

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策 研究事業）
分担研究報告書

Vpr による p53 不活性化機構

研究分担者 山下 克美 金沢大学医薬保健研究域・准教授

研究要旨 HIV ゲノムにコードされる Vpr 遺伝子の単独発現による DNA 損傷誘発を、ゲノム損傷応答因子 p53 およびその上流の ATR、p53 の下流の CHK1 について、活性化の指標であるリン酸化を、ウエスタンブロットにより検出した。その結果、いずれの因子も活性化されている事が判明した。

A．研究目的

近年、長期にわたる感染者において、腫瘍の発生が報告されている。細胞の癌化においてゲノム不安定化が必須な役割を演じていることは周知の事実である。

本研究の主任研究者である石坂らは、HIV ゲノムコードされる Vpr タンパク質が DNA 損傷を誘発することを発表し、Vpr が HIV 感染細胞におけるゲノム不安定化の誘因となり、ひいては HIV 感染者における腫瘍発生の重要な原因因子である可能性を示した。

本研究ではこの仮説に基づき、Vpr 誘発性のゲノム損傷応答系のエンドポイントの一つである、癌抑制遺伝子 p53 の動態を解明することが目的である。その成果を成果を基盤として、p53 の動態を直接的または間接的に抑制する低分子化合物の探索等、HIV 感染細胞における Vpr を標的とした癌化抑制法の開発を目指す。

B．研究方法

本研究では、Vpr 発現モデルとして石坂らによって開発された、テトラサイクリン (Tet) 添加により Vpr タンパクが発現される HT1080 細胞 (MIT-23 細胞) を使用した。

Tet 不含培地で培養した MIT-23 細胞に 1-5 μ g/mL のドキシサイクリン (Dox : Tet 誘導体) を添加した。48 時間後に細胞を回収し、検討対象タンパクの発現と DNA 損傷誘発性リン酸化をウエスタンブロット法にて検討した。

検討対象のタンパク質は、p53、p53(pS15)、CHK1(pS345)、p21 および Vpr である。

(倫理面への配慮)

現段階では培養細胞を使用する研究のため、倫理面への配慮は不要である。

C．研究結果

p53 の発現誘導: 3 μ g/mL と 5 μ g/mL の Dox 処理において、発現上昇が認められたが、それ以下の濃度では検出不能であった。

p53(S15) のリン酸化: p53 の発現と同様に、3 μ g/mL と 5 μ g/mL の Dox 処理においてのみリン酸化が検出された。

CHK1(S345) のリン酸化: p53 発現および S15 のリン酸化と同様に、3 μ g/mL と 5 μ g/mL の Dox 処理においてのみリン酸化が認められた。

p21 の発現: p21 は p53 の転写ターゲットであるため、p53 発現が認められる Dox dose での発現が期待されたが、発現は確認できなかった。

Vpr の発現: Dox 添加による Vpr の発現は、すべての dose において検出できなかった。

D．考察

本研究では、p53 関連の応答と CHK1 のリン酸化が検出された。p53 の転写標的である p21 の誘導は検出できなかったが、検出に使用した抗体が原因の可能性があり、今後の検討課題である。また、DNA 損傷を惹起する Vpr の発現誘導も検出できていないが、過去の石坂らの実験では Vpr タンパク質が検出されているため、条件検討で問題が解決する可能性が高い。

Vpr の発現に関しては、p53 の発現誘導、p53S15 のリン酸化ならびに CHK1S345 のリン酸化が認められているため、現時点では検出できていないが、発現はされているものと考えられる。

Vpr 誘発性の DNA 損傷リスポンス (DDR: DNA damage response) の一経路として p53 が誘導されることは (本研究では p21 の検出をできなかったが)、p53 の下流の細胞応答が引き起こされていることが強く示唆される。Vpr は DDR のみならず、多様な細胞変化を誘導し、細胞がん化の誘因となる

可能性が示されており、今後は p53 活性化の下流の遺伝子発現の解析等が、Vpr の発がんにおける機能を明らかにする上で重要である。

Vpr は細胞周期において、G2 期から M 期への進行および、M 期の進行遅延を引き起こすことも知られており、これらのイベントが染色体不安定化の原因となることも示されている。一方、DNA 損傷によって G2 から M 期への進行遅延が引き起こされることは周知の事実である。これらの事実は、Vpr が誘発する DNA 損傷が M 期侵入遅延および M 期進行の攪乱の原因である可能性も示唆する。

Vpr 誘発性 DDR としての p53 の動態ならびに、DDR としての細胞周期進行遅延の解明は、AIDS 関連性の悪性腫瘍誘発の分子機序の理解に重要な情報をもたらすことが期待されるため、DDR と細胞周期進行の関連を追求することが今後の重要な課題となる。

E . 結論

今年度の研究では、Vpr の発現によって誘発される DDR を検出することを試みた。その結果、p53 の発現誘導、リン酸化、CHK1 の活性化を示すリン酸化等が検出された。

本研究では、p53 の重要な下流因子である p21 の

発現が検出できなかった。さらに、Vpr タンパク質も検出できなかったため、Vpr 誘導発現系の改良が求められる。

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表

1.論文発表

なし。

2.学会発表

なし。

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1.特許取得

なし。

2.実用新案登録

なし。

3.その他

特記すべき事なし。