

# 論文審査の結果の要旨

氏名 マリルース アナメルバ アラインガ ラミーレス

本論文は2章からなり、第1章は成人T細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)、第2章は牛白血病ウイルス(BLV)の転写活性化因子 Tax によって制御される宿主因子について述べられている。

成人T細胞白血病(ATL)を誘発するHTLV-1および地方病性牛白血病(EBL)を誘発するBLVの転写活性化因子Taxは自身のlong terminal repeat(LTR)に作用してウイルス遺伝子の転写を活性化すると同時に、細胞側因子に作用してアポトーシスの抑制、細胞増殖や不死化の誘導、細胞周期の進行および遺伝子変異を誘導し、発癌の引き金を引くと考えられている。一方で、Taxがアポトーシス誘導能や細胞周期停止能を介して細胞増殖を負に制御することも報告されている。本研究では、マイクロアレイによりTaxにより発現が変化する遺伝子を網羅的に解析すると同時に、Tax発現細胞をリアルタイムイメージングにより観察した。

第1章では、HTLV-1 Taxが誘導する細胞異常を解析した。HeLa細胞に構築したFlag融合Tax発現ベクターを導入したところ、Taxのトランスフォーミング活性とは反対の細胞増殖を負に制御する細胞周期のG1期停止およびアポトーシスが誘導された。この興味深いTaxの機能に関連する遺伝子発現の変化をマイクロアレイにより解析した。Tax発現ベクター導入30時間後にRNAを抽出して、18,400個のヒト遺伝子を含むHuman Genome U133 plus 2.0 arrayチップを使用して、発現が2倍以上上昇した188個の遺伝子と低下した61個の遺伝子を同定した。この中に細胞周期関連遺伝子が17個、そしてアポトーシス関連遺伝子が23個含まれていた。マイクロアレイにより得られた結果の再現性をリアルタイムPCRにより確認した。細胞周期関連遺伝子ではSMAD3, JUN, GADD45 $\beta$ , DUSP1 およびIL-8の5遺伝子、アポトーシス関連遺伝子ではNFKBIA, NR4A1, IER3, TNFAIP3, BTG2, TNFRS9, BIRC3 およびIL6の8遺伝子の再現性が確認された。

続いて、Taxが誘導する細胞周期のG1期停止とアポトーシスの関連性を明確にするために、細胞周期可視化プローブ“Fucci”発現細胞に構築したcyan fluorescence protein(CFP)蛍光タンパク質融合Tax発現ベクターを導入して24時間後からリアルタイムイメージングを行った。その結果、Taxが細胞周期をG1期で停止した後にアポトーシスを誘導する過程を経時的に観察することに始めて成功した。

第2章では、BLV Taxによる遺伝子発現解析を網羅的に行った。当研究室の先行研究にお

いて見出された、BLV LTR に対して高い転写活性化を有する D247G 変異型、転写活性化能を消失した S240P 変異型および野生型 Tax を組み込んだ発現ベクターを構築して、これらの Tax の転写活性化能の違いと関連する宿主因子をマイクロアレイにより解析した。発現が 2 倍以上変化した遺伝子は、野生型で 122 個、S240P で 118 個、D247G で 139 個であった。野生型および D247 では発現上昇を示した遺伝子数が多かったが、S240P では発現低下遺伝子数が発現上昇遺伝子数とほぼ同じであった。発現上昇遺伝子には、転写活性化、細胞増殖、細胞周期制御、細胞輸送、リン酸化、アポトーシスおよびストレス機能に関連する遺伝子が含まれていた。発現低下遺伝子には、免疫応答に関連する遺伝子が最も多かった。

マイクロアレイ解析により得られた結果の再現性を HeLa 細胞とウシ 23CLN 細胞で確認した。発現が上昇した遺伝子として転写活性化に関与する FOS、JUN、NR4A2、RORA、GEM、RGS2 および RRAD、免疫応答に関与する TNFAIP6、細胞増殖に関与する CYR61、およびアポトーシスに関与する IER3、TNFRSF12A および TNFRSF21 を、発現が低下した遺伝子として転写活性化に関与する ID2、インターフェロン関連遺伝子 IFIT1 および IFIT3、アポトーシス関連遺伝子である TNFSF10 を選択し、リアルタイム PCR およびウエスタンブロット解析を行ったところ、ヒトおよびウシ細胞の両者においてほぼ良好な再現性が確認された。

マイクロアレイ解析により、BLV Tax が転写活性化および細胞増殖に加えて、これまで明らかにされていなかったストレス応答や免疫応答に寄与することを初めて明らかにした。

なお、本論文は、武田英里、間陽子との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。