

# 論文審査の結果の要旨

氏名 村上 知行

本論文は、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 Vpr に着目し、第 1 章は「Vpr 発現細胞のライブイメージング」、第 2 章は「Vpr による G2 期停止関連新規宿主因子の探索」について述べられている。

第 1 章では、核内蛍光の変化で細胞周期を識別可能な fluorescent ubiquitination based cell-cycle indicator2 (Fucci2) -expressing HeLa (HeLa/Fucci2) 細胞を用いることで、以下の 4 つのことを明らかにした。

- 1) 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な蛍光顕微鏡 CELAVIEW RS100 および Western blot を用いて、HeLa/Fucci2 細胞において、Vpr が G2 期停止およびアポトーシスを誘導することを明らかにした。
- 2) Vpr 発現細胞のライブイメージングの結果、Vpr は G2 期停止を誘導するにもかかわらず、G2 期停止後 G2 期ではアポトーシスを誘導せず、M 期または G1 期においてアポトーシスを誘導することを見出した。
- 3) Caspase-3 の活性を測定する蛍光プローブ SCAT3.1 を用いて、Vpr 誘導性アポトーシスがすべて Caspase-3 依存的であることを示した。
- 4) タンパク質の発現を迅速・可逆的に調節可能な ProteoTuner Shield System を用いて、Vpr 誘導性 G2 期停止が可逆的であり、アポトーシスの誘導には Vpr の継続的な発現および G2 期停止の継続が重要であることを明らかにした。

第 2 章では、siRNA ライブラリーを使用するとともに、第 1 章で使用したイメージング解析法をスクリーニング系に応用し、新規 Vpr 誘導性 G2 期停止関連因子として、Huntingtin interacting protein 1 (HIP1) を同定した。さらに、その機能解析を行った結果、以下の 6 つのことを明らかにした。

- 1) DNA 二本鎖切断マーカーである  $\gamma$ -H2AX の焦点の数をカウントすることで、HIP1 が Vpr 誘導性 DNA 二本鎖切断とは非依存的な経路で G2 期停止を誘導することを示した。
- 2) HIP1 は DNA 二本鎖切断とは非依存的な経路で G2 期停止を誘導するが、その経路には Vpr 誘導性 DNA 二本鎖切断に重要な DCAF1 が関与している可能性を示唆した。
- 3) Vpr と HIP1 が結合していることを免疫沈降法にて明らかにし、GST pull-down によりその結合が直接結合であることを示した。
- 4) Vpr 発現細胞中の HIP1 の局在を解析することで、Vpr が HIP1 の核局在を促進していることを見出した。
- 5) ジギトニンおよび Triton X-100 を用いることで、核に局在している Vpr および HIP1 を標識し検出する実験系を立ち上げ、Vpr 発現細胞および Vpr 非発現細胞のどちらにおいても HIP1 が核に局在している場合、G2/M 期の割合が増加していることを明らかにした。
- 6) ヒト末梢血単核球由来最終分化マクロファージにおいて、HIP1 が Vpr 依存的に HIV-1 の感染を促進している可能性を示した。

第 1 章では、HeLa/Fucci2 細胞を用いることで Vpr 誘導性 G2 期停止およびアポトーシスの可視化に世界で初めて成功した。また、SCAT3.1 を組み合わせることで Vpr 発現細胞における細胞周期の動態と Caspase-3 の活性の変化を同時に解析することにも成功した。さらに、ProteoTuner Shield System により、Vpr 誘導性 G2 期停止が可逆的であることを単一の細胞において示した。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。

第 2 章では、Vpr 誘導性 G2 期停止関連因子を同定するために、第 1 章で使用したイメージング法をスクリーニング系に応用し、新規 Vpr 誘導性 G2 期停止関連因子 HIP1 を同定した。また、Vpr が HIP1 を介して既知の経路とは異なる DNA 二本鎖切断を伴わない経路で G2 期停止を誘導することを見出すとともに、Vpr が HIP1 の核局在の促進により HIP1 誘導性 G2 期停止を促進していることを明らかにした。さらに、マクロファージを用いた HIV-1 感染実験から、HIP1 が Vpr 依存的な HIV-1 感染制御因子である可能性を示した。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。

なお、本論文第 1 章は、間 陽子との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上 1969 字