

# 論文の内容の要旨

論文題目 ヒト免疫不全ウイルス1型アクセサリ-タンパク質  
Vprの機能解析

氏 名 村上 知行

## 【目的と意義】

ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1)アクセサリ-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 T 細胞の減少を惹起し、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 細胞にトランスフェクションし、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。さらに、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さらに解析した。また、ProteoTuner Shield System を用いて Vpr 誘導性 G2 期停止およびアポトーシス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。この事実を検証するために、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 の G2 期停止およびアポトーシス誘導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 42.5%減少した。この結果から、Vpr による G2 期停止とアポトーシスが可逆的であることが示唆された。

### 2) Vpr による G2 期停止を制御する宿主因子の同定

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。これらの結果から、HIP1 は Vpr による G2 期停止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ーである  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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 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に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粒子の形成を促進し、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。近年、アポトーシスの抑制がウイルスの増殖をも抑制すること、および伝染性ファブリキウス囊病ウイルスがアポトーシスの誘導によりウイルス粒子の放出を促進することが明らかになった。以上のことから、Vpr によるアポトーシスの誘導もウイルス増殖および粒子の放出を惹起する役割を担っている可能性がある。

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  $\gamma$ -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。