

氏 名(本籍)	にし 西	ざわ 澤	まさ 雅	こ 子
学位の種類	博	士	(農	学)
学位記番号	農	博	第	618号
学位授与年月日	平	成	12年	3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科畜産学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	Analysis of the Mechanism of Cell Growth Retardation Induced by HIV-1 Accessory Gene Product Vpr (HIV-1 アクセサリー遺伝子産物 Vpr の細胞増殖抑制機構の解析)			
論文審査委員	(主 査)	教 授	勝 亦 瞭 一	
		教 授	小 原 嘉 昭	
		教 授	太 田 實	

論文内容要旨

序論

レトロウイルス科に属する数々のウイルスは、ヒト、サル、ウシ、ウマ、ネコなどの哺乳動物やニワトリに種特異的に感染し、白血病・乳ガン・肉腫・免疫不全といった様々な疾患を引き起こす。それらレトロウイルスの中で、疾患との関わりが最も良く研究されているのは、後天性免疫不全症(エイズ)を引き起こすヒト免疫不全ウイルス1型(Human immunodeficiency virus type 1: HIV-1)である。HIV-1はCD4陽性T細胞及びマクロファージに感染し死滅させるため、エイズ患者は免疫系が破綻して死に至ることが知られる。その発症過程の細部を明らかにすることは、新たな治療法を開発するために重要であるのみならず、動物界におけるその他のレトロウイルス疾患の発症機構を理解するのにも役立つものと予想される。

HIV-1は他のレトロウイルスにない特徴として、ウイルス複製に必須でない幾つかのアクセサリ一遺伝子を有している。それら遺伝子産物の1つであるVprは、マクロファージへのHIV-1の感染効率を上昇させ、またHIV-1潜伏感染細胞からのウイルス産生を惹起する作用があり、エイズ発症と深く関わっていると見なされている。また、リンパ球系細胞株においては、発現されたVprは、細胞周期をG₂(gap2)期で停止(G₂期アレスト)させ、その細胞増殖が抑制されると同時に、ウイルス産生が高まることが認められている(1)。以上の知見は、VprがHIV-1感染細胞をG₂期アレストさせ、ウイルス複製効率を著しく高めることによって、エイズが発症するということを予想させる。従って、Vprの機能をより詳しく解析することは極めて重要であると思われる。

Vprは核に局在する96アミノ酸残基からなる蛋白で、大きく5つのドメイン(Fig. 1参照)に分けることができる。最近、Vprの多様な機能は、それぞれ別のドメインに依存して発揮されることが分かってきた(2,4,5)が、Vpr蛋白のどのドメインがG₂期アレストに関与するのかは明らかでない。一方、vpr遺伝子を導入した齧歯類細胞においては、Vprは細胞周期をG₂期でアレストすることなくその増殖を抑制することが報告されており(3)、Vprには別の細胞増殖抑制作用があることも考えられる。このような増殖抑制は、霊長類細胞ではG₂期アレストが先行するため、検出し難いものと思われる。Vprの持つ多様な機能が、別々のドメインに依存していることを考慮すると、G₂期アレストと第2の細胞増殖抑制能は異なるドメインに担われている可能性がある。その検証は、Vprの各ドメインの欠失変異体を用いることによって行えるものと予想される。そこで、本研究では、Vprの各種欠失変異体をHeLa細胞で発現させる系を使って、G₂期アレストに係わるドメインの決

定と G₂期アレストによらない細胞増殖の抑制についての解析を行うこととした。

第1章 HIV-1 のC末端欠失型 Vpr 蛋白による G₂期アレストを介さない細胞の増殖抑制

HIV-1 感染性 DNA クローン pNL43 を鋳型として、PCR 法により *vpr* 遺伝子の各ドメインの欠失変異体を作製し、ヒト子宮頸部癌由来 HeLa 細胞株に導入した (Fig. 1)。ウエスタンブロットで HeLa 細胞内の発現を確認できた変異体を選び、これらを導入した細胞の細胞周期を Flow cytometry 法により測定し、G₂期アレスト能の有無について解析した (Fig. 2)。DNA 含量は FACSscan により解析後、G₂/M 期、G₁ 期の細胞の比率 (G₂/M:G₁ 比) を ModFit LT™ (Verity Software House, Inc.) システムにより計算した。野生型 *vpr* 導入細胞での G₂/M:G₁ 比を 1.00 としたときのコントロール及び変異体導入細胞のそれと比較した場合、導入した全ての変異体の G₂ 期アレスト能は野生型と比較してコントロールベクターと同程度にまで低下した (Table 1)。この結果から、Vpr の高次構造が G₂ 期アレストの誘導に重要であることが分かった。さらに Vpr の G₂ 期アレスト以外の増殖抑制能について解析するために、各種欠失変異体の細胞増殖に及ぼす効果をコロニー形成法により解析した。野生型 *vpr* 遺伝子を導入した HeLa 細胞におけるコロニー形成阻害率を 100% としたときの、各変異体でのコロニー形成阻害率 (Table 2) を算出したところ、C81 変異体のみが約 35% の細胞増殖抑制効果を示した。この結果は Vpr には G₂ 期アレスト以外の細胞増殖抑制効果も有する可能性を示唆するものである。

Vpr の多様な機能発揮には Vpr の C 末端側に存在するロイシンジッパー様ドメインの重要性が指摘されている (2, 4, 5)。そこで、Vpr と C81 が誘導する細胞増殖抑制能の機能残基を決定するために、HIV-1 分離株間の Vpr のロイシンジッパー様ドメインのアミノ酸配列のホモロジー解析を行った (Fig. 3)。ロイシンジッパー様ドメイン中の 60、67、74、81 位の Ile/Leu が HIV-1 分離株間で高度に保存されていたことから、野生型 *vpr* および C81 のロイシンジッパー様ドメインの 60、67、74、81 位の Ile/Leu を各々 PCR 法により Pro に置換した変異体を作製した (Fig. 4)。野生型 *vpr* およびその変異体を導入した HeLa 細胞の細胞周期を Flow cytometry 法により、細胞増殖に及ぼす効果をコロニー形成法により解析した。この結果、ロイシンジッパー様ドメインの 74、81 位の Ile を Pro に置換することで野生型 *vpr* によって誘導される G₂ 期アレストは完全に消失し、同時に増殖阻害も

見られなかった(Fig. 5A、B)。一方、60及び67位の点変異体は各々約17%のG₂期アレスト能を残しており、コロニー形成法でも増殖抑制が見られた。次にC81により誘導される細胞増殖抑制の機能残基を明らかにするため、C81の点変異体(Fig. 4参照)を導入したHeLa細胞における[³H]thymidineの細胞内への取り込み量を測定し、細胞増殖能を比較した(Fig. 6)。60、67、74位の点変異体を導入したHeLa細胞では[³H]thymidineの細胞内への取り込みはコントロールベクターを導入した細胞と同レベルであったが、81位の点変異体C81/I81Pでは40%抑制された。このことからG₂期アレストの発揮にはロイシンジッパー様ドメインの74、81位のIleが、C81により誘導される細胞増殖抑制には、60、67、74位のIle/Leuが特に重要であることが明らかとなった。

これらの結果から、VprはG₂期アレストを介さない増殖抑制能も有している可能性があり、前述の齧歯類細胞で起こる細胞増殖抑制はこの効果のみが発揮されるためであると考えられる。また、VprとC81の持つ増殖抑制活性は互いに異なる残基に依存して発揮されることから、この二つの細胞増殖抑制活性は異なる経路を介して誘導される可能性のあることが示唆された。

第2章 HIV-1のC末端欠失型Vpr蛋白によるG₁期アレストを介したアポトーシスの誘導

前章でVprのC末端欠失変異体C81はG₂期アレスト以外の機能によって細胞増殖を誘導することを明らかにしてきた。その増殖抑制活性をさらに詳細に解析するために、まずC81、あるいは野生型Vpr発現細胞における細胞増殖マーカーのBrdUの細胞内への取り込みをanti-BrdU抗体で蛍光染色し観察した。その結果、VprとC81発現細胞ではanti-BrdU抗体で染色される細胞がコントロールベクター導入細胞と比較して減少していたことから、増殖抑制を起こしていることが確認された(Fig. 7A)。次にDNA複製のライセンス化に関わる因子であるMCM蛋白の核内局在を抗MCM抗体を用いた蛍光染色で調べた。MCMは細胞周期のS期後期~G₂期にかけてDNAから遊離し、界面活性剤によって核から容易に溶出される。そのため、界面活性剤処理したS期後期~G₂期の細胞は、anti-MCM抗体によって核が染色されない。このMCMの性質を利用して解析した結果、Vpr発現細胞ではG₂期の細胞が多く見られたのに対し、C81発現細胞では核が染色されている細胞、即ちG₂期ではない細胞がコントロールベクター導入細胞とほぼ同じ値を示した(Fig. 7B, Table 3)。この結果から、C81による増殖抑制はG₂期アレストではないことが再確認された。C81

導入細胞の細胞周期を FACS によって解析したところ、C81 導入細胞の $G_2/M:G_1$ 比はコントロールの 0.32 と比べて極端に低下し 0.04 になった(Fig. 7C)。これは C81 の増殖抑制効果は G_2 期アレストではないこと、むしろ G_1 期アレストである可能性を示している。

G_1 期アレストと関連する現象としてアポトーシス誘導が考えられる。そこで C81 による細胞増殖抑制効果がアポトーシスである可能性について検討した。アポトーシス誘導を解析することを目的として、アポトーシスマーカーである annexin V を用いた蛍光染色を行った。遺伝子導入マーカーとして GFP (green fluorescent protein) を共導入し、GFP 発現細胞におけるアポトーシス細胞の割合を算出した。その結果、C81 発現細胞では annexin V によって染色される細胞がコントロールベクターや Vpr 導入細胞に比べて顕著に増加した (Fig. 8A)。微分干渉像による細胞形態の観察の結果、C81 発現細胞ではアポトーシス小体を形成していると思われる細胞がコントロールベクターや Vpr 導入細胞に比べて増加していた(Fig. 8A)。また、Hoechst 33258 を用いた核染色から、C81 発現細胞では核の凝集が高頻度で観察された(Fig. 8B)。さらに、C81 導入細胞において、アポトーシスの実行因子として知られる caspase-3 の顕著な活性上昇が見られた(Fig. 8C)。これらの結果から、C81 はアポトーシスによって細胞増殖抑制を誘導することが明らかになった。

さらに、C81 が細胞周期を G_1 期でアレストすることから、 G_1 期アレストとアポトーシスとの関連性について検討した。コントロールベクター、Vpr 及び C81 を導入した HeLa 細胞の $G_1:G_2/M$ 比、annexin V 陽性細胞数および caspase-3 活性の経時変化を調べた(Fig. 9A-C)。その結果、C81 によって誘導される G_1 期アレストとアポトーシスは同時に誘導され、どちらも DNA 導入後 36 時間で最大値を示した。この結果は、C81 によって誘導される G_1 期アレストとアポトーシスは同じ経路を介して誘導される可能性を示唆している。この点を明確にするために Fig. 4 の C81 点変異体を用いて caspase-3 の活性上昇及び細胞周期を解析した。その結果、アポトーシス誘導能と G_1 期アレスト能は 60、67 及び 74 位の点変異によりほぼ完全に消失したのに対し、81 位の変異では若干残っていた(Fig. 10)。このことから、C81 によって誘導されるアポトーシスと G_1 期アレスト能とが密接に関連していることが検証された。

以上の結果から、C81 が誘導する細胞増殖抑制は、 G_1 期でアポトーシスを介して起こり、その抑制はロイシンジッパー様ドメイン中の異なる残基に依存して発揮されることから、 G_2 期アレストとは異なる経路によって誘導されるものと考えられる(Table 4)。この Vpr 変異体で得られた結果から、野生型 Vpr には、アポトーシスを介して細胞増殖を抑制させる G_1 期アレスト能を保有する

ものと推察される。

総括

HIV-1 アクセサリー遺伝子産物 Vpr は HeLa 細胞に対して細胞周期を G₂ 期で停止させることによって細胞増殖を抑制することが知られているが、Vpr の C 末端を欠失した変異体 C81 は、G₂ 期アレスト能を失っているにも拘わらず、なお、細胞増殖抑制活性を有することを見出した。野生型 Vpr による G₂ 期アレストにはロイシンジッパー様ドメインの 74、81 位の Ile が重要であるのに対し、C81 変異体による細胞増殖抑制には同ドメインの 60、67 および 74 位の Ile/Leu が必要であることから、両者の細胞増殖抑制活性は異なる経路で誘導されることが示唆された。その点をさらに解析し、C81 変異体は G₂ 期ではなく、G₁ 期で細胞増殖を抑制し、その抑制はアポトーシスが誘導されて起こることを検証した。これらの結果から、Vpr は、G₂ 期アレストに加え、アポトーシスを伴って細胞増殖を抑制させる G₁ 期アレスト能をも備えていることを本研究によって初めて明らかにした。

引用文献

- (1) Goh, W. C., Rogel, M. E., Kinsey, C. M., Michael, S. F., Fultz, P. N., Nowak, M. A., Hahn, B. H., and Emerman, M. (1998). HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat. Med.* **4**(1), 65-71.
- (2) Mahalingam, S., Ayyavoo, V., Patel, M., Kieber-Emmons, T., and Weiner, D. B. (1997). Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J. Virol.* **71**(9), 6339-6347.
- (3) Nishino, Y., T. Myojin, M. Kamata, and Y. Aida. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr gene product prevents cell proliferation on mouse NIH3T3 cells without the G₂ arrest of the cell cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**:550-554.
- (4) Mahalingam, S., Collman, R. G., Patel, M., Monken, C. E., and Srinivasan, A. (1995). Functional analysis of HIV-1 Vpr: identification of determinants essential for subcellular localization. *Virology* **212**(2), 331-339.

- (5) Zhao, L. J., Mukherjee, S., and Narayan, O. (1994). Biochemical mechanism of HIV-I Vpr function. Specific interaction with a cellular protein. *J. Biol. Chem.* **269**(22), 15577-15582.

原著論文

- (1) **Masako Nishizawa**, Tetsuya Myojin, Yoshii Nishino, Yutaka Nakai, Masakazu Kamata, and Yoko Aida. (1999). A Carboxy-Terminally Truncated Form of the Vpr Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Retards Cell Proliferation Independently of G₂ Arrest of the Cell Cycle. *Virology* **263**(2), 313-322.
- (2) **Masako Nishizawa**, Masakazu Kamata, Ryoichi Katsumata, and Yoko Aida. (1999). A Carboxy-Terminally Truncated Form of the Vpr Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Induces Apoptosis through G₁ Arrest of the Cell Cycle. Submitted in *J. Virol.*

参考論文

- (1) **Masako (Nishizawa) Chou**, Takafumi Matsunaga, Yasuhiro Takada, and Noriyuki Fukunaga. (1999). NH₄⁺ transport system of a psychrophilic marine bacterium, *Vibrio* sp. Strain ABE-1. *Extremophiles* **3**(2), 89-95.
- (2) Kazunori Inabe, **Masako Nishizawa**, Shigeru Tajima, Kazuyoshi Ikuta, and Yoko Aida. (1999). The YXXL sequences of a transmembrane protein of bovine leukemia virus are required for viral entry and incorporation of viral envelope protein into virions. *J. Virol.* **73**(2), 1293-301.

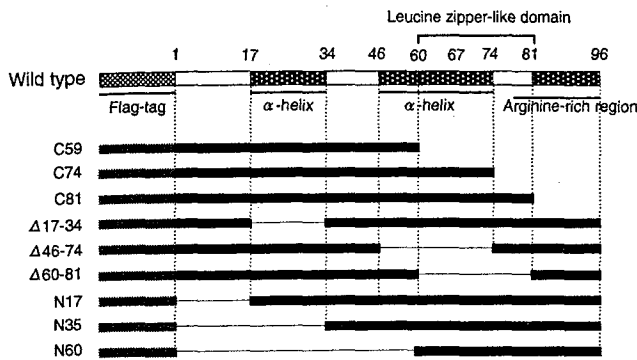


FIG. 1. Construction and expression of mutant Vpr proteins. Plasmids containing cDNA for the deleted mutant forms of Vpr were generated by PCR from HIV-1_{NL4-3}. The positions of the predicted first α -helical domain, second α -helical domain, leucine zipper-like domain, and arginine-rich carboxy-terminal domain are indicated. The regions of the Vpr generated by each construct are shown in black; grey showing represents the Flag-tag.

TABLE 1
Cell cycle arrest activity in HeLa cells expressing wild-type and deletion mutant Vpr proteins^a.

Mutant	Relative G ₂ /M:G ₁ ratio	G ₂ arrest
Control	0.29 ^b	— ^c
Wild type	1.00	+
C74	0.29	—
C81	0.04	—
Δ17-34	0.38	—
N17	0.36	—
N35	0.33	—

^a HeLa cells were transfected with pME18Neo that encodes Flag-tagged wild-type Vpr, mutant or control pME18Neo-Flag together with the green fluorescent protein (GFP) expression vector, pEGFP-N1. Then, 48 h after transfection, DNA content of cells was determined as described in Fig. 2.

^b Values were defined in each experiment by setting the G₂/M:G₁ ratios for cells that expressed wild-type Vpr to 1.0. The results represent the mean of three independent experiments of each mutant.

^c +, Full G₂ arrest; —, no G₂ arrest.

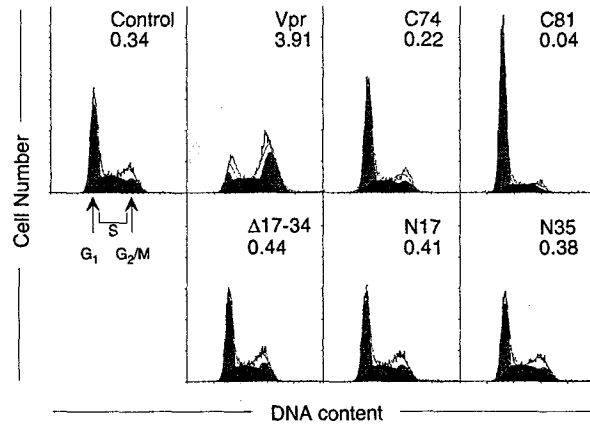


FIG. 2. DNA content of HeLa cells that expressed Flag-tagged wild-type Vpr and deletion mutant forms of Vpr. HeLa cells were transfected with pME18Neo that encoded Flag-tagged wild-type, C74, C81, Δ17-34, N17, N35 or the control pME18Neo-Flag together with a GFP expression vector, pEGFP-N1. Then, 48 h after transfection, cells were harvested for analysis of DNA content and stained with propidium iodide. Cells that were GFP-positive were analyzed by flow cytometry using the Lysis II for acquisition and ModFit LT for quantitative analysis of DNA content. Arrows indicate peaks of cells at the G₁ and G₂/M phases. The G₂/M:G₁ ratio is indicated at the upper right of each graph.

TABLE 2
Proliferation of colony forming cells expressing wild-type and deletion mutant Vpr proteins^a.

Mutant	Relative number of colonies ^b	Inhibition of growth ^c (%)
Control	527.7 ± 47.3 ^d	0 ± 10
Vpr	40.8 ± 7.1	100 ± 1
C74	544.0 ± 19.9	-3 ± 4
C81	358.7 ± 6.0	35 ± 1
Δ17-34	624.6 ± 37.0	-20 ± 8
N17	738.4 ± 39.6	-44 ± 8
N35	691.7 ± 83.6	-34 ± 17

^a HeLa cells were cotransfected with pME18Neo that encoded Flag-tagged wild-type Vpr, C74, C81, Δ17-34, N17 or N35 or the control pME18Neo-Flag together with a pSV- β -galactosidase plasmid. Then, 48 h after transfection, cells were harvested. Some cells were subjected to an assay of β -galactosidase activity, and the rest were replated in selective medium that contained G418.

^b The data shown present the relative number of drug-resistant colonies counted twelve days after drug selection. The relative number of colonies was calculated as actual number of colonies/relative β -Gal activity.

^c The blocking of colony formation by each mutant was normalized by reference to parallel transfections with pME18Neo-Fvpr or a control pME18Neo-Flag to 100 and 0% blocking, respectively.

^d Mean ± SD.

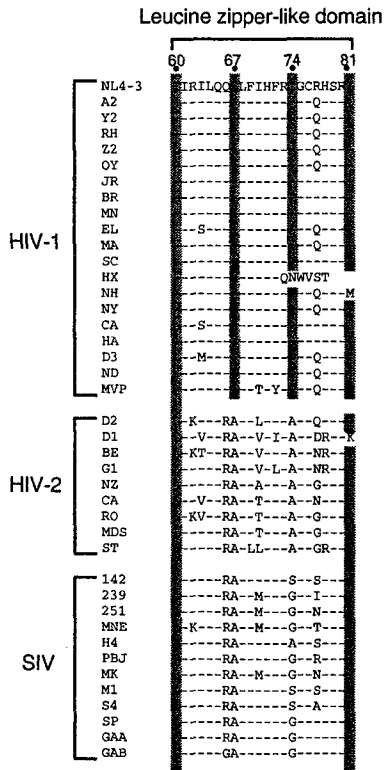


FIG. 3. Sequence alignment of leucine zipper-like domains of Vpr from various isolates of HIV-1, HIV-2 and SIV. Peptide sequences of the leucine zipper-like domain span amino acids 60-81 of Vpr of HIV-1, and the four Ile/Leu residues whose arrangement conforms to that in a typical leucine zipper are indicated by dots. Numbers denote positions of amino acid residues. Identical amino acids are shaded. Most isolates of HIV-1 show strong conservation of the leucine zipper motif in Vpr.

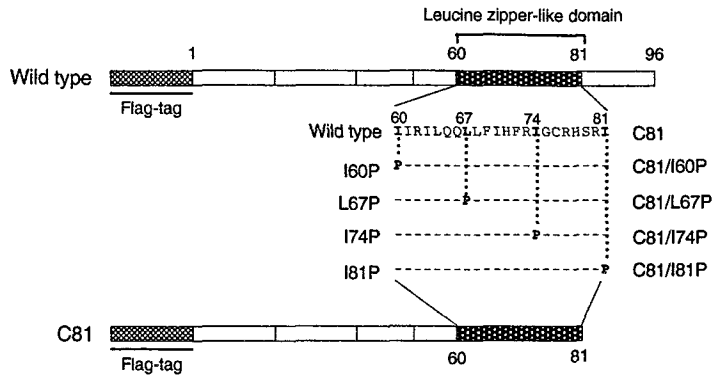


Fig. 4. The mutations introduced within the leucine zipper-like domain of wild-type Vpr and C81. The sequences of the leucine zipper-like domain (represented by dark shaded) are shown in the single-letter amino acid code and the locations of four Ile/Leu residues are indicated. The sequences of the mutant form of Vpr used in this study are indicated under the wild-type sequence, which was derived from HIV-1_{NL4-3}.

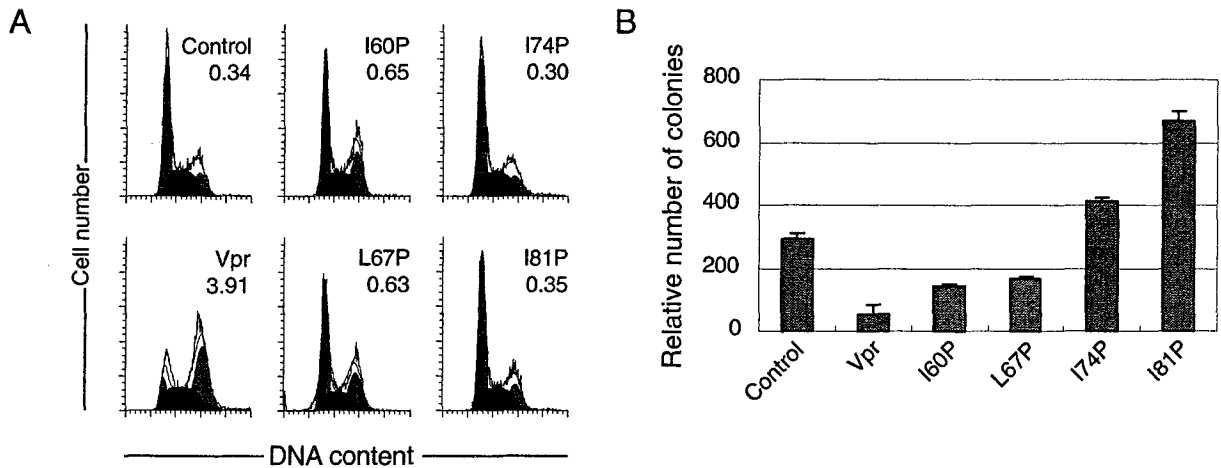


FIG. 5. Analysis of the cell cycle and the proliferation of colony formation of HeLa cells expressing the substitution mutant Vpr proteins. HeLa cells were transfected with pME18Neo encoding Flag-tagged wild-type Vpr, I60P, L67P, I74P or I81P or the control pME18Neo-Flag together with a GFP expression vector, pEGFP-N1 (A), or a pSV- β -galactosidase plasmid (B). (A) At 48 h posttransfection, DNA content of the cells was determined by flow cytometry as described in Fig. 2. G₂/M:G₁ ratios are indicated at the upper right of each graph. (B) Twelve days later, surviving colonies were counted and then the relative number of colonies was calculated as actual number of colonies/relative β -Gal activity as described in Table 3. Each column and error bar represent the mean \pm SD. of result from three samples.

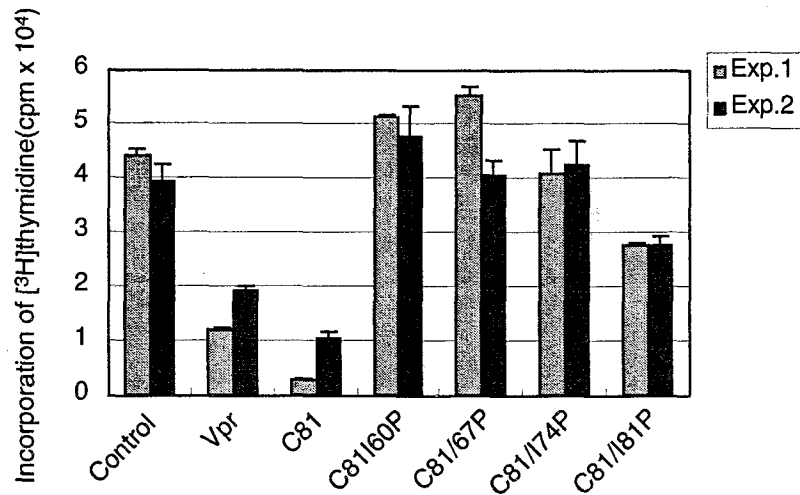


FIG. 6. Uptake of [³H]-thymidine by HeLa cells that expressed substitution mutant Vpr with site-specific. HeLa cells were transfected with pME18Neo that encoded Flag-tagged wild-type Vpr, C81, C81/160P, C81/167P, C81/174P or C81/181P or the control pME18Neo-Flag together with a pSV- β -Galactosidase plasmid. Twelve hours after transfection, some cells were assayed for β -Gal activity and the rest were replated at 1×10^5 cells/well in 24-well flat-bottomed plates. After a 30-h incubation, cells were incubated for 12 h with $0.5 \mu\text{Ci}$ of [³H]-thymidine and then harvested on glass fiber filters. The incorporation of radioactivity was determined by liquid scintillation counting and incorporation of [³H]-thymidine was calculated as radioactivity/ β -Gal activity. Each column and error bar represent the mean \pm SD. of results from four samples in two independent experiments.

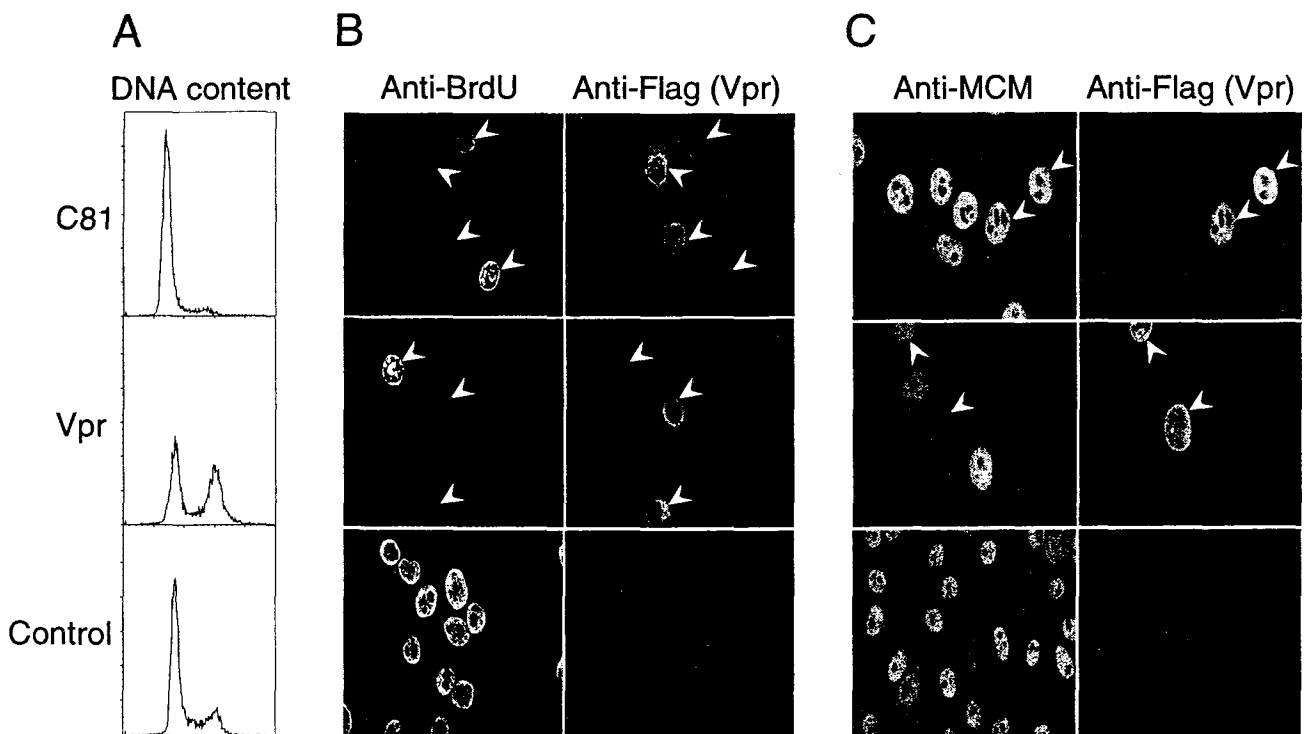


Fig. 7. Cell cycle analysis of HeLa cells that expressed C81. (A) Analysis of DNA content. HeLa cells were transfected with pME18Neo that encoded Flag-tagged wild-type Vpr or Flag-tagged C81 or with the control pME18Neo-Flag together with the GFP expression vector pEGFP-N1. Then, 36 h after transfection, cells were harvested and stained with PI. Cells that were GFP-positive were analyzed by flow cytometry. (B) Two-color immunofluorescence of cells that progressed through the S phase. HeLa cells were transfected with pME18Neo that encoded Flag-tagged wild-type Vpr or Flag-tagged C81 or with the control pME18Neo-Flag. Then, 36 h after transfection, cells were incubated for 15 min with BrdU to monitor DNA synthesis, stained with anti-BrdU rat MAb followed by FITC-conjugated anti-rat IgG, and with Flag-specific MAb M2 followed by Cy3-conjugated anti-mouse IgG for detection of cells that expressed Vpr. (C) Two-color immunofluorescence of cells that progressed through the very late S-to-G₂ phase. HeLa cells were transfected with pME18Neo that encoded Flag-tagged wild-type Vpr or Flag-tagged C81 or with the control pME18Neo-Flag. Cells were reacted with anti-MCM rabbit serum followed by FITC-conjugated anti-rabbit IgG, and with Flag-specific MAb M2 followed by Cy3-conjugated anti-mouse IgG for detection of cells that expressed Vpr. The stained cells were visualized by confocal laser scanning microscopy, and cells representative of the population were photographed. Arrowheads indicate Vpr-positive cells.

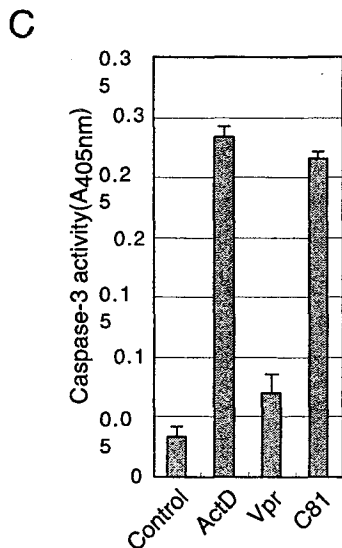
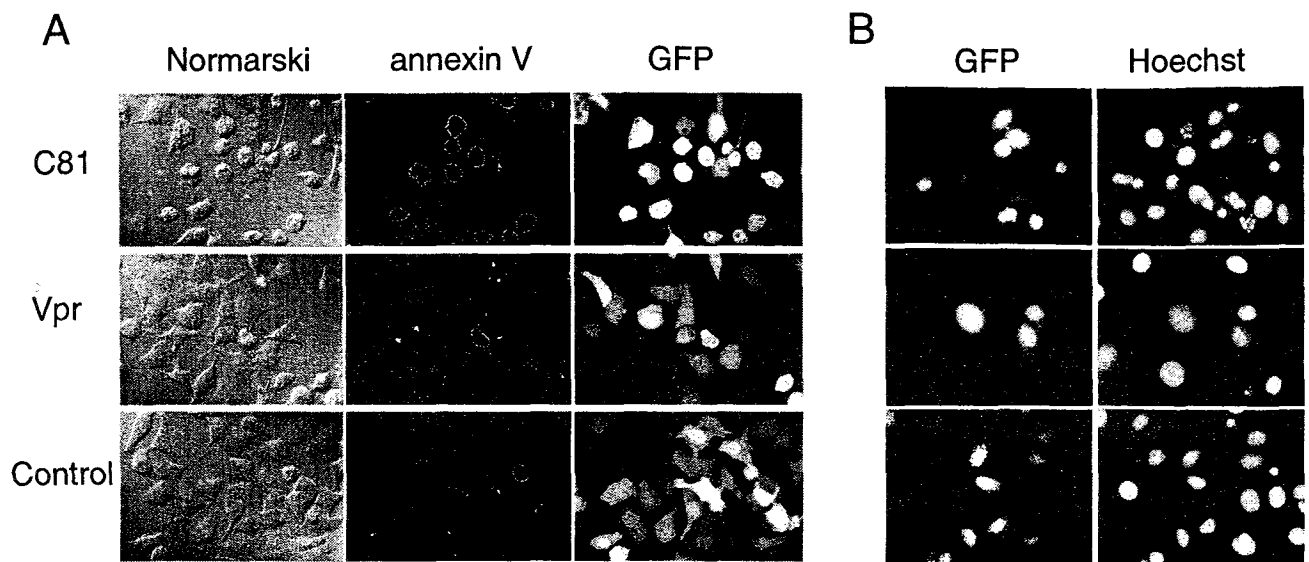


Fig. 8. The expression of C81 induced apoptosis in HeLa cells. HeLa cells were transfected with pME18Neo that encoded Flag-tagged wild-type Vpr or Flag-tagged C81 or with the control pME18Neo-Flag together with the GFP expression vector pEGFP-N1 (A and B) or without this vector (C). GFP was used as the reporter molecule for discrimination between transfected and untransfected cells. (A) Thirty-six hours after transfection, cells were stained with annexin V-biotin and streptavidin-PE for identification of apoptotic cells. (B) HeLa cells were fixed in 1% of formaldehyde and then in 70% ethanol and stained with Hoechst 33258 to monitor the morphology. Apoptotic bodies were revealed by fluorescence microscopy. (C) HeLa cells were harvested 36 h after transfection and then caspase-3 activity was measured with a colorimetric kit.

TABLE 3. Analysis of stage of the cell cycle of HeLa cells that expressed either C81 or wild-type Vpr.

	% of cells stained with antibodies against cell cycle markers ^b					
	$G_2/M:G_1$ ratio ^a		BrdU (S-phase marker)		MCM (late S-to- G_2 phase marker)	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
C81	0.01	0.02	20.1	12.1	72.0	75.6
Vpr	1.02	0.75	19.0	16.8	18.3	32.4
Control	0.17	0.27	33.5	44.5	80.0	77.1

a HeLa cells were transfected with pME18Neo that encoded Flag-tagged wild-type Vpr or Flag-tagged C81 or the control pME18Neo-Flag together with the GFP expression vector pEGFP-N1. Cells were harvested 36 h later and stained with PI. Cells were analyzed by flow cytometry. Data are presented after gating to eliminate cells in which GFP did not emit relative fluorescence. Percentages of cells in the G_2/M phase and G_1 phase were calculated. The $G_2/M:G_1$ ratios were calculated by dividing the percentage of cells at G_2/M by the percentage of the cells at G_1 .

b HeLa cells were transfected with pME18Neo that encoded Flag-tagged wild-type Vpr or Flag-tagged C81 or the control pME18Neo-Flag. To detect cells that progressed through the S phase, 36 h after transfection, cells were incubated with BrdU, stained with anti-BrdU MAb followed by FITC-conjugated rat IgG, and an anti-Flag MAb followed by Cy3-conjugated mouse IgG. To detect cells that progressed through very late S-to- G_2 phase, 36 h after transfection, cells were treated with PBS that contained 0.05% Triton X-100, stained with anti-MCM rabbit serum followed by FITC-conjugated rabbit IgG, and an anti-Flag MAb followed by Cy3-conjugated mouse IgG. Results are expressed as percentages of positive cells that stained with each antibody. Values in parentheses indicate Vpr or C81-positive cells/BrdU or MCM-positive cells.

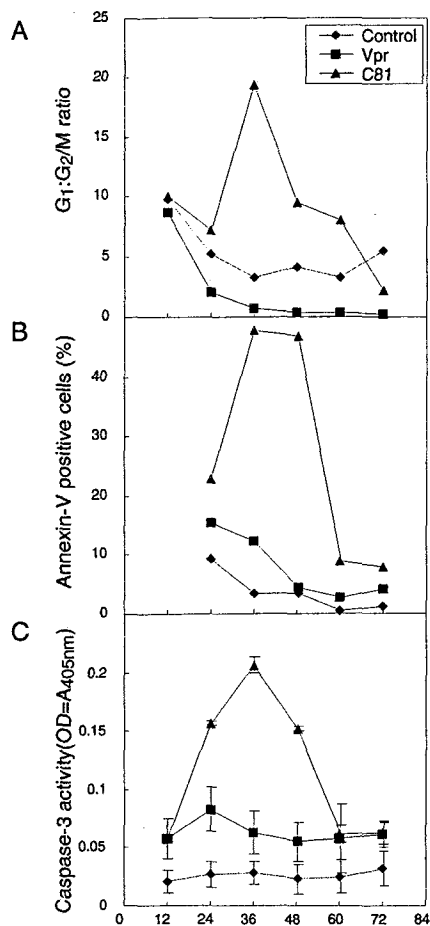


Fig. 9. Kinetics of changes in the G_1 : G_2 /M ratio, in the number of annexin V-positive cells and in caspase-3 activity in HeLa cells that expressed Vpr or C81. HeLa cells were transfected with pME18Neo that encoded Flag-tagged C81, Vpr or the control pME18Neo-Flag together with the GFP expression vector pEGFP-N1 (A and B) or without it (C). GFP was used as a reporter molecule for discrimination between transfected and untransfected cells. The G_1 : G_2 /M ratio (A), the number of annexin V-positive cells (B) and the caspase-3 activity (C) were determined, as described in the legend to Fig. 8, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h after transfection.

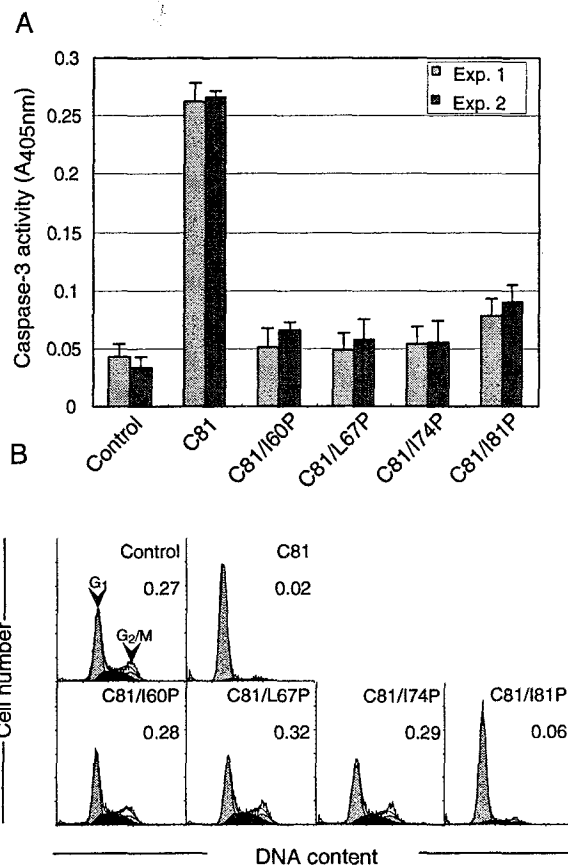


Fig. 10. Analysis of the cell cycle and the caspase activity of HeLa cells that expressed variants of C81. (A) Thirty-six hours after transfection with pME18Neo that encoded Flag-tagged C81, C81/I60P, C81/L67P, C81/I74P, or C81/I81P or the control pME18Neo-Flag, cell lysates were prepared and caspase-3 activity was determined as described in the legend to Fig. 8. Each column and error bar represent the mean \pm standard deviation of results from three samples in two independent experiments. (B) Thirty-six hours after transfection with pME18Neo that encoded Flag-tagged C81, C81/I60P, C81/L67P, C81/I74P, or C81/I81P or the control pME18Neo-Flag together with the GFP expression vector pEGFP-N1, cells were harvested for analysis of DNA content. They were stained with PI and cells that were GFP-positive were analyzed by flow cytometry as described in the text. Arrowheads indicate peaks of cells at the G_1 and G_2 /M phases. The G_2 /M: G_1 ratio is indicated in the upper right of each graph.

TABLE 4.
Effects of replacements of Ile/Leu residues within the leucine zipper-like domain of C81 on the activities of the different variant proteins.

Protein	Activity		
	G_1 arrest	Apoptosis	Suppression of growth ^a
C81	++ ^b	++	++
C81/I60P	-	±	-
C81/L67P	-	±	-
C81/I74P	-	±	-
C81/I81P	+	+	+

^a Suppression of growth was analyzed by uptake of [³H]thymidine by HeLa cells.

^b Extent of activity: -, negative; ±, weakly positive; +, positive; ++, strongly positive.

論文審査結果要旨

エイズは、病原体であるヒト免疫不全ウイルス(HIV)がCD4陽性T細胞やマクロファージに感染し細胞障害をもたらす結果、細胞性免疫能が著しく低下するために起きる。しかし、細胞を障害する機序については不明であり、その解明は根本的な治療法を確立するためにも重要である。HIV-1ゲノムには構造遺伝子と調節遺伝子の他に数種のアクセサリ遺伝子がコードされているが、近年、その一つであるVpr遺伝子が霊長類細胞の増殖を細胞周期のG₂期で停止(G₂期アレスト)させる機能を持つことがわかり注目されている。

本研究者は、このVprタンパクの細胞増殖抑制機能について、96アミノ酸からなる本タンパクの各種欠失および点変異体を作製し、それらをHeLa細胞で発現させる系を用いて詳細に解析した。欠失解析の結果、野生型VprはG₂期アレストによる増殖抑制作用のためコロニー形成能を著しく阻害するのに対し、各ドメインを欠失した変異体はG₂期アレスト能を喪失することが確認された。しかし、C末端ドメインの15アミノ酸を欠失した変異体C81においてのみ、なお約30%の細胞増殖抑制活性が残存することを見出した。

このC81変異体の細胞抑制作用についてさらに追究した。C末端ドメインに隣接するロイシンジッパー様ドメインはHIV-1野生株間で高度に保存されており、Vprの病原性発現に重要と考えられるので、その60, 67, 74および81位のIle/LeuをProに置換した変異株をC81と野生型Vprから作製し、それらの細胞増殖抑制活性を調べた。その結果、野生型VprによるG₂期アレストは74および81位のIleを必要とするが、C81変異体による細胞増殖抑制には60, 67, 74位のIleまたはLeuが関与することが判明した。この作用残基の違いからC81変異体は、G₂期アレストとは異なる細胞増殖抑制機構を有していることが示唆された。

C81変異体による細胞増殖抑制が起こる細胞周期を見極めるために、核へのプロモデオキシウリジンの取り込みと核DNAに結合するMinichromosomemaintenanceタンパクの存在を免疫蛍光染色法によって解析した結果、細胞はG₁期アレストを起こしていることが明らかになった。このG₁期アレストは、細胞のAnnexin Vによる免疫蛍光染色、Caspase-3活性の測定、Hoechst3325を用いる核の凝集観察に基づき、アポトーシスを伴うことが判明した。C81変異体のロイシンジッパー様ドメインの置換変異体ではG₁期アレスト能とともにアポトーシスも認められないことから、両機能は密接に連係して発現することが実証された。

以上のように本研究は、HIV-1のVpr遺伝子がアポトーシスを伴ったG₁期アレストによる細胞増殖抑制活性を備えていることを初めて明らかにしたものであり、審査員一同は本研究者に博士(農学)の学位を授与するに値するものと認定した。