

氏名(本籍)	やまぐちともゆき 山口智之(愛知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2672号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Human immunodeficiency virus type1 Vpr modifies cell proliferation via multiple pathways (HIV-1, Vprは複数の経路で細胞の増殖に影響を与える)
主査	筑波大学教授 医学博士 林 英生
副査	筑波大学助教授 医学博士 内田和彦
副査	筑波大学助教授 医学博士 須磨崎 亮

## 論文の内容の要旨

### (目的)

HIVのアクセサリー分子のひとつであるVprは約15KDaの蛋白質であり、ウイルスの複製に必須ではないと考えられていた。しかし近年、多くの研究からVprがウイルスの複製、特にマクロファージ内での複製において重要であるということが明らかになってきた。Vprの機能はこれまでに大きく分けて2つの機能、すなわち、ウイルスのプレインテグレーションコンプレックス(二本鎖DNAゲノム、インテグラーゼ、逆転写酵素、マトリックス蛋白が複合体を構成したもの)を核内に輸送する機能(核移行能)と、宿主の細胞周期をG2期で阻止する機能(細胞周期停止期)である。また、これらの機能は、レンチウイルス間で広く保存されており、感染個体内でのウイルス伝播、複製に重要であることが示唆されている。T細胞指向性ウイルス由来のVprとマクロファージ指向性ウイルス由来のVprの機能については、これらの相違は、まだ明らかではない。

本研究では、種々のウイルス株由来のVprを様々な細胞株に発現させ、その機能について解析を行った。

### (材料・方法)

T細胞指向性ウイルスSF2, NL43, BH10由来のvpr(Vpr2, Vpr43, Vpr10)とマクロファージ指向性ウイルスSF162由来のvpr(Vpr162)の下流にInternal Ribosomal Entry Site(IRES)およびGreen Fluorescent Protein(GFP)を挿入した発現ベクターを構築した。この発現ベクターをそれぞれ、293T細胞, HeLa細胞, COS細胞にトランスフェクトした後、細胞を固定しPropidium Iodide(PI)でDNAを染色したのち、Fluorescence-Activated Cell Sorter(FACS)を用いてGFP陽性画分について細胞周期の解析を行った。また、GFP陽性画分に関してMTTアッセイにより増殖能を調べた。

### (結果)

HeLa細胞にそれぞれのVprのコンストラクトをトランスフェクションしGFP陽性の細胞の細胞周期を解析すると、Vpr43, Vpr162を発現させたときは、G2/G1の値がそれぞれ1.45, 1.17とこれまでの報告と同様に細胞周期のG2期停止が観られたが、Vpr2, Vpr10を発現させたときは、G2/G1の値はそれぞれ0.56, 0.41となりG2期停止は観られなかった。しかし興味深いことにVpr2を発現させた細胞の形態を光学顕微鏡下で観察すると、細胞が巨大になり付着性が強まるといったVpr43, Vpr162によるG2期停止時と同じような像が観られた。そこで、GFP陽性

の細胞をソーティングし MTT assay により細胞増殖に与える影響を観察した結果、Vpr10 を発現させた細胞では増殖停止が観られなかったものの、Vpr2 を発現させた細胞は、Vpr43、Vpr162 と同様に明らかな増殖の停止が観られた。この時 Vpr2 を発現させた細胞に顕著な死細胞の増加は観察されなかった。この結果より Vpr2 は G2 期停止の経路以外で細胞増殖を抑制していることが示唆された。さらに、G2 期停止に重要だと報告されている Vpr の C 末端の塩基性アミノ酸の豊富な領域 (18 アミノ酸) を Vpr43 由来の配列に置換したキメラ Vpr (Vpr162/43, Vpr2/43, Vpr10/43) のコンストラクトを作製し上記と同じ解析を行ったところ Vpr2/43 では G2/G1 の値が 0.99 となり明らかな G2 期停止能の回復が観察され、MTT assay においても増殖停止が観られた。上記の機能の相違は蛋白の発現量または、核移行能の相違によるものではないということはウエスタンブロットおよび免疫染色により確認した。

この結果より Vpr の G2 期停止に重要な C 末端の領域は Vpr2 で観られたそれ以外の経路での増殖抑制にも重要であることが明らかとなった。また、弱いながらも HeLa 細胞と同様に、COS 細胞でも Vpr2 は G2 期停止以外の細胞増殖抑制を示した。しかし、293T 細胞では他の Vpr と同様に G2 期停止が観察された。

#### (考察)

本研究では IRES および GFP を挿入した発現ベクターを用いることにより、これまでの cotransfection 法では得られなかったより正確な Vpr の機能を観察することが可能となった。

その結果、Vpr2 は G2 期停止以外の経路で細胞増殖を阻害することが強く示唆された。また G2 期停止に重要だと報告されている C 末端の 18 アミノ酸を NL43 由来の配列に置換したキメラ Vpr (Vpr2/43) では G2 期停止が観られることから Vpr2 の細胞増殖抑制の経路にもこの領域が重要であると考えられた。

Vpr43 を発現した細胞のすべてが G2 期で停止できる訳ではないという点、また Vpr2 を 293T 細胞に発現させると G2 期停止が観察されるという点、さらに C 末端の 18 アミノ酸は G2 期停止とそれ以外の経路での細胞増殖抑制の両方に重要であるという三つの観点から、本来 Vpr は G2 期停止能とそれ以外の経路での細胞増殖抑制の両方の機能を持っている可能性がある。そのため本研究で得られた結果は Vpr のわずかな配列の違いと発現させる細胞腫の違いによってどちらかの機能 (G2 期停止とそれ以外の経路での細胞増殖抑制) が顕著に現れた結果であると考えられる。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究はヒト免疫不全ウイルス、HIV、のアクセサリ分子である約 15KDa の蛋白、Vpr、の機能をしらべ、それは細胞分裂を G2 期で停止させるとともに、それ以外の経路での細胞の増殖を阻害することを明らかにした。この成果はさらに Vpr が細胞に異常な中心体の複製を起こさせ、細胞の増殖を阻害しアポトーシスを誘導するという発見につながっており (参考論文)、本論文は価値ある研究報告である。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。