

氏 名（本籍）	たぐち 田 口	たかし 崇（兵庫 県）
学 位 の 種 類	博 士（医 学）	
学 位 記 番 号	博 甲 第 4102 号	
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 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	人間総合科学研究科	
学 位 論 文 題 目	HIV-1 アクセサリー遺伝子 <i>vpr</i> による M 期の異常と Ran の機能解析	
主 査	筑波大学教授	獣医学博士
副 査	筑波大学助教授	医学博士
副 査	筑波大学助教授	医学博士
副 査	筑波大学講師	博士（工学）
		八 神 健 一
		内 田 和 彦
		竹 内 薫
		奥 脇 暢

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### （目的）

HIV-1 アクセサリー遺伝子 *vpr* は G2/M arrest 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うゲノム不安定性を誘発するが、そのメカニズムは不明である。本研究は、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た。

### （対象と方法）

レンチウイルスベクター（2 次ウイルスの産生能を欠失した pseudotype-HIV ベクター）を用い、野生型 VPR を含むウイルス（以下、VPR + ウイルス）と変異型 VPR を含むウイルス（以下、VPR- ウイルス）を HeLa 細胞に感染させた後、レーザースキャニングサイトメーターにより細胞周期と免疫染色による解析を行った。次いで、VPR の機能を解析するため、プロテオーム解析を行った。

### （結果）

#### 1) VPR による分裂期の異常の誘導

VPR + ウイルスにより感染後に著明な G2 期細胞の貯留を認め、その後、徐々に減少した。分裂期の細胞は感染後一度減少した後増加に転じ、60 時間後には 25% の細胞が分裂期に貯留した。一方、VPR- ウイルスによる細胞周期の大きな変化は認められなかった。また、VPR による分裂期細胞の貯留は染色体が紡錘体赤道面に集合する前段階、即ち分裂前期の状態を示した。さらに、染色体の分配異常や紡錘体の形成不良も検出された。これらの結果から VPR によるゲノム不安定性は分裂期の異常により誘導されることが示唆された。

#### 2) VPR による Ran の制御

クロマチン画分を 2 次元電気泳動法で展開し、VPR 発現細胞とコントロール細胞由来の検体間でスポットを比較した結果、VPR で特異的に誘導されるスポットを 5 個見出した。ToF-MAS 解析の結果、グアニンヌクレオチド結合タンパク質である Ran（Ras related nuclear protein）を同定した。2 次元電気泳動法と Ran

の抗体を用いたウェスタンブロッティング法により、VPRが発現すると Ran の pI が高くなり、泳動時のスポットが移動することが認められた。次いで、Ran のリコンビナントタンパク質を発現精製し GTP または GDP と結合させ RanGTP, RanGDP を調製し、2 次元電気泳動法で解析した結果、RanGDP は RanGTP より高い pI を示した。これらの結果からクロマチン上に存在する VPR が GDP 型から GTP 型へ変化する Ran の修飾を阻害することが示唆された。次に分裂期において微小管の重合を促進する 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したが、VPR 発現細胞では明確な局在は観察されなかった。

#### (考察)

Ran は微小管の重合やキネトコアの構成による紡錘体の形成、中心体の数の制御など、分裂期において重要な役割を担う。最近、RanGDP はクロマチン上のグアニンヌクレオチド変換因子である RCC1 によって RanGTP に変換され、TPX2 を活性化型に変換することが示唆された。この活性化型 TPX2 は中心体から紡錘体に沿って局在し、微小管重合および紡錘体の形成を促進すると考えられる。本研究において、VPR が分裂期の細胞を貯留させ、染色体の分配異常を誘発すること、また Ran のクロマチン上での修飾を阻害し GTP 結合型 Ran の形成を阻害すること、さらに Ran の制御により分裂期の進行を阻害する可能性が示唆された。今後、TPX2 の活性化に関与する AuroraA との会合を示すことにより VPR により誘導される M 期の異常の分子機序として、Ran-TPX2 の活性化障害であることを明らかにできると思われる。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、HIV-1 アクセサリー遺伝子 *vpr* による感染細胞のゲノム不安定化のメカニズムを明らかにしようとするもので、ウイルスベクターを用いた VPR の発現による細胞周期や発現タンパクのプロテオーム解析を行った。その結果、VPR は分裂期の細胞を貯留させ、染色体の分配異常を誘発すること、Ran のクロマチン上での修飾を阻害し、GTP 結合型 Ran の形成を阻害すること、さらに Ran の制御により分裂期の進行を阻害する可能性を示し、VPR によるゲノム不安定化特に M 期の異常の分子機序として、Ran-TPX2 の活性化障害であることを示唆した。HIV のウイルス複製や AIDS の病態発生に関連する感染細胞のゲノム不安定化の基本的な分子機構に関する有用な情報をもたらす優れた研究である。

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。