筑 波 大 学

博 士 （医学） 学 位 論 文

DA
4102
2005
(H4)

学位論文

HIV-1アクセサリー遺伝子*vpr*による
M期の異常とRanの機能解析

2005

筑波大学大学院人間総合科学研究科

田口　　崇

寄贈
田口 崇 氏

06006627

目録

略号

1. 文献的考察 1

1.1. HIV-1 アクセサリー遺伝子産物 VPR の機能と役割 1

1.1.1. HIV-1 の遺伝子構造

1.1.2. VPR の機能

1.1.3. ウイルスへの VPR の取り込み

1.1.4. VPR の逆転写における働き

1.1.5. VPR の PIC の核内移行における役割

1.1.6. VPR による LTR の転写活性化

1.1.7. VPR による細胞周期異常の誘導

1.2. RanGTP/RCC1 による細胞内の物質輸送 4

1.2.1. 細胞における核膜を介した輸送

1.2.2. Ran の機能

1.2.3. Ran とグアニンヌクレオチドの結合

1.2.4. Ran による核膜を介した輸送の制御

1.3. Ran/RCC1 による細胞周期の制御 6

1.3.1. RanGTP による核膜の形成

1.3.2. RanGTP による中心体の制御

1.3.3. RanGTP による紡錘体形成の促進

2. 研究の目的 8

3. 実験手技 9

3.1. 細胞 9

3.2. ウイルスの調製 9

3.3. 細胞周期の解析 10

3.4. プロテオーム解析 10

3.5. リコンビナントタンパク質の発現と精製 11

3.6. グアニンヌクレオチド結合の解析 11

3.7. 抗体 11

4. 結果 13

4.1. VPR^+ ウイルスによる細胞周期の異常 13

4.2. VPR^+ ウイルスによる分裂期の細胞の蓄積 13

4.3. VPR^+ ウイルスによる分裂前中期の蓄積 14

4.4. VPRによるRanの等電点変化 15

4.5. VPRによるRanGTP結合型の減少 15

4.6. VPRとRanの結合 16

4.7. VPRとグアニンヌクレオチドの結合 16

4.8. VPRによる紡錘体形成の阻害 17

5. 考察 18

5.1. VPRによる分裂期細胞の蓄積 18

5.2. VPRによるDNAの多倍体化 18

5.3. VPRによるRanGTP形成阻害 19

5.4. VPRによるラギング染色体の誘導 19

5.5. VPRによるRanの制御と紡錘体形成 20

5.6. VPRによるRanの制御と中心体の異常 21

5.7. VPRによる分裂期の異常のウイルス感染における意義 21

6. 謝辞 22

7. 図表の説明 23

8. 図表 27

9. 参考文献 48

略号

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
DOX	Doxycycline
dUMP	Deoxyuridine monophosphate
GDP	Guanosine 5'-diphosphate
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
GST	Glutathione S-transferase
HIV	Human immunodeficiency virus
HTLV-1	Human T cell leukemia virus 1
IgG	Immumogloblin G
IN	Integrase
LSC	Laser scanning cytometer
LTR	Long terminal repeat
MLV	Murine leukemia virus
MPF	Maturation promoting factor
NES	Nuclear export signal
NLS	Nuclear localization signal
NOC	Nocodazole
PI	Propidium iodide
PIC	Pre-integration complex
Ran	Ras related nuclear protein
RanGAP	Ran GTPase activating protein
RT	Reverse transcriptase
RTC	Reverse transcription complex

SAF	Spindle assembly factor
UNG2	Uracil DNA glycosylase 2

1. 文献的考察

1.1. HIV-1 アクセサリー遺伝子産物 VPR の機能と役割

1.1.1. HIV-1 の遺伝子構造

ヒト免疫不全ウイルス HIV-1 は *gag*、*pol*、*env* の構造遺伝子と *tat*、*rev*、*nef*、*vpu*、*vpr*、*vif* の 6 つの遺伝子から構成されている(Freed EO., 2001)。*tat*、*rev* は調節遺伝子と呼ばれウイルスの複製には必須であるが、*nef*、*vpu*、*vpr*、*vif* 遺伝子は *in vitro* でのウイルス複製に必ずしも必要でないためにアクセサリー遺伝子と呼ばれている(Freed EO., 2001)。しかしながら動物モデルを用いた解析から、これらのアクセサリー遺伝子は *in vivo* でのウイルス複製や AIDS 発症に重要な役割を担っていることが明らかにされている(Ueno T, et al., 2002)。

1.1.2. VPR の機能

VPR は 96 アミノ酸の塩基性タンパク質であり、HIV-1、HIV-2 および SIV でよく保存されている(Tristem M et al. 1992)。VPR は小さなタンパク質であるにもかかわらずウイルス RNA の逆転写、ウイルス DNA を含む複合体 PIC の核内輸送、HIV-LTR (long terminal repeat)の転写活性化、細胞周期の制御などウイルス複製に関わる多くのステップに関与している(Andersen JL et al., 2005)。さらに VPR はウイルス粒子中に存在するのに加えて、エイズ患者の血清や脳脊髄液など広範囲に存在する(Andersen JL et al., 2005)ことから、未知の生物学的機能を持つ可能性も考えられている。

1.1.3. ウイルスへの VPR の取り込み

ウイルス粒子中への VPR の取り込みは GAG タンパク質のカルボキシ末端 p6 領域

との直接結合を介して行われる(Accola MA et al., 1999; Bachand F et al., 1999; Jenkins Y et al., 2001)。この結合から VPR は、VPR/GAG の比が約 1:7 で存在し、ウイルス粒子中 275 分子程度存在すると考えられている(Muller B et al., 2000)。また VPR が取り込まれる際、宿主細胞に由来するタンパク質として、Uracil DNA glycosylase 2 (UNG2) をウイルス粒子内に誘導することが報告された(Chen R et al., 2002)。UNG2 は DNA 中の、シトシンの脱アミノ反応や、dUMP の誤った組込みによって生じたウラシルを除去することで生体内の DNA 変異を抑制する(Krokan HE et al., 2001)。

1.1.4. VPR の逆転写における働き

ウイルスが標的細胞に感染するとウイルス粒子内のウイルス RNA、ウイルスタンパク質(RT、IN、NCp7、VPR)、マトリクスタンパク質及び VPR によってウイルス粒子に取り込まれた UNG2 などから構成される複合体 RTC が感染細胞に放出される(Fassati A et al., 2001; Miller MD et al.,2000)。この RTC 中でウイルス RNA は逆転写酵素によって DNA に転写されるが、高頻度にヌクレオチドの誤った取り込みによる DNA の可能性を伴っている。UNG2 は RT による逆転写の正確性を保持し DNA の変異を抑制するために必要である事が明らかになった(Chen R et al., 2002; Chen R et al, 2004)。

1.1.5. VPR の PIC の核内移行における役割

レトロウイルスは感染細胞のゲノム DNA に組み込まれた後、初めて RNA に転写され、ウイルスが産生される(Bukrinsky M. 2004)。したがってウイルスゲノムが核内に入る事が必須である。それには 2 種類の方法があり、一つは核膜の消失する分裂期に染色体へ到達する方法と、何らかの能動的な機構により核膜を通過する方法で

ある。MLV や HTLV-1 のオンコレトロウイルスは前者の方法により感染すると考えられており核膜が崩壊しない非分裂細胞には感染することができない(Tsukasaki K et al., 2000)。一方、レンチウイルスである HIV は非分裂細胞に対しても感染することが可能であるという際立った特徴を有している(Bukrinsky M. 2004; Heinzinger NK et al., 1994; Gallay P et al., 1995; Gallay P et al, 1997)。VPR を欠失した HIV-1 は T 細胞などの分裂細胞では野生型ウイルスと同様に増殖するが、マクロファージなどの非分裂細胞ではほとんど増殖しないことが知られている。このことから、VPR による PIC の核内移行は非分裂細胞への感染に極めて重要な役割を果たしていることが示唆される。VPR は核移行シグナルを持たないため、既知の核輸送経路とは異なる経路で PIC を核へ移行させていると考えられる (Lu YL et al., 1993;)。しかし、その詳細な機構はまだ解明されていない。これまでに提唱された機序の一つとして、VPR は核膜孔の構成成分であるヌクレオポリンと結合することで NPC の複合体形成を阻害し、核膜の構造を変化させることで、PIC の核内輸送に関与している事が考えられている(Depienne C et al., 2000; Reil H et al., 1998; Haffar OK et al., 2000; Dupont S et al., 1999)。また、インポルチンαと結合することによる核輸送が提唱された(Kamata M et al., 2005)

1.1.6. VPR による LTR の転写活性化

VPR機能の一つとして転写活性化が報告されている(Cohen EA et al., 1990; Ogawa K, 1989)。その機構として VPR は、宿主細胞の転写因子である Sp1 や TFIIB と結合し効率よく LTR (long terminal repeat)に結合させることでこれらの転写因子による転写を活性化させると考えられている(Wang L et al., 1995; Agostini I et al., 1999)。転写活性誘導は LTR だけではなく、解析されたプロモーターすべてについて認められた。

1.1.7.　VPR による細胞周期異常の誘導

最もよく解析されている VPR の機能として、VPR は分裂細胞を G2/M 期で貯留させる働きが報告されている(Bartz SR et al., 1996; Zimmerman ES et al, 2004)。その機構として maturation promoting factor(MPF)複合体の構成成分である cdc2 の不活性化や(Re F et al., 1995)、DNA 損傷シグナル伝達の中で中心的な役割を担っている ATR を介したチェックポイント機構の関与が示されている(Roshal M et al., 2003)。このような細胞周期の停止によりウイルス産生量が増加する可能性が提唱されているが(Goh WC et al., 1998)、HIV の病原性に対する意義は明らかにされていない。また VPR による G2/M 期の貯留は、単に細胞周期の遅延だけではなく、染色体の異数倍体化(Shimura M et al., 1999a)、異常な小核の形成(Shimura M et al., 1999b)、中心体の数の異常などを伴ったゲノム不安定性とも密接に関連している事が報告され(Minemoto Y et al., 1999)、高頻度にエイズ症例で認められる悪性腫瘍の発症にも関与している可能性が指摘されている。

1.2.　RanGTP/RCC1 による細胞内の物質輸送

1.2.1.　細胞における核膜を介した輸送

ヒトの細胞をはじめとする真核細胞は核膜によって核と細胞質に隔てられている。核内で合成された mRNA は細胞質に移行し、この mRNA に含まれる遺伝情報が、リボソームで正確にタンパク質に翻訳される。一方、合成されたタンパク質のうち核内で機能するタンパク質は速やかに核内へ移行する。またある種の転写因子や細胞周期制御因子は、核内での働きを終えると細胞質に輸送されることも知られている。この様に核膜を介して様々な高分子が能動的輸送によって細胞質－核間を行き

来する事が細胞の生命維持に必須になっている。

1.2.2. Ranの機能

Ranは低分子量Gタンパク質ファミリーに属し(Bischoff FR et al., 1991a)、細胞質一核間のタンパク質輸送において非常に重要な役割を担っている。一方、近年 Ranは核膜を介した物質輸送だけではなく、細胞分裂においても例えば核膜形成、中心体の数の制御、紡錘体形成などの重要な局面で大切な役割を担っていることが明らかになってきた。

1.2.3. Ranとグアニンヌクレオチドの結合

Ran は他の分子との相互作用により GTP 結合型あるいは GDP 結合型に変換される。即ち、GTP 結合型の Ran は、GTPase 活性化因子である RanGAP などの作用による加水分解で GDP 結合型に変換され(Seewald MJ et al., 2003)、GDP 結合型の Ran はGDP/GTP変換因子であるRCC1の作用によりGTP結合型に変換される(Bischoff FR et al., 1991b)。細胞内では、RanGAP が細胞質に、RCC1 が核に局在することから RanGTP は主として核に、RanGDP は細胞質に存在していると考えられている。

1.2.4. Ranによる核膜を介した輸送の制御

一般に核内で機能するタンパク質は核局在シグナルであるnuclear localization signal (NLS)を有しておりインポルチンと結合することで核移行が生じる(Gorlich D et al., 1995)。インポルチンはインポルチンα、βからなっており、一旦細胞質で核タンパク質と複合体を形成して核内に移行した後、複合体から解離する。この際、核内に存在する RanGTP がインポルチンと結合することで、核タンパク質とインポルチンの

複合体が解離し、核内における機能が発現すると考えられている(Gorlich D et al., 1996)。一方、タンパク質の核外移行においては、核外移行シグナルである nuclear export signal (NES)を持つタンパク質が核内において RanGTP の存在化でエクスポルチンと複合体を形成し、細胞質に輸送される。そして細胞質に移行した後は、RanGAP などの作用で RanGTP が RanGDP に変換されることにより、核外移行タンパク質は複合体から遊離する(Richards SA et al., 1997)。即ち、Ran は GTP/GDP 結合型の変換によって細胞質－核間輸送の制御因子として機能している。

1.3. RanGTP による細胞周期の制御

1.3.1. RanGTP による核膜の形成

Ran は、上述した様に細胞質－核間の輸送における機能が主たる役割として考えられてきた。しかし近年 Ran システムがクロマチン・核膜形成にも重要な役割を担っている事が分かってきた。 RanGTP はクロマチンに接着した RCC1 によってクロマチン近傍で作り出される。ゲルビーズに RanGTP を固定化し、ヒト培養細胞間期の抽出液を加えるとクロマチン非存在下でもビーズの表面に核膜が形成された(Zhang C et al., 2001)。このことから RanGTP は核の位置を定め核膜形成に必要な核膜小胞の集積と融合に必要であることが示された。

1.3.2. RanGTP による中心体の制御

正常細胞において中心体の複製は一回の細胞分裂あたり一度のみ行われるよう厳密に制御されている(Balczon R., 2000)。その抑制を担うタンパク質の一つとしてヌクレオホスミンが報告されている(Tokuyama Y et al., 2001)。ヌクレオホスミンは、NES を持つタンパク質でエクスポルチンの一つである Crm1 と RanGTP の複合体として

核外に移行した後、複合体から遊離する。そしてこのヌクレオホスミンは中心体に作用してその複製を抑制する(Wang W et al., 2005)。つまり Ran の核外輸送機構に依存して中心体の数は制御されていることが示唆された。

1.3.3. RanGTP による紡錘体形成の促進

また紡錘体形成でもクロマチン近傍に形成される RanGTP が重要な役割を担っている事が分かってきた(図 1)。即ちインポルチンα、βとの結合により不活性化された紡錘体形成因子(SAF)はクロマチン上で形成された RanGTP によって活性化され、紡錘体形成が誘導される(図 1)。SAF の一つである TPX2 は、インポルチンから解き放たれた後 AuroraA と結合し、紡錘体に沿って局在しながら微小管重合を促進する(Gruss OJ et al., 2002, Tsai MY et al., 2003)。また別の SAF である NuMA は、活性化後に微小管結合タンパク質であるダイニンと結合して微小管の中心体側に移動する。移動によって中心体近傍に到達した NuMA は、中心体と微小管を繋ぎとめる役割を果たし、紡錘体の形成が完了する(Kisurina-Evgenieva O et al., 2004)。

私は今回、VPR による細胞周期異常の分子機序の解析過程で Ran が関与していることを見出した。そこで上述したように分裂期で広範囲な機能を有する Ran と VPR との関係に興味がもたれることから本論文では、VPR による分裂期の異常と Ran の制御に関する実験データを提示し、そのウイルス感染における役割について論じたい。

2. 研究の目的

HIV-1 アクセサリー遺伝子 *vpr* は G2/M への貯留を引き起こし核の多数性や異数性、また中心体の数の異常などを伴ったゲノム不安定性を誘発することが報告されている。今回私は VPR の発現による細胞周期の異常とその分子機構を明らかにすることを目的として解析し、VPR が RanGTP の形成を抑制することを見出した。本研究では、VPR による RanGTP 形成障害の分子機序を明らかにするとともに、この現象のウイルス感染における意義についても考察を行った。

3. 実験手技

3.1. 細胞

各細胞の培養は 10% 牛胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium で培養した。細胞周期の解析にはHeLa細胞を、ウイルス調製にはHEK293T細胞を用いた。MIT-23とコントロール細胞のΔVPR細胞はヒト繊維芽肉腫細胞(HT1080)から作製された(Shimura M et al., 1999a)。VPRの発現誘導およびコントロールにはDOX (3 μg/ml)を添加した。

3.2. ウイルスの調製

pNL-Luc-E$^-$R$^+$とpNL-Luc-E$^-$R$^-$はHIV-1のNL4-3株から作製された(Adachi A et al., 1986)。それぞれのプラスミドは、*env*、*nef*遺伝子を欠失してマーカー遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を導入している。またpNL-Luc-E$^-$R$^-$は*vpr*をコードする5180塩基にフレームシフト変異を導入しており*vpr*は欠失している。ウイルスの作製にはHEK293TにpNL-Luc-E$^-$R$^-$もしくはpNL-Luc-E$^-$R$^+$、のVSV-GをコードするpHIT/GのプラスミドDNAを共に遺伝子導入試薬であるFugene-6 (Roche)を用い遺伝子導入した。翌日培養液を交換し培養を続け、遺伝子導入から48時間後に培養上清を回収した。回収した培養上清は120 × *g*、5分の条件で遠心しVPR- ウイルス(以下R$^-$ ウイルス)もしくはVPR+ ウイルス(以下R$^-$ ウイルス)とした。ウイルス量はp24 ELISA kit (ZeptoMetrix)で測定した。ウイルスは-80°Cで保存し、各ウイルス保存液の感染効率はMagic-5細胞を用い確認した。各ウイルスをp24が200 ng/mlの濃度で感染させると70-80 %の細胞がβ-ガラクトシダーゼ染色陽性になった (MOI=0.7-0.8)。

3.3. 細胞周期の解析

細胞周期の解析にはレーザースキャニングサイトメーター(LSC2; Olympus)を用いた。細胞を固定後、RNase A (200 μg/ml) とPI (50 μg/ml) で30分処理し解析した。DNAは蛍光総量と蛍光強度のパラメーターで測定した。蛍光総量はDNAの量と一致し、蛍光強度は染色体の凝縮度を示す。

3.4. プロテオーム解析

細胞からのタンパク質の抽出には緩衝液(15 mM Tris-HCl pH7.5, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 2 mM Sodium orthovanabate, 250 mM Sucrose, 1 mM DTT, 0.3% NP-40, 0.1% Protease inhibitor cocktail (SIGMA))で処理後 2000 *g* _ 5 分遠心し、沈殿物を同緩衝液で再懸濁してから 2000 *g* _ 3 分遠心することを 2 回繰り返した。さらに沈殿物を緩衝液(10 mM PIPES pH6.5, 10 mM EDTA, 0.1% Protease inhibitor cocktail (SIGMA))で懸濁後 6000 g _ 20 分遠心して沈殿物をクロマチン画分とした。二次元電気泳動の一次元目(等電点)の電気泳動には等電点電気泳動装置であるIPGphor(Amersham Biosciences)を用い pH3-10 のゲルにクロマチン画分を泳動用溶液(8M Urea, 2% CHAPS)で溶解した試料を添加して泳動した。一次元目が終了後、ゲルを SDS 及び還元アルキル化処理して二次元目の SDS-PAGE により分離後、銀染色法あるいはウエスタンブロッティング法によって解析した。銀染色法によって染色したタンパク質のスポットの同定には、スポットを切り出してトリプシン(Promega)でゲル内のタンパク質をペプチドに特異的切断後、Tof-MAS である AXIMA-CFR (SHIMADZU)を用いてペプチドの質量を測定した。タンパク質の同定には Tof-MAS 解析によって得られたペプチドの質量を用いネット上のサイトである ProteinProspector の MS-FIT (http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm)で解析した。

3.5.　　リコンビナントタンパク質の発現と精製

リコンビナント GST-VPR、GST-Ran およびコントロール GST は pGEX6p-1 ベクター(Amersham Biosciences)を用い大腸菌 BL21codon plus(STRATAGENE)で発現した。各タンパク質は AKTAprime(Amersham Biosciences)を用いマニュアルに従い精製した。

3.6.　　RanGDP および RanGTP の調製

タグが付いていないリコンビナント Ran の発現及び精製は PURESYSTEM classic II mini (PURESYSTEM)を用いマニュアルの標準プロトコールに従い行った。精製した Ran は緩衝液 (30 mM K-PO_4 pH7.4, 2 M b-mercaptoethanol, 5 M $MgCl_2$) に透析後、10mM EDTA と、Ran に対し GDP もしくは GTP を 1:100 のモル比になるように添加した。試料は、室温にて 60 分静置後 10 mM $MgCl_2$ を加え再び緩衝液 (30 mM K-PO_4 pH7.4, 2mM β-mercaptoethanol, 5mM $MgCl_2$) に透析後、それぞれを RanGDP および RanGTP とした。

3.7.　　グアニンヌクレオチド結合の解析

GST、GST-Ran 及び GST-VPR とグアニンヌクレオチドの結合の解析と解離定数の測定には BIACORE3000 (BIACORE)を用いた。緩衝液は HBS-EP に 10mM $MgCl_2$ を添加して用いた。リコンビナント GST-VPR、GST-Ran およびコントロール GST を CM5 センサーチップに固定し、GDP 及び GTP の結合及び解離を測定し解離定数を求めた。

3.8.　　抗体

VPR に対する抗体(8D1)は VPR 合成ペプチドをマウスに免疫して作成した (ニッポ

ンバイオテスト)。1 次抗体として HIV-1 の gag p24 (ZeptoMetrix)、ルシフェラーゼ (Promega)、 MPM-2 (Becton Dickinson)、サイクリン B1 (Santa Cruz Biotechnology)、GAPDH (TREVIGEN)、ヒストン H1 (Santa Cruz Biotechnology)、Ran (BD Bioscience)、RCC1 (Transduction laboratories)、チュブリンβ (NeoMakers)、TPX2 (Oliver Gruss 博士より供与された) を用いた。2 次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ標識された抗ウサギ IgG (Amersham Biosciences)、 抗ヤギ IgG (Jackson ImmunoResearch)、抗マウス IgG (Amersham Biosciences)もしくは蛍光標識された抗ウサギ IgG (Invitrogen)、 抗ヤギ IgG (Invitrogen)、抗マウス IgG (Invitrogen)を用いた。ウエスタンブロッティング法は ECL-Plus Western Blot Detection System (Amersham Biosciences) を用いた。

4. 結果

4.1. VPR$^+$ ウイルスによる細胞周期の異常

感染に用いたウイルスはエンベロープタンパク質を欠失しているため二次ウイルスは産生されず再感染性は示さない。まずp24が50 ng相当のR$^+$ウイルス中に250-500 pgのVPRが取り込まれていることをウエスタンブロッティングによって確認した(図2)。その結果、野生型ウイルスについて報告されているのと同様にウイルス粒子内にVPRが取り込まれている事が明らかとなった(図2 R+)。このウイルスを用いてHeLa細胞にp24が200 ng/mlの濃度でウイルスを感染させ細胞周期を解析したところ感染後12時間でG2/M期への蓄積が見られ、さらに54時間まで継続して増加した (図3下段)。また感染後54時間では染色体DNA量の増加を示す細胞が観察された(図3下段　矢印)。一方、R$^-$ウイルスを感染させた細胞では細胞周期の変化は観察されなかった(図3上段)。

4.2. VPR$^+$ ウイルスによる分裂期の細胞の蓄積

分裂期の細胞を解析するため、レーザースキャニングサイトメーター(LSC)により蛍光総量(横軸)と蛍光強度(縦軸)からDNA量と染色体の凝縮度を解析し、4NでDNA量が等しい分裂期(region B)とG2期(region D)の細胞を分離して解析した (図4)。ウイルスの感染後、経時的な細胞周期の変化を解析した。図5で示すようにR$^+$ウイルス感染後24時間で約50%の細胞がG2期(region D)に蓄積した。一方、分裂期の細胞は36時間後から増加し始め感染後54時間で約15%の蓄積が見られた(図5左下 region B)。さらにR$^+$ウイルスの感染後、36時間から多倍体化を示す細胞の増加が見られた(図5右

上 region C)。対照的に分裂後期から終期の細胞は減少が見られた(図5左上 region A)。これらの変化はR^+ウイルスの感染にのみ観察され、R^-ウイルスの感染によっては細胞周期に特に変化は見られなかった(図3、4上段)。

次にウイルスを感染54時間後の染色体の形態を観察した。図4で示したregion BにおいてコントロールやR^-ウイルスを感染した細胞のほとんどが、染色体が細胞中央部に並んだ分裂前期(図6 cont, R-)であるのに対し、R^+ウイルス感染細胞では染色体の細胞中央部への集積を示さない分裂前中期(図6 R+)の状態であった。さらに分裂期で多倍体化(図4 region C)を示す細胞においても分裂前中期でありラギング染色体と呼ばれる染色体が観察された(図6 R+右)。

4.3. VPR$^+$ ウイルスによる分裂前中期の蓄積

R^+ウイルス感染細胞の分裂期の細胞の蓄積をさらに確認するため分裂期のマーカーであるMPM-2の免疫染色を行った。図7において分裂期の同調剤であるノコダゾールで処理し分裂期に集積した細胞では44.3%でMPM-2の染色性が強く観察されるのに対し、サイミジンを過剰量添加してG1-S期に集積した細胞では0.7%とほとんどの細胞でMPM-2の染色性が認められなかった。コントロール細胞及びウイルス感染細胞においてMPM-2の染色を行ったところDNA量が4Nで凝縮度が高い分裂期の細胞で染色性が認められた(図8)。コントロール細胞においてMPM-2陽性細胞は6.5%に対しR^+ウイルスの感染60時間後は25%と大きく上昇し分裂期の蓄積が見られた。一方R^-ウイルスでは8%とコントロール細胞との明らかな差異は認められなかった(図9)。

次に分裂期に発現が大きく上昇するサイクリンB1の免疫染色を行った。その結果、R^+ウイルス感染細胞においてM期の細胞がサイクリンB1の染色性が見られた。この

結果からもVPRによる分裂期の蓄積の誘発は分裂前期で細胞周期が遅延した結果を反映していることが示唆された(図10)。

4.4. VPRによるRanの等電点変化

VPRの局在を明らかにするため、VPR発現細胞を細胞質画分とクロマチン画分に分画しウエスタンブロッティング法で解析した。その結果、VPRはクロマチン画分においてバンドが見られ、細胞質画分にはVPRのシグナルは見られなかった(図11)。このようにVPRはクロマチン画分に局在することから、クロマチン画分を標的として、2次元電気泳動法で展開し銀染色法でタンパク質を染色した後、VPR発現細胞とコントロール細胞由来検体間でスポットを比較した。その結果、VPR発現細胞に特異的な約25kDa、pI7.0に位置するスポットを見出した(図12右)。

このVPR発現細胞に特異的なスポットを同定するためゲルから切り出しトリプシン処理後、Tof-MAS(SHIMADZU)で解析したところタンパク質由来の質量ピークを得た。この質量をタンパク質同定用ソフトウェアであるMS-FITで同定を試みたところ最も高い確立でRanが同定された(表1)。Ranは25kDa、pI7.0のタンパク質でありスポットの位置の数値もほぼ一致した。次に2次元電気泳動法とRanの抗体を用いたウエスタンブロッティング法を組み合わせて解析したところ、VPR発現細胞で認められるRanの変化はタンパク量そのものの増加ではなくpIが高くなることで誘導されることが示唆された(図13)。

4.5. VPRによるRanGTP結合型の減少

リコンビナントRanより調製したRanGDPおよびRanGTPを2次元電気泳動法後、Ran抗体を用いてウエスタンブロッティング法で解析したところGDPを付加されたRanはGTPを添加されたRanより高いpIを示した(図14)。

4.6. VPRとRanの結合

VPRとRanの結合を解析するためVPR発現細胞においてVPR抗体を用いた免疫沈降法を行った。免疫沈降後のウエスタン解析によりVPRとRanが共沈することを確認した(図15中段　矢印)。この結果から、VPRとRanは細胞において複合体を形成することが明らかとなった。しかしながらRCC1との結合は見られなかった(図15上段　破線矢印)。

次にVPRとRanの直接的結合性を調べるため、リコンビナントタンパク質を用いた免疫沈降法を行った。VPRとRanのリコンビナントタンパク質を用いてそれぞれモル比を変えて混合し、VPR抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、Ranが共沈し(図16左)、逆にRan抗体を用いて免疫沈降するとVPRが共沈した(図16右)。また結合はVPRとRanのモル比が1：1の時に共沈する量が最も多くなることから、VPRとRanは1：1で直接結合することが示唆された(図16)。

4.7. VPRとグアニンヌクレオチドの結合

VPRとグアニンヌクレオチドの結合をBIACORE3000によって解析した。GST、GST-Ran及びGST-VPRをそれぞれ結合したCM5センサーチップとGTP、GDPの結合を解析するとGST-RanとGST-VPRはGTP、GDPの濃度依存的に結合したが、コントロールであるGSTは結合を示さなかった。この時のGTPに対する解離定数はGST-Ranは0.00113、GST-VPRは8.74e-5でありGST-VPRがGST-Ranより約13倍結合力が高い事

を示した。一方、GDPに対する解離定数はGST-Ranは8.19e-8、GST-VPRは1.42e-4でありGST-VPRがGST-Ranより約1/5.75e4倍と結合力が低い事が示唆された(表2)。

4.8. VPRによる紡錘体形成の阻害

微小管の構成成分であるβ−チュブリンに対する抗体を用いた免疫染色を行うと、コントロール細胞の分裂期には紡錘体の形成が観察された。しかし微小管重合阻害剤であるノコダゾールを処理すると紡錘体の形成は観察されなかった。一方、VPR発現細胞ではβ−チュブリンの局在が見られず紡錘体の形成は見られなかった(図17)。また分裂期においてTPX2の免疫染色を行った。その結果、コントロールの細胞ではTPX2が紡錘体に沿って局在する様子が観察されたのに対して、VPR発現細胞では高濃度な領域が観察されるものの明確な局在は観察されなかった(図18)。

5. 考察

5.1. VPRによる分裂期細胞の蓄積

これまで最もよく解析されてきたVPRの機能として分裂細胞でVPRが発現すると細胞周期のG2期で増殖遅延が誘導されることが知られている(Bartz SR et al., 1996; Zimmerman ES et al, 2004)。R^+ウイルスを感染させると(図5右下 region D)24時間後に約50%の細胞がG2期に貯留し、その後徐々に減少する傾向が認められた。一方、分裂前中期の細胞数はコントロール群では6%であるのに対し、感染後12から24時間で約3%に減少し、徐々に増加し54時間後には約15%にまで達した(図5右下 region B)。これはVPRによるG2期の貯留が完全ではなくG2期で一端停留した細胞がM期に進入するためと考えられる。さらに図8、9においてR^+ウイルス感染細胞におけるMPM-2陽性細胞が増加することからも分裂期細胞が増加していることが支持される。一方、図5左上(region A)で示すように分裂終期の細胞は減少し続けていることが推察される。以上のことからVPRによって誘導される細胞周期異常はG2期ばかりではなく分裂前中期でも認められる事が明らかになった。

5.2. VPRによるDNAの多倍体化

VPRの機能として染色体DNAの異数倍体化(Shimura M et al., 1999a)、異常な小核の形成(Shimura M et al., 1999b)、中心体の数の異常(Minemoto Y et al., 1999)が報告された。図5右上では感染後36時間から多倍体化した分裂期の細胞が増え54時間後には約4%に達する。VPRによって分裂期前中期に貯留するにも関わらず多倍体化した細胞が増加することはDNAの複製が分裂期をスキップして継続的に行われていることを示唆する。通常DNAの複製は一細胞周期中で一回のDNA合成が生じる様、厳密に制

御されている。 (Pacek M et al., 2004)。この機構としてDNAと結合する複製ライセンシング因子が細胞周期に伴って複合体の機能を変える事が報告されている(Pacek M et al., 2004)。したがってVPRによって複製ライセンシング因子が機能しなくなるため分裂期をスキップしてDNAの複製が行われている可能性が考察される。

5.3. VPRによるRanGTP形成阻害

図13、14の二次元電気泳動の結果はVPRによってRanGTP形成が阻害されることを示した。クロマチン上においてVPRがRanGTP形成を阻害する機構としてRCC1によるGEF活性の阻害が考えられる。図15、16からVPRはRanと直接結合するがRCC1とはクロマチン上で結合しない。また図17からVPRはGTPと強く結合し、その解離定数から計算すればGTPに対する親和性はRanより13倍高い。一方GDPに対してはRanより結合は弱い。このことからVPRはRanと結合することによってRCC1によるGEF活性を阻害すること、またはRanと結合しRanGTPのGTPをRanから奪う可能性が考察される。ハムスターにおいてRCC1温度感受性変異体は細胞周期の異常が認められDNA合成期においても未成熟な染色体の凝縮が誘導される(Nishijima H et al., 2000)。この機構は明らかではないがRCC1の機能が消失することでRanGTPの形成が阻害され細胞周期のチェックポイント機構が破綻するためと考えられている(Nishijima H et al., 2000)。VPR発現時にはRanGTP形成が阻害されるもののDNA合成期において未成熟な染色体の凝縮は認められない。これはVPRによってRanGTP生成が完全には阻害されていない事、またG2/M期で貯留する働きがより強いためと考察される。

5.4. VPRによるラギング染色体の誘導

図6ではDNAの凝縮は見られるが染色体の細胞中央部への集積が見られずラギング染色体が生じている様子が観察された。最近の研究ではラギング染色体を生じる機構としてキネトコアと微小管の結合異常が報告されている(Cimini D et al., 2003)。通常、染色体の分離には一つの染色体のキネトコアに対し紡錘体の両極のうち片側の極からの微小管のみが結合する(Cimini D et al., 2003)。しかしながら、一つのキネトコアに紡錘体の両極からの微小管が結合する、相同染色体の二つのキネトコアの両方に片側の極の微小管が結合する、あるいはキネトコアに対する微小管の結合が起こらない異常によって染色体の細胞中央部への移動が妨げられラギング染色体が生じる(Cimini D et al., 2003)。キネトコアに対する微小管の結合異常はRCC1温度感受性変異体において報告され(Arnaoutov A et al., 2003)、RanGTP依存的にRan-GAP1とRanBP2がキネトコアに結合することによって制御されている事が明らかとなった(Arnaoutov A et al., 2005)。これらの報告からVPRによるラギング染色体の誘導はRanGTPの形成阻害により生じる可能性も示唆される。

5.5. VPRによるRanの制御と紡錘体形成

RanGTPはTPX２の活性化によって紡錘体形成に関わる事が報告された(Gruss OJ et al., 2002)。図17の結果においてVPRは紡錘体形成を阻害し、TPX2の免疫染色の結果(図18)からTPX2の活性化が低下している事が示唆された。その機構として図19で示すようにクロマチン上のVPRは、RanGTPへの変換を阻害しTPX2の活性化を阻害する事によって、微小管の重合及び紡錘体の形成阻害を誘導するのではないかと推察した。この仮説を証明するため現在、TPX2の活性化に関与するインポルチンα、β及びAuroraAとの会合の有無について、コントロール細胞とVPR発現細胞を用いて比較検

討中である。この結果によりVPRにより誘導されるM期の異常の分子機序として、Ran-TPX2の活性化障害の重要性が明確に出来るものと思われる。

5.6. VPRによるRanの制御と中心体の異常

VPRの発現により中心体の数の異常が報告された(Minemoto Y et al., 1999)。一方でRanGTPの形成はヌクレオホスミンを活性化し、中心体に作用してその複製を抑制する(Wang W et al., 2005)。これらの報告からVPRはRanGTPの阻害を介して中心体の数の異常を誘発する事が推測される。

5.7. VPRによる分裂期の異常のウイルス感染における意義

これまで考察してきたようにVPRによって誘導される分裂期の異常はRanの制御によって誘導される事が示唆された。最近の研究では、HIV-1を末梢血細胞に感染すると染色体異数倍体化の頻度が増加し多倍体化する事が報告された(Shimura M et al., 2005)。今回の解析によって、このHIV-1に伴って生じる感染細胞の多倍体化はVPRに起因することが推察される。VPRによって染色体が多倍体化し一細胞あたりのDNAが増加することは、宿主DNAに組み込まれたウイルスのコピー数を増加させ、ウイルス産生に有利に働くと考えられる。さらに核膜のない分裂期に感染細胞を貯留することで再感染を生じ易い細胞環境を作っている事も予想される。これらの仮説を証明するために一細胞あたりのウイルスのコピー数を定量的に測定することが必要であるが、この実験によりVPRによる分裂期の異常の意義を明らかにすることができると考えている。

6. 謝辞

本研究を行うにあたり終始熱心に御指導、御鞭撻、またそもそもこの研究を行うに至った動機を与えてくださいました国立国際医療センター研究所難治性疾患研究部　石坂幸人部長に深く感謝いたします。

また、筑波大学大学院人間総合科学研究科　狩野繁之教授に深く御礼申し上げます。

最後に、本研究遂行に当たって御協力していただいた国立国際医療センター研究所難治性疾患研究部の皆様と、体調や生活を心配してくださりまた支援していただいた家族に、感謝いたします。

図表の説明

図1　紡錘体形成における Ran の役割　○印は各タンパク質を示した。

図2　R^+ ウイルス粒子中のVPR　R-及びR+ウイルスをVPR及びp24の抗体を用いウエスタンブロッティング法で解析した。R-及びR+のレーンにはp24タンパク質50 ng相当のウイルスタンパク質をアプライした。コントロールとして125-500 pgのVPRをアプライした。

図3　VPRによるDNA量の変化　コントロール及びウイルス感染から核時間を経た細胞をPI染色した後LSCによって解析した。横軸はDNA量を縦軸は細胞数を示した。矢印で示した4nはG2期とM期の細胞を、8nは多倍体化した細胞を示した。

図4　VPRによる細胞周期の変化　図3の試料を横軸にDNA量、縦軸にDNAの凝縮度で示した。各領域はA. 分裂後終期、B. 分裂前中期、C. 多倍体分裂期、D. G2期を示した。

図5　VPRによる各細胞周期の増減　図4の各領域の細胞数の割合の経時的変化をグラフ化した。横軸に感染後の時間、縦軸には細胞総数に対する各領域の細胞の割合を示した。

図6　VPRによる分裂期の異常　図4の各領域に相当するコントロール及びR-、R+の染色体を顕微鏡観察し、代表的な状態の細胞を三つずつ示した。分裂中期の計

数は染色体が細胞中央に並んだ細胞を数えた。ラギング染色体の計数は一部の染色体が離脱を示す細胞を数えた。

図7　MPM-2を用いた分裂期細胞の染色　MPM-2抗体による蛍光免疫染色とDNAのPI染色後、LSCで解析した。横軸はDNA量を縦軸は細胞数を示した。MPM-2陽性細胞は、MPM-2抗体で染色していない細胞をネガティブコントロールとし、より輝度の高い細胞を陽性として赤色で示した。ThymidineはS期、NocはM期、contは無処理の細胞を示した。

図8　VPRによる分裂期細胞の増加1　コントロール及びウイルス感染から各時間を経た細胞をMPM-2による蛍光免疫染色とDNAのPI染色後LSCによって解析した。横軸はDNA量を縦軸は細胞数を示した。MPM-2陽性細胞は赤色で示した。

図9　VPRによる分裂期細胞の増加2　図8のMPM-2陽性細胞の経時的変化をグラフ化し示した。横軸は感染後の時間を縦軸はMPM-2陽性細胞の割合を示した。

図10　VPRによるサイクリンB1陽性細胞の増加　サイクリンB1抗体による蛍光免疫染色とDNAのPI染色後、LSCで解析した。上側2段はコントロール細胞においてDNAの量と凝縮度から各細胞周期の細胞のDNAとサイクリンB1の染色性を示した。下側2段は図4 region B に相当するR+ウイルス感染細胞のDNAとサイクリンB1の染色性を示した。

図11　細胞におけるVPRの局在　VPR発現細胞とコントロール細胞の細胞質とクロマチン画分をVPR、GAPDH、ヒストンH1の各抗体を用いてウエスタンブロッティング法で解析した。GAPDHは細胞質のマーカー、ヒストンH1はクロマチンのマーカーとして用いた。

図12　VPRによって誘導されるタンパク質の同定　VPR発現細胞とコントロール細胞のクロマチン画分を二次元電気泳動後、銀染色法により染色しタンパク質スポットのパターンを比較した。写真は25kDa、pI7.0を中心に拡大して示した。変化の見られたスポットを赤丸で示した。

表1　Tof-MASによる解析　Tof-MASを用いたタンパク質スポットの解析によって一致する確立が高いタンパク質をスコア順に示した。

図13　VPRによるRanの等電点の変化　図12と同じ条件で二次元電気泳動後、Ran抗体を用いてウエスタンブロッティング法により解析した。矢印で示した点線はR-及びR+におけるRanのpIを示した。

図14　VPRとグアニンヌクレオチドの結合による等電点の変化　リコンビナントRanより調製した。RanGDPとRanGTPを二次元電気泳動後、Ran抗体を用いてウエスタンブロッティング法により解析した。矢印で示した点線はそれぞれGDP結合型及びGTP結合型RanのpIを示した。

図15　細胞内におけるVPRとRanの結合　VPR発現細胞とコントロール細胞の抽出液を用いてVPR抗体(8D1)による免疫沈降法した後、RCC1、Ran及びVPR抗体を用いてウエスタンブロッティング法により解析した。実線の矢印はそれぞれRanとVPRのバンドの位置を、点線の矢印はRCC1のバンドの位置を示した。

図16　VPRとRanの直接結合　リコンビナントRanとVPRをモル比が1：0.25から1：2になるように混合し、VPR抗体(8D1)もしくはRan抗体による免疫沈降法した後Ran及びVPR抗体を用いてウエスタンブロッティング法により解析した。

表2　VPRとグアニンヌクレオチドの解離定数　BIACORE3000の解析ソフトフェアを用いて各結合の解離定数を導いた。KD値はVPRもしくはRanに対するGTP、GDPの解離定数を示した。Fold increaseにはRanを1とした時のVPRに対するGTP、GDPの結合性を示した。

図17　VPRによる紡錘体形成への影響　β-チュブリン抗体による蛍光免疫染色とDNAのヘキスト33258染色後、蛍光顕微鏡により観察し、DNAが凝縮した代表的な状態の細胞を二つずつ示した。緑色はβ-チュブリン、青色は染色体を示す。

図18　VPRによるTPX2の局在の変化　TPX2抗体による蛍光免疫染色とDNAのヘキスト33258染色後、蛍光顕微鏡により観察し、DNAが凝縮した代表的な状態の細胞を二つずつ示した。赤色はTPX2、青色は染色体を示す。

図19　VPRによる紡錘体形成阻害のメカニズム　○印は各タンパク質を示した。

図 1

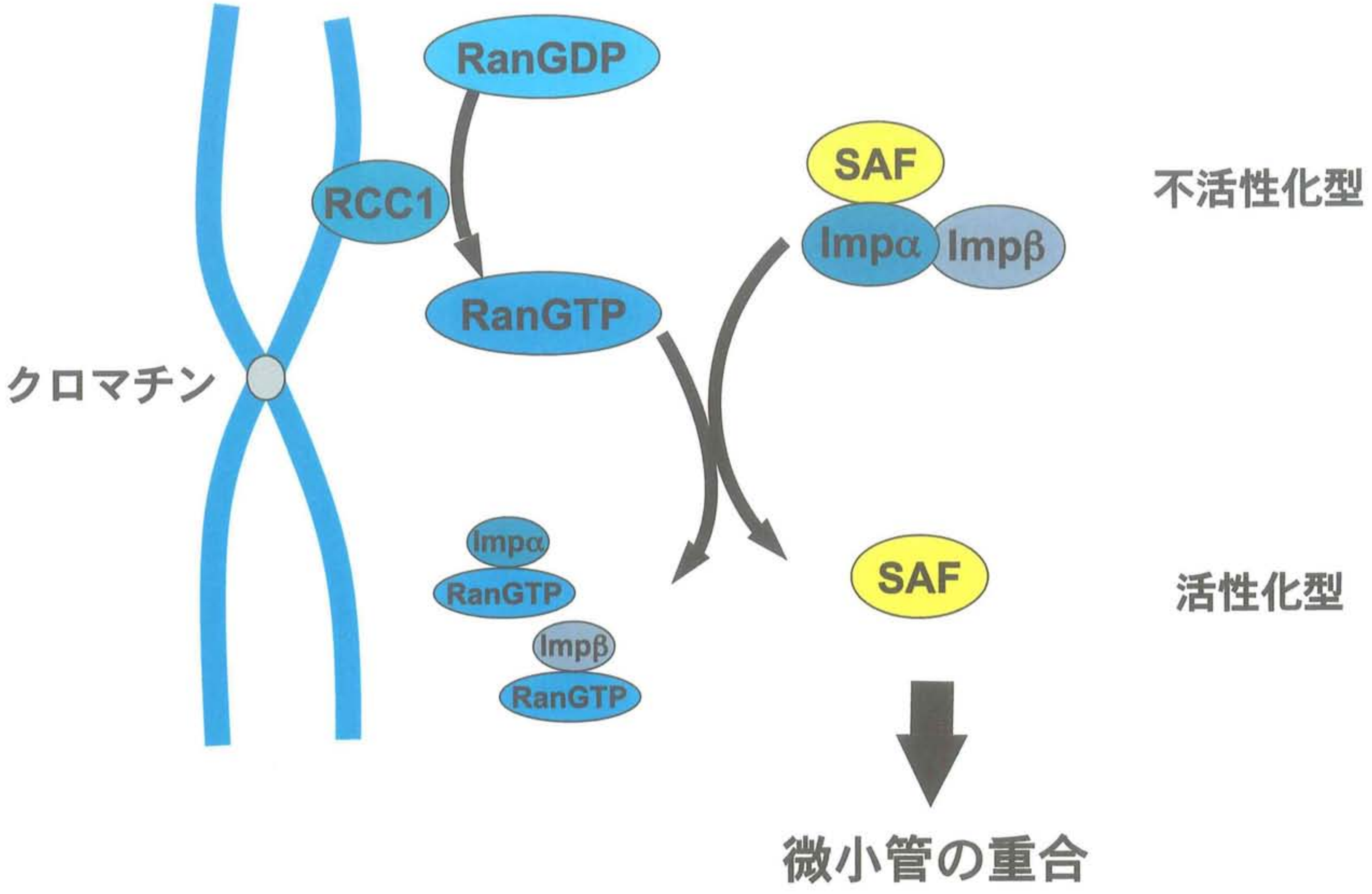

RanGDP
RCC1
RanGTP
SAF
Impα
Impβ
不活性化型
クロマチン
Impα
RanGTP
Impβ
RanGTP
SAF
活性化型
微小管の重合

図 2

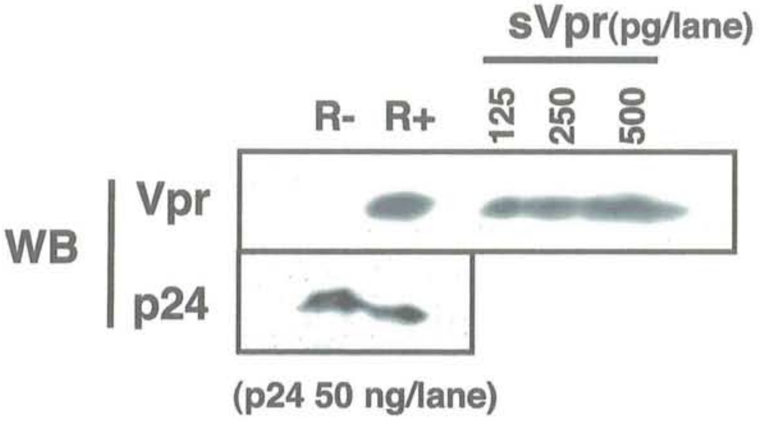
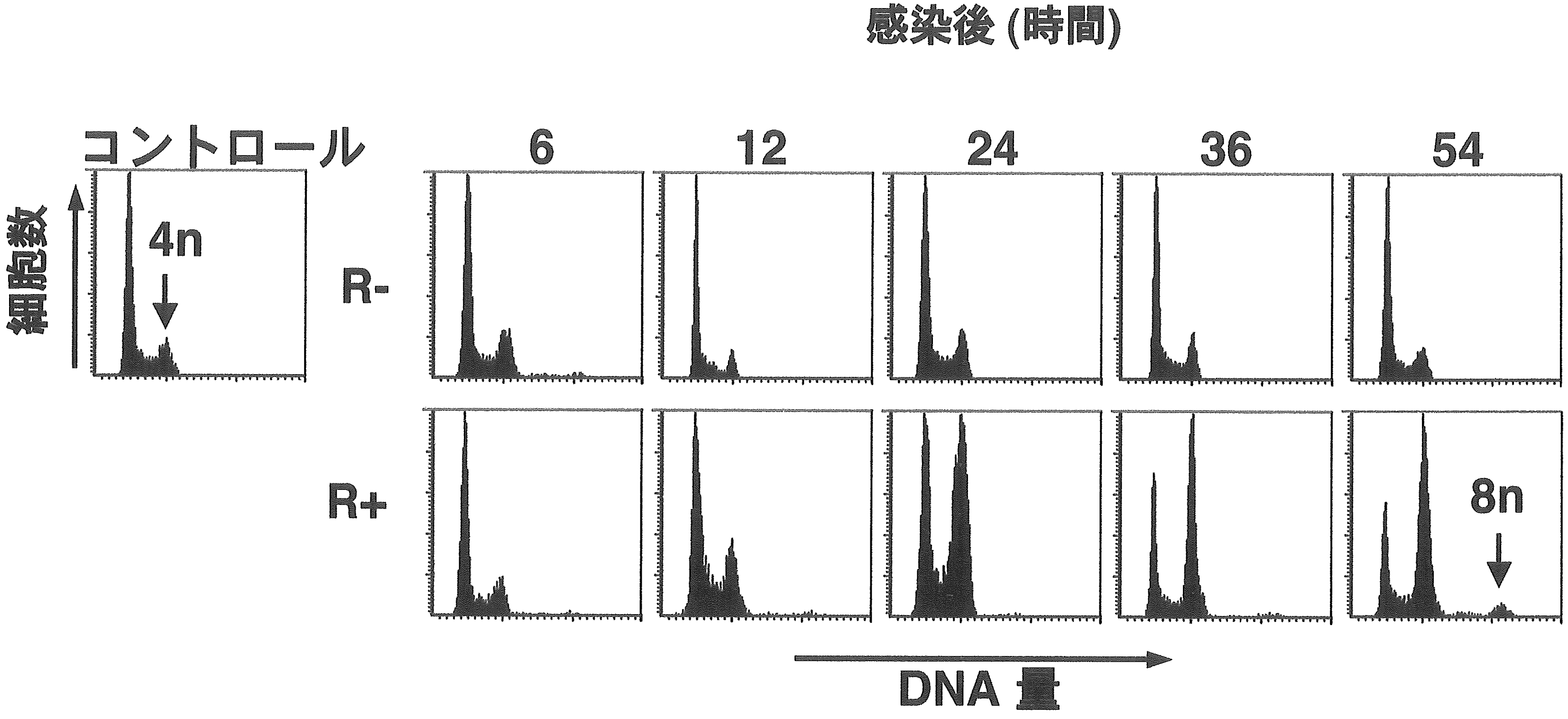
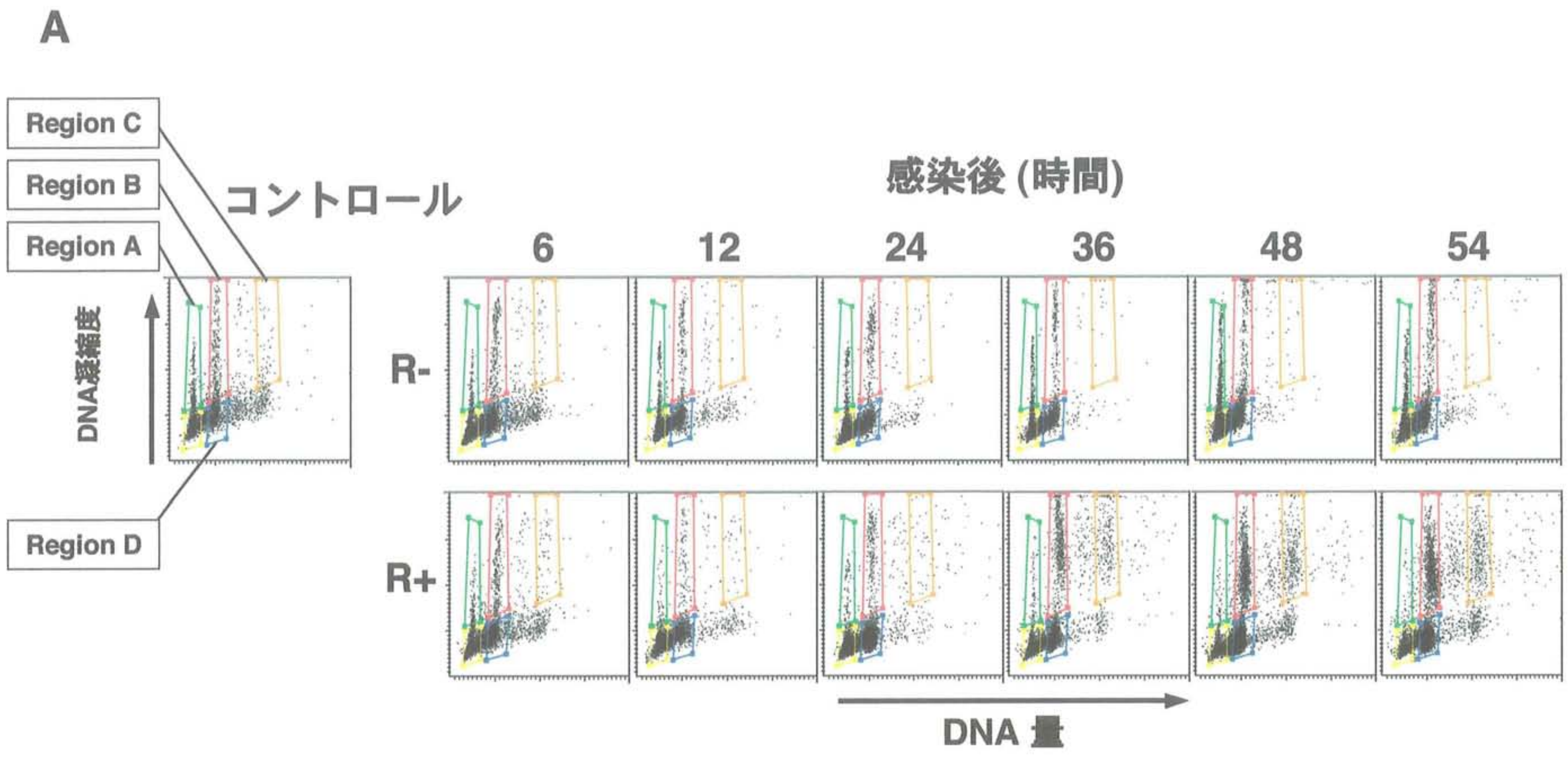


図 3



29

図 4


A
Region C
Region B
Region A
Region D
コントロール
DNA凝縮度
感染後 (時間)
6
12
24
36
48
54
R-
R+
DNA 量

30

図 5

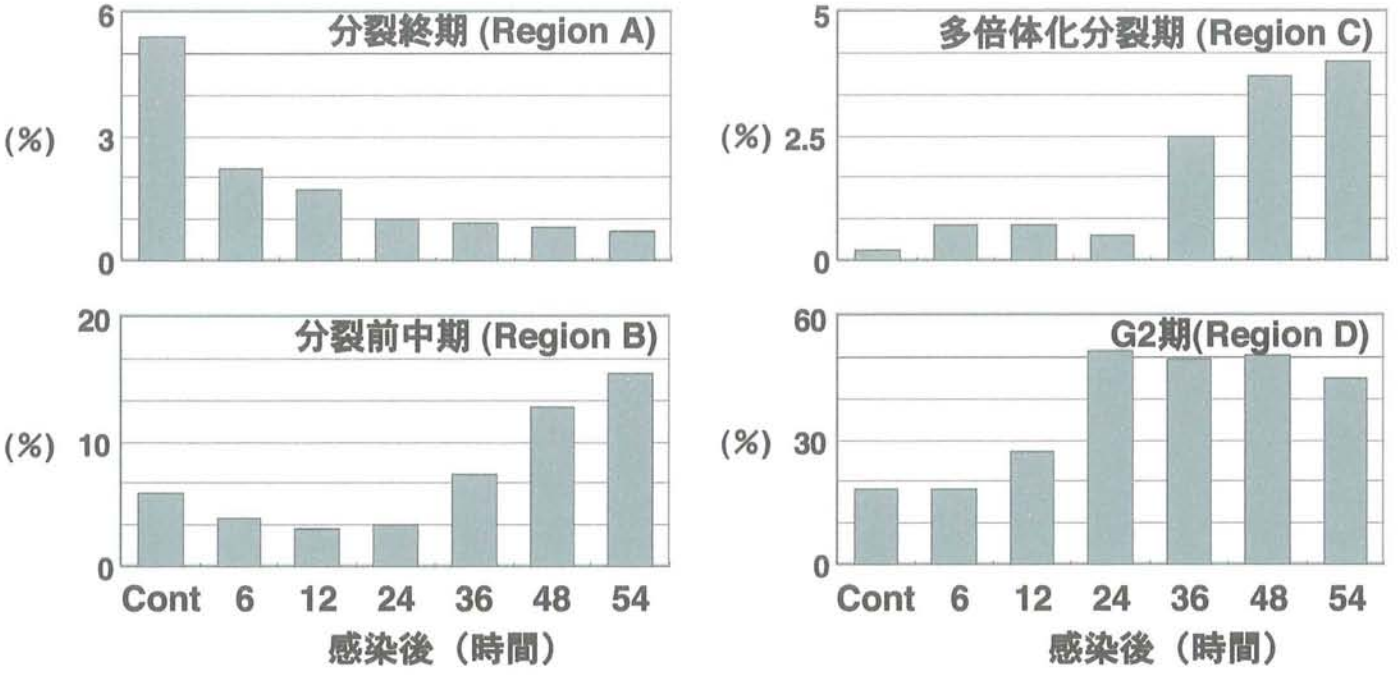
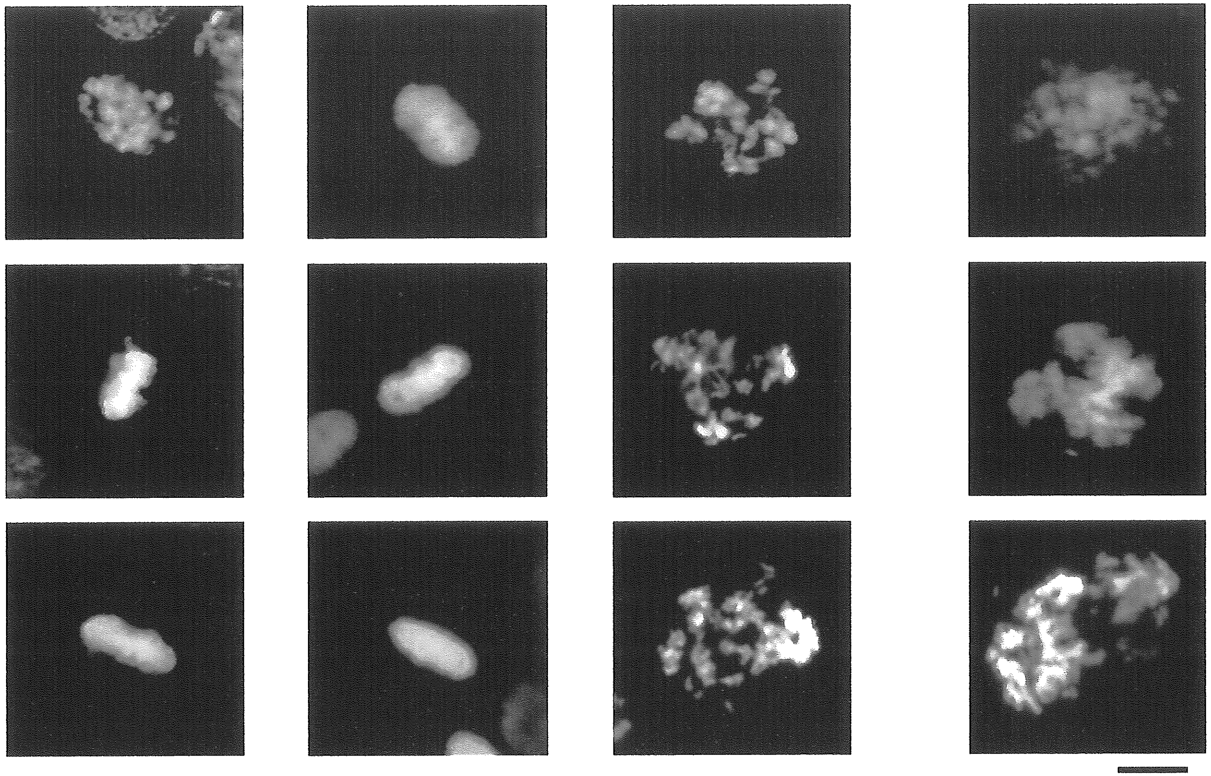

分裂終期 (Region A)
(%)
6
3
0
多倍体化分裂期 (Region C)
(%)
5
2.5
0
分裂前中期 (Region B)
(%)
20
10
0
G2期(Region D)
(%)
60
30
0
Cont
6
12
24
36
48
54
感染後（時間）
Cont
6
12
24
36
48
54
感染後（時間）

図 6

Region	B			C
	Cont	R-	R+	R+



10 mm

分裂中期	29% (2/7)	31% (11/35)	2% (1/57)
ラギング染色体	0% (0/7)	3% (1/35)	56% (32/57)

図 7

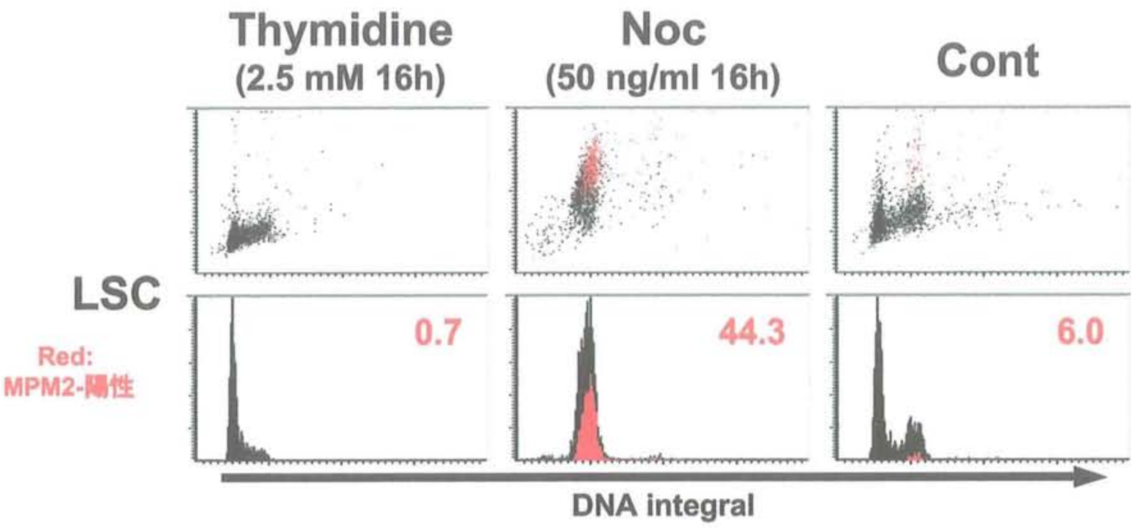

Thymidine
(2.5 mM 16h)
Noc
(50 ng/ml 16h)
Cont
LSC
Red:
MPM2-陽性
0.7
44.3
6.0
DNA integral

図 8

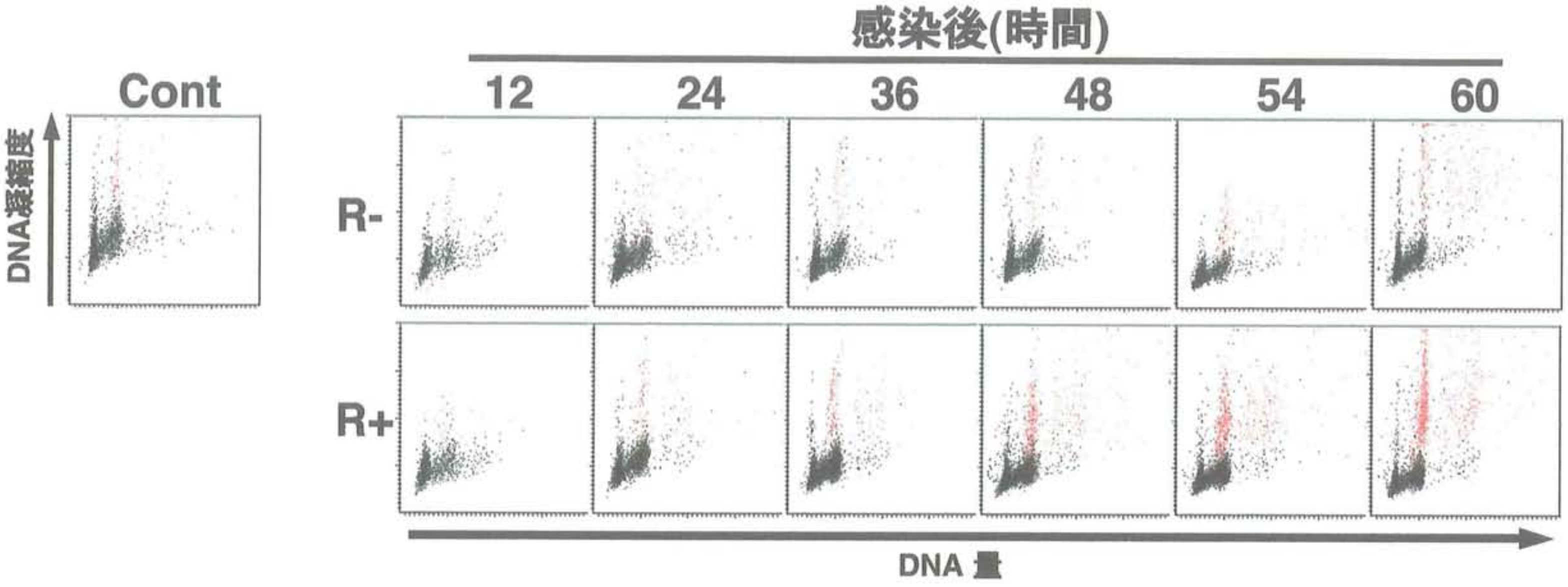
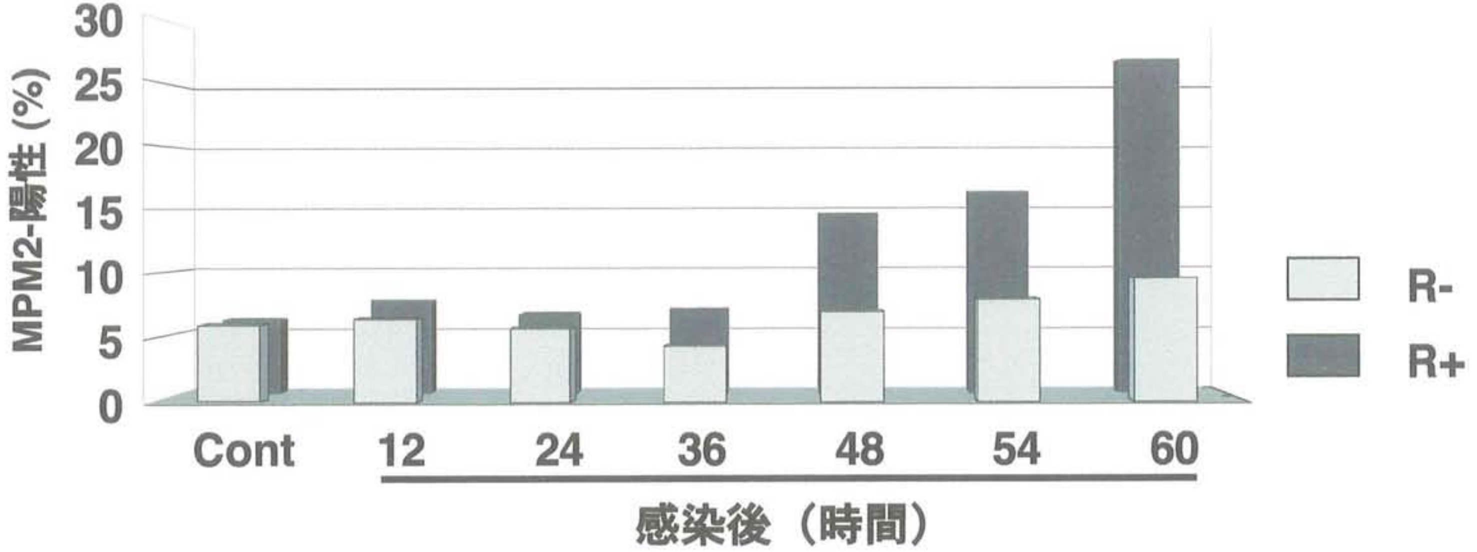


図 9



35

図 10

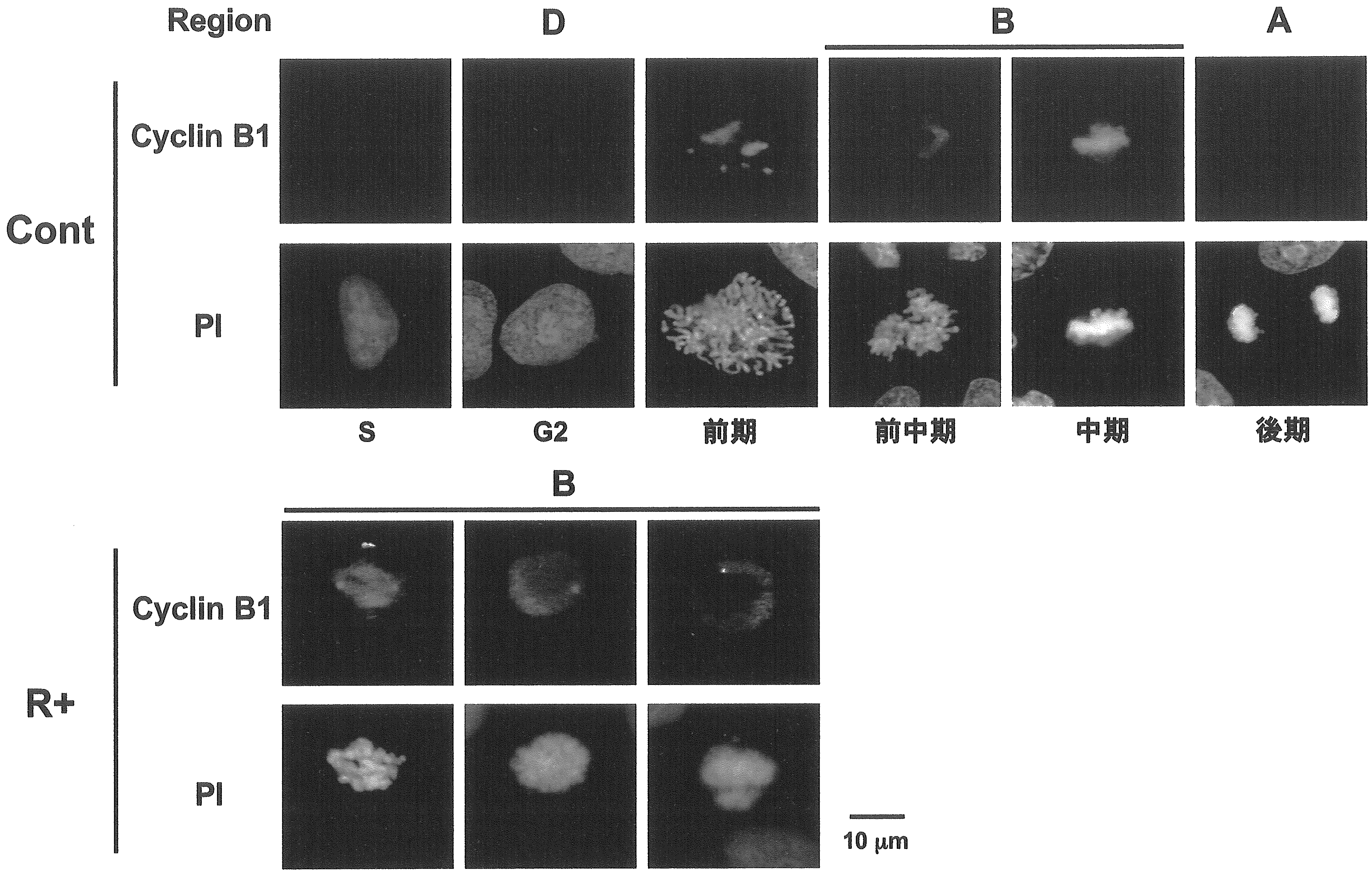

Region
D
B
A
Cont
Cyclin B1
PI
S
G2
前期
前中期
中期
後期
B
R+
Cyclin B1
PI
10 μm

図 11

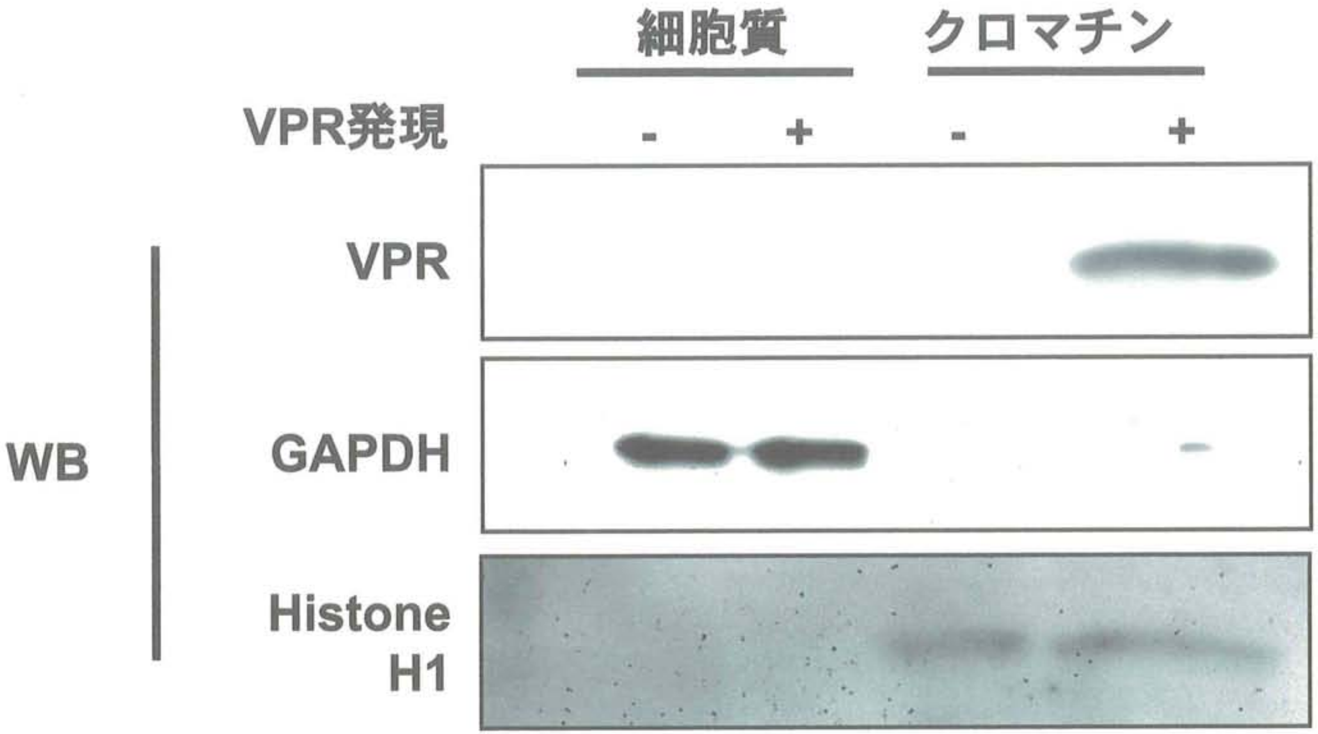


図 12

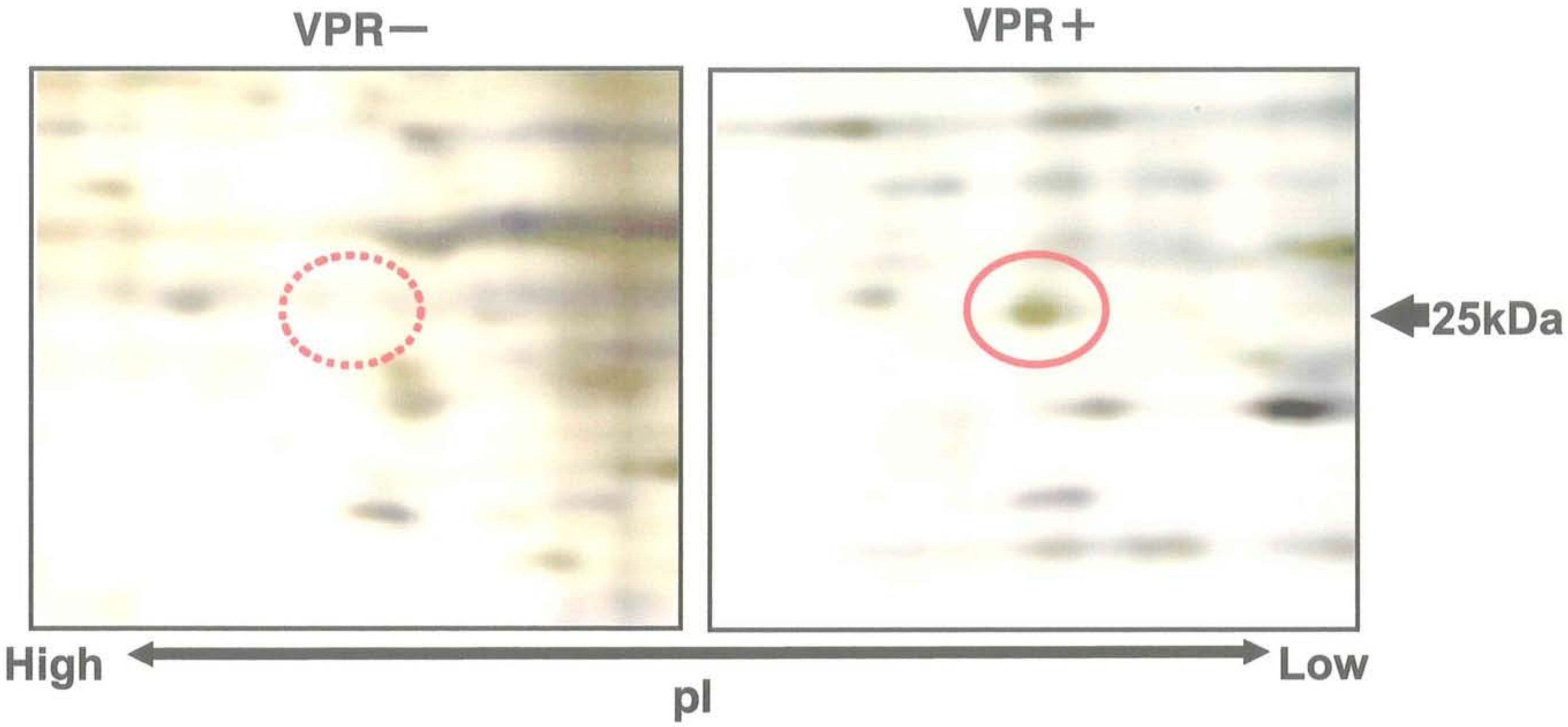
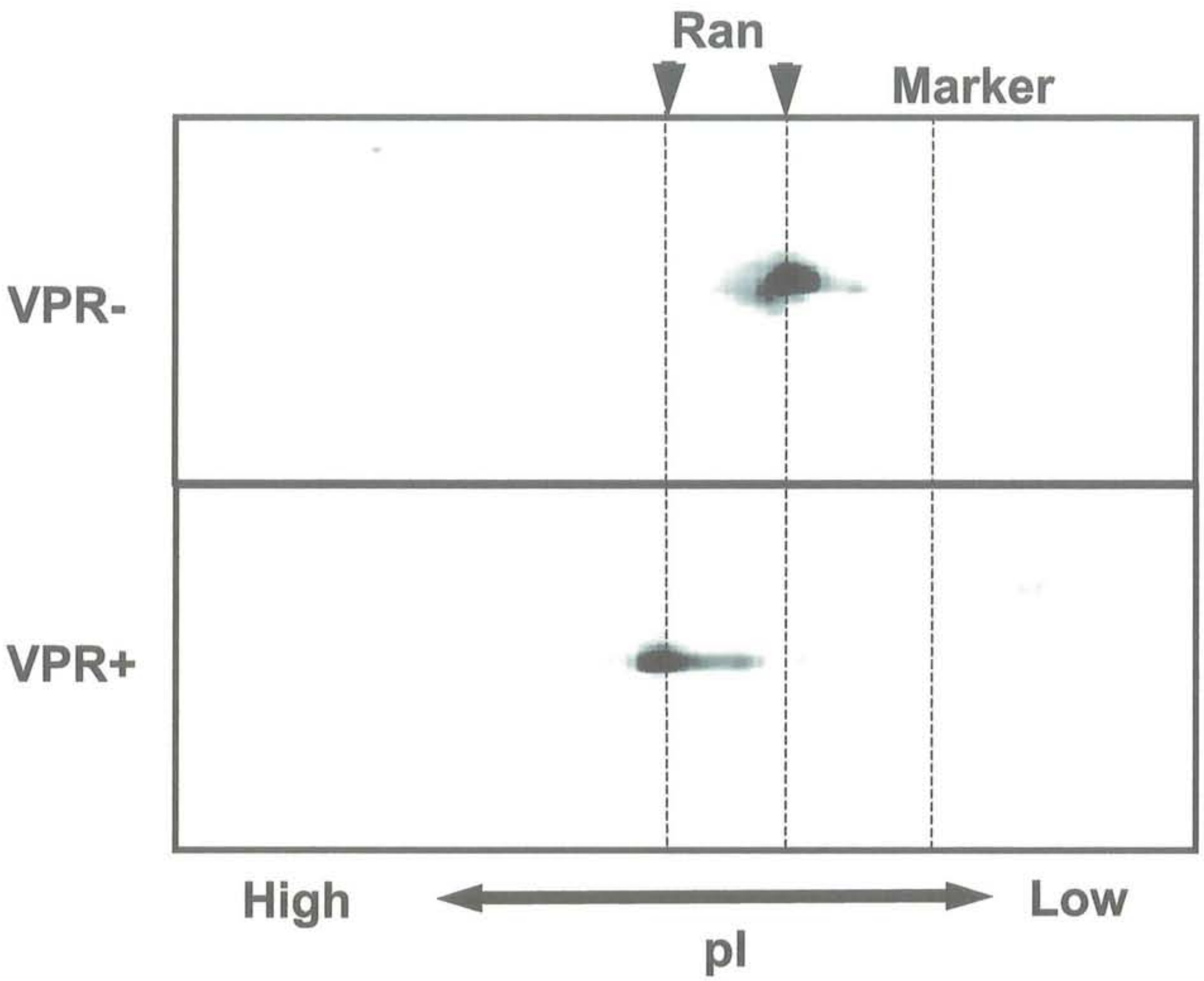


表 1

	MOWSE Score	#/16(%) Masses Matched	Protein MW (Da)/pI	Protein Name
1	9728	7 (43)	24423/7.0	GTP-binding nuclear protein Ran
2	38.8	4 (25)	48198/5.6	NF-kappa-B essential modulator
3	32.2	5 (31)	45836/9.8	Myeloid cell nuclear differentiation antigen
4	23.2	4 (25)	33538/5.4	Upstream stimulatory factor 1
5	12.2	4 (25)	48128/8.3	Glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor

図 13



40

図 14

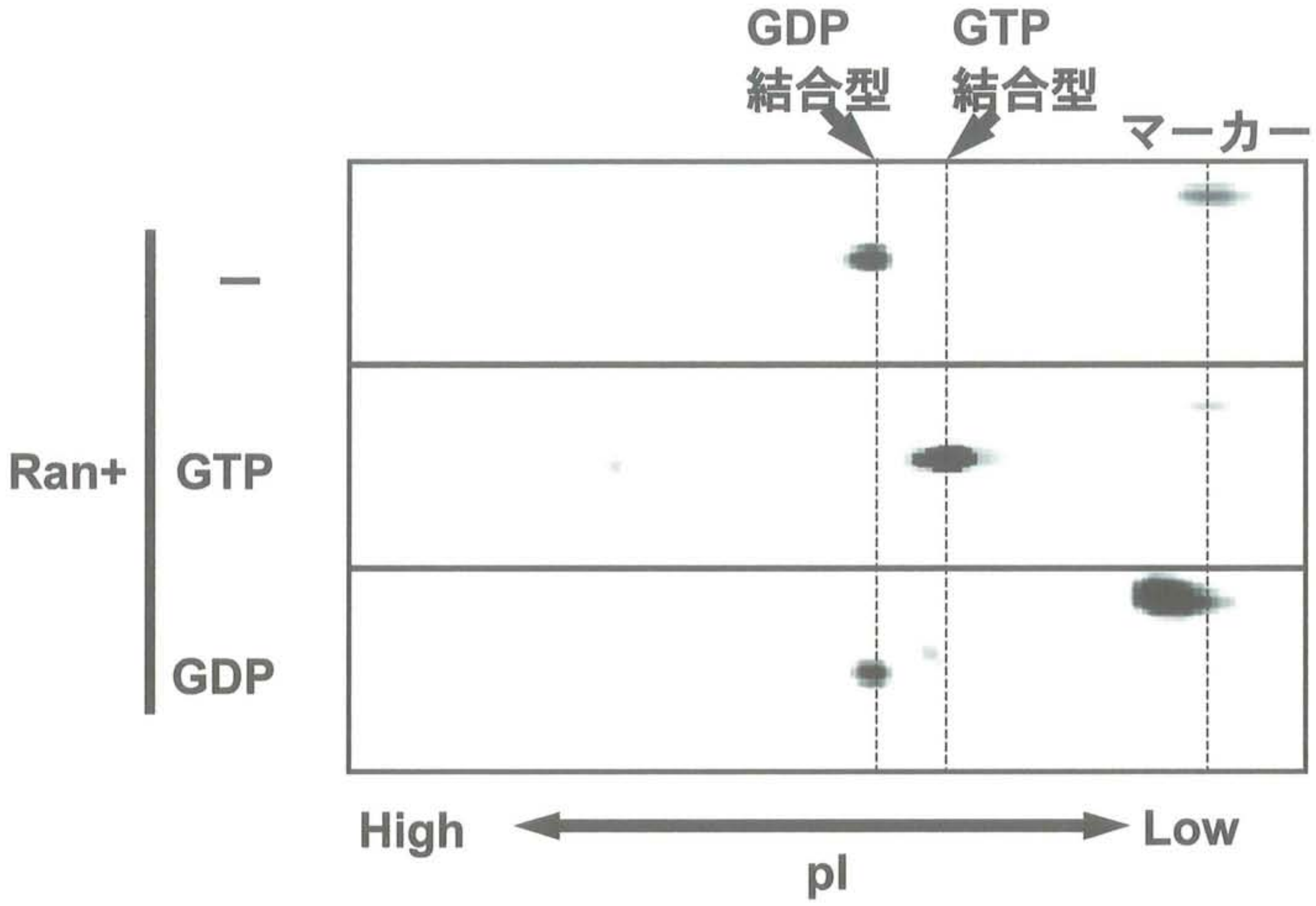


図 15

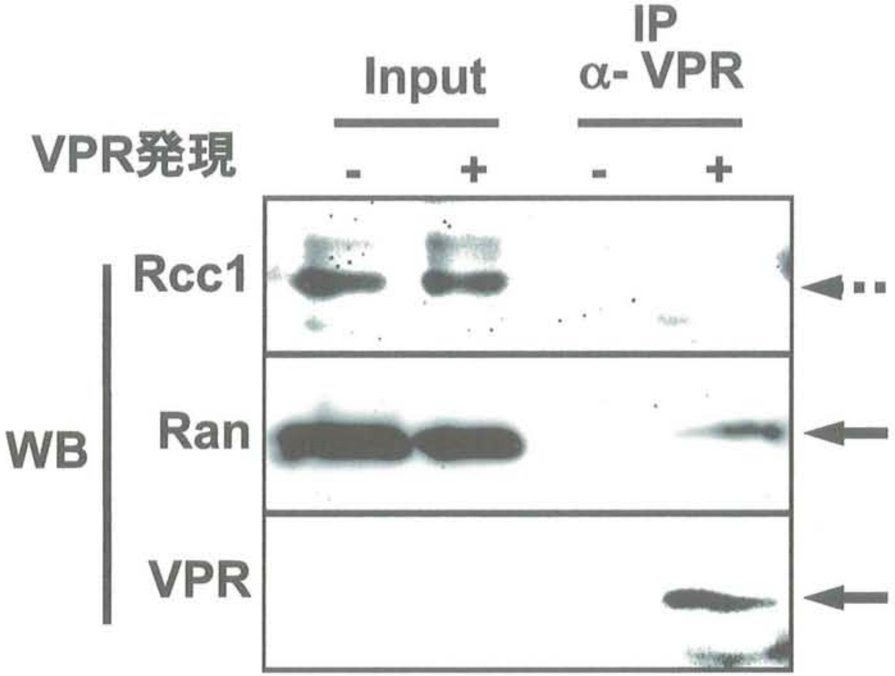


図 16

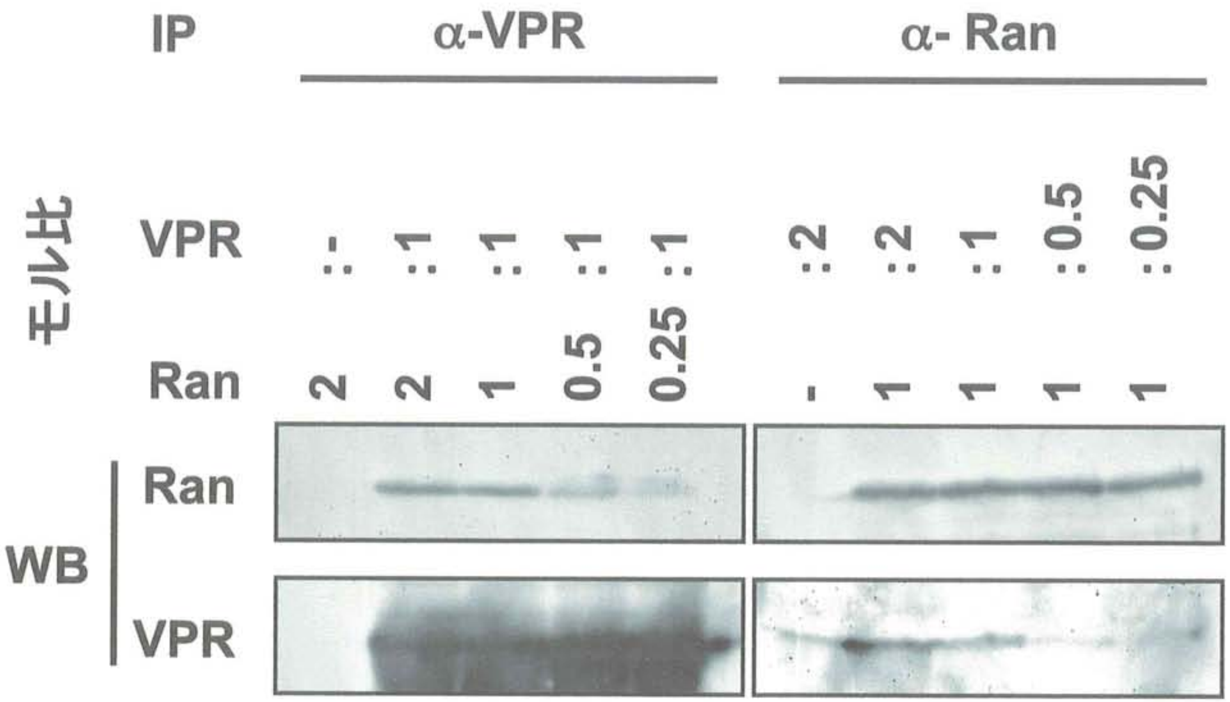


表 2

	KD値		Fold increase (Ran/VPR)
	VPR	Ran	
GTP	8.74e-5	0.00113	13
GDP	1.42e-4	8.19e-8	5.75e-4

β-チュブリン

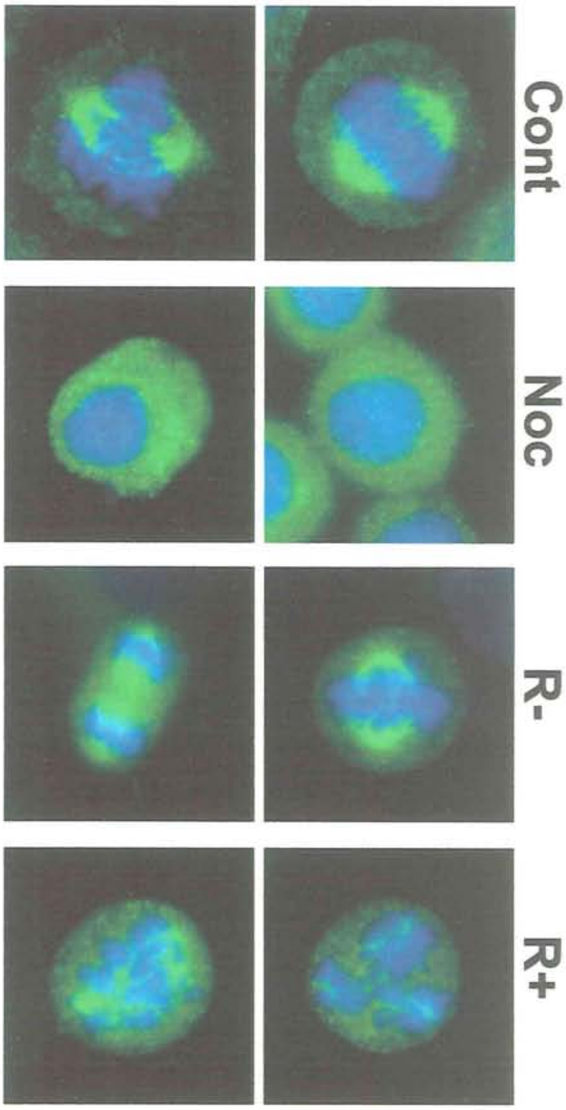


図 17

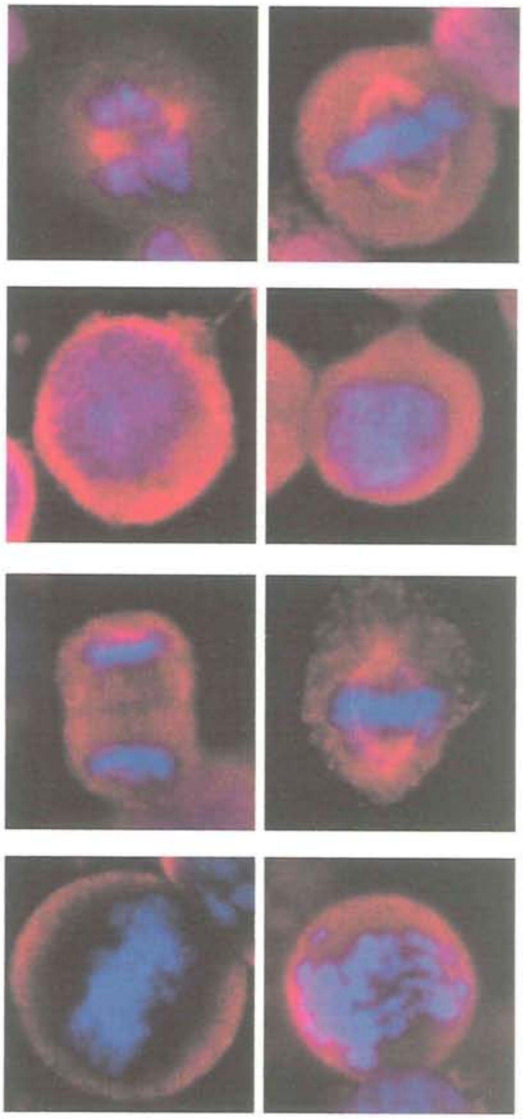
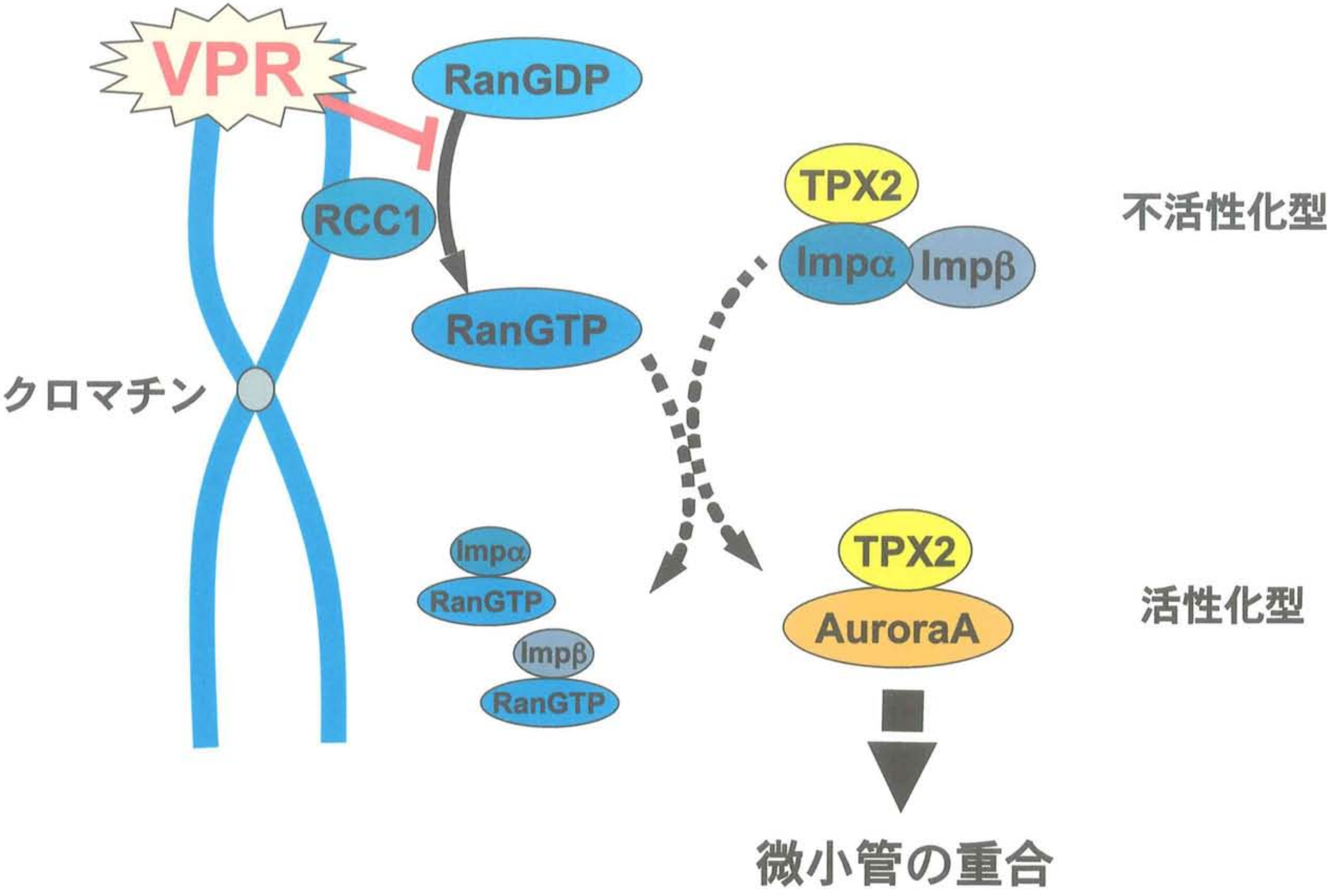


図 18

図 19


VPR
RanGDP
RCC1
RanGTP
クロマチン
TPX2
Impα
Impβ
不活性化型
Impα
RanGTP
Impβ
RanGTP
TPX2
AuroraA
活性化型
微小管の重合

参考文献

Accola MA, Bukovsky AA, Jones MS, Gottlinger HG. A conserved dileucine-containing motif in p6(gag) governs the particle association of Vpx and Vpr of simian immunodeficiency viruses SIV(mac) and SIV(agm). J Virol. 1999 73(12):9992-9.

Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, Martin MA. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. J Virol. 1986 59(2):284-91.

Agostini I, Navarro JM, Bouhamdan M, Willetts K, Rey F, Spire B, Vigne R, Pomerantz R, Sire J. The HIV-1 Vpr co-activator induces a conformational change in TFIIB. FEBS Lett. 1999 450(3):235-9.

Andersen JL, Planelles V. The role of Vpr in HIV-1 pathogenesis. Curr HIV Res. 2005 Jan;3(1):43-51.

Arnaoutov A, Azuma Y, Ribbeck K, Joseph J, Boyarchuk Y, Karpova T, McNally J, Dasso M. Crm1 is a mitotic effector of Ran-GTP in somatic cells. Nat Cell Biol. 2005 7(6):626-32.

Arnaoutov A, Dasso M. The Ran GTPase regulates kinetochore function. Dev Cell. 2003 5(1):99-111.

Bachand F, Yao XJ, Hrimech M, Rougeau N, Cohen EA. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor. J Biol Chem. 1999 274(13):9083-91.

Balczon R. Centrosome replication in somatic cells: the significance of G1 phase. Curr Top Dev Biol. 2000 49:251-66.

Bartz SR, Rogel ME, Emerman M. Human immunodeficiency virus type 1 cell cycle control: Vpr is cytostatic and mediates G2 accumulation by a mechanism which differs from DNA damage checkpoint control. J Virol. 1996 70(4):2324-31.

Bischoff FR, Ponstingl H. Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991a 88(23):10830-4.

Bischoff FR, Ponstingl H. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. Nature. 1991b 354(6348):80-2.

Bukrinsky M. A hard way to the nucleus. Mol Med. 2004 10(1-6):1-5.

Chen R, Le Rouzic E, Kearney JA, Mansky LM, Benichou S. Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages. J Biol Chem. 2004 279(27):28419-25.

Chen R, Wang H, Mansky LM. Roles of uracil-DNA glycosylase and dUTPase in virus replication. J Gen Virol. 2002 83(10):2339-45.

Chiao EY, Krown SE. Update on non-acquired immunodeficiency syndrome-defining malignancies. Curr Opin Oncol. 2003 Sep;15(5):389-97.

Cimini D, Moree B, Canman JC, Salmon ED. Merotelic kinetochore orientation occurs frequently during early mitosis in mammalian tissue cells and error correction is achieved by two different mechanisms. J Cell Sci. 2003 116(20):4213-25.

Cohen EA, Terwilliger EF, Jalinoos Y, Proulx J, Sodroski JG, Haseltine WA. Identification of HIV-1 vpr product and function. J Acquir Immune Defic Syndr. 1990 3(1):11-8.

Depienne C, Roques P, Creminon C, Fritsch L, Casseron R, Dormont D, Dargemont C, Benichou S. Cellular distribution and karyophilic properties of matrix, integrase, and Vpr proteins from the human and simian immunodeficiency viruses. Exp Cell Res. 2000 260(2):387-95.

Dupont S, Sharova N, DeHoratius C, Virbasius CM, Zhu X, Bukrinskaya AG, Stevenson M, Green MR. A novel nuclear export activity in HIV-1 matrix protein required for viral replication. Nature. 1999 402(6762):681-5.

Engels EA, Biggar RJ, Marshall VA, Walters MA, Gamache CJ, Whitby D, Goedert JJ. Detection and quantification of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus to predict AIDS-associated Kaposi's sarcoma. AIDS. 2003 17(12):1847-51.

Fassati A, Goff SP. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human

immunodeficiency virus type 1. J Virol. 2001 75(8):3626-35.

Freed EO. HIV-1 replication. Somat Cell Mol Genet. 2001 26(1-6):13-33.

Gallay P, Hope T, Chin D, Trono D. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 94(18):9825-30.

Gallay P, Swingler S, Aiken C, Trono D. HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. Cell. 1995 80(3):379-88.

Goh WC, Rogel ME, Kinsey CM, Michael SF, Fultz PN, Nowak MA, Hahn BH, Emerman M. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. Nat Med. 1998 4(1):65-71.

Gorlich D, Kostka S, Kraft R, Dingwall C, Laskey RA, Hartmann E, Prehn S. Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. Curr Biol. 1995 Apr 1;5(4):383-92.

Gorlich D, Pante N, Kutay U, Aebi U, Bischoff FR. Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. EMBO J. 1996 Oct 15;15(20):5584-94.

Gruss OJ, Wittmann M, Yokoyama H, Pepperkok R, Kufer T, Sillje H, Karsenti E, Mattaj IW,

Vernos I. Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. Nat Cell Biol. 2002 4(11):871-9.

Haffar OK, Popov S, Dubrovsky L, Agostini I, Tang H, Pushkarsky T, Nadler SG, Bukrinsky M. Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. J Mol Biol. 2000 299(2):359-68.

Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, Gendelman HE, Ratner L, Stevenson M, Emerman M. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 91(15):7311-5.

Jenkins Y, Sanchez PV, Meyer BE, Malim MH. Nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Vpr is not required for virion packaging. J Virol. 2001 75(17):8348-52.

Kamata M, Nitahara-Kasahara Y, Miyamoto Y, Yoneda Y, Aida Y. Importin-alpha promotes passage through the nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. J Virol. 2005 79(6):3557-64.

Kisurina-Evgenieva O, Mack G, Du Q, Macara I, Khodjakov A, Compton DA. Multiple mechanisms regulate NuMA dynamics at spindle poles. J Cell Sci. 2004 117(26):6391-400.

Krokan HE, Otterlei M, Nilsen H, Kavli B, Skorpen F, Andersen S, Skjelbred C, Akbari M, Aas PA, Slupphaug G. Properties and functions of human uracil-DNA glycosylase

from the UNG gene. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 2001;68:365-86.

Lu YL, Spearman P, Ratner L. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. J Virol. 1993 67(11):6542-50.

Miller MD, Farnet CM, Bushman FD. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. J Virol. 1997 71(7):5382-90.

Minemoto Y, Shimura M, Ishizaka Y, Masamune Y, Yamashita K. Multiple centrosome formation induced by the expression of Vpr gene of human immunodeficiency virus. Biochem Biophys Res Commun. 1999 May 10;258(2):379-84.

Muller B, Tessmer U, Schubert U, Krausslich HG. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein is incorporated into the virion in significantly smaller amounts than gag and is phosphorylated in infected cells. J Virol. 2000 74(20):9727-31.

Nishijima H, Seki T, Nishitani H, Nishimoto T. Premature chromatin condensation caused by loss of RCC1. Prog Cell Cycle Res. 2000 4:145-56.

Ogawa K, Shibata R, Kiyomasu T, Higuchi I, Kishida Y, Ishimoto A, Adachi A. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus vpr open reading frame. J Virol. 1989 63(9):4110-4.

Pacek M, Walter JC. A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. EMBO J. 2004 23(18):3667-76.

Re F, Braaten D, Franke EK, Luban J. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. J Virol. 1995 69(11):6859-64.

Reil H, Bukovsky AA, Gelderblom HR, Gottlinger HG. Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein. EMBO J. 1998 17(9):2699-708.

Richards SA, Carey KL, Macara IG. Requirement of guanosine triphosphate-bound ran for signal-mediated nuclear protein export. Science. 1997 Jun 20;276(5320):1842-4.

Roshal M, Kim B, Zhu Y, Nghiem P, Planelles V. Activation of the ATR-mediated DNA damage response by the HIV-1 viral protein R. J Biol Chem. 2003 278(28):25879-86.

Seewald MJ, Kraemer A, Farkasovsky M, Korner C, Wittinghofer A, Vetter IR. Biochemical characterization of the Ran-RanBP1-RanGAP system: are RanBP proteins and the acidic tail of RanGAP required for the Ran-RanGAP GTPase reaction? Mol Cell Biol. 2003 Nov;23(22):8124-36.

Shi Q, King RW. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. Nature. 2005 Oct 13;437(7061):1038-42.

Shimura M, Tanaka Y, Nakamura S, Minemoto Y, Yamashita K, Hatake K, et al. Micronuclei formation and aneuploidy induced by Vpr, an accessory gene of human immunodeficiency virus type 1. FASEB J. 1999a 13:621-37.

Shimura M, Onozuka Y, Yamaguchi T, Hatake K, Takaku F, Ishizaka Y. Micronuclei formation with chromosome breaks and gene amplification caused by Vpr, an accessory gene of human immunodeficiency virus. Cancer Res. 1999b 59:2259-64.

Shimura M, Tokunaga K, Konishi M, Sato Y, Kobayashi C, Sata T, Ishizaka Y. Premature sister chromatid separation in HIV-1-infected peripheral blood lymphocytes. AIDS. 2005 Sep 2;19(13):1434-1438.

Tokuyama Y, Horn HF, Kawamura K, Tarapore P, Fukasawa K. Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. J Biol Chem. 2001 276(24):21529-37.

Tristem M, Marshall C, Karpas A, Hill F. Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpx and vpr. EMBO J. 1992 (9):3405-12.

Tsai MY, Wiese C, Cao K, Martin O, Donovan P, Ruderman J, Prigent C, Zheng Y. A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. Nat Cell Biol. 2003 Mar;5(3):242-8.

Tsukasaki K, Koeffler P, Tomonaga M. Human T-lymphotropic virus type 1 infection. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol. 2000 13(2):231-43.

Ueno T, Sakai H. The function of accessory genes of HIV-1. Nippon Rinsho. 2002 60(4):674-80.

Wang L, Mukherjee S, Jia F, Narayan O, Zhao LJ. Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat. J Biol Chem. 1995 270(43):25564-9.

Wang W, Budhu A, Forgues M, Wang XW. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. Nat Cell Biol. 2005 7(8):823-30.

Zhang C, Clarke PR. Roles of Ran-GTP and Ran-GDP in precursor vesicle recruitment and fusion during nuclear envelope assembly in a human cell-free system. Curr Biol. 2001 11(3):208-12.

Zimmerman ES, Chen J, Andersen JL, Ardon O, Dehart JL, Blackett J, Choudhary SK, Camerini D, Nghiem P, Planelles V. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-mediated G2 arrest requires Rad17 and Hus1 and induces nuclear BRCA1 and gamma-H2AX focus formation. Mol Cell Biol. 2004 24(21):9286-94.