

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 HIV-1 アクセサリー遺伝子産物 Vpr と相互作用する
細胞内因子の解析

指導教官 渡邊 俊樹 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 磯貝 まや

[研究目的]

後天性免疫不全症候群（AIDS）の原因ウイルスであるヒト免疫不全症ウイルス（HIV-1）のアクセサリー遺伝子産物の一つ Vpr は、ウイルス粒子内に取り込まれて存在する 96 アミノ酸からなる蛋白質である。Vpr は細胞内で核膜・核に局在し、細胞周期の G2 期 arrest、細胞の分化、多倍体化、およびアポトーシスの誘導、ウイルスの感染効率や複製効率の上昇など、細胞に対して多様な効果をもたらすことが報告されており、AIDS の病態に重要な意義をもつ可能性が考えられる。Vpr の多様な機能は、細胞内因子との相互作用により発揮されると考えられ、その作用機構を解明することにより AIDS 克服に貢献できる可能性があるが、詳細は未だ明らかでない。

そこで、本研究では、Vpr の作用機構の解明をめざして、Vpr と相互作用する細胞内因子の同定とその解析を試みた。

[材料と方法]

野生型 Vpr およびその 8 種類の変異体を bait (釣り餌) として用いた yeast two-hybrid 法により、human CD4⁺ T-cell および HeLa cDNA library をスクリーニングした。得られた陽性クローンについて、酵母での共導入実験および塩基配列決定とデータベース検索を行なった。得られたクローンのうち human homologue of RAD23 A (HHR23A) を選択し、Vpr との結合に重要な領域を yeast two-hybrid β -galactosidase assay により解析した。この結果同定された HHR23A の C 末端側 Ubiquitin associated (UBA) ドメインについて、結合に重要な Vpr 側の領域を、Vpr 蛋白のドメイン構造として予測されている α -helix1、 α -helix2 とそれに重なる leucine zipper-like domain 等の欠失または点変異体との酵母での共導入実験により解析した。また UBA ドメインの哺乳類細胞における Vpr の機能との関連を予測するため、これらの変異体を HeLa 細胞へトランスフェクションし、局在を蛍光抗体法により、また G2 期 arrest 能をフローサイトメトリー法により解析し、Vpr の機能発現に重要な部位を同定した。さらに HHR23A および UBA ドメインが、哺乳類細胞における Vpr の機能発現に影響するかどうかを確認するため、HeLa 細胞へ共導入し、Vpr により誘導される G2 期 arrest への影響をフローサイトメトリー法により解析した。

[結果と考察]

Vpr 相互作用細胞内因子を yeast two-hybrid 法により検索した結果、野生型 Vpr および細胞増殖抑制能を保持したままの 5 種類の変異体を bait として用いた場合、cDNA library 4×10^7 個のスクリーニングを試みたにもかかわらず、陽性クローンを得ることが出来なかった。そこで、野生型 Vpr と同様の発現能、核膜・核への局在能を保持しているが、細胞増殖抑制能を完全に消失する、N17C81 変異体 (Vpr の 17-81 位の 65 アミノ酸を含む) を bait として用いた。この結果、HeLa S3 cDNA library 5×10^5 個のスクリーニングにより、66 個の二次スクリーニング陽性クローンが得られた。DNA シーケンシ

ングおよび BLAST 解析の結果、得られた cDNA クローンは、Vpr 結合分子として報告されている UNG および HHR23A の他に、未だ報告されていない 3 種類の既知の蛋白質、および 7 種類の EST クローンであることが確認された。またこれらのクローンはいずれも yeast two-hybrid 法において野生型 Vpr との結合能を有していた。

次に、得られたクローンの中で、Vpr の局在および G2 期 arrest 能に関与しているのではないかと報告があるが相互作用の詳細が未だ明らかにされていない HHR23A を選択し、Vpr の機能との関連性を明らかにするため、Vpr との相互作用の詳細を解析した。Yeast two-hybrid β -gal. assay による解析の結果、HHR23A の C 末端側 UBA ドメインを含むクローン（C 末端側 54 アミノ酸）は野生型 Vpr とも結合活性が見られたが、全長の HHR23A では結合活性が見られなかった。このことから、全長の HHR23A は生体内で Vpr と相互作用しない可能性が示された。

一方、Vpr との結合活性が見られた UBA ドメインはヌクレオチド除去修復機構関連分子の他に、ユビキチン化やその解除に関連すると予想される分子、および protein kinase の一部などで見られる sequence motif であることから、これらの機構を介して細胞周期の制御に関連した Vpr の多様な機能の発現に関与している可能性が考えられる。そこで本研究では、UBA ドメインと Vpr の変異体との酵母での共導入実験を行ない、結合に重要な Vpr 側のドメインを同定した。欠失変異体との共導入の結果、96 アミノ酸のうち N 末端側 30 位までの領域は必須ではなく、 α -helix1 後半以降の領域が重要であることが示唆された。さらに詳細に解析するため、 α -helix 1 ドメインのうち前半にある 4 つの Leu (20, 22, 23 および 26 位) の点変異体、後半の 30, 33 および 34 位の各点変異体、 α -helix2 とこれに重なる leucine zipper-like domain のうち leucine zipper-like domain の 4 つの Leu/Ile (60, 67, 74 および 81 位) の各点変異体を用いて共導入実験を行なった。この結果、 α -helix1 後半の 33 位、leucine zipper-like domain の 67 および 74 位が、UBA domain との結合に重要であることが明らかとなった。

以上の Yeast two-hybrid 法を用いた解析により得られた結果をもとに、UBA ドメインの哺乳類細胞における Vpr の機能との関連を予測するため、哺乳類細胞における Vpr の機能発現に重要な部位を解析した。その結果、Vpr の核局在には α -helix 1 前半と、 α -helix 2 から leucine zipper 様配列にかけての 60 位および 67 位に加え、 α -helix 1 後半の 33 位のアミノ酸残基の保存が特に重要であることが示された。また Vpr による G2 期 arrest の誘導には α -helix 1 前半、60、67 位、および特に 74、81 位に加え、 α -helix 1 後半の 33 位のアミノ酸残基の保存が重要であることが示された。

さらに、哺乳類細胞内における HHR23A および UBA domain の Vpr の機能発現への影響を確認するため、HeLa 細胞への共導入実験を行なった。この結果、Vpr による G2 arrest への影響は殆ど見られなかった。

これらの結果から、HHR23A および UBA domain は Vpr による G2 arrest に直接は関与しないと考えられた。さらに、Vpr の機能発現には、UBA ドメインを有する細胞内因子が、単独あるいは他の分子と共に、それぞれ Vpr の特定の部位と相互作用して関与している、という可能性が示唆された。

以上により、Vpr は、UBA ドメインを有する細胞内因子と相互作用して、ヌクレオチド除去修復機構、ユビキチン-プロテアソームシステム、および蛋白質リン酸化といういずれも細胞の恒常性維持の全般にわたって非常に重要である機構に影響を及ぼし、その結果として、細胞に対し様々な効果を引き起こすことによって、AIDS の病態に関与している可能性が考えられた。