを明らかにすることが重要である。

HIP1 はシャトリングタンパク質として、HIPPI の核移行に必須である(92)。HIP1 を単独で強制発現させたとき、HIP1 が核局在している細胞においてわずかに G2 期停止が認められたことから、HIPPI が HIP1 による G2 期停止に関与している可能性が考えられる。HIPPI は転写制御因子として、様々な宿主因子の発現の制御を介して(92,93) 細胞周期の進行に関与している可能性が考えられる。HIP1 が核に局在している細胞における HIPPI の局在解析や、遺伝子発現を網羅的に解析することで、HIP1 による G2 期停止誘導機構が明らかになることが期待される。

近年、Vpr が MDM において、RNA サイレンシングに重要な RNase である Dicer をユビキチン・プロテアソーム系により分解し、ウイルス複製を促進させることが報告された(36)。このことから、MDM において HIP1 は Vpr が Dicer を分解するのを促進する役割を担っている可能性がある。具体的には、Vpr と HIP1 が直接結合することから、Dicer と Vpr の結合を HIP1 がより強固にする可能性や、HIP1 が Vpr と Dicer の結合を架橋する可能性等が考えられる。これらの可能性を検証するために、HIV-1 感染 MDM における HIP1 および Dicer の局在解析や結合解析が非常に重要であると考えられる。

Vpr は HIP1 を介して DNA 二本鎖切断非依存的に G2 期停止を誘導することが明らかになった。また、HIP1 が MDM における HIV-1 感染に Vpr 依存的に関与している可能性が示された。分裂細胞の HeLa 細胞と非分裂細胞の MDM という大きく異なる 2 種類の細胞において、Vpr が HIP1 という単一の分子を用いて機能を発揮するという事は非常に興味深い。また、HIP1 を介した Vpr 誘導性 G2 期停止は DNA 二本鎖切断を伴わないという点において、これまでに報告されてきた Vpr による G2 期停止の誘導機構とは大きく異なっている。DNA にダメージを与えず HIP1 を利用することで G2 期停止を誘導することが、果た

して HIV-1 感染にどのように影響を及ぼすのか、その意義の解明が期待される。さらに、HIP1 と Vpr の結合は新規抗ウイルス薬の標的になると考えられる。これまでに、Vpr 依存的な抗ウイルス効果を持つ化合物がいくつか報告されているが(90,91,94,95)、実際に臨床に使用されるような化合物は見つかっていない。しかし、多剤併用療法において耐性ウイルスの出現は大きな問題であり、異なる作用点を持った抗ウイルス薬の創製は、今後のエイズ治療に非常に重要であると考えられ、Vpr と HIP1 の結合は新たな標的となるのではないだろうか。

結論

HeLa/Fucci2 細胞および SCAT3.1 を用いることで、Vpr 誘導性 G2 期停止およびアポトーシスの可視化に成功した。その結果、Vpr は G2 期停止を誘導するにもかかわらず、G2 期ではなく主に M 期および G1 期においてアポトーシスを誘導することを明らかにした。さらに、Vpr 誘導性 G2 期停止が部分的にはあるが可逆的であること、Vpr がアポトーシスを誘導するためには Vpr の継続的な発現が重要であることが明らかになった。本研究で使用した、ライブイメージング技術は HIV-1 感染細胞に応用することも可能であり、今後、HIV-1 感染と細胞周期およびアポトーシスの関係性の解明が期待される。

さらに、Vpr 誘導性 G2 期停止関連因子を同定するための CELAVIEW RS100 を用いたスクリーニング系にて、新規 G2 期停止関連因子 HIP1 を同定した。また、Vpr は HIP1 の核局在の促進を介して、HIP1 による G2 期停止誘導を促進していることを明らかにした。加えて、Vpr を有する HIV-1 の MDM における感染を HIP1 が促進している可能性を示した。このことから、Vpr と HIP1 の結合が、新規抗ウイルス薬の標的となり得ると考えられる。

謝辞

本研究の機会を頂き、終始多大なるご指導を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科連携教授・理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニットユニットリーダー、間陽子先生に謹んで感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、P3施設の使用に関しての懇切丁寧なご指導を賜りました日本大学医学部産婦人科学系産婦人科学分野、山本樹生教授、血液内科学分野、武井正美准教授、微生物分野、黒田和道准教授に御礼申し上げます。

研究遂行にあたり、様々な協力をしていただいた理化学研究所脳科学研究センター細胞機能探索研究チーム宮脇敦史チームリーダー、坂上（沢野）朝子博士、理化学研究所 BSIーオリンパス連携センター、田島哲也氏、樋口香織氏、シンガポール大学医学部、山本直樹教授、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター、佐藤裕徳博士、大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課、駒野淳博士に深く感謝致します。

本論文の執筆にあたり、様々な助言を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科連携准教授・理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニット、竹嶋伸之輔先生に感謝致します。

本論文の執筆にあたり、多大な御指導、御鞭撻および厳正な審査を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科病態医療科学分野、渡邊俊樹教授、同ゲノム制御医科学分野、菅野純夫教授、同感染制御分野、川口寧教授、東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻宿主寄生体学分野、伊庭英夫教授に深く感

謝の意を表します。

終始ご協力を賜りました理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニット、佐藤洋隆博士、Chutiwitoonchai Nopporn 博士、大野歩博士、柿坂道範氏、Lowela Siarot 氏、Bai Lanlan 氏、Mairepati Palati 氏、橋本容子氏、石塚鮎子氏、浜田佳奈子氏、松本有生氏、菊谷真理氏に感謝いたします。

最後に、終始援助し支えてくれた両親、友人にこの場を借りて深く感謝の意を表します。

参考文献

1. Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A. and Saxon, A. (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *The New England journal of medicine*, **305**, 1425-1431.
2. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C. *et al.* (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 868-871.
3. Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E. and Gallo, R.C. (1984) Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*, **224**, 497-500.
4. Clavel, F., Guyader, M., Guetard, D., Salle, M., Montagnier, L. and Alizon, M. (1986) Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature*, **324**, 691-695.
5. Bagasra, O., Seshamma, T., Oakes, J.W. and Pomerantz, R.J. (1993) High percentages of CD4-positive lymphocytes harbor the HIV-1 provirus in the blood of certain infected individuals. *Aids*, **7**, 1419-1425.
6. Berger, E.A., Murphy, P.M. and Farber, J.M. (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and

- disease. *Annual review of immunology*, **17**, 657-700.
7. Bukrinsky, M.I., Sharova, N., Dempsey, M.P., Stanwick, T.L., Bukrinskaya, A.G., Haggerty, S. and Stevenson, M. (1992) Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 6580-6584.
 8. Allain, J.P., Laurian, Y., Paul, D.A. and Senn, D. (1986) Serological markers in early stages of human immunodeficiency virus infection in haemophiliacs. *Lancet*, **2**, 1233-1236.
 9. Goudsmit, J., de Wolf, F., Paul, D.A., Epstein, L.G., Lange, J.M., Krone, W.J., Speelman, H., Wolters, E.C., Van der Noordaa, J., Oleske, J.M. *et al.* (1986) Expression of human immunodeficiency virus antigen (HIV-Ag) in serum and cerebrospinal fluid during acute and chronic infection. *Lancet*, **2**, 177-180.
 10. Weber, J.N., Clapham, P.R., Weiss, R.A., Parker, D., Roberts, C., Duncan, J., Weller, I., Carne, C., Tedder, R.S., Pinching, A.J. *et al.* (1987) Human immunodeficiency virus infection in two cohorts of homosexual men: neutralising sera and association of anti-gag antibody with prognosis. *Lancet*, **1**, 119-122.
 11. Embretson, J., Zupancic, M., Ribas, J.L., Burke, A., Racz, P., Tenner-Racz, K. and Haase, A.T. (1993) Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature*, **362**, 359-362.
 12. Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J.F., Butini, L., Montroni, M.,

- Fox, C.H., Orenstein, J.M., Kotler, D.P. and Fauci, A.S. (1993) HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*, **362**, 355-358.
13. Simmonds, P., Balfe, P., Peutherer, J.F., Ludlam, C.A., Bishop, J.O. and Brown, A.J. (1990) Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *J Virol*, **64**, 864-872.
 14. Finzi, D. and Siliciano, R.F. (1998) Viral dynamics in HIV-1 infection. *Cell*, **93**, 665-671.
 15. Han, Y., Lassen, K., Monie, D., Sedaghat, A.R., Shimoji, S., Liu, X., Pierson, T.C., Margolick, J.B., Siliciano, R.F. and Siliciano, J.D. (2004) Resting CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes. *J Virol*, **78**, 6122-6133.
 16. Tristem, M., Marshall, C., Karpas, A. and Hill, F. (1992) Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpx and vpr. *The EMBO journal*, **11**, 3405-3412.
 17. Cohen, E.A., Dehni, G., Sodroski, J.G. and Haseltine, W.A. (1990) Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J Virol*, **64**, 3097-3099.
 18. Yuan, X., Matsuda, Z., Matsuda, M., Essex, M. and Lee, T.H. (1990) Human immunodeficiency virus vpr gene encodes a virion-associated protein. *AIDS research and human retroviruses*, **6**, 1265-1271.
 19. Connor, R.I., Chen, B.K., Choe, S. and Landau, N.R. (1995) Vpr is

- required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology*, **206**, 935-944.
20. Nitahara-Kasahara, Y., Kamata, M., Yamamoto, T., Zhang, X., Miyamoto, Y., Muneta, K., Iijima, S., Yoneda, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y. and Aida, Y. (2007) Novel nuclear import of Vpr promoted by importin alpha is crucial for human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages. *J Virol*, **81**, 5284-5293.
 21. Subbramanian, R.A., Kessous-Elbaz, A., Lodge, R., Forget, J., Yao, X.J., Bergeron, D. and Cohen, E.A. (1998) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr is a positive regulator of viral transcription and infectivity in primary human macrophages. *The Journal of experimental medicine*, **187**, 1103-1111.
 22. Lang, S.M., Weeger, M., Stahl-Hennig, C., Coulibaly, C., Hunsmann, G., Muller, J., Muller-Hermelink, H., Fuchs, D., Wachter, H., Daniel, M.M. *et al.* (1993) Importance of vpr for infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. *J Virol*, **67**, 902-912.
 23. Sato, K., Misawa, N., Iwami, S., Satou, Y., Matsuoka, M., Ishizaka, Y., Ito, M., Aihara, K., An, D.S. and Koyanagi, Y. (2013) HIV-1 Vpr Accelerates Viral Replication during Acute Infection by Exploitation of Proliferating CD4(+) T Cells In Vivo. *PLoS pathogens*, **9**, e1003812.
 24. Iijima, S., Nitahara-Kasahara, Y., Kimata, K., Zhong Zhuang, W., Kamata, M., Isogai, M., Miwa, M., Tsunetsugu-Yokota, Y. and Aida, Y. (2004) Nuclear localization of Vpr is crucial for the efficient replication of HIV-1 in primary CD4+ T cells. *Virology*, **327**, 249-261.

25. Morellet, N., Bouaziz, S., Petitjean, P. and Roques, B.P. (2003) NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR. *Journal of molecular biology*, **327**, 215-227.
26. Laguette, N., Bregnard, C., Hue, P., Basbous, J., Yatim, A., Larroque, M., Kirchhoff, F., Constantinou, A., Sobhian, B. and Benkirane, M. (2014) Premature Activation of the SLX4 Complex by Vpr Promotes G2/M Arrest and Escape from Innate Immune Sensing. *Cell*, **156**, 134-145.
27. Belzile, J.P., Duisit, G., Rougeau, N., Mercier, J., Finzi, A. and Cohen, E.A. (2007) HIV-1 Vpr-mediated G2 arrest involves the DDB1-CUL4AVPRBP E3 ubiquitin ligase. *PLoS pathogens*, **3**, e85.
28. DeHart, J.L., Zimmerman, E.S., Ardon, O., Monteiro-Filho, C.M., Arganaraz, E.R. and Planelles, V. (2007) HIV-1 Vpr activates the G2 checkpoint through manipulation of the ubiquitin proteasome system. *Virology journal*, **4**, 57.
29. Hrecka, K., Gierszewska, M., Srivastava, S., Kozackiewicz, L., Swanson, S.K., Florens, L., Washburn, M.P. and Skowronski, J. (2007) Lentiviral Vpr usurps Cul4-DDB1[VprBP] E3 ubiquitin ligase to modulate cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 11778-11783.
30. Le Rouzic, E., Belaidouni, N., Estrabaud, E., Morel, M., Rain, J.C., Transy, C. and Margottin-Goguet, F. (2007) HIV1 Vpr arrests the cell cycle by recruiting DCAF1/VprBP, a receptor of the Cul4-DDB1 ubiquitin ligase. *Cell cycle*, **6**, 182-188.

31. Schrofelbauer, B., Hakata, Y. and Landau, N.R. (2007) HIV-1 Vpr function is mediated by interaction with the damage-specific DNA-binding protein DDB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 4130-4135.
32. Wen, X., Duus, K.M., Friedrich, T.D. and de Noronha, C.M. (2007) The HIV1 protein Vpr acts to promote G2 cell cycle arrest by engaging a DDB1 and Cullin4A-containing ubiquitin ligase complex using VprBP/DCAF1 as an adaptor. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 27046-27057.
33. Zimmerman, E.S., Chen, J., Andersen, J.L., Ardon, O., Dehart, J.L., Blackett, J., Choudhary, S.K., Camerini, D., Nghiem, P. and Planelles, V. (2004) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-mediated G2 arrest requires Rad17 and Hus1 and induces nuclear BRCA1 and gamma-H2AX focus formation. *Molecular and cellular biology*, **24**, 9286-9294.
34. Zimmerman, E.S., Sherman, M.P., Blackett, J.L., Neidleman, J.A., Kreis, C., Mundt, P., Williams, S.A., Warmerdam, M., Kahn, J., Hecht, F.M. *et al.* (2006) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces DNA replication stress in vitro and in vivo. *J Virol*, **80**, 10407-10418.
35. Huang, C.Y., Chiang, S.F., Lin, T.Y., Chiou, S.H. and Chow, K.C. (2012) HIV-1 Vpr Triggers Mitochondrial Destruction by Impairing Mfn2-Mediated ER-Mitochondria Interaction. *PLoS One*, **7**, e33657.
36. Casey Klockow, L., Sharifi, H.J., Wen, X., Flagg, M., Furuya, A.K., Nekorchuk, M. and de Noronha, C.M. (2013) The HIV-1 protein Vpr

- targets the endoribonuclease Dicer for proteasomal degradation to boost macrophage infection. *Virology*, **444**, 191-202.
37. Hashizume, C., Kuramitsu, M., Zhang, X., Kurosawa, T., Kamata, M. and Aida, Y. (2007) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with spliceosomal protein SAP145 to mediate cellular pre-mRNA splicing inhibition. *Microbes Infect*, **9**, 490-497.
 38. Kuramitsu, M., Hashizume, C., Yamamoto, N., Azuma, A., Kamata, M., Yamamoto, N., Tanaka, Y. and Aida, Y. (2005) A novel role for Vpr of human immunodeficiency virus type 1 as a regulator of the splicing of cellular pre-mRNA. *Microbes Infect*, **7**, 1150-1160.
 39. Zhang, X. and Aida, Y. (2009) HIV-1 Vpr: a novel role in regulating RNA splicing. *Curr HIV Res*, **7**, 163-168.
 40. Kino, T., Gragerov, A., Slobodskaya, O., Tsopanomichalou, M., Chrousos, G.P. and Pavlakis, G.N. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) accessory protein Vpr induces transcription of the HIV-1 and glucocorticoid-responsive promoters by binding directly to p300/CBP coactivators. *J Virol*, **76**, 9724-9734.
 41. Aida, Y. and Matsuda, G. (2009) Role of Vpr in HIV-1 nuclear import: therapeutic implications. *Curr HIV Res*, **7**, 136-143.
 42. Kamata, M., Nitahara-Kasahara, Y., Miyamoto, Y., Yoneda, Y. and Aida, Y. (2005) Importin-alpha promotes passage through the nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol*, **79**, 3557-3564.
 43. Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M.A., Ratner, L.,

- Lane, C.M., Moore, M.S., Blobel, G. and Bukrinsky, M. (1998) Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *The EMBO journal*, **17**, 909-917.
44. Felzien, L.K., Woffendin, C., Hottiger, M.O., Subbramanian, R.A., Cohen, E.A. and Nabel, G.J. (1998) HIV transcriptional activation by the accessory protein, VPR, is mediated by the p300 co-activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 5281-5286.
45. Goh, W.C., Rogel, M.E., Kinsey, C.M., Michael, S.F., Fultz, P.N., Nowak, M.A., Hahn, B.H. and Emerman, M. (1998) HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nature medicine*, **4**, 65-71.
46. Planelles, V., Jowett, J.B., Li, Q.X., Xie, Y., Hahn, B. and Chen, I.S. (1996) Vpr-induced cell cycle arrest is conserved among primate lentiviruses. *J Virol*, **70**, 2516-2524.
47. Stivahtis, G.L., Soares, M.A., Vodicka, M.A., Hahn, B.H. and Emerman, M. (1997) Conservation and host specificity of Vpr-mediated cell cycle arrest suggest a fundamental role in primate lentivirus evolution and biology. *J Virol*, **71**, 4331-4338.
48. Ayyavoo, V., Mahboubi, A., Mahalingam, S., Ramalingam, R., Kudchodkar, S., Williams, W.V., Green, D.R. and Weiner, D.B. (1997) HIV-1 Vpr suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor kappa B. *Nature medicine*, **3**, 1117-1123.
49. Majumder, B., Venkatachari, N.J., Srinivasan, A. and Ayyavoo, V.

- (2009) HIV-1 mediated immune pathogenesis: spotlight on the role of viral protein R (Vpr). *Curr HIV Res*, **7**, 169-177.
50. Thieu, K.P., Morrow, M.P., Shedlock, D.J., Schoenly, K.A., Mallilankaraman, K., Choo, A.Y., Fagone, P., Weiner, D.B. and Muthumani, K. (2009) HIV-1 Vpr: regulator of viral survival. *Curr HIV Res*, **7**, 153-162.
51. Zhu, Y., Gelbard, H.A., Roshal, M., Pursell, S., Jamieson, B.D. and Planelles, V. (2001) Comparison of cell cycle arrest, transactivation, and apoptosis induced by the simian immunodeficiency virus SIVagm and human immunodeficiency virus type 1 vpr genes. *J Virol*, **75**, 3791-3801.
52. Andersen, J.L., DeHart, J.L., Zimmerman, E.S., Ardon, O., Kim, B., Jacquot, G., Benichou, S. and Planelles, V. (2006) HIV-1 Vpr-induced apoptosis is cell cycle dependent and requires Bax but not ANT. *PLoS pathogens*, **2**, e127.
53. Lum, J.J., Cohen, O.J., Nie, Z., Weaver, J.G., Gomez, T.S., Yao, X.J., Lynch, D., Pilon, A.A., Hawley, N., Kim, J.E. *et al.* (2003) Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *The Journal of clinical investigation*, **111**, 1547-1554.
54. Somasundaran, M., Sharkey, M., Brichacek, B., Luzuriaga, K., Emerman, M., Sullivan, J.L. and Stevenson, M. (2002) Evidence for a cytopathogenicity determinant in HIV-1 Vpr. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**,

9503-9508.

55. Jacotot, E., Ravagnan, L., Loeffler, M., Ferri, K.F., Vieira, H.L., Zamzami, N., Costantini, P., Druillennec, S., Hoebeke, J., Briand, J.P. *et al.* (2000) The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *The Journal of experimental medicine*, **191**, 33-46.
56. Vieira, H.L., Haouzi, D., El Hamel, C., Jacotot, E., Belzacq, A.S., Brenner, C. and Kroemer, G. (2000) Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell death and differentiation*, **7**, 1146-1154.
57. Azuma, A., Matsuo, A., Suzuki, T., Kurosawa, T., Zhang, X. and Aida, Y. (2006) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces cell cycle arrest at the G(1) phase and apoptosis via disruption of mitochondrial function in rodent cells. *Microbes Infect*, **8**, 670-679.
58. Nishizawa, M., Kamata, M., Katsumata, R. and Aida, Y. (2000) A carboxy-terminally truncated form of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein induces apoptosis via G(1) cell cycle arrest. *J Virol*, **74**, 6058-6067.
59. Nishizawa, M., Kamata, M., Mojin, T., Nakai, Y. and Aida, Y. (2000) Induction of apoptosis by the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 occurs independently of G(2) arrest of the cell cycle. *Virology*, **276**, 16-26.
60. Nishizawa, M., Myojin, T., Nishino, Y., Nakai, Y., Kamata, M. and

- Aida, Y. (1999) A carboxy-terminally truncated form of the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 retards cell proliferation independently of G(2) arrest of the cell cycle. *Virology*, **263**, 313-322.
61. Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H. *et al.* (2008) Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*, **132**, 487-498.
62. Sakaue-Sawano, A., Kobayashi, T., Ohtawa, K. and Miyawaki, A. (2011) Drug-induced cell cycle modulation leading to cell-cycle arrest, nuclear mis-segregation, or endoreplication. *BMC cell biology*, **12**, 2.
63. Luo, K.Q., Yu, V.C., Pu, Y. and Chang, D.C. (2001) Application of the fluorescence resonance energy transfer method for studying the dynamics of caspase-3 activation during UV-induced apoptosis in living HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **283**, 1054-1060.
64. Tyas, L., Brophy, V.A., Pope, A., Rivett, A.J. and Tavaré, J.M. (2000) Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *EMBO reports*, **1**, 266-270.
65. Nagai, T. and Miyawaki, A. (2004) A high-throughput method for development of FRET-based indicators for proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun*, **319**, 72-77.
66. Banaszynski, L.A., Chen, L.C., Maynard-Smith, L.A., Ooi, A.G. and Wandless, T.J. (2006) A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *Cell*, **126**, 995-1004.

67. Nishino, Y., Myojin, T., Kamata, M. and Aida, Y. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr gene product prevents cell proliferation on mouse NIH3T3 cells without the G2 arrest of the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun*, **232**, 550-554.
68. Di Marzio, P., Choe, S., Ebright, M., Knoblauch, R. and Landau, N.R. (1995) Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol*, **69**, 7909-7916.
69. Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Valent, A., Raslova, H., Yakushijin, K., Horne, D., Feunteun, J., Lenoir, G., Medema, R. *et al.* (2004) Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene*, **23**, 4362-4370.
70. Jowett, J.B., Planelles, V., Poon, B., Shah, N.P., Chen, M.L. and Chen, I.S. (1995) The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol*, **69**, 6304-6313.
71. Rogel, M.E., Wu, L.I. and Emerman, M. (1995) The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J Virol*, **69**, 882-888.
72. Shimura, M., Tanaka, Y., Nakamura, S., Minemoto, Y., Yamashita, K., Hatake, K., Takaku, F. and Ishizaka, Y. (1999) Micronuclei formation and aneuploidy induced by Vpr, an accessory gene of human immunodeficiency virus type 1. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **13**,

621-637.

73. Shimura, M., Toyoda, Y., Iijima, K., Kinomoto, M., Tokunaga, K., Yoda, K., Yanagida, M., Sata, T. and Ishizaka, Y. (2011) Epigenetic displacement of HP1 from heterochromatin by HIV-1 Vpr causes premature sister chromatid separation. *The Journal of cell biology*, **194**, 721-735.
74. Watanabe, N., Yamaguchi, T., Akimoto, Y., Rattner, J.B., Hirano, H. and Nakauchi, H. (2000) Induction of M-phase arrest and apoptosis after HIV-1 Vpr expression through uncoupling of nuclear and centrosomal cycle in HeLa cells. *Experimental cell research*, **258**, 261-269.
75. Sakai, K., Dimas, J. and Lenardo, M.J. (2006) The Vif and Vpr accessory proteins independently cause HIV-1-induced T cell cytopathicity and cell cycle arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 3369-3374.
76. Wang, J., Reuschel, E.L., Shackelford, J.M., Jeang, L., Shivers, D.K., Diehl, J.A., Yu, X.F. and Finkel, T.H. (2011) HIV-1 Vif promotes the G₁ to S-phase cell-cycle transition. *Blood*, **117**, 1260-1269.
77. Belzile, J.P., Abrahamyan, L.G., Gerard, F.C., Rougeau, N. and Cohen, E.A. (2010) Formation of mobile chromatin-associated nuclear foci containing HIV-1 Vpr and VPRBP is critical for the induction of G₂ cell cycle arrest. *PLoS pathogens*, **6**, e1001080.
78. Maudet, C., Bertrand, M., Le Rouzic, E., Lahouassa, H., Ayinde, D., Nisole, S., Goujon, C., Cimarelli, A., Margottin-Goguet, F. and Transy,

- C. (2011) Molecular insight into how HIV-1 Vpr protein impairs cell growth through two genetically distinct pathways. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 23742-23752.
79. Li, G., Park, H.U., Liang, D. and Zhao, R.Y. (2010) Cell cycle G2/M arrest through an S phase-dependent mechanism by HIV-1 viral protein R. *Retrovirology*, **7**, 59.
80. Belzile, J.P., Richard, J., Rougeau, N., Xiao, Y. and Cohen, E.A. (2010) HIV-1 Vpr induces the K48-linked polyubiquitination and proteasomal degradation of target cellular proteins to activate ATR and promote G2 arrest. *J Virol*, **84**, 3320-3330.
81. Tan, L., Ehrlich, E. and Yu, X.F. (2007) DDB1 and Cul4A are required for human immunodeficiency virus type 1 Vpr-induced G2 arrest. *J Virol*, **81**, 10822-10830.
82. Kalchman, M.A., Koide, H.B., McCutcheon, K., Graham, R.K., Nichol, K., Nishiyama, K., Kazemi-Esfarjani, P., Lynn, F.C., Wellington, C., Metzler, M. *et al.* (1997) HIP1, a human homologue of *S. cerevisiae* Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. *Nature genetics*, **16**, 44-53.
83. Wanker, E.E., Rovira, C., Scherzinger, E., Hasenbank, R., Walter, S., Tait, D., Colicelli, J. and Lehrach, H. (1997) HIP-I: a huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. *Human molecular genetics*, **6**, 487-495.
84. Reddy, P.H., Williams, M. and Tagle, D.A. (1999) Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends in*

- neurosciences*, **22**, 248-255.
85. Gottfried, I., Ehrlich, M. and Ashery, U. (2010) The Sla2p/HIP1/HIP1R family: similar structure, similar function in endocytosis? *Biochemical Society transactions*, **38**, 187-191.
 86. Hyun, T.S., Rao, D.S., Saint-Dic, D., Michael, L.E., Kumar, P.D., Bradley, S.V., Mizukami, I.F., Oravecz-Wilson, K.I. and Ross, T.S. (2004) HIP1 and HIP1r stabilize receptor tyrosine kinases and bind 3-phosphoinositides via epsin N-terminal homology domains. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 14294-14306.
 87. Mishra, S.K., Agostinelli, N.R., Brett, T.J., Mizukami, I., Ross, T.S. and Traub, L.M. (2001) Clathrin- and AP-2-binding sites in HIP1 uncover a general assembly role for endocytic accessory proteins. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 46230-46236.
 88. Hyun, T.S. and Ross, T.S. (2004) HIP1: trafficking roles and regulation of tumorigenesis. *Trends in molecular medicine*, **10**, 194-199.
 89. Mills, I.G., Gaughan, L., Robson, C., Ross, T., McCracken, S., Kelly, J. and Neal, D.E. (2005) Huntingtin interacting protein 1 modulates the transcriptional activity of nuclear hormone receptors. *The Journal of cell biology*, **170**, 191-200.
 90. Ong, E.B., Watanabe, N., Saito, A., Futamura, Y., Abd El Galil, K.H., Koito, A., Najimudin, N. and Osada, H. (2011) Vipirinin, a coumarin-based HIV-1 Vpr inhibitor, interacts with a hydrophobic region of VPR. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 14049-14056.

91. Watanabe, N., Nishihara, Y., Yamaguchi, T., Koito, A., Miyoshi, H., Kakeya, H. and Osada, H. (2006) Fumagillin suppresses HIV-1 infection of macrophages through the inhibition of Vpr activity. *FEBS letters*, **580**, 2598-2602.
92. Banerjee, M., Datta, M., Majumder, P., Mukhopadhyay, D. and Bhattacharyya, N.P. (2010) Transcription regulation of caspase-1 by R393 of HIPPI and its molecular partner HIP-1. *Nucleic acids research*, **38**, 878-892.
93. Datta, M., Choudhury, A., Lahiri, A. and Bhattacharyya, N.P. (2011) Genome wide gene expression regulation by HIP1 Protein Interactor, HIPPI: prediction and validation. *BMC genomics*, **12**, 463.
94. Kamata, M., Wu, R.P., An, D.S., Saxe, J.P., Damoiseaux, R., Phelps, M.E., Huang, J. and Chen, I.S. (2006) Cell-based chemical genetic screen identifies damnacanthal as an inhibitor of HIV-1 Vpr induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, **348**, 1101-1106.
95. Suzuki, T., Yamamoto, N., Nonaka, M., Hashimoto, Y., Matsuda, G., Takeshima, S.N., Matsuyama, M., Igarashi, T., Miura, T., Tanaka, R. *et al.* (2009) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr-Importin alpha interactions as a novel HIV-1 therapy. *Biochem Biophys Res Commun*, **380**, 838-843.

図表

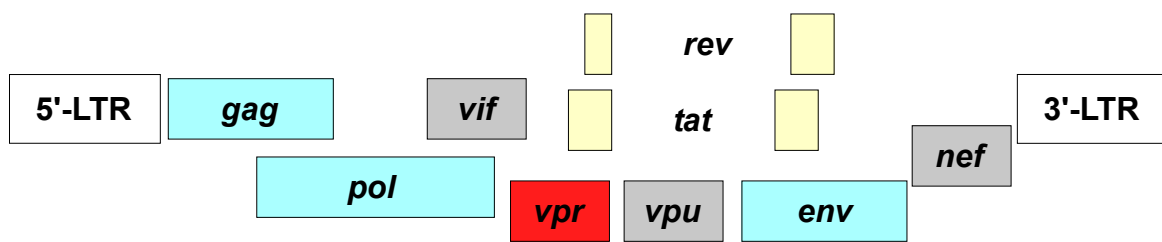


図1 HIV-1ゲノムの構造

HIV-1は、すべてのレトロウイルスに共通な構造遺伝子 *gag*、*pol*、*env*、調節遺伝子 *tat*、*rev* に加え、アクセサリー遺伝子 *vpr*、*vpu*、*vif*、*nef* を有している。

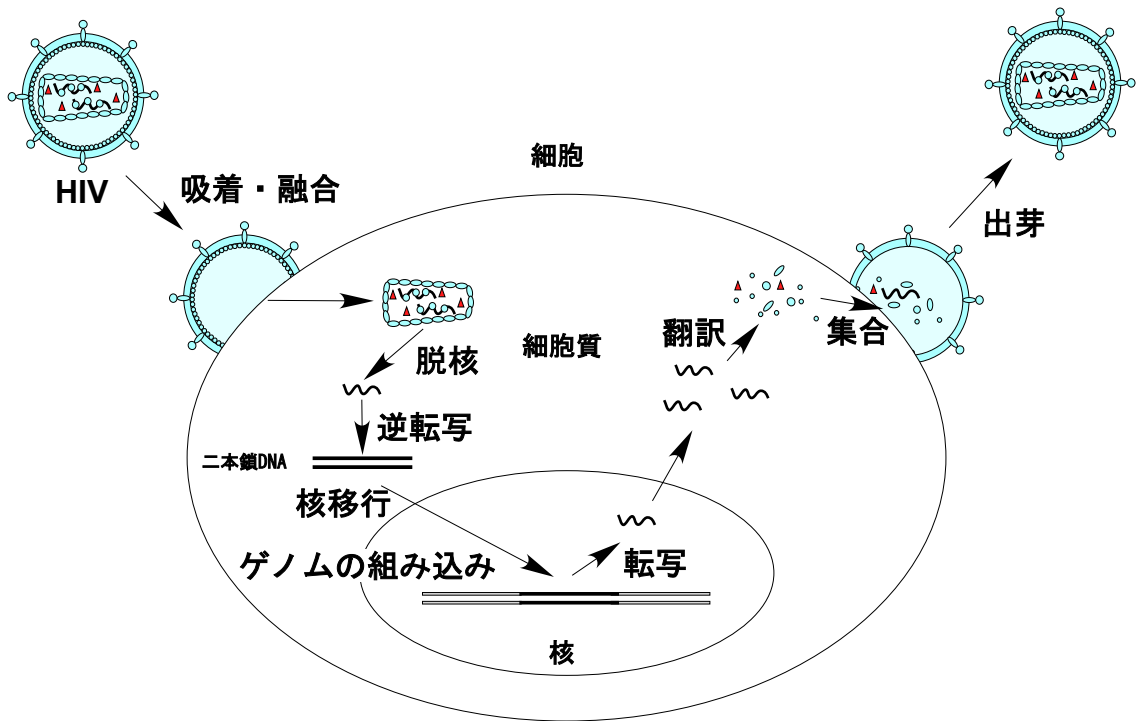
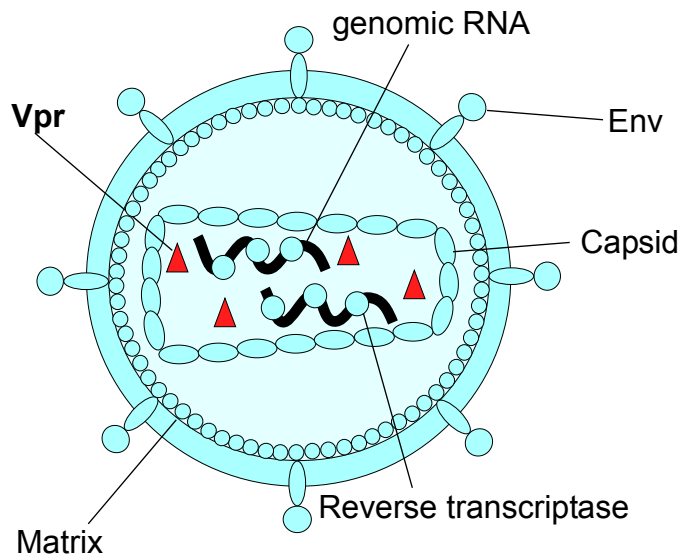
A**B**

図2 HIV-1の生活環と粒子構造

(A) HIV-1は宿主細胞に吸着・融合後、脱核する。ゲノムRNAがDNAに逆転写され、preintegration complexを形成し核移行した後にゲノムを宿主ゲノムに組み込み、プロウイルスとなる。プロウイルスからの転写後、新たなウイルス粒子が形成され、細胞から出芽する。

(B) HIV-1の粒子構造を示す。粒子内にはVpr (赤) が取り込まれている。

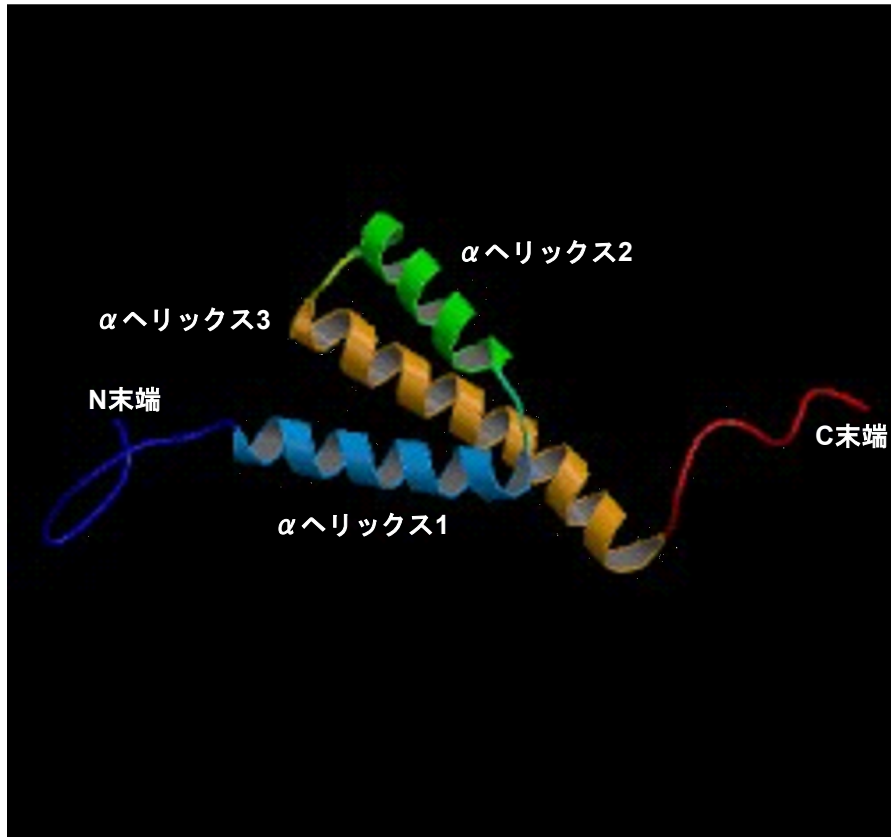


図3 HIV-1 Vprの立体構造
HIV-1 Vprは3つの α ヘリックス構造を形成している。

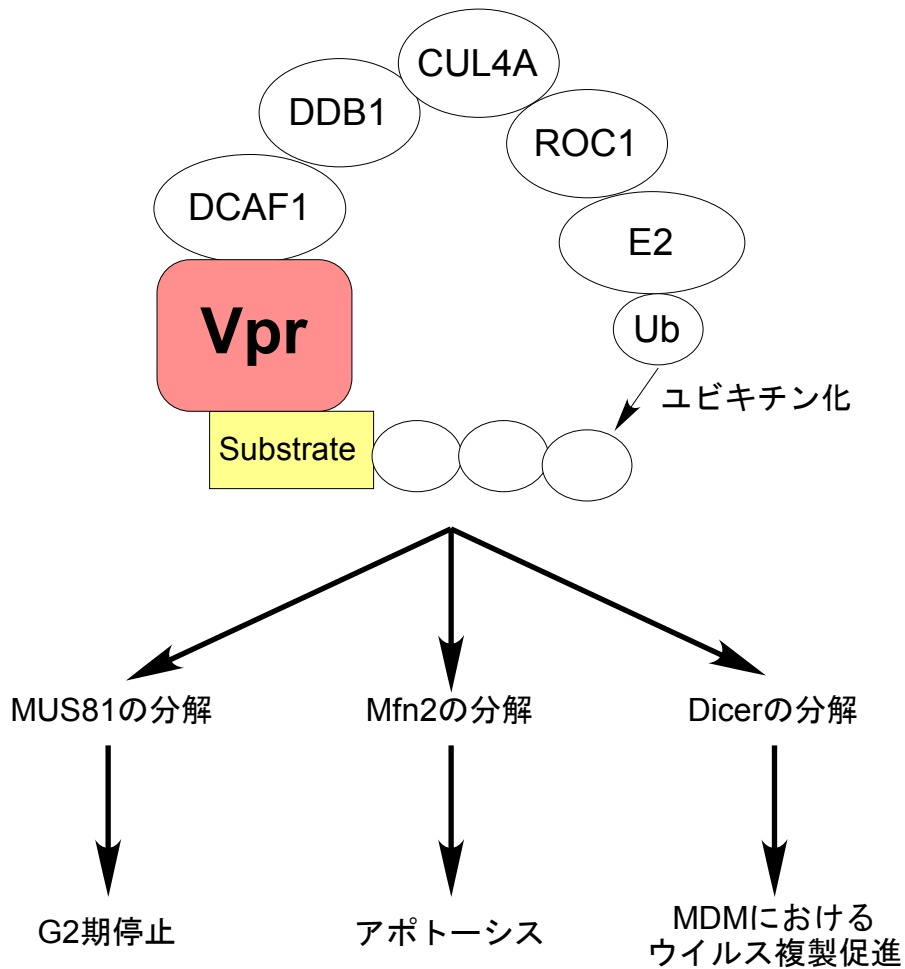


図4 Vprの機能と宿主因子の分解

VprはDCAF1、DDB1、CUL4A等とユビキチンリガーゼ複合体を形成し、様々な宿主因子を分解することで機能を発揮する。

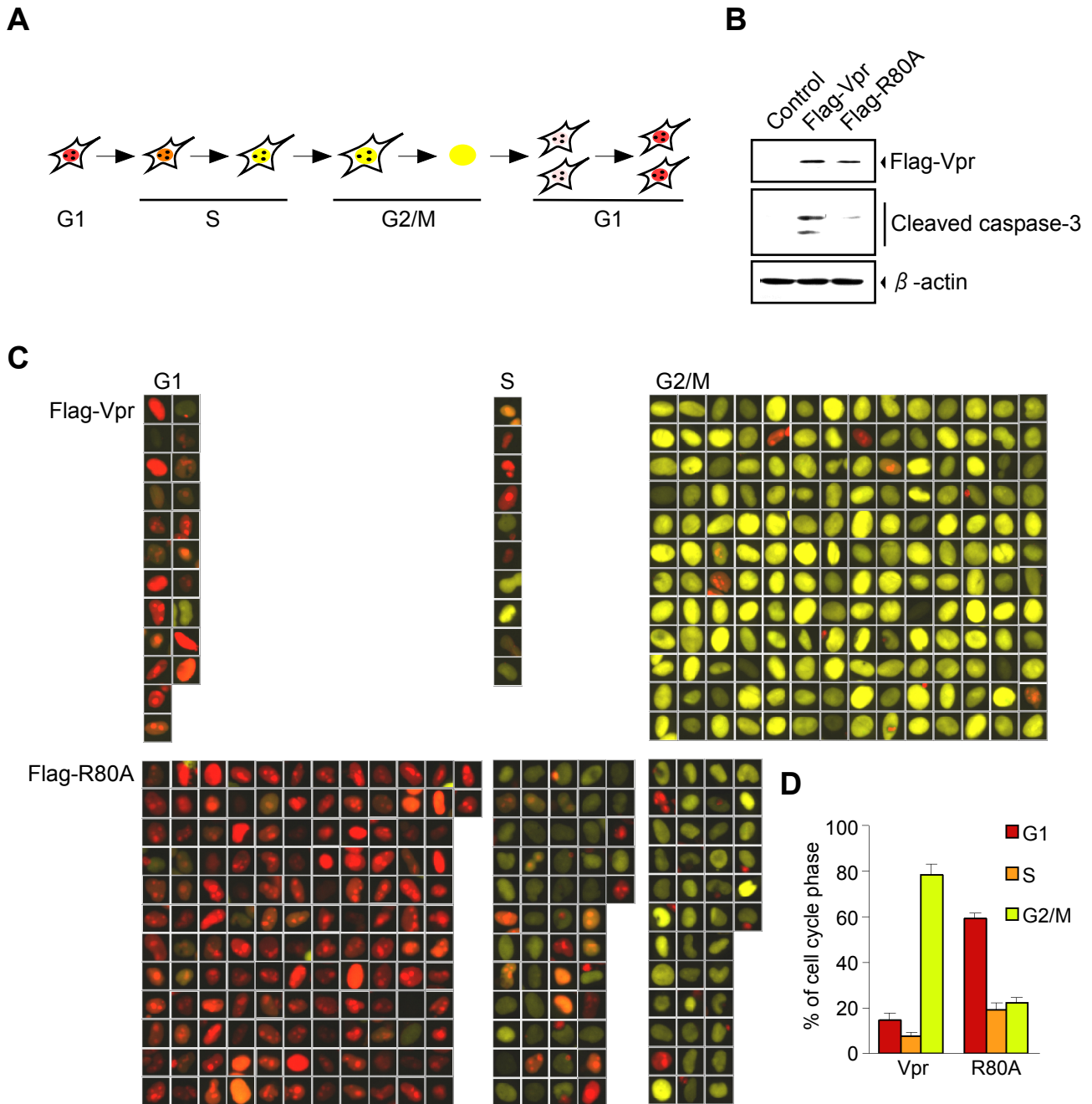


図5 HeLa/Fucci2細胞におけるVpr誘導性アポトーシスとG2期停止の解析

(A)HeLa/Fucci2細胞における細胞周期の進行に伴う蛍光の変化。

(B-D)HeLa/Fucci2細胞にpME18Neo-FVpr、pME18NeoまたはpME18Neo-R80Aを導入し、72時間培養した。

(B)Flag-Vprおよび活性型Caspase-3の発現をWestern blotにより検出した。

(C)Flag-VprおよびFlag-R80A発現細胞における細胞周期をCELAVIEW RS100にて解析し、細胞周期ごとの画像を示した。

(D)Flag-VprおよびFlag-R80A発現細胞における細胞周期の割合を算出した。

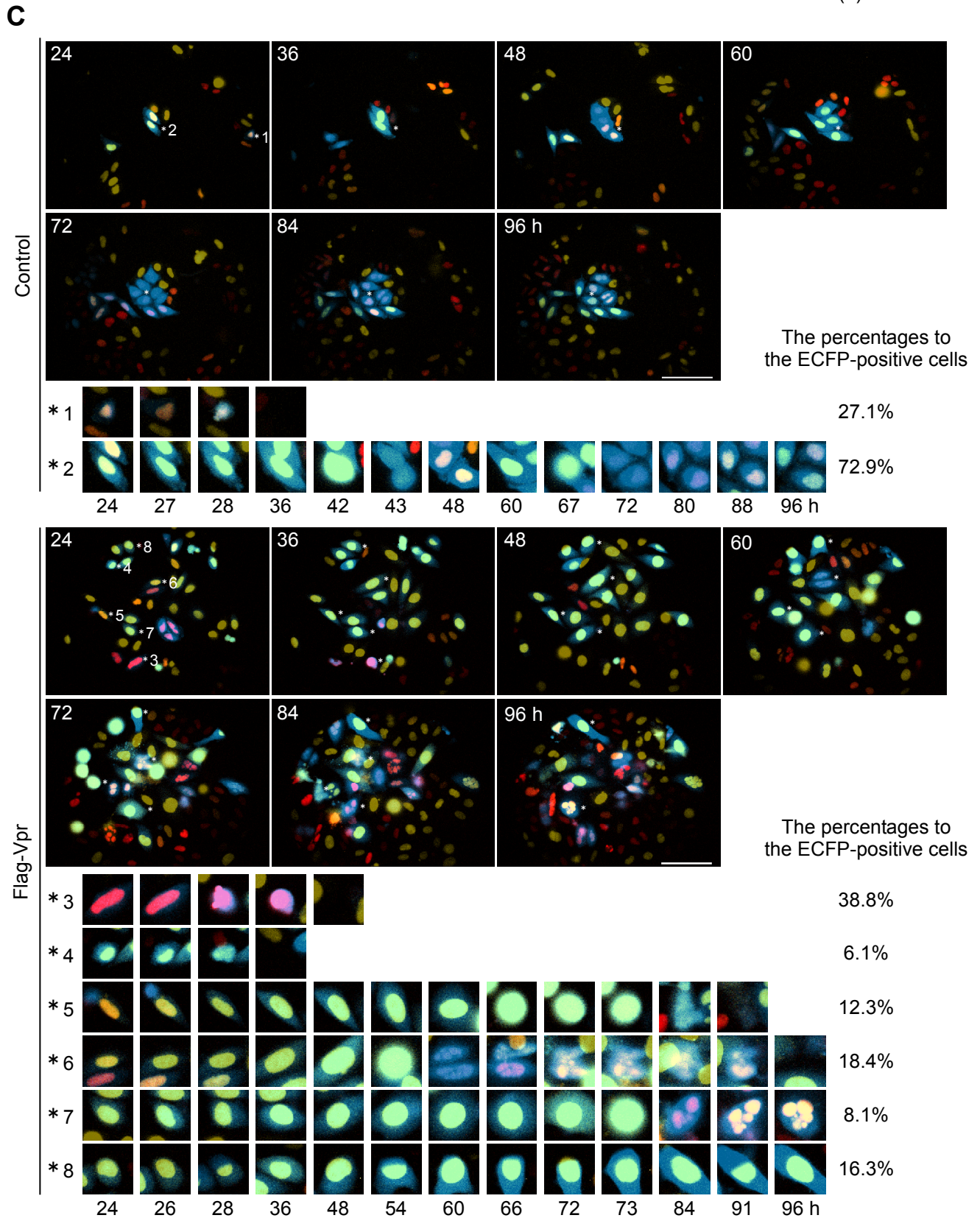
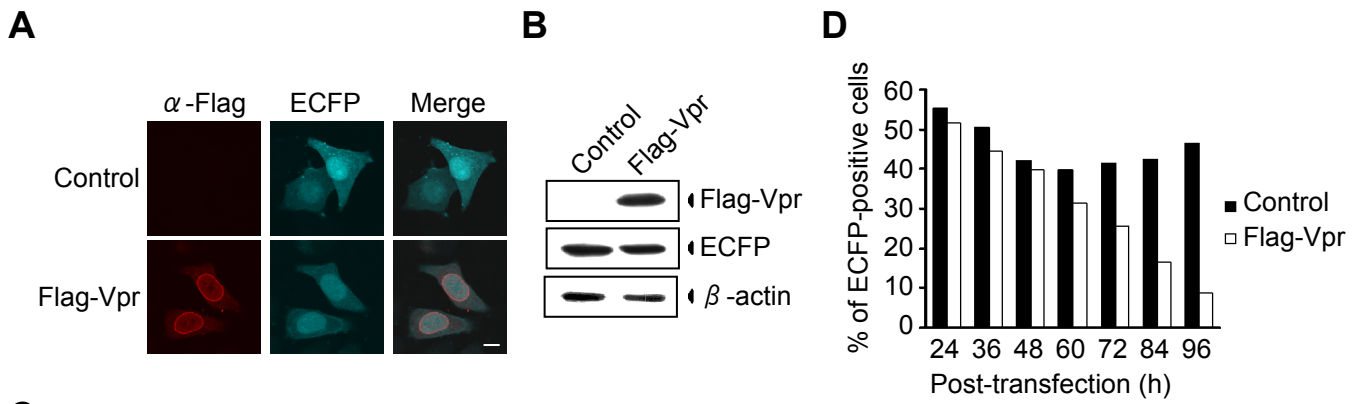


図6 HeLa/Fucci2細胞におけるVpr誘導性G2期停止とアポトーシスのライブイメージング

(A)HeLa細胞にpME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ECFPまたはpME18Neo/Flag-IRES-ECFPを導入し、24時間後におけるFlag-VprおよびECFPの発現を蛍光抗体法により解析した。

(B-D)HeLa/Fucci2細胞にpME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ECFPまたはpME18Neo/Flag-IRES-ECFPを導入し、24時間培養した。

(B)細胞を回収し、Flag-VprおよびECFPの発現をWestern blotにより解析した。

(C)LCV110を用いて、15分間隔で72時間、ECFP発現細胞のライブイメージングを行った。細胞周期の動態と細胞死の代表的な8種類のパターン(*1-8)を示した。時間はトランスフェクション後の時間、スケールバーは100 μ mを示す。

(D)ECFP発現細胞の割合の変化を算出した。

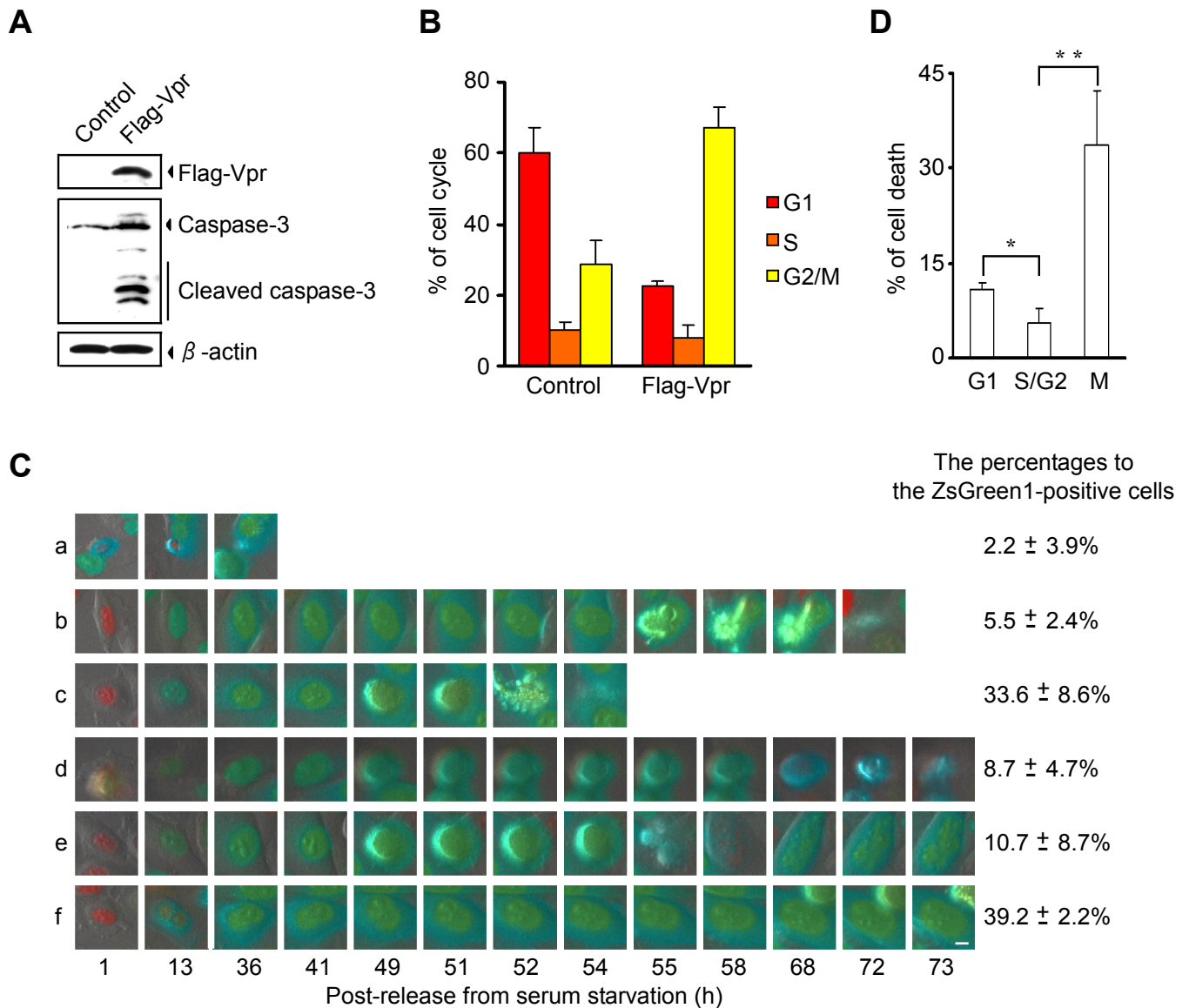


図7 細胞周期を同調させたHeLa/Fucci2細胞におけるVpr誘導性G2期停止とアポトーシスのライブイメージング

(A-B) HeLa細胞にpAdeno-X/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1またはpAdeno-X/IRES-ZsGreen1をMOI=100で感染させ、72時間培養した。

(A) Flag-Vpr、ZsGreen1および活性型Caspase-3の発現をWestern blotにより解析した。

(B) ZsGreen1陽性細胞における細胞周期をCELAVIEW RS100にて解析した。

(C and D) HeLa/Fucci2細胞にpAdeno-X/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1を0.3% FBS含有DMEMを培地としてMOI=50で感染させ、23時間培養した。培地を交換した後、LCV110を用いて、15分間隔で72時間、ZsGreen1陽性細胞のライブイメージングを行った。

(C) 細胞周期の動態と細胞死の代表的な6種類のパターン(a-f)を示した。スケールバーは5 μ mを示す。

(D) ZsGreen1陽性細胞が細胞死を起こした細胞周期の割合を算出した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ とし、p値はStudent t testにより算出した。

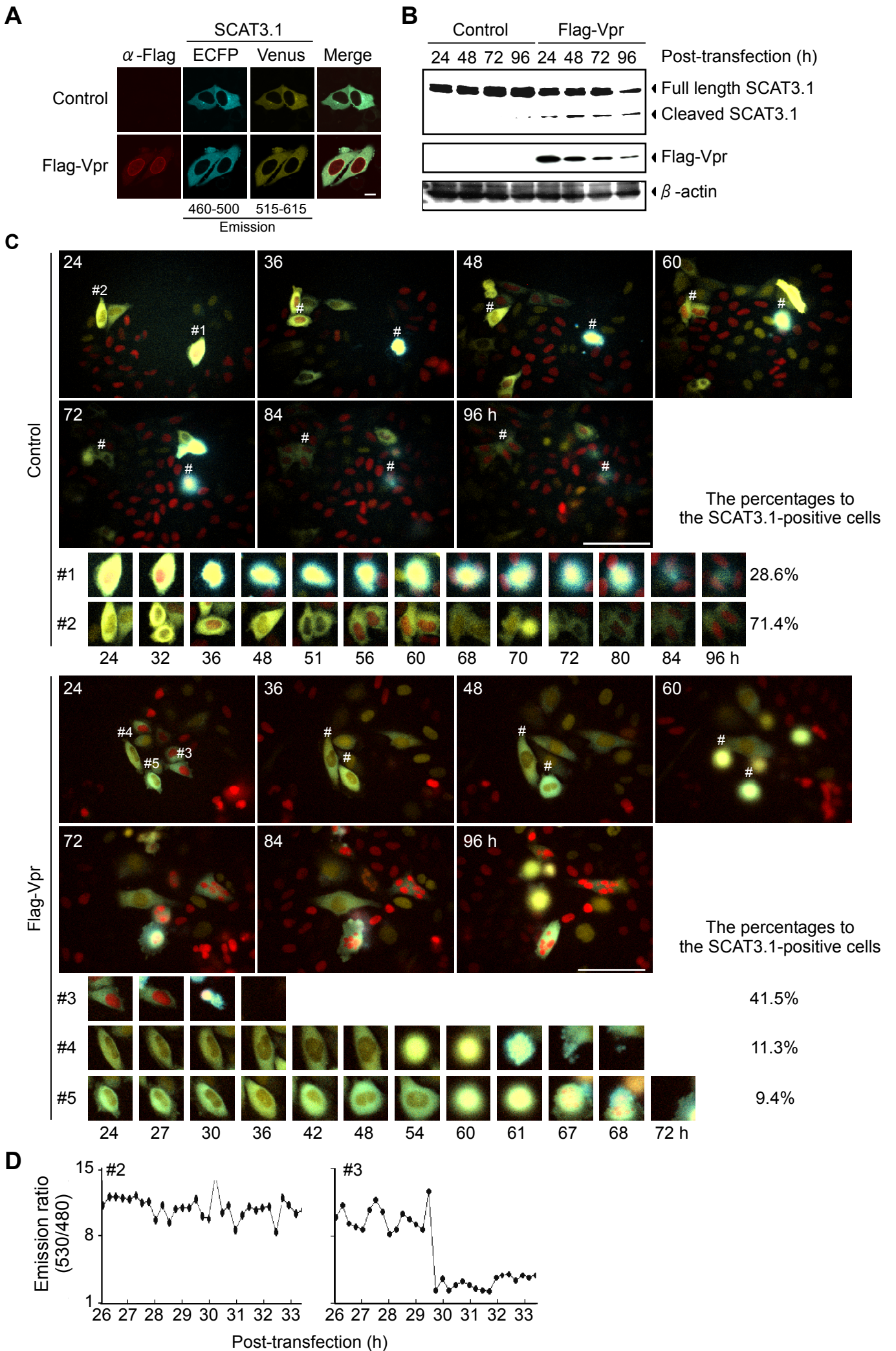


図8 SCAT3.1およびHeLa/Fucci2細胞を用いたVpr誘導性アポトーシスとG2期停止のライブイメージング

(A)HeLa細胞にpME18Neo/Flag-Vpr-IRES-SCAT3.1またはpME18Neo/Flag-IRES-SCAT3.1を導入し、24時間後におけるFlag-VprおよびSCAT3.1の発現を蛍光抗体法により解析した。SCAT3.1は440 nmの光で励起し、460-500 nmおよび515-615 nmの蛍光をそれぞれ検出した。

(B-D)HeLa/Fucci2細胞にpME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ECFPまたはpME18Neo/Flag-IRES-ECFPを導入し、24時間培養した。

(B)細胞を回収し、Flag-VprおよびSCAT3.1の発現の変化をWestern blotにより解析した。

(C)LCV110を用いて、15分間隔で72時間、SCAT3.1発現細胞のライブイメージングを行った。細胞周期の動態とアポトーシスの代表的な5種類のパターン(#1-5)を示した。時間はトランスフェクション後の時間、スケールバーは100 μ mを示す。

(D)#2および#3細胞のベクター導入後26時間から33時間における530/480の値を測定した。

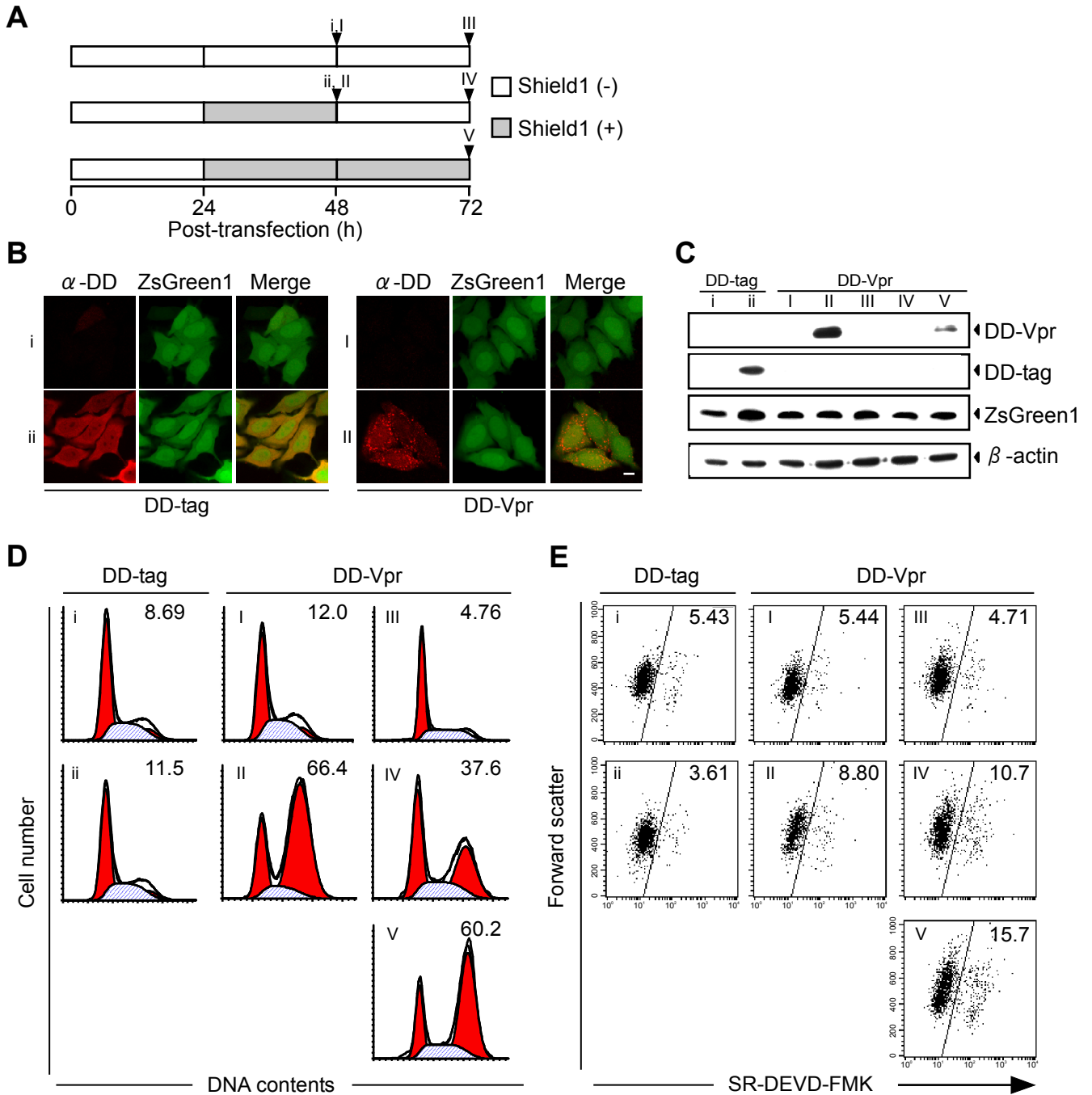


図9 DD-Vprを用いたVpr誘導性G2期停止およびアポトーシスの解析

(A)Shield1処理の方法を示した。HeLa細胞にpME18Neo/DD-Vpr-IRES-ZsGreen1(I-V)またはpME18Neo/DD-IRES-ZsGreen1(i and ii)を導入し、24時間培養した。細胞を500 nMのShield1を含まない培地(i and I)およびShield1を含む培地(ii and II)で24時間培養し、Shield1を洗い流した。Shield1を含まない培地(IV)またはShield1を含む培地(V)において、さらに24時間培養した。

(B)i、ii、I、IIにおけるDD-VprおよびZsGreen1の発現を蛍光抗体法により解析した。スケールバーは10 μ mを示す。

(C)i、ii、I、II、III、IV、Vにおいて細胞を回収し、DD-Vpr、DD-tag、およびZsGreen1の発現をWestern blotにより解析した。

(D)i、ii、I、II、III、IV、Vにおいて細胞を回収し、フローサイトメーターを用いてZsGreen1陽性細胞の細胞周期を解析した。右上の数字はG2/M期の細胞の割合を示す。

(E)i、ii、I、II、III、IV、Vにおいて細胞を回収し、フローサイトメーターを用いてZsGreen1陽性細胞のCaspase-3の活性を解析した。右上の数字は活性型Caspase-3陽性細胞の割合を示す。

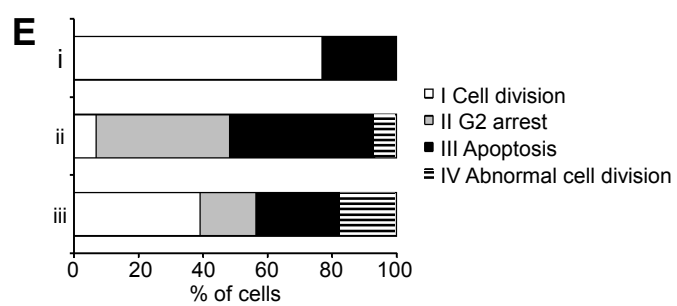
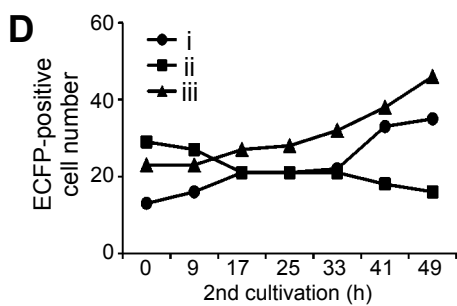
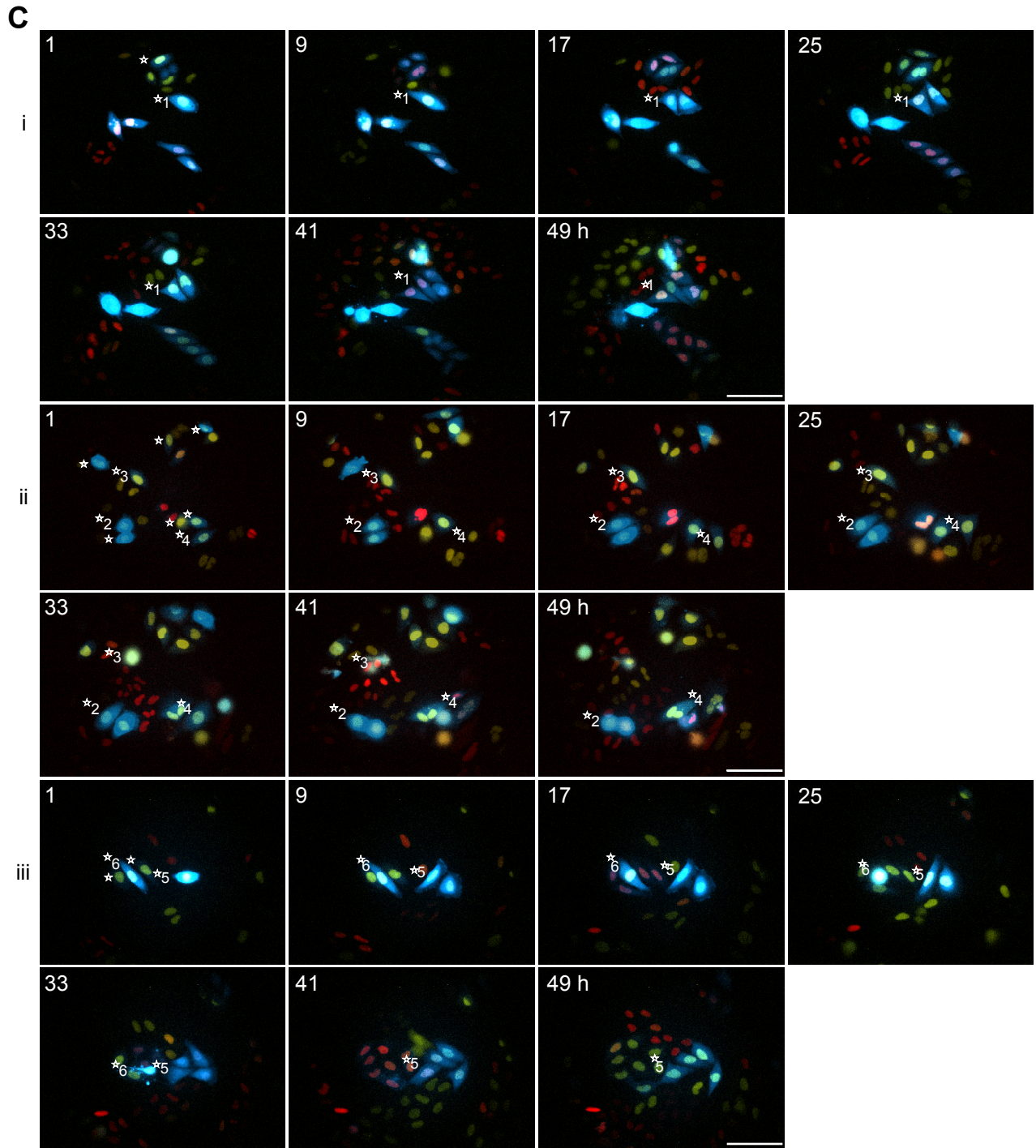
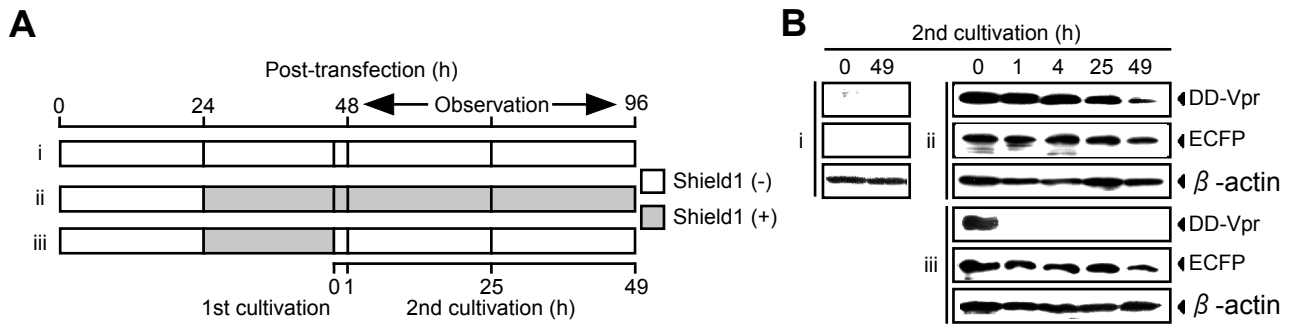


図10 DD-VprおよびHeLa/Fucci2細胞を用いたライブイメージングによるVpr誘導性G2期停止およびアポトーシスの解析

(A)Shield1処理の方法を示した。HeLa/Fucci2細胞にpME18Neo/DD-Vpr-IRES-ECFPを導入し、24時間培養した。細胞を500 nMのShield1を含まない培地(i)およびShield1を含む培地(ii and iii)で23時間培養し（一次培養）、Shield1を洗い流した。Shield1を含まない培地(i and iii)またはShield1を含む培地(ii)において、さらに49時間培養した（二次培養）。

(B)それぞれの条件において細胞を回収し、DD-VprおよびECFPの発現をWestern blotにより解析した。

(C)二次培養開始1時間後から、ECFP陽性かつFucci2の蛍光が黄色の細胞を選択し（☆1-6）、LCV110を用いて15分間隔で48時間ライブイメージングを行った。左上の時間は二次培養開始からの時間を、スケールバーは100 μ mを示す。

(D)それぞれの条件におけるECFP陽性細胞数を算出した。

(E)それぞれの条件におけるECFP陽性細胞の正常に細胞分裂をした細胞の割合、G2期停止を継続していた細胞の割合、アポトーシスを起こした細胞の割合、異常な細胞分裂を起こした細胞の割合を算出した。

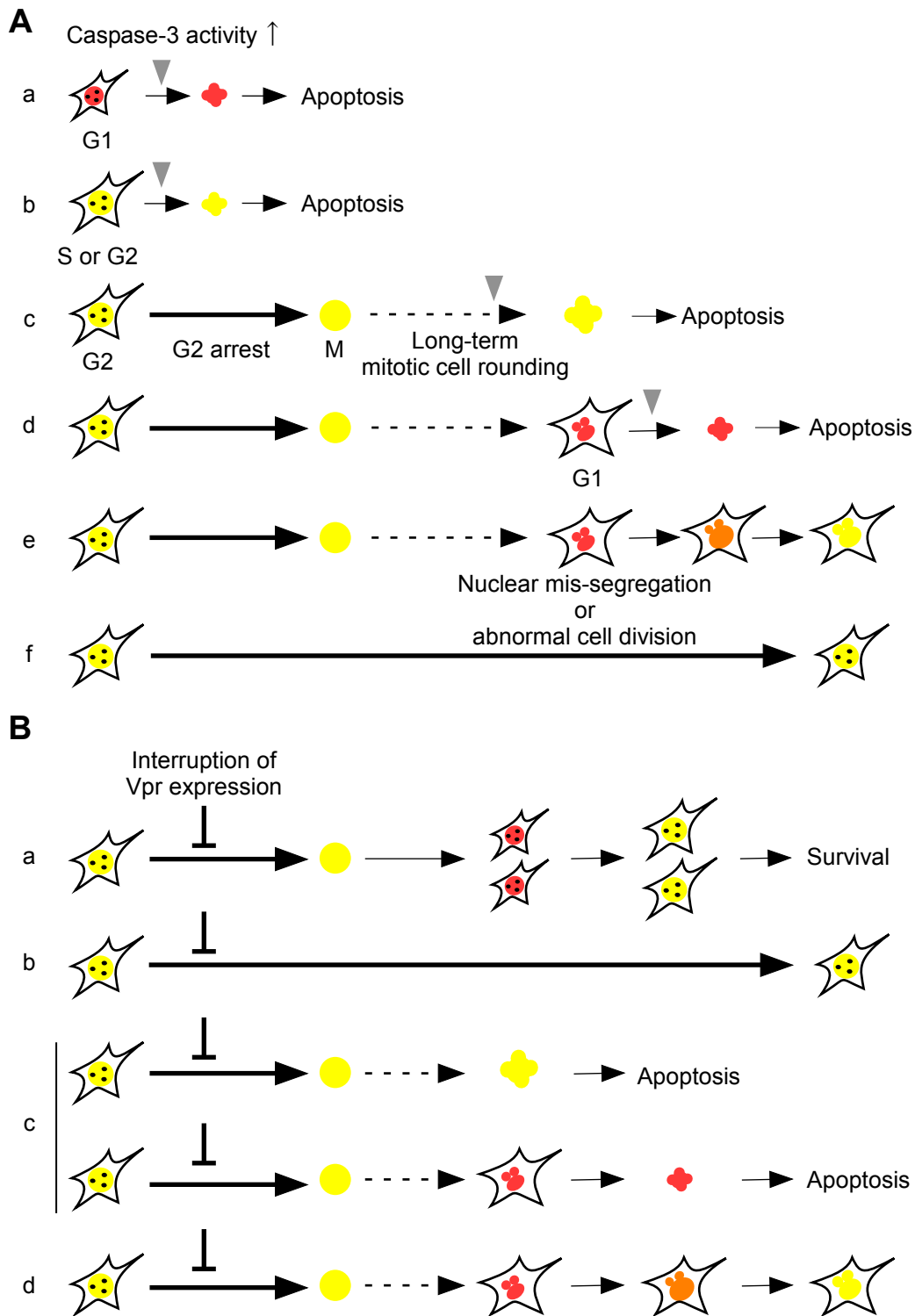


図11 Vpr誘導性G2期停止とアポトーシスの時間的な関係のモデル

(A)VprはG2期停止を伴わずにG1期(a)、S期またはG2期(b)においてアポトーシスを誘導した。さらに、G2期停止後、長期のmitotic cell roundingを起こしてから(c)、mis-segregationや異常な細胞分裂の後(d)にもアポトーシスを誘導した。アポトーシスを起こさなかった細胞は、微小核などを有した状態で細胞周期を進行させるか(e)、G2期停止を継続していた(f)。また、このときのアポトーシスは全てCaspase-3依存的だった。

(B)Vprの発現を約1日で停止させた場合、その細胞が辿る運命は、正常な細胞分裂(a)、G2期停止の継続(b)、G2期停止の後にアポトーシスを起こす(c)、G2期停止の後に異常な細胞分裂を起こす(d)の4種類に分類された。太い矢印はG2期停止を、破線矢印は長期のmitotic cell roundingを、灰色の矢頭はCaspase-3が活性化したことを示す。

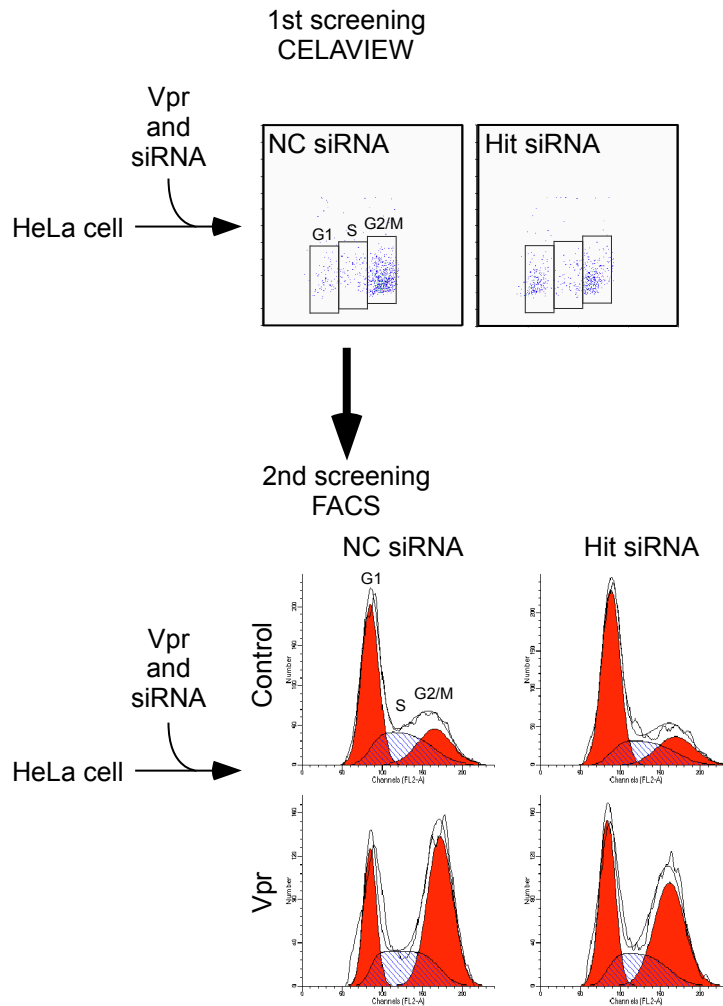


図12 Vpr誘導性G2期停止を抑制するsiRNAのスクリーニング法

Vpr誘導性G2期停止を抑制するsiRNAのスクリーニング法を示した。一次スクリーニングには、CELAVIEW RS100を用いて、二次スクリーニングにはフローサイトメーターを用いてG2期停止抑制能および正常な細胞周期への影響を解析した。

表1 siRNAスクリーニング

スクリーニング	方法	siRNA
		陽性数/使用したsiRNA数
1次スクリーニング	細胞イメージ解析システム CELAVIEW RS100	36/256
2次スクリーニング	フローサイトメーター FACS Calibur	11/24*

* : 36種類中12種類は十分な量のsiRNAを確保できなかった。

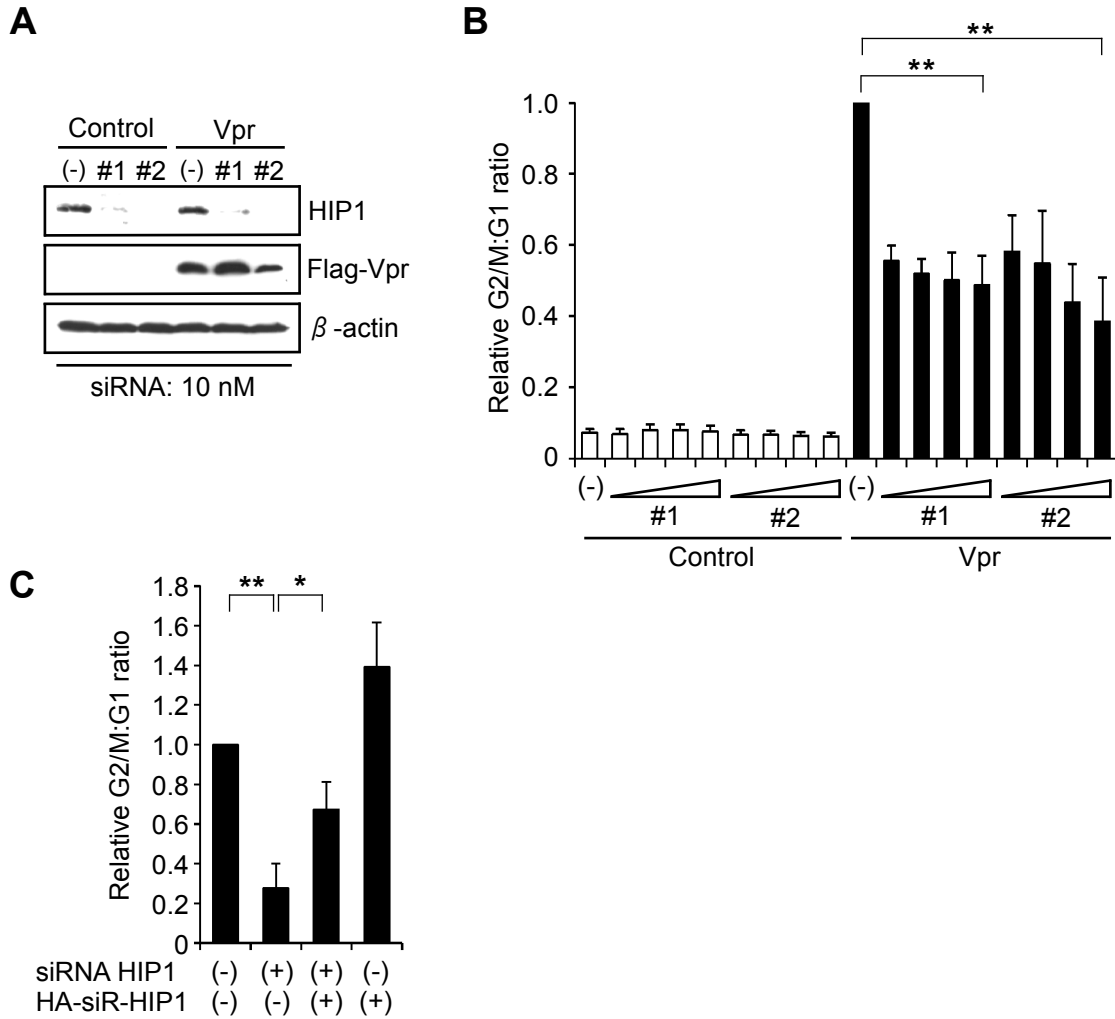


図13 Vpr誘導性G2期停止へのHIP1ノックダウンの効果

(A and B) HeLa細胞にpME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1またはpME18Neo/Flag-IRES-ZsGreen1およびHIP1に対する異なる配列を有する2種類のsiRNAを終濃度1-10 nMになるようにそれぞれ導入し、48時間培養した。

(A)細胞を回収し、Flag-VprおよびHIP1の発現をWestern blotにより解析した。

(B)CELAVIEW RS100を用いてZsGreen1陽性細胞の細胞周期を解析した。

(C)HeLa細胞にpME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1、siRNAによって分解されない塩基配列を持つsiR-HIP1発現ベクターpCAGGS/HA-siR-HIP1およびHIP1に対するsiRNAを導入し、48時間培養後、CELAVIEW RS100を用いてZsGreen1陽性細胞の細胞周期を解析した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ とし、p値はStudent t testにより算出した。

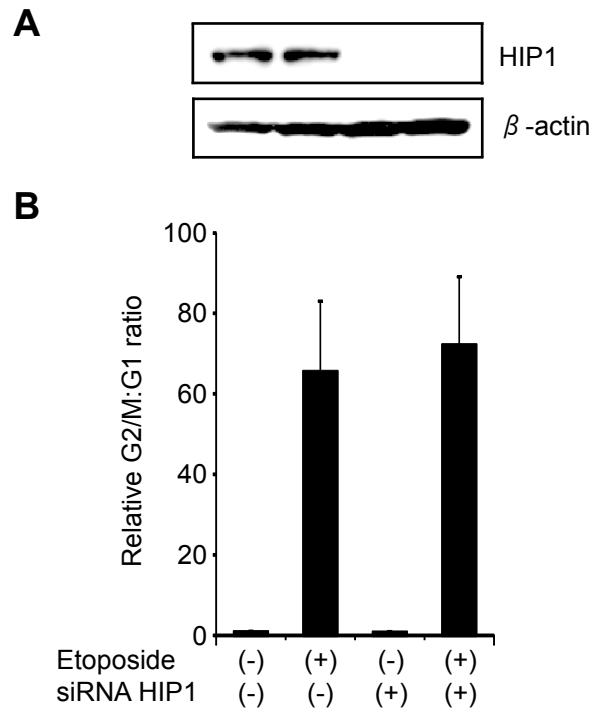


図14 エトポシド誘導性G2期停止へのHIP1ノックダウンの効果解析
 (A and B)HeLa細胞にHIP1に対するsiRNAを導入し、24時間培養した後、エトポシドを終濃度10 μ Mになるように添加して、さらに24時間培養した。
 (A)細胞を回収し、HIP1の発現をWestern blotにより解析した。
 (B)CELAVIEW RS100を用いて細胞周期を解析した。

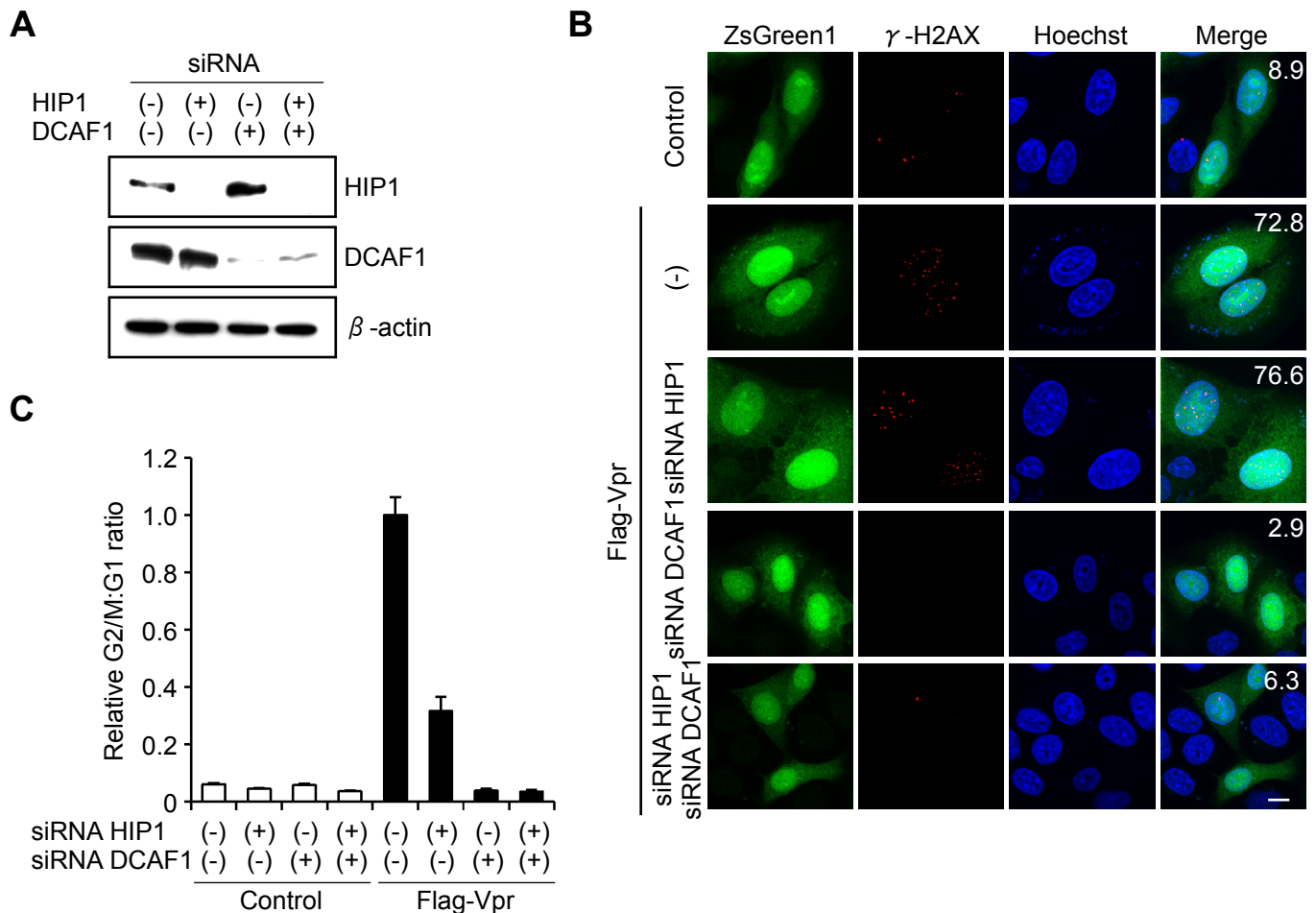
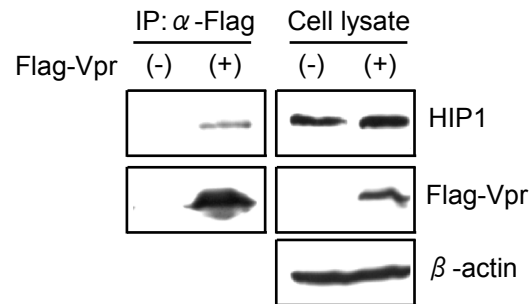
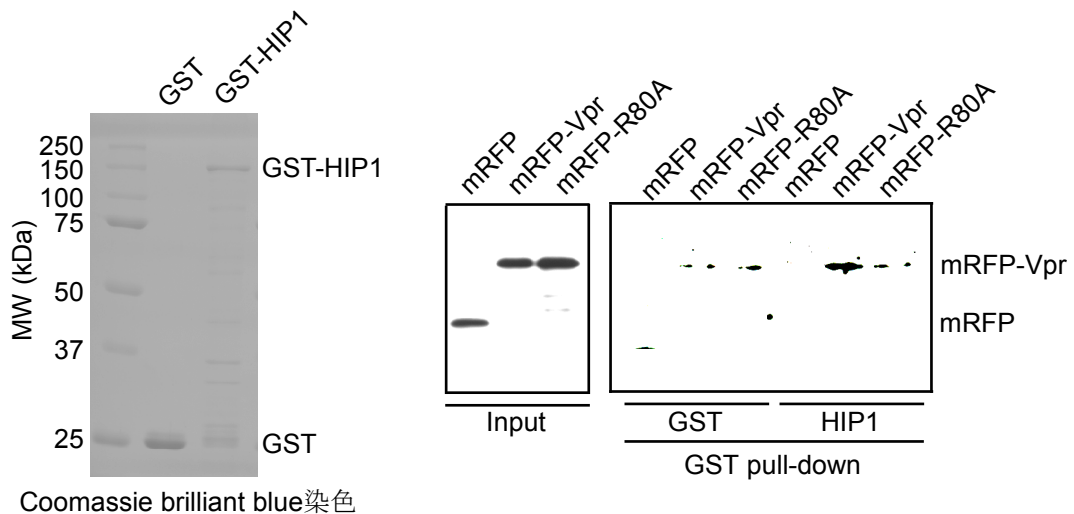


図15 Vpr誘導性DNA二本鎖切断およびG2期停止へのHIP1およびDCAF1ノックダウンの効果解析
 (A)HeLa細胞にHIP1およびDCAF1に対するsiRNAを導入した。48時間培養した後、細胞を回収し、HIP1およびDCAF1の発現をWestern blotにより解析した。
 (B and C)HeLa細胞にpME18Neo/Flag-Vpr-IRES-ZsGreen1またはpME18Neo/Flag-IRES-ZsGreen1およびHIP1またはDCAF1に対するsiRNAを導入し、48時間培養した。
 (B)蛍光抗体法によりDNA二本鎖切断のマーカである γ -H2AXのフォーカスを標識し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。100個以上のZsGreen1陽性細胞における γ -H2AXのフォーカス数が10個以上の細胞の割合を算出し、右上に示した。スケールバーは10 μ mを示す。
 (C)CELAVIEW RS100を用いてZsGreen1陽性細胞の細胞周期を解析した。

A**B****図16 VprとHIP1の結合解析**

(A) HeLa細胞にpME18Neo-FVprを導入し、48時間培養した後、細胞を回収した。タンパク質を抽出し、Anti-FLAG M2 Affinity Gelを用いて免疫沈降を行い、Western blotによりタンパク質を検出した。

(B) 大腸菌を用いて発現・精製したGSTまたはGST-HIP1の結合したglutathione sepharose beadsと293T細胞を用いて発現・精製したmRFP、mRFP-VprおよびmRFP-R80Aを混和し、GST pull-downを行い、Western blotによりmRFP、mRFP-VprおよびmRFP-R80Aを検出した。

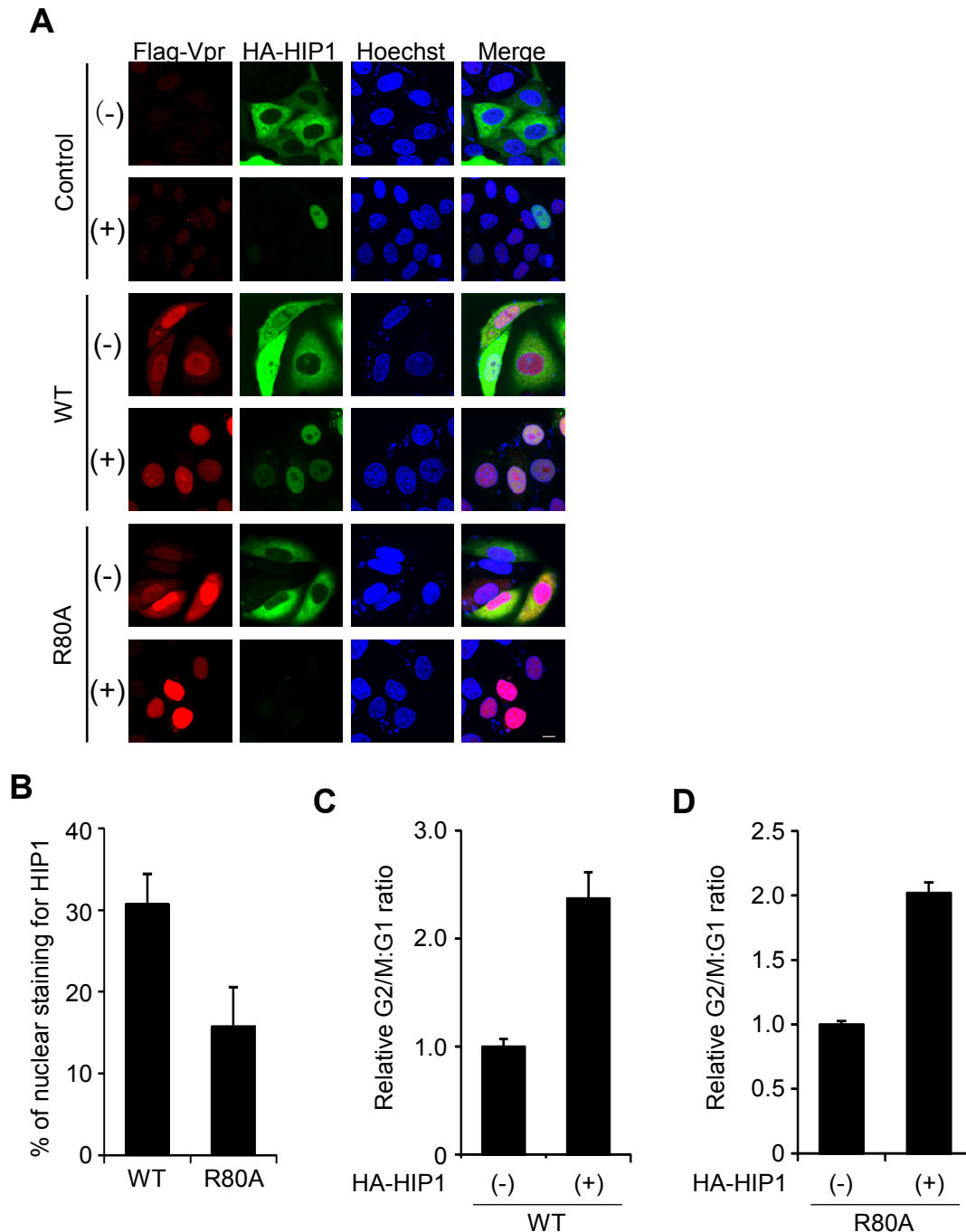


図17 VprとHIP1の局在と細胞周期の解析

(A-D) HeLa細胞にpME18Neo、pME18Neo-FVpr、またはpME18Neo-R80AおよびpCAGGS/HA-HIP1を導入し、48時間培養した。DigitoninおよびTriton X-100を用いて細胞質中のタンパク質を溶出させた後、蛍光抗体法によりFlag-VprおよびHA-HIP1陽性細胞を検出した。

(A) 共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞を観察した。(±)はDigitoninおよびTriton X-100処理を行ったかそうでないかを示す。

(B) DigitoninおよびTriton X-100処理を行った細胞の、Vpr (WTまたはR80A) 発現細胞における、HA-HIP1が核に局在している細胞の割合をCELAVIEW RS100を用いて算出した。

(C) DigitoninおよびTriton X-100処理を行った細胞の、WT Vpr発現細胞中のHA-HIP1陽性または陰性細胞の細胞周期をCELAVIEW RS100を用いて算出した。

(D) DigitoninおよびTriton X-100処理を行った細胞の、R80A Vpr発現細胞中のHA-HIP1陽性または陰性細胞の細胞周期をCELAVIEW RS100を用いて算出した。

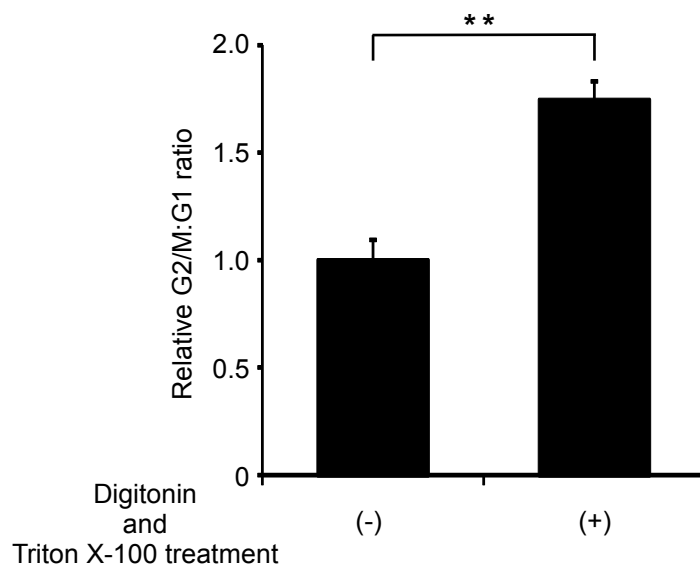


図18 HIP1の局在と細胞周期の解析

HeLa細胞にpCAGGS/HA-HIP1を導入し、48時間培養した。DigitoninおよびTriton X-100を用いて細胞質中のタンパク質を溶出させた後、蛍光抗体法によりHA-HIP1発現細胞を検出し、HA-HIP1発現細胞の細胞周期をCELAVIEW RS100にて算出した。(±)はDigitoninおよびTriton X-100処理を行ったかそうでないかを示す。** $p < 0.01$ とし、p値はStudent t testにより算出した。

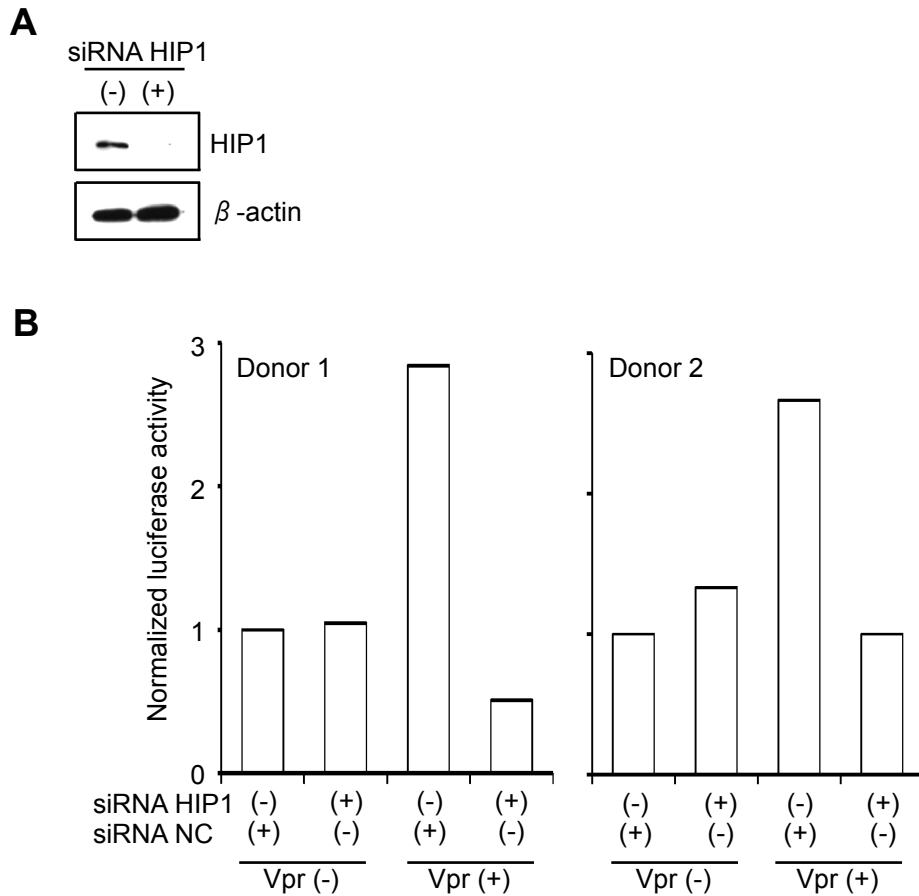


図19 MDMにおけるHIV-1感染に対するHIP1ノックダウンの効果解析

(A and B)ヒト末梢血単核球からCD14陽性リンパ球を単離し、macrophage-colony stimulating factorを用いてマクロファージに分化誘導した。siRNAを用いてHIP1をノックダウンし、24時間後に野性型およびVpr欠損VSV-G偽ウイルスをそれぞれ感染させた。

(A)siRNA導入後48時間において細胞を回収し、HIP1の発現をWestern blotにより解析した。

(B)感染6日後におけるルシフェラーゼの活性をルシフェラーゼアッセイにより解析した。