

エイズウイルス由来タンパク質 Vpr および
terpendole E が誘導する細胞分裂阻害機構の解析

2005 年 9 月

中 澤 順 子

目 次

第1章	序論	
(1)	細胞周期とは	1
(2)	細胞周期調節因子；サイクリン、CDK、CKI	1
(3)	ユビキチン化システムによる活性制御	2
(4)	チェックポイント機構による細胞周期制御	3
(5)	スピンドルチェックポイント	5
(6)	<i>S. cerevisiae</i> におけるチェックポイント	5
(7)	M 期研究の重要性	6
(8)	本研究の目的	7
第2章	HIV-1 Vpr による細胞増殖阻害機構の解析	
第1節	序論	8
(1)	HIV-1	8
(2)	HIV-1 の感染機構	8
(3)	AIDS 発症機構	9
(4)	HIV-1 と類縁ウイルス	10
(5)	HIV-1 がコードするタンパク質	11
(6)	Vpr について	12
第 2 節	Vpr によって誘導される酵母の増殖阻害	15
第 3 節	Vpr が DNA 傷害/複製チェックポイントに与える影響	17
第 4 節	変異型 Vpr が酵母の増殖および Vpr の局在に与える影響	28
第 5 節	第 2 章考察	38
第 6 節	実験方法	39
第3章	Terpendole E による細胞周期分裂期阻害機構の解析	
第1節	序論	
(1)	微小管およびチューブリンタンパク質	43
(2)	モータータンパク質の働き	44
(3)	KHC の構造および機能	45
(4)	Eg5 の構造および機能	46
(5)	天然化合物 terpendole E	47
第2節	G/M 期阻害剤としての terpendole E	49
第3節	<i>in vitro</i> におけるチューブリン重合に対する影響	52
第4節	3Y1 の細胞周期に与える影響	54

第5節	細胞骨格および中心体に与える影響	56
第6節	キネシンモータータンパク質を用いた gliding assay	61
第7節	ゴルジ体輸送に与える影響	68
第8節	キネシンモータータンパク質の ATPase 活性に与える影響	70
第9節	Eg5 と微小管との結合性に terpendole E が与える影響	73
第10節	他の ACAT 阻害剤が細胞周期に与える影響	75
第11節	第 3 章考察	77
第12節	実験方法	79
第 4 章 総括		86
参考文献		88
謝辞		98

第1章 序論

細胞周期とは

生体では骨髄や胸腺、腸管など一部の細胞では細胞増殖を繰り返し行なっている。このような細胞を「細胞周期にある」ということができ、細胞周期は4つのサイクルに分けることができる。染色体合成を行うS期(synthesis)、細胞分裂が行われるM期(mitosis)、M期から次のS期までの間のG1期(Gap1)およびS期からM期までの間のG2(Gap2)である。また増殖を行っていない細胞や増殖サイクルを外れて休止状態にある細胞をG0期にあるという。G1期にある細胞である点を過ぎた細胞はG0期に入ることはなく細胞周期は進行していくが、その点を制御点(restriction point)という。

(2) 細胞周期調節因子；サイクリン、CDK、CKI

細胞周期の研究は独立になされていた研究が結びついたことで急発展したものである。1971年に増井禎夫らは卵成熟促進因子としてMPF(maturation promoting factor)を発見した(Masui and Markert, 1971)。一方で、Hartwellらは出芽酵母における様々な温度感受性変異株より細胞周期調節因子としてCDC28をクローニングし(Hereford and Hartwell, 1974)、Nurseらは分裂酵母の細胞周期変異株からCDC28のホモログとなるcdc2遺伝子を分離した(Nurse, 1975)。1983年にはHuntらによって海産無脊椎動物卵の細胞周期の進行に応じて周期的に変動するタンパク質としてサイクリンが発見された(Evans et al., 1983)。その後、ヒトにも分裂酵母のCdc2(CDK1ともいう)ホモログが見出され、Cdc2が真核生物に共通している酵素であることが分かった(Lee and Nurse, 1987)。そして、MPFが真核細胞のM期に普遍的に存在するサイクリンBおよびCdc2キナーゼからなる複合体であることが明らかになった(Dunphy et al., 1988; Gautier et al., 1990; Gautier et al., 1988)。サイクリンBはこのリン酸化酵素の調節サブユニット、Cdc2は触媒サブユニット(CDK: cyclin dependent protein kinase)に相当する。

現在、哺乳類細胞においては、サイクリンは約20種類、CDKは9種類が発見されている。そして細胞周期の各段階は異なるCDK-サイクリン複合体で制御されているきわめて複雑な機構であることが明らかになっている。各サイクリンのタンパク質量は主に転写レベル

で調節されている。サイクリンタンパク質が合成されると直ちにCDKとの複合体を形成する。CDK4/6-サイクリンD はG1期に、G1/S期ではCDK2-サイクリンE はG1/S期に、CDK2-サイクリンAはS期に、Cdc2(CDK1)-サイクリンAおよびCdc2(CDK1)-サイクリンBはM期およびM期の開始に活性化し、それぞれの標的タンパク質をリン酸化する。これらCDK-サイクリン複合体の活性は、細胞内局在、CDKのリン酸化・脱リン酸化、CDKインヒビター(CKI: cyclin dependent kinase inhibitor)などによって複雑に制御されている。一方、酵母では細胞周期に必須なCDKは唯ひとつで、*Saccharomyces cerevisiae*ではCDC28、*Schizosaccharomyces pombe*ではCDC2が機能している。

細胞周期進行の負の制御因子であるCKIは2つのタイプに分けることができる。1つ目は、CDK結合領域をもちCDK-サイクリン複合体に結合することでCDKの活性を阻害するタイプのCKI(Cip1(p21)、Kip1(p27)、Kip2(p57))である。2つ目は、CDK4、CDK6と強固に結合してCDKとサイクリンの結合を競合的に阻害し、キナーゼ活性を発揮させなくするタイプのINK4(inhibitors of CDK4)ファミリー(p15/p16/p18/p19)である。また、CDK-サイクリン複合体はCDKサブユニットの活性中心近くのアミノ酸残基のリン酸化によっても抑えられる。このリン酸化はWee1タイプのタンパク質キナーゼが担っており、Cdc25タイプの脱リン酸化酵素によってこれらの抑制的リン酸化は取り除かれる。

(3) ユビキチン化システムによる活性制御

細胞周期を通じたサイクリンやCKIのタンパク量の変動は合成速度だけではなく、ユビキチン化を伴うプロテアソーム依存的な分解系によっても制御されている。ユビキチンは分子量約8 kDaの小さなタンパク質である。標的となるタンパク質のリジン残基に多数のユビキチンが鎖状に結合すると26Sプロテアソームに認識され標的タンパク質は速やかに破壊される。標的タンパク質にユビキチンを付加する反応にはユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)の3つの酵素が必要である。細胞周期制御に関わるE3としてはAPC (anaphase-promoting complex) とSCF (Skp1-Cullin-F-box protein complex)の2種類が知られている。G1のサイクリンはSCFによってユビキチン化され、M期のサイクリンはAPCによってユビキチン化される。APCとSCFはともに共通の機能をもつサブユニットから構成されるタンパク複合体である。ユビキチン化される標的基質と結合するF-boxタンパク質、ユビキチン-E2が結合するリングフィンガータンパク質(APCでは

APC11、SCFではRbx1)、これら2つが結合して複合体のコアユニットとなるCullin/Cdc53タンパク質ファミリー(APCではAPC2、SCFではCdc53)をサブユニットとしてユビキチンリガーゼ複合体を構成している。

F-boxタンパク質はWD40ドメインを含むものやロイシンリッチドメインを含むものを含めて多種類存在し基質と直接結合する。従ってF-boxタンパク質はユビキチン化を受けるタンパク質の基質特異性と時期特異性において重要な役割を果たしている。MからG1期ではF-boxタンパク質としてCdc20またはCdh1のいずれかがAPC活性化因子として働く。Cdc20は主にM期進行に働き、Cdh1はおもにM期からの脱出やG1期で働いている。一方、SCF複合体は細胞周期を通じて活性化している。WD40ドメインを持つF-boxタンパク質のひとつ β -Trcp1は、Cdc25A、Wee1や β -cateninに結合し、ロイシンリッチドメインをもつF-boxタンパク質のひとつSkp2はp27、p21、p57などに結合してSCF依存的なユビキチン化を誘導することが知られている。また最近ではSCF^{skp2}の活性制御がAPC^{Cdh1}によって担われているという報告がなされ(Bashir et al., 2004; Wei et al., 2004)、APCおよびSCFが相互に作用しあう、より複雑な機構であることが明らかになってきた。

(4) チェックポイント機構による細胞周期制御

細胞周期を負に調節するその他の因子として1989年にHartwellとWeinertは細胞周期における「チェックポイント」という概念を打ち出した。細胞はDNA複製や細胞分裂などのステージごとの完了が確認されるまで細胞周期の進行を停止させる機能をもっている。チェックポイントは当初、外的な要因(放射線や薬剤)によって初めて活性化される防御機構と考えられたが現在では減数分裂における遺伝子組み換えやDNA複製エラーなどにおいても機能していると考えられている。チェックポイント機構はDNAの傷害/複製に関わるものと分裂期中期での紡錘体形成および染色体分配に関わるものが知られている。

DNA傷害/複製チェックポイント機構ではまず初めにホスファチジルイノシトール3-OHキナーゼ様キナーゼ(phosphatidylinositol-3-OH kinase like kinase: PI3KK)であるATM (ataxia telangiectasia mutated)およびATR (ATM and Rad3 related)がセンサーとして働く。ATMやATRによるリン酸化をうけることで活性化されたChk2やChk1などの基質は、最終的にはサイクリン依存性プロテインキナーゼ(CDKs)の活性化を阻害することで細胞周期をさまざまな段階で停止させる。G1期におけるDNA傷害ではATMまたはChk2が癌抑制タンパク質p53

をリン酸化、安定化させ、CDK阻害因子の一種p21の発現を介してS期促進因子(サイクリンE-CDK2)を阻害する。また、S/G2期におけるDNA傷害/複製チェックポイントではChk2あるいはChk1が共通にCdc25ホスファターゼをリン酸化・不活性化させ、M期促進因子(サイクリンB-Cdc2)を阻害する。さらにChk2やChk1はWee1キナーゼを活性化することでもサイクリンB-Cdc2を阻害する。

ATMは常染色体劣性遺伝子疾患である毛細血管拡張性運動失調(AT: Ataxia telangiectasia)の原因遺伝子で、3056アミノ酸からなるおよそ350 kDaのタンパク質である。ATMが変異または欠損しているATの患者に見られる特徴は、進行性の小脳性運動失調(ataxia)、毛細血管拡張症(telangiectasia)、精神遅滞、免疫不全、早老症状、発癌率の上昇などである。ATMは通常は2量体もしくはそれ以上の多量体で存在しているが、線照射などによって二本鎖DNA切断が生じるとSer1981の自己リン酸化がおき2量体が解離して活性化型の単量体となる。そして活性化型のATM単量体が下流の基質をリン酸化することでシグナルを伝えると考えられている(Bakkenist and Kastan, 2003)。最近ではATMの活性化制御にMre11複合体も関与していると考えられている(Carson et al., 2003; Horejsi et al., 2004; Kitagawa et al., 2004; Mochan et al., 2004; Uziel et al., 2003); (Lee and Paull, 2004)。Mre11複合体はMre11(meiotic recombination 11)、Rad50、Nbs1(Nijmegen breakage syndrome 1)からなる複合体タンパク質であり、出芽酵母ではNbs1の代わりにXrs2(x ray sensitive 2)と呼ばれるタンパク質が働いている。Nbs1の遺伝子に変異を持つ患者はナイメーヘン染色体不安定性症候群(Nijmegen breakage syndrome)、Mre11の遺伝子に変異を持つ患者はATLD(AT liked disease)とよばれ、いずれもAT患者と非常に良く似た症状を示す。またMre11複合体以外にもH2AXや53BP1(p53 binding protein 1)、MDC1(mediator of DNA damage checkpoint 1)、BRCA1(breast cancer 1)などのATMの基質がDNA二重鎖切断後におけるATMの活性化および下流へのシグナル伝達に関わっていることが示唆されている。

ATRは2644アミノ酸からなるおよそ301kDaのタンパク質であり、複製阻害やUVなどのストレスの有無に関わらずATR-IP (ATR interacting protein)と複合体を形成している。DNAの傷害が細胞内に生じるとssDNAに結合するRPA(replication protein A)およびATRIPを介してATRがDSBsに結合する。そして下流のシグナルをリン酸化すると考えられている。このとき、Rad17複合体(Rad17、Rfc1-4)やRAD9-RAD1-HUS1などがATRの活性化に働いている(Zou and Elledge, 2003)。ATRやChk1を欠損したノックアウトマウスは胎児の段階で胚性致死(embryonic lethal) となることから(Brown and Baltimore, 2000; Liu et al., 2000; Takai et al.,

2000)、ATRやChk1は外界からの傷害がない場合においても、細胞周期調節因子として重要な役割を果たしていると考えられている。また、ATMのノックアウトマウスは胚性致死には至らず、通常の細胞周期においては必須な遺伝子ではないことが示唆されている(Shiloh and Kastan, 2001)。

(5) スピンドルチェックポイント制御機構

細胞周期のM期中期では両極の紡錘体極より伸びてきた動原体微小管が染色体に結合し、姉妹染色体が赤道面上に並列し、続く後期で娘染色体がそれぞれの紡錘体極へと分配されていく。このとき全ての染色体の動原体に両極より伸びてきた微小管が結合し、ある程度の張力を伴って染色体が両極に引っ張られていることが確認できるまで染色体分離は起こらず細胞周期はM期中期で停止する。この状態を監視しているのがスピンドルチェックポイントである。全ての準備が整うと活性化状態にあったチェックポイントが不活性化し、動原体上のCdc20に結合していたチェックポイントタンパク質のひとつMad2がCdc20から外れAPC^{Cdc20}が活性化される。活性化されたAPCはセキュリンの分解を促し、セキュリンと複合体を形成していたセパレーズが遊離して、姉妹染色体を架橋しているコヒーシンを分解する。その結果、姉妹染色体の分離が起こり、細胞周期はM期後期へと進行する。

スピンドルチェックポイントの成分はもともと出芽酵母から見つかった。微小管作用薬を処理すると細胞周期をとめることができずに死んでしまうような遺伝子変異株のスクリーニングから、Bub1-3 (budding uninhibited by benzimidazole)およびMad1-3 (mitosis arrest deficient)が同定された(Hoyt et al., 1991; Li and Murray, 1991)。後にそれらのホモログが高等動物においても発見された。Rod (rough-deal)、ZW10 (zeste-white 10)、Aurora B、さらに微小管モータータンパク質であるキネシンのひとつCENP-E (centromere-associated protein E)などもスピンドルチェックポイントタンパク質としての役割を担うことが報告されている。これらのタンパク質は動原体または紡錘体極に局在している。

(6) *S. cerevisiae*におけるチェックポイント機構

チェックポイント機構は酵母でも高度に保存された機構であり同様のシグナル経路が存在する。*S. cerevisiae* では Mec1 (mitosis entry checkpoint 1) および Tel1 (telomere length

regulation) が哺乳類の ATM および ATR とホモロジーをもち、センサータンパク質として機能している。Mec1 は DNA 傷害や複製阻害など様々なタイプにおけるチェックポイント機能を担っており、一方、Tel1 は Mec1 の相補的な働きをしていると考えられている。動物細胞において ATR が ATRIP と相互作用するのと同様に、Mec1 は Ddc2 (DNA damage checkpoint 2) (Lcd1、Pie1 ともいう) に結合する。Mec1 と Ddc2 は Mec1-Ddc2 複合体として働き、DNA の傷害や複製阻害がおきた箇所へ移動する。また動物細胞と同様に酵母でも PRA(replication protein A)が、Mec1-Ddc2 複合体の DNA 傷害部位への局在を促進している。

Mec1やTel1は基質であるRad53(radiation sensitive)やchk1(checkpoint kinase 1)をリン酸化することで下流にシグナルを伝える。Rad53とChk1は哺乳類におけるChk2およびChk1とそれぞれ相同性をもっている。酵母ではRad53がDNA傷害や複製阻害においてより重要な働きを持っており、Chk1はRad53の相補的な働きを持っていると考えられている。

Mec1の活性化とそれに伴うRad53のリン酸化にはDDC1、MEC3、RAD17およびRAD24が重要な役割を果たす。Ddc1、Mec3およびRad17はそれぞれ哺乳類のRad9、Hus1、Rad1(9-1-1複合体)に相当し、PCNA (proliferating cell nuclear antigen)様の複合体を形成する。哺乳類のRad17のホモログにあたる酵母のRad24はRFC(replication factor C)に構造的に似ており、Rfc2、Rfc3、Rfc4、Rfc5とともにRFC複合体を形成している。そしてこのRad24複合体はDdc1複合体のDNA傷害部位への移行を制御する。

(7) M期研究の重要性

細胞内のタンパク質を特異的に阻害するような細胞膜透過性の低分子化合物は分子細胞生物学の研究を行なう上で非常に重要である。特に細胞周期調節機構を阻害するCDK阻害剤、DNA合成阻害剤、細胞分裂阻害剤などは細胞周期の研究を進める上で重要な役割を果たしている。例えば、微小管作用薬であるコルヒシンは細胞周期を分裂期(M期)に停止させる化合物であるが、微小管の構成成分としてのtubulinの発見に結びついた化合物である(Borisly and Taylor, 1967; Shelanski and Taylor, 1967)。そして細胞内のチューブリンの機能解明を行なうためのツールとしても使われてきた。さらにノコダゾールやタキソール等も生細胞の微小管ダイナミクスを阻害する薬剤であり、これらの低分子化合物を用いることで、細胞周期研究が飛躍的に進んだ(Rieder and Palazzo, 1992; Waters et al., 1998)。また、培養細胞を用いた実験系での細胞同調には、ヒドロキシウレアやアフィディコリンなどのS期

進行阻害剤や前述のノコダゾールなどが広く利用されている (Table. 1-1)。また化合物のみならず細胞周期の進行を阻害するようなペプチドやタンパク質を用いた細胞周期制御機構の研究は、生体分子の機能解明を行っていくうえで重要な役割を果たすと考えている。一方、癌細胞は増殖を繰り返し行なう細胞であるが、生体のほとんどの細胞は休止期にあるため、細胞増殖を阻害するような薬剤、つまり細胞周期の進行を阻害する薬剤は抗がん剤になりうる。実際に、M期阻害剤としての微小管作用薬(タキソールやビンカルカロイド)は抗がん剤として臨床で用いられている。しかしながらM期に細胞周期を停止させる細胞透過性の低分子化合物で微小管以外をターゲットとする薬剤ほとんど知られておらず、微小管以外をターゲットとする薬剤の開発が期待されている。

(Table. 1-1 細胞周期阻害剤、同調剤)

分類	阻害剤	標的タンパク質	作用など
細胞骨格	colcemid	tubulin	微小管重合阻害、細胞分裂期阻害。および適切な希釈で分裂期中期の紡錘系を不活化し、染色体を中期に組織的に固定することが可能
	colchicine	tubulin	微小管重合阻害、細胞分裂期阻害
	nocodazole	tubulin	微小管重合阻害、細胞分裂期阻害
	paclitaxel	tubulin	微小管重合安定化剤、抗腫瘍・抗白血病物質、腫瘍壊死因子 (TNF-)の放出を刺激する
	vinblastine	tubulin	微小管重合阻害
	trvprostatin A	(MAPs?)	微小管結合タンパク質依存性の微小管重合阻害
	pironetin	tubulin	微小管重合阻害
物質輸送	cytochalasin B	actin	アクチンのモノマーとポリマーの平衡を阻害。細胞質分裂、移動運動、食作用などの細胞運動を妨げる
	pentoxifylline	ホスホジエステラーゼ	エンドトキシン誘導による腫瘍壊死因子腫瘍壊死因子 (TNF-)の合成を阻害する
DNA合成阻害	actinomycin D	DNA依存性RNAポリメラーゼ	DNAインターカレーター、DNA依存性RNAポリメラーゼの阻害、セリンプロテアーゼの競合的阻害剤
	Aphidicolin	DNAポリメラーゼ	真核細胞のDNAポリメラーゼ _a に対して特異的阻害作用を示すが原核細胞のDNAポリメラーゼの型の判定やDNAの複製、修復、および細胞文化や増殖の機序の解析に利用される
	hydroxyurea	リボヌクレオチドレダクターゼ	リボヌクレオチドレダクターゼを阻害することで、DNA合成の慎重反応が阻害され、S期停止を引き起こす 抗腫瘍物質
	camptothecin	DNAトポイソメラーゼI	高白血病作用および抗腫瘍作用、細胞周期 G2/M期停止
	etoposide	DNAトポイソメラーゼII	様々な腫瘍に対して強力な活性を示すおよびアポトーシス誘導活性を持つ

(8) 本研究の目的

本研究においては、以上のことを踏まえ細胞周期の最終段階である分裂期の制御機構の解析を行なうことは有用であると考えM期の開始または進行を阻害するタンパク質および化合物に関する阻害機構の解析を行なった。第1章ではHIV-1 Vprによる細胞増殖阻害機構の解析、第2章では微生物の培養液から単離された天然化合物Terpendole Eによる細胞周期M期阻害機構の解析をまとめた。

第2章 HIV-1 Vprによる細胞増殖阻害機構の解析

第1節 序論

(1) HIV-1の発見

人類において最初にエイズ(AIDS; aquired immunodeficiency sndrome)が確認されたのは1981年のことである。ニューヨークとカリフォルニアにおいて、それまで健康だった若い同性愛者の男性が、突然カポジ肉腫とカリニ肺炎の症状を伴う奇妙な病気にかかったことが報告された(anonymous¹⁾, 1981; anonymous²⁾, 1981)。そしてこれらの患者に共通してCD4陽性T細胞の減少による免疫異常がおこることが明らかになり(Gottlieb et al., 1981)、この原因不明の病気は、後天性免疫不全症候群、エイズ(AIDS)と命名された(Cantwell, 1982)。1983年にはヨーロッパ大陸のフランスで、リンパ節腫脹を伴うAIDS患者からこれまでに知られていなかったLymphadenopathy associated virus (LAV)とよばれる新しいウイルスが分離された(Barre-Sinoussi et al., 1983)。続いて翌年、アメリカでも多数のAIDS患者からウイルスが分離された。当時ヒトのCD4陽性T細胞特異的に感染することが知られていたレトロウイルスはヒト白血病ウイルス1および2 (HTLV-I, HTLV-II; human T-lymphotrophic virus I, II)であったことから、アメリカのAIDS患者から発見されたウイルスはHTLVの配列とは似ていなかったものの、HTLVIIIあるいはAIDS related virus (ARV)と命名された。その後フランスで発見されていたウイルスとアメリカで発見されたウイルスが同一のものであることがわかり、現在ではヒト免疫不全ウイルス(HIV-1; human immunodeficiency virus type 1)の名称に統一されている。

(2) HIV-1の感染機構

HIV-1は主にCD4陽性T細胞に感染し、その他にもCD4を発現しているマクロファージや樹状細胞にも感染する。これは、HIV-1ウイルス粒子の抗原表面を覆うエンベロープ(envelope)タンパク質と宿主細胞の細胞表面のCD4抗原との強い結合性によるものである。細胞内への侵入にはCD4以外にケモカインレセプターであるコレセプターとしてのCXCR4 (T細胞などで発現)またはCCR5 (マクロファージなどで発現)を必要とする。CXCR4あるいはCCR5が結合すると、エンベロープが構造変化を起こし細胞膜との融合が生じて、

ウイルスは細胞質内に侵入すると考えられている。またCXCR4をコレセプターとするHIV-1株をCXCR4-tropic、およびCCR5をコレセプターとするHIV-1株をCCR5-tropicなウイルスと呼んでいる。CXCR4ウイルスは感染した細胞に細胞融合(synsitia)を誘導するウイルスである。

(3) AIDSの発症機構

HIV-1に感染直後から1ヶ月くらいは患者の体内においてウイルスが急激に増殖し、臨床的には発熱や発疹などの症状が現れる。この時HIV-1ウイルスが感染するヘルパーCD4陽性T細胞は多少減少するがまたすぐにもとの状態に戻される。その後、細胞性免疫および抗体性免疫が働き出すとウイルスは急激に減少し、患者には目立った症状は表れなくなる。この状態はウイルスの潜伏期間と呼ばれており、見かけ上のウイルス量はさほど変化していないが、実際は100億もの新しいHIVウイルス粒子が毎日生産され免疫細胞によってすぐに駆除されている。ウイルスが感染することでウイルス生産細胞となったCD4陽性ヘルパーT細胞は、HIV-1ウイルスそのものまたはCD8陽性キラーT細胞のターゲットとなることによってすぐに破壊されている。同時に1日におよそ 2×10^9 個もの新たなCD4陽性T細胞を作ることで、生体におけるCD4陽性T細胞の数をほぼ平衡状態に保っている。一方、極わずかな割合のウイルスは寿命の長いメモリーT細胞に感染する。メモリーT細胞のゲノムDNAに組み込まれたウイルスは増殖および感染細胞表面の抗原提示を行わないために、ウイルスは完全に細胞の中に隠れてしまう。そのため化学療法における薬剤はメモリーT細胞を認識することができず、このことがHIV-1の治療をより困難にしている。そして何らかの刺激が与えられるとメモリーT細胞に潜伏していたウイルスが再び増殖するようになる。

HIV-1に感染後、CD4陽性T細胞数がある程度保たれている潜伏期間は短くて1-2年、長くて15年くらいであり、この間ヘルパーT細胞の平衡状態が徐々に傾いて減少してくる。またHIV-1ウイルスは逆転写の過程でミスを伴った複製を行なうという特徴をもつ。新たなウイルスの感染によって提示される新たな抗原を認識し、ウイルスを駆除するためには免疫細胞も次々と新しく作られなければならない。ウイルスの駆除に必要なキラーT細胞が効率よく働くためにはヘルパーT細胞が必要であるが、ヘルパーT細胞の減少に伴い新たに作られたキラーT細胞が十分に機能しなくなると、もはやウイルス量を制御できなくなる。

そしてCD4陽性T細胞の数がおよそ200 cells/mm³になるとウイルスは急激に増殖し、患者の免疫活性はほぼ失われる。この状態をAIDSと定義している。ひとたびAIDSが発症すると健康体には問題のない細菌感染などの日和見感染によって、HIV-1に感染した患者の多くが2年以内に亡くなることが多い。(財団法人エイズ予防財団の発表によると)2004年に世界では新たに490万人が感染し、310万人が亡くなったと推計され、2004年末にけるHIV-1の感染またはAIDSの発症が確認されている数はおよそ4千万人に及ぶ。今日でもHIV-1の感染は広まる一方であり、HIV-1は人類にとって非常に深刻な問題となっている。

(4) HIV-1と類縁ウイルス

ヒトに感染するHIVはHIV-1のほかにHIV-2が知られている。HIV-1は世界中で流行している免疫不全症を引き起こすウイルスであるが、HIV-2はHIV-1に比べるとはるかに病原性の低いウイルスである。さらに類縁ウイルスとしてサルの免疫不全ウイルス(SIV; simian immunodeficiency virus)があり、その宿主に応じて何種類か知られている。HIV-1はSIVcpz(チンパンジー)より、HIV-2はSIVmac/SIVsm(マカークサル/スーティーマンガベイ)より独立に伝わってきたと考えられている。SIVは通常は本来の感染宿主に対しては病原性を示さないが、異なる種族に感染すると免疫不全を引き起こす。例えばアフリカ緑ザル(African Green Monkeys)由来のSIVagmは多くの野生の健康なアフリカ緑ザルが感染しているが臨床的な症状は現れない。しかしSIVagmがマカークサルに感染すると病原性を発揮し免疫不全を引き起こす。HIV-1は他のほとんどの動物種には感染しないため、HIV-1のモデル系を他の動物種で作る事は困難を極めている。唯一HIV-1が感染するチンパンジーではワクチンの開発レベルまでは感染を成立させることができるが、AIDSの発症にはほとんどいわず、AIDS疾患モデル動物を用いた薬剤開発は難しい状況にある。

(5) HIV-1がコードするタンパク質

HIV-1は全長9749残基からなり、他のレトロウイルスにも保存された3つの構造タンパク質Gag、Pol、Envをコードしている。GagおよびPolは前駆体タンパク質を形成したのち、プロテアーゼによって認識され、Gagはmatrix、capsid、nucleocapsidおよびp6に、Polはreverse transcriptase、integraseおよびproteaseに切断される。HIV-1はこの他にも6つのタンパク質(Nef、

Vif、Tat、Rev、Vpu、Vpr)をコードしている(Fig. 2-1-1)。これらの6つのタンパク質はHIV-1ウイルスの感染において、必ずしも必要ではないが、以下に示すような補助的な役割を担っていると考えられる。

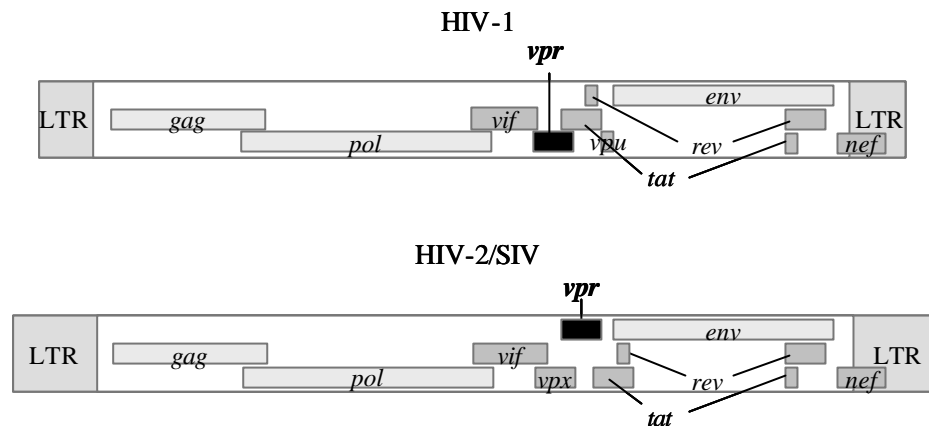


Fig. 2-1-1 HIV-1、HIV-2、SIVがコードするタンパク質

- Nef (negative regulatory factor ; 206アミノ酸)
感染成立初期から発現がみられ、ゴルジ体に局在するCD4をエンドソーム、次いでリソソームへ運ぶことによってCD4のタンパク質レベルでの発現制御を行なっている。
- Vif (virion infectivity factor ; 192アミノ酸)
宿主細胞のウイルス複製防御機構であるシチジンデアミナーゼ、APOBEC3Gを特異的に認識し、プロテアソーム依存的経路によって分解させ、ウイルスの侵入および感染を促進させる働きをもつ(Marin et al., 2003; Sheehy et al., 2003)。
- Tat (trans activation of transcription ; 86アミノ酸)
ウイルスの複製に必須なウイルスゲノム転写プロモーターLTRからの転写を極度に増大させ、HIV-1の全ての遺伝子の転写(タンパク質の合成)を正に制御する因子であり、ウイルス産生に必要である(Berkhout et al., 1989)。
- Rev (gulator of virion protein expression; 116アミノ酸)
3つの構造タンパク質(Gag、Pol、Env)のmRNAにのみ結合し、スプライシングの阻害を行なうことでこれらのタンパク質の発現を促進する。RevはTatと同様にウイルスの増殖に必要である。
- Vpu (viral protein U ; 81アミノ酸)

新たに作られたウイルス粒子の放出を促進し、Vpuが β -Trecp1と結合してCD4抗原のSCF $^{\beta}$ -Trecp1依存的な分解を誘導させることでT細胞の活性を抑制する働きを持つ(Margottin et al., 1998; Strebel et al., 1989; Willey et al., 1992)。またVpuはHIV-2や多くのSIVにはコードされず、HIV-1に特徴的なタンパク質である。(HIV-2やSIVは代わりにVpxをコードしている。)

- Vpr (viral protein R ; 96アミノ酸)

ウイルス粒子中に存在するタンパク質であり(Cohen et al., 1990a)、以下に示すようにPIC(preintegration complex)に取り込まれること、および細胞周期をG2期に停止させるという2つの大きな特徴を含め、様々な働きをもつ。

(6) Vprについて

HIV-1はレトロウイルスファミリーの中のレンチウイルス族に含まれる。レトロウイルスはウイルス粒子を細胞表面に結合させた後、逆転写酵素を用いてRNAを二本鎖DNAに変換する。そして二本鎖ウイルスゲノムを宿主細胞の核DNAに組み込ませて増殖を行なうウイルスである。HIV-1を含むレンチウイルスは他のレトロウイルス(HTLV-1 : ヒト成人T細胞白血病ウイルスなど)とは異なり、宿主細胞の細胞分裂期にみられる核膜崩壊を伴わない非分裂細胞にも感染できるという特徴をもつ。これには二本鎖ウイルスゲノムを含むPIC(preintegration complex)が働いていると考えられているが、核膜孔(直径約25 nm)よりもはるかに大きなPIC(直径約56 nm)がどのようにして核膜を通過しているかについて、詳細な機構は明らかにされていない。HIV-1ではPICに含まれている3つのタンパク質、MA (matrix)、Int (integrase)、Vpr (viral protein R)がこの核膜通過に重要な働きを担っていることが示唆されている(Fig. 2-1-1、2-1-2)。MAおよびINTはそのアミノ酸配列にNLS (nuclear localization signal)を含んでおり、このNLS配列を介して核内輸送物質タンパク質であるimportin- α と結合する(Bukrinsky et al., 1993; Gallay et al., 1997; von Schwedler et al., 1994)。Vprもまたimportin- α と結合することが知られている。しかしVprはMAやIntとは異なりSV-40のNLS配列を含むペプチドを加えてもimportin- α との結合は解離されてこないことから、MAやIntとは異なる様式でimportin- α に結合していると考えられている {Gallay, 1997 #241} {Jenkins, 1998 #242}。また、VprはT細胞などの分裂を繰り返す細胞への感染には必ずしも必要ないが、マクロファージなどの分裂を行わない細胞に対するHIV-1の感染の効率を上げるこ

とが知られている {Connor, 1995 #243}{Heinzinger, 1994 #164}{Gallay, 1996 #140}。さらにVprは核膜孔複合体(nuclear pore complex)(Fouchier et al., 1998)、nucleoporin hCG1 (Le Rouzic et al., 2002)や核膜の構成成分であるラミン(de Noronha et al., 2001; Segura-Totten and Wilson, 2001)とも結合することが報告されているが、VprがどのようにしてPICの核内輸送に関わっているのかについても、その詳細な機構は明らかにされていない。

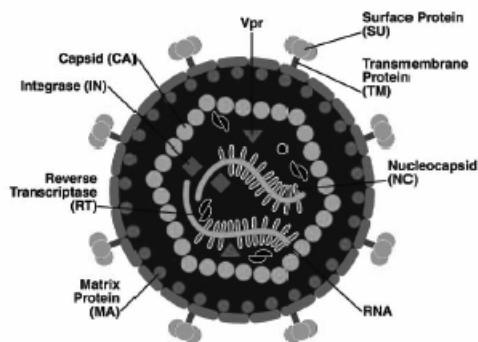


Fig. 2-1-2 HIV-1ウイルス粒子概略図

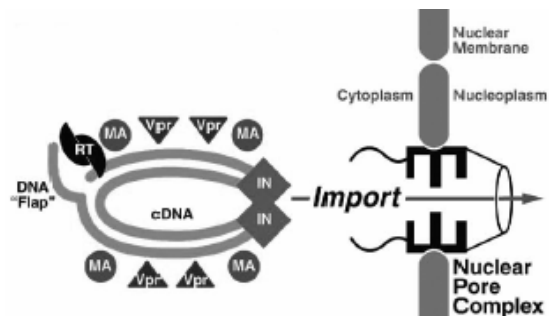


Fig. 2-1-3 HIV-1 PIC模式図

(Microbes and Infection vol.4、67-73、2002より)

HIV-1 ウイルス感染細胞が G2 期に停止することが分ったのは 1992 年のことであり (Lewis et al., 1992)、その後 Vpr タンパク質を単独で発現させても G2 期停止を引き起こすことなどから、HIV-1 ウイルスによる細胞周期の停止には Vpr タンパク質が必要十分条件であることが示された(He et al., 1995; Jowett et al., 1995)。このとき G2 期から M 期への移行に必須な Cdc25C および Cdc2/cyclin B が活性化していないことが知られている(He et al., 1995; Re et al., 1995)。また Vpr は出芽酵母、*Saccharomyces cerevisiae* や、分裂酵母、*Schizosaccharomyces pombe* においても増殖阻害を引き起こすことが知られており (Macreadie et al., 1995; Zhao et al., 1996)、Vpr による細胞増殖阻害の作用点は細胞周期調節因子の中でも高度に保存されているものであると考えられている。

これまでに Vpr と結合する様々なタンパク質が報告されている。転写因子である TFIIB (Agostini et al., 1996)、Sp1(Wang et al., 1995)、MOV34(Mahalingam et al., 1998)や p300/CREB(Kino et al., 2002)、核内への物質輸送に働く importin- α (Popov et al., 1998) (Vodicka et al., 1998)、DNA 修復酵素である UNG (uracil DNA glycosylase) (Bouhamdan et al., 1996)および hHHR23A (Withers-Ward et al., 1997)などである。cDNA のスクリーニングからは Vpr に

よる増殖抑制活性を抑えて酵母の増殖を回復させるタンパク質として、HSP42 や HSP70 などの熱ショックタンパク質が得られている(Gu et al., 1997; Iordanskiy et al., 2004)。しかしながら、いずれの場合においても細胞周期停止に直接結びつくような詳細な機構は明らかにされておらず、以前不明のままである。

その他のVprが示す活性としては、ウイルスの増殖に必須なウイルスRNAの転写プロモーターLTR (long terminal repeat)からの転写活性化上昇に直接働いているという報告や(Cohen et al., 1990b)、細胞のアポトーシス誘導活性をもつこと(Stewart et al., 1997)、さらに長期間にわたりAIDSを発症しない(T細胞が減少せず免疫不全に陥らない)HIV-1感染患者のウイルスにVpr の変異が見出されるなど(Somasundaran et al., 2002; Zhao et al., 2002; Lum et al., 2003)、VprはHIV-1の感染や増殖のみならず、AIDSの発症という臨床面においても重要な役割を担っていると考えられる非常に興味深いタンパク質である。

以上のことから、Vprによって誘導される未だ不明なG2期阻害活性機構の解析を行なうことは、HIV-1の臨床治療へ応用されるだけでなく、新たなG2期停止機構の解明にもつながると考えた。Vprは酵母でも増殖阻害を起こすことから、本研究では出芽酵母*S. cerevisiae*を用いて解析を行なった。第2節ではVprが酵母の増殖に与える影響、第3節ではVprがDNA傷害/複製チェックポイントに与える影響、第4節では様々な点突然変異体Vprを用いた解析を行なった結果をまとめた。

第2節 Vprによって誘導される酵母の増殖阻害

Vpr が酵母の増殖に与える影響を調べるために、N 末に Flag タグを融合させた Vpr を、銅を添加により酵母内でタンパク質の発現が誘導されるベクター(pYEX-BX)に挿入した。また Vpr をもたないベクターコントロールとして、Flag-Vpr が逆向きに挿入されているベクターを用い、これらのベクターを酵母に形質転換させた。

初めに Vpr タンパク質の発現を、抗 Flag 抗体を用いたウエスタンブロットティング法により確認した。発現を誘導しない培地(Vpr-off)でも多少 Vpr の発現の漏れが認められたが、発現誘導培地で 1 時間培養することで Vpr タンパク質の顕著な発現上昇が検出された(Fig. 2-2-1 A)。次に Vpr が酵母の増殖に与える影響を培養液の濁度を指標に調べた。Vpr をもたない酵母では発現誘導培地中でも増殖することが確認されたが(Fig. 2-2-1 B、control)、Vpr を発現させることにより、酵母の増殖が顕著に抑えられることが確認された(Fig. 2-2-1 B、Vpr)。このことから既に報告されていたように(Berglez et al., 1999; Macreadie et al., 1995; Macreadie et al., 1997)、本実験系においても Vpr の発現により酵母の生育が顕著に阻害されることが確認された。次に Vpr タンパク質を発現させた際に細胞周期に与える影響を FACS により解析した。Vpr を発現した細胞では DNA 量が 1C である細胞の割合(G1 期に相当)が僅かに上昇する傾向が見られたものの、特異的な細胞周期に停止する様子は確認されなかった(Fig. 2-2-1 C、Vpr)。続いて Vpr が酵母の細胞形態に与える影響を調べるために、Vpr を発現誘導後の酵母の出芽状態を指標にそれぞれのタイプの割合を数えたところ、Vpr タンパク質を発現させても、Vpr を持たない細胞と比較して細胞形態が大きく変化することはないことが分かった(Fig. 2-2-1 D)。以上のことから、Vpr は酵母の細胞形態や細胞周期には顕著な影響を及ぼさずに細胞増殖を阻害することが明らかになった。

これまでに Vpr を出芽酵母に発現させると形態異常が誘導させることが報告されていたが(Gu et al., 1997)、本研究においては Vpr の発現を誘導してから 4 時間目までの間では、Vpr による形態異常は誘導されないことが分かった。Gu らによる形態異常の変化は Vpr の発現を誘導させてから比較的長時間経過したものであることから、Vpr による直接的な作用ではない可能性が考えられる。

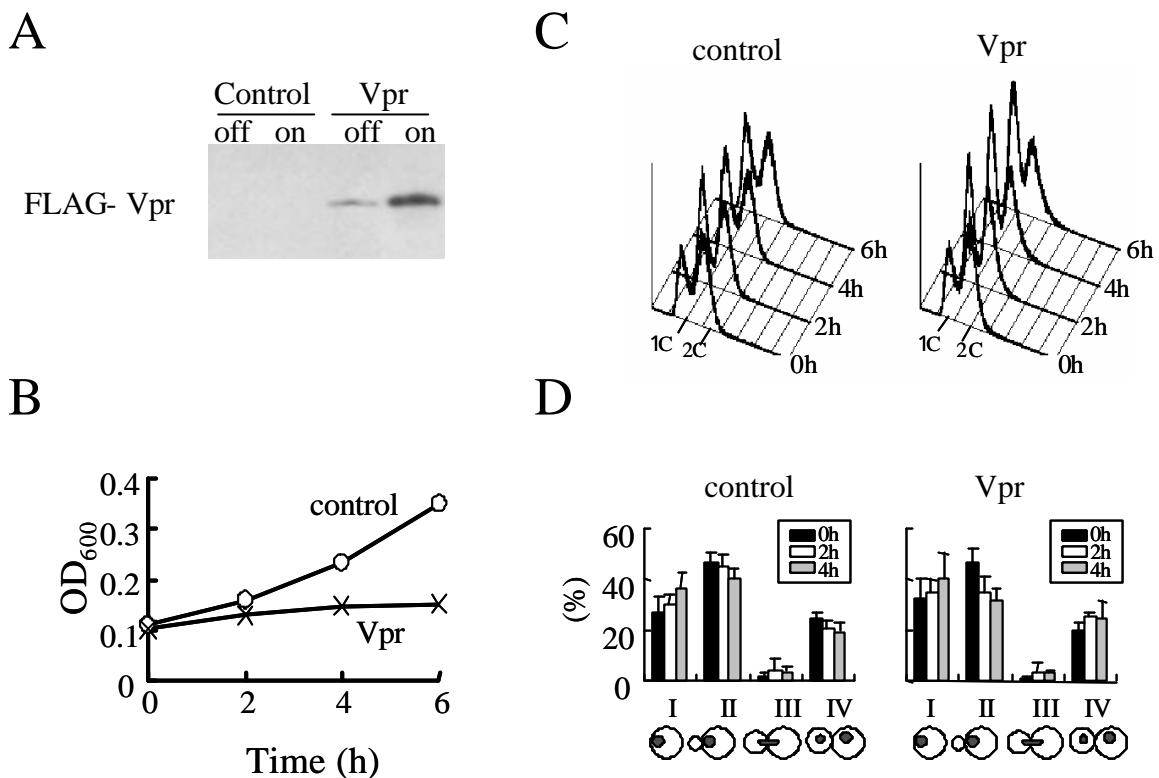


Fig. 2-2-1 Vpr-inhibited yeast cell growth

A: Yeast cells transformed with control or Vpr vector were grown to the log phase in non-inducible medium and were cultured in either non-inducible (off) or inducible (on) medium for 1 h. Cell lysates from an equal density of cells were examined for Vpr expression by Western blotting with anti-FLAG antibody.

B and C: Cells were cultured in the inducible medium as in A and the effects of Vpr on the growth were determined by the increase in cell density (B) and FACS analysis (C).

D: The morphology of yeast cells expressed control or Vpr for 0, 2, 4h were observed under Nomarski and fluorescence microscopy after DAPI staining. Histogram showed the percentage of each cell types (I-IV); the single cell body without a bud (I) or with a bud (II), the double cell body with dividing nucleus (III), and the double cell with two nucleuses (IV). Data from three independent experiments are shown; for each time point more than 200 cells were counted.

第3節 VprがDNA傷害/複製チェックポイントに与える影響

Vprによる動物細胞でのG2期停止がおこると、Cdc25およびcyclin B/cdc2が活性化状態にないことが明らかになっている。この状態がDNA傷害/複製チェックポイントが活性化した場合に見られる状態と似ていることから、これまでにVprがDNA傷害/複製チェックポイントを介して増殖阻害を引き起こしているか否かを検討した報告がいくつかなされている。しかしながらDNA傷害チェックポイントを解除するような薬剤を処理した場合に矛盾した結果が報告されるなど(Bartz et al., 1996; Poon et al., 1997)、VprとDNAチェックポイントとの関わりは明らかではない。最近では、動物細胞においてDNA傷害・複製阻害のチェックポイントにおけるセンサータンパク質のひとつ、ATRがVprによる増殖阻害に関与していることが報告されたが、ATRの活性化に至る詳細なメカニズムは依然不明のままである(Roshal et al., 2003; Zimmerman et al., 2004)。そこで本節においては、VprがDNA傷害/複製チェックポイントに与える影響を調べるために、種々のチェックポイント変異株にVprを発現させ、Vprがこれらの酵母の増殖に及ぼす影響を調べた。

出芽酵母ではPI3KKファミリーに属するMec1(動物細胞のATMホモログ)およびTel1(動物細胞のATRホモログ)が、チェックポイントのセンサータンパク質として機能しており、その下流ではRad53(動物細胞のchk2ホモログ)およびChk1(動物細胞でもChk1)がアダプタータンパク質として働いている(Fig. 2-3-1)。Mec1やRad53が変異した酵母では、IR照射によるDNA傷害やヒドロキシウレア(HU)による複製阻害に対して高感受性を示す結果として、生存率の低下がひきおこされることが知られている。一方、Tel1やChk1は、それぞれMec1やRad53に対して相補的な役割を担っていると考えられている。Tel1はMec1が存在するときに、Chk1はRad53が存在するときには、Tel1またはChk1の変異そのものだけでは生存率の低下は誘導されず、野生型と同様にチェックポイントが機能することが知られている(Sanchez et al., 1999; Sanchez et al., 1996)。本研究ではMec1変異株(Y306; *mec1-21*)、Tel1変異株(Y658; $\Delta tel1$)、Mec1とTel1の両変異株(Y664; *mec1-21 \Delta tel1*)、Chk1変異株(Y801; $\Delta chk1$)、Rad53変異(Y303; *rad53-21*)、Chk1とRad53の両変異株(Y858; *rad53-21 \Delta chk1*)、およびこれらの親株としての野生株(Y300; wt)の増殖にVprが与える影響を調べた。

(1) チェックポイント変異株にヒドロキシウレアが及ぼす影響

初めにDNA複製阻害剤であるヒドロキシウレア(HU)がチェックポイント変異株に与える影響を調べた。対数増殖期に培養した酵母の培養液の一部を寒天培地にまき、これを0時間の寒天プレートとした。培養液に終濃度が15 mg/mlとなるようにHUを加え、HU存在下で12時間培養後、0時間と等量の培養液を、HUを含まない寒天培地に撒きこれを12時間の寒天プレートとした。寒天プレートを3日間、30°Cのインキュベーターで培養し、生えてきたコロニー数を調べた。その結果、野生株では12時間HU存在下で培養した後、スタート時(0時間)と比べてコロニー数が多少増加したことが確認されたが、*rad53*および*mec1*の変異を含む株、(Y306;*mec1-21*、Y664;*mec1-21 Δtel1*、Y858;*rad53-21 Δchk1*)はHU存在下で培養すると、コロニー数が顕著に減少した。また、Tel1の変異(Y658;*Δtel1*)、およびChk1変異(Y801;*Δchk1*)ではHU処理によるコロニーの減少は認められなかった(Fig. 2-3-2)。これらのことから、用いた変異株(Y306;*mec1-21*、Y664;*mec1-21 Δtel1*、Y858;*rad53-21 Δchk1*)は報告されているようにHUに対して高感受性であることが確認された。

(2) VprがMec1およびTel1に与える影響

DNA傷害/複製チェックポイント経路において、センサータンパク質として働いているMec1およびTel1にVprが与える影響を調べた。Mec1変異株(Y306;*mec1-21*)、Tel1変異株(Y658;*Δtel1*)、およびMec1とTel1の両変異株(Y664;*mec1-21 Δtel1*)にVprの発現ベクターを形質転換させ、Vprがこれらの酵母の増殖に与える影響を、培養液の濁度を指標に測定した。Vprの発現ベクターを持たない酵母は株間で増殖速度に多少の差はみられたものの、全ての株が発現誘導培地で生育することが確認された(Fig. 2-3-3、A-D、open circles)。野生株の酵母にVprの発現を誘導すると、12時間後においてもほとんど濁度の上昇はみられず、酵母の増殖は顕著に抑えられた(Fig. 2-3-3、A、closed circle)。次に各種変異株にVprの発現を誘導したところ、すべての株で顕著な増殖阻害が認められ、12時間培養後においてもほとんど増殖しないことが確認された。このことから、VprはMec1およびTel1変異株においても野生株と同程度の増殖阻害を誘導することが確認された。

Vprは酵母に対して細胞死の誘導を伴わない増殖阻害を引き起こすことが報告されている(Gu et al., 1997)。このときVprがチェックポイントを活性化することで増殖を阻害しているならば、チェックポイントタンパク質が機能しないチェックポイント変異株では、Vprの発現により細胞死が誘導されることが予測される。そこで、液体培地中でVpr発現誘導

後に非発現誘導寒天培地に酵母を播き30℃で培養し、Vprタンパク質を除去した際に見られるコロニー形成率を調べた。

初めに野生株にVprの発現を誘導し、発現誘導開始から24時間後まで酵母を含む培養液を一定量ずつ寒天培地に播き、30℃で3日間培養後、生えてきたコロニー数を数えた。このとき培養液中の細胞数がほとんど変化しなかったことから(Fig. 2-3-3 A, Vpr)、寒天培地上のコロニー数は各時間における生存率を表しているものとみなした。野生型の酵母にVprを発現させると、24時間後でもスタート時とそれほど大きな変化は見られなかった(Fig. 2-3-4, A, wt)。次に、Mec1およびTel1変異株にVprの発現を誘導し同様の実験を行なったところ、HU処理時に認められたような極端なコロニー数の減少はみられず、野生株にVprを発現させたときの結果と比べてさほど変わらないことが分かった(Fig. 2-3-4, A)。以上の結果よりVprによる酵母の増殖阻害はMec1およびTel1には依存していないことが示唆された。

(3) VprがRad53およびChk1に与える影響

VprはMec1やTel1には影響を与えていないことが示唆されたが、その下流因子であるRad53およびChk1をVprが直接活性化することにより細胞周期が停止している可能性が考えられた。そこでRad53変異株(Y301; *rad53-21*)、Chk1変異株(Y801; Δ *chk1*)およびそれらの両変異株(Y858; *rad53-21* Δ *chk1*)を用いて3節(2)と同様の実験を行なった。その結果、Vprの発現を伴わないときに株間で多少の増殖速度の違いが見られたが、Vprの発現誘導条件下でも生育することが確認された。そこでVprの発現誘導を行なったところ、いずれの変異株においてもVprを発現させたことによる顕著な増殖抑制活性が観察された(Fig. 2-3-3 A, E-G)。また、Vprの発現誘導後におけるコロニー形成率は3つの変異株ともに野生株と同様で、顕著な差は確認されなかった。以上の結果より、VprはRad53およびChk1を活性化することによって増殖阻害を引き起こしているのではないことが示唆された(Fig. 2-3-4, B)。

Rad53はUV照射などによるDNA損傷やヒドロキシウレア(HU)処理などによるDNA複製阻害が起きた場合にMec1およびTel1からリン酸化を受けることで活性化され、下流へとそのシグナルを伝える。このリン酸化型Rad53はSDS-pageのアクリルアミドゲル中では泳動の遅延にともなうバンドシフトにより確認できることが知られている(Sanchez,

1996 #244}{Sun, 1996 #245}。そこで、抗 Rad53 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により、確認のために Vpr の発現誘導後の Rad53 タンパク質のリン酸化状態を調べた。はじめに野生型の酵母(Y300)を HU 存在下で 2 時間培養後、(内在性の)Rad53 タンパク質の検出を行ったところ、顕著な Rad53 タンパク質のバンドシフトを確認することができた(Fig. 2-3-5、+HU)。Vpr を 2 時間発現誘導させた酵母では、Rad53 タンパク質のバンドシフトは確認されず、Vpr は Rad53 タンパク質を活性化させていないことが確認された(Fig. 2-3-5)。

(4) Mre11/Rad50/Xrs2複合体に及ぼす影響

最後に確認のため、DNAに傷害がおきたときに傷害部位に直接結合し、Tel1やMec1などの下流にシグナルを伝えることが知られているチェックポイントタンパク質、Mre11/Rad50/Xrs2(動物細胞のMre11/Rad50/Nbs1のホモログ)にVprが与える影響を調べた。用いた株は野生型(W303-1A)、 $\Delta xrs2$ (DDY004)、 $\Delta mre11$ (DDY006)、 $\Delta rad50$ (DDY008)およびこれら3つのタンパク質全てを欠損させた変異株 $\Delta mre11/\Delta rad50/\Delta xrs2$ (DDY022)である。これらの株に、ガラクトースの添加によってN末にFlagタグを融合させたVprの発現が誘導されるベクター(pYES2)を形質転換させ、酵母の増殖率およびコロニー形成率に与える影響を調べた。

Vprの発現ベクターをもたない全ての株において、発現誘導条件下での増殖がみられたことから、この培地条件でも酵母が生育することが確認された。野生株にVprを発現させた場合、銅の添加によってVprの発現が誘導されるベクター(pYEX-BX)に比べると増殖阻害活性は弱かったものの、Vprを発現させることで酵母の生育が遅くなることが確認された(Fig. 2-3-6 A)。Vpr発現誘導後の酵母のコロニー形成率に与える影響を3節(2)および(3)と同様の手法で確認したところ、野生型で多少のコロニー形成率の増加が認められ、また、いずれの変異株においても顕著な低下は認められないことが分かった(Fig. 2-3-6 B)。これらの結果より、*mre11/rad50/xrs2*のいずれの欠損株にVprの発現を誘導しても、野生株と比較した際の顕著な変化が認められず、VprはMre11/Rad50/Xrs2複合体には影響を及ぼしていないことが示唆された。

(5) 第3節まとめ

第3節において、Vprが*S. cerevisiae*においてDNA傷害/複製チェックポイントを介して増殖阻害を引き起こしているかについて調べた。実験に用いた全てのチェックポイント変異株において、野生株と同程度のVprによる増殖阻害が認められた。さらに、Vprが酵母の生存に与える影響を調べた結果、いずれの株においても生存率の極端な低下は見られず、野生株と同程度の生存率を示した。これらの結果より、Vprが*S. cerevisiae*においてはDNA傷害/複製チェックポイントを介さずに増殖を阻害している可能性が示唆された。

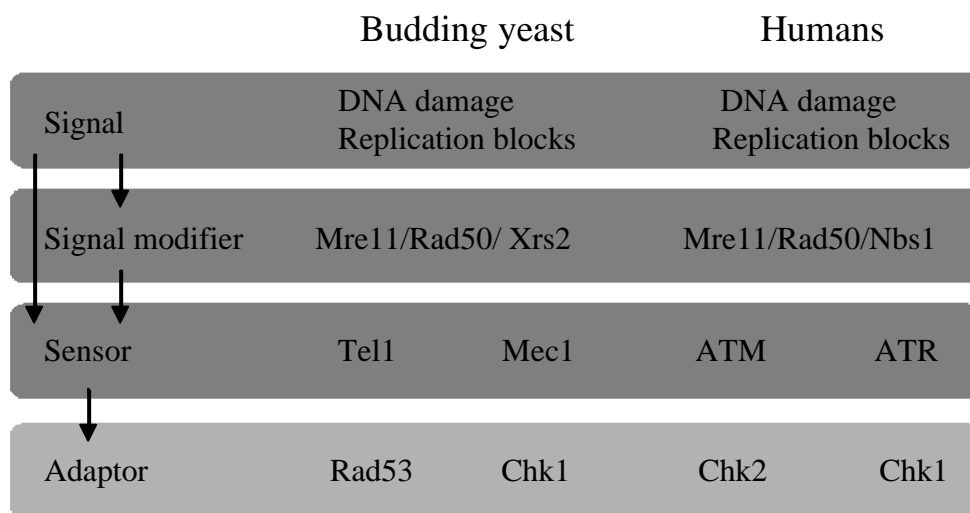


Fig. 2-3-1 Checkpoint signaling in budding yeast and humans

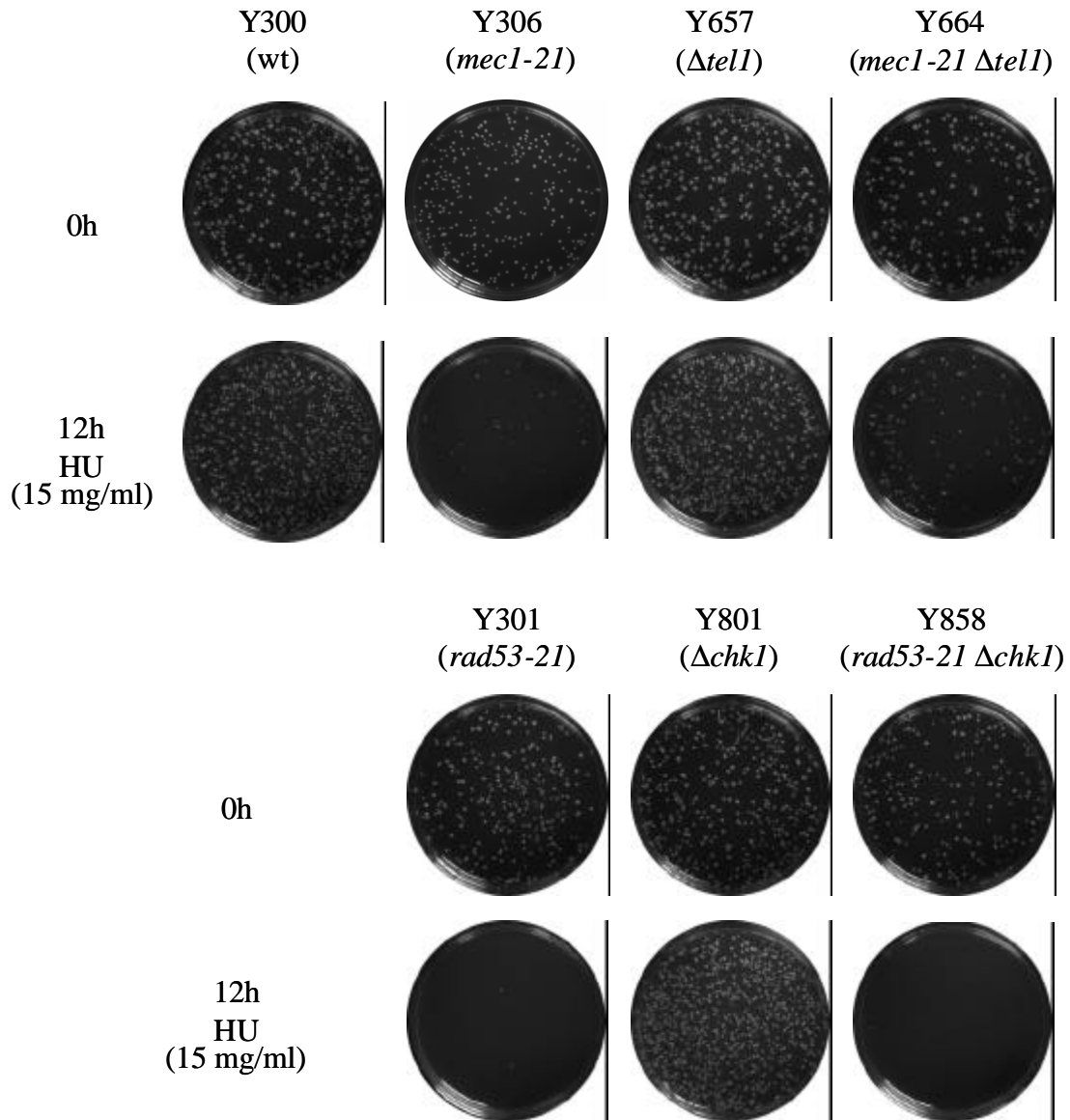


Fig. 2-3-2 The sensitivity for HU in checkpoint deficient strains

Wild type strain or strains deficient in checkpoint functions were transformed with control (reversed-Vpr) vector and incubated in the selection medium over night. Each culture were plated on the selection agar plates(0h), then further incubated with 15 mg/ml HU for 12 hour. Each cultures with the equal volume to 0 h were plated on the plate (without HU) and incubated at 30°C for 3 days.

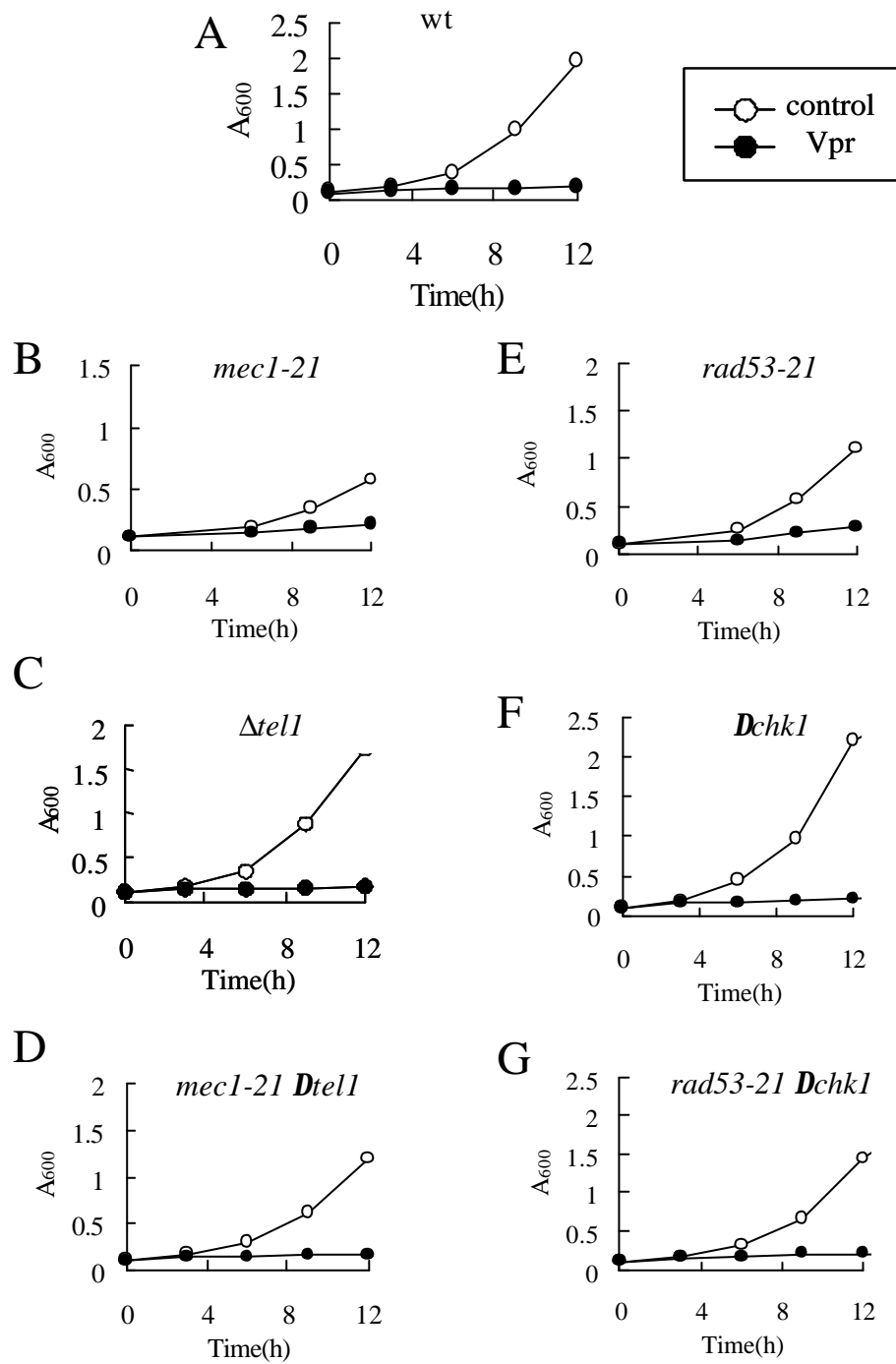


Fig. 2-3-3 Growth inhibition by Vpr in DNA damage or replication checkpoint mutant strains

Growth of each strain with Vpr expression (closed symbols in A-G) was examined by the increase in optical density of the cell culture (A_{600}). Growth of each strain without Vpr expression vector in the same medium is also shown (open symbols).

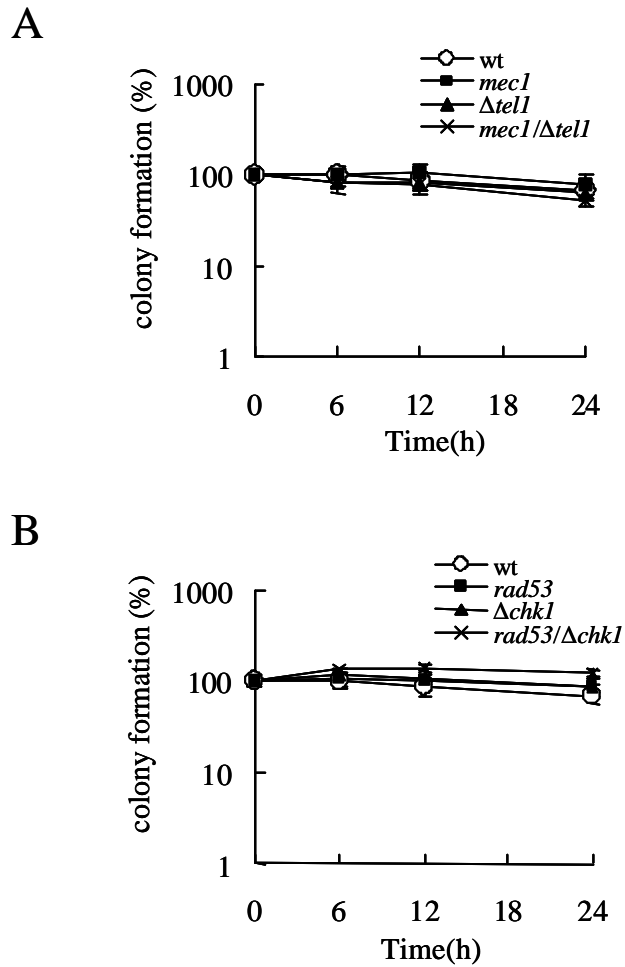


Fig. 2-3-4 Colony forming ability after Vpr expression of DNA damage or replication checkpoint strains

Yeast growth after Vpr expression was examined by the colony forming ability. After incubation in the inducible medium for indicated periods, cells were plated on non-inducible agar plates, incubated at 30°C for 3 days and colony numbers were counted. The colony numbers indicate the number of living cells at each time point and are indicated as percent of 0 time (without induction of Vpr).

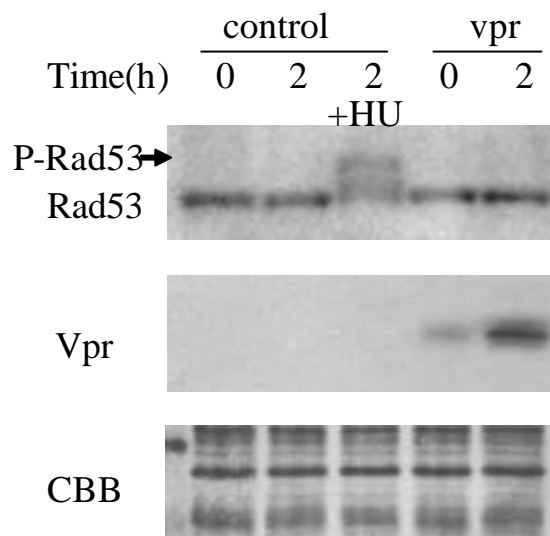


Fig. 2-3-5 Effect of Vpr expression on Rad53 phosphorylation

Yeast cells were grown to the log phase in non-inducible medium (0h). Cells were washed with inducible medium and cultured for 2 hours (2h), or 15 mg/ml hydroxyurea (HU) were added to the control cells and cultured for 2 hours. Rad53 and Vpr proteins were detected by western blotting with anti-Rad53 antibody (upper) or anti-Flag antibody (middle). CBB stained filter is also shown as a loading control (bottom).

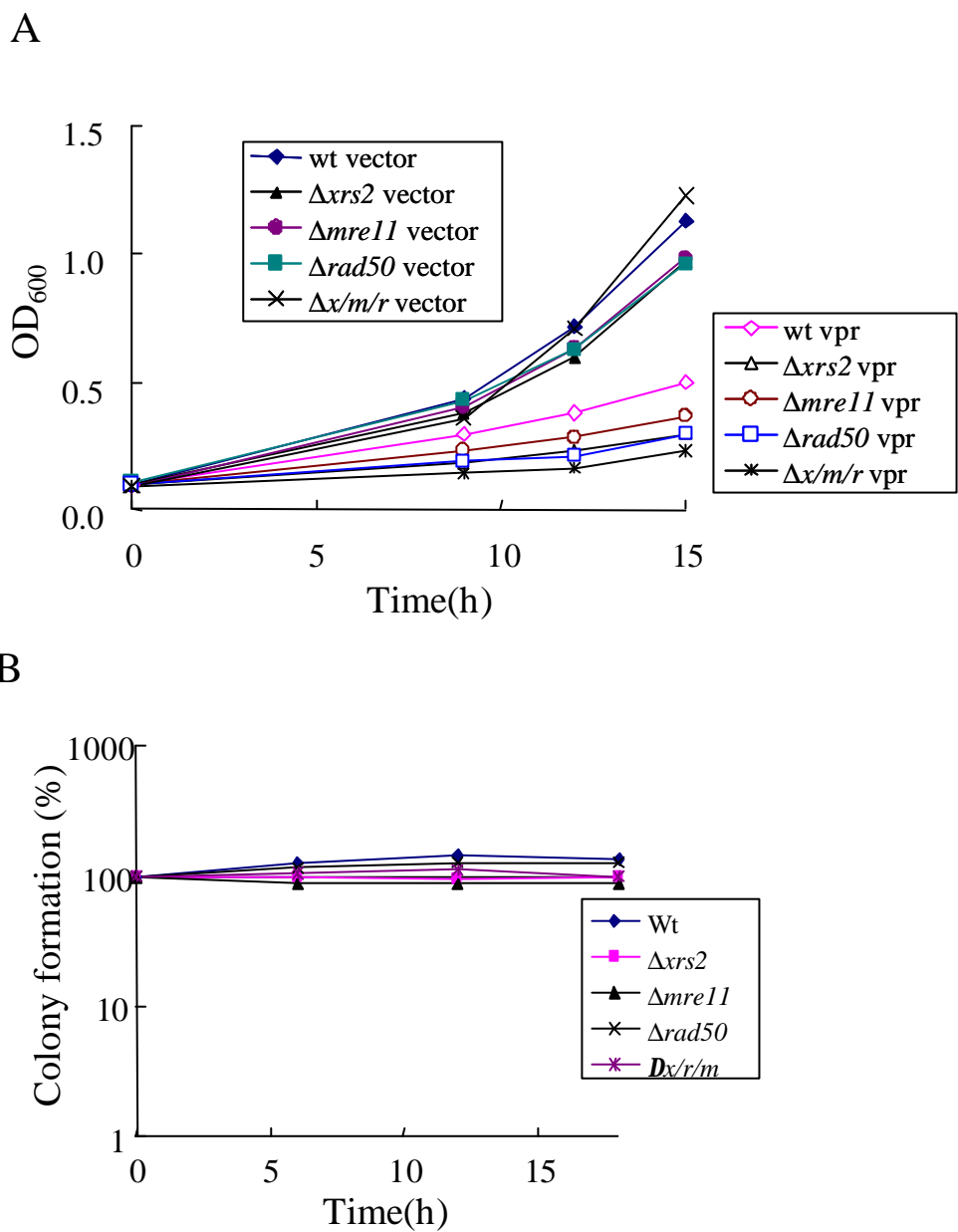


Fig. 2-3-6 The effects of Vpr expression on the growth of Mre11/Rad50/XRS2 mutant strains

A: The effects of Vpr expression on the yeast growth were examined as described in Fig. 2-3-3.

B: Colony forming ability after Vpr expression were determined as described in Fig. 2-3-4

第4節 変異体Vprが酵母の増殖に与える影響

Vprは全長96アミノ酸からなるタンパク質であり、NMRを用いた解析からVprは3つのヘリックス(17-33、38-50、56-77)をもつことが明らかにされている(Morellet et al., 2003)。またC末は酸性アミノ酸が多い配列である(Fig. 2-4-1、A)。これまでに、動物細胞における変異型Vprを用いた解析によりVprが示す様々な機能(細胞周期停止、核局在、UNGとの結合、アポトーシス誘導など)に必要な部位や、それぞれの機能の関わりが明らかになっている。例えば、細胞周期阻害活性にはC末端が重要であると考えられている(Chen et al., 1999; Di Marzio et al., 1995; Nishizawa et al., 1999; Yao et al., 1995)。またC末のアミノ酸変異であるH71R、R73A、I74P、G75A、C76A、R80A、R90K(Di Marzio et al., 1995; Gaynor and Chen, 2001; Selig et al., 1997)およびN末のA30L(Di Marzio et al., 1995; Gaynor and Chen, 2001; Stewart et al., 1997)もG2期阻害活性を示さなくなることから、これらのアミノ酸がG2期停止機構に関わっていることが示唆されている。またVprの局在はE25K、H71R、およびC末欠損変異では、野生型が示す核膜局在から核および細胞質の局在へと変化することから(Vodicka et al., 1998; Yao et al., 1995)、核への局在にはN末およびC末が必要であることが示唆されている。UNGとの結合はE25K、W54R、H71Rによってほぼ完全に阻害されること(Selig et al., 1997)などから少なくとも3箇所がUNGとの結合に関わっていることが示唆されている。またHIV-1に感染しているものの長期に渡ってCD4陽性T細胞が減らずAIDSの発症には至らない患者からはVprにQ3Rの変異が認められ(Somasundaran et al., 2002)、そのほかI74P、C76A、R80Aなどのアミノ酸変異によってもアポトーシス活性がなくなることが報告されている(Gaynor and Chen, 2001; Nishizawa et al., 2000)。その他にもウイルス粒子(virion)に取り込まれるのに必要な領域や転写活性誘導に関わる部位などが調べられている。しかしながら、それぞれの働きに相関性は見出せず、すべて独立した部位によって引き起こされると考えられている。またVprは酵母でも増殖阻害を引き起こすことから、動物細胞における様々なVprの働きのうち、酵母の増殖阻害に関わっているような作用や、酵母と動物細胞で共通の作用を見出すことができれば、その後の動物細胞での細胞周期停止機構の解明において有用であると考えた。

(1) 変異体Vprの作成

動物細胞での働きが既に分かっている様々な変異型V_{pr}を作成し、酵母に発現させ、酵母における増殖阻害活性および局在におよぼす影響について調べた。実験に用いた変異体を(Fig. 2-4-1 A)に示した。これらの変異型V_{pr}が安定して発現することを確認するために、これらの遺伝子を含むベクターを酵母に形質転換させ、発現誘導培地で1時間培養した後、ウエスタンブロッティング法により、FLAG抗体を用いてV_{pr}の発現を確認した。発現量に多少の差は見られたが、すべての変異型V_{pr}の発現が確認された (Fig. 2-4-1 B)。

(2) 変異体V_{pr}が増殖阻害に与える影響

変異型V_{pr}が酵母の増殖に与える影響を調べた。まずV_{pr}発現を誘導しない寒天培地上にこれらの酵母を5倍ずつの希釈系列でスポットし、30℃で培養した。野生型V_{pr}の発現ベクターを持つ株とコントロールの株では増殖速度に差は見られず、変異型V_{pr}の発現ベクターを持つ酵母でも増殖速度に変化は見られなかったことから、すべての株が同等に増殖することが確認された。次に、これらの酵母をV_{pr}の発現が誘導される寒天培地にスポットしたところ、第2節の結果と同様に、野生型V_{pr}を発現した酵母の増殖は顕著に阻害された。図中では、野生型V_{pr}によって誘導される増殖阻害を(++)と表記し、V_{pr}の発現ベクターを持たないコントロールにおける増殖阻害を(-)と表記した。Q3RやE25K、W54R、R73A、R80A、R90K変異のV_{pr}でも野生株と同程度の増殖阻害が確認され (Fig. 2-4-2; ++) これらのアミノ酸はV_{pr}による増殖阻害には関与していないことが示唆された。H71R、I74P、C76AおよびC末端欠損型(R73AおよびH78Tを含むC末18アミノ酸欠損のV_{pr})のV_{pr}では、コントロール程度の早い増殖は見られなかったものの、増殖抑制活性が弱められ酵母の増殖が回復した(±)。また残りの変異体、A30L、L67A、H71Rでは野生型ほどの増殖阻害活性は見られず、増殖抑制活性が多少弱められていることが確認された(+)。またFig. 2-4-1 Bの結果と合わせて、これらの増殖速度の違いはV_{pr}の発現レベルの差に依存してないことが示唆された。

以上の変異体V_{pr}の酵母における増殖抑制活性の結果をTable. 2-4-1にまとめた。その結果、V_{pr}のC末端変異(H71R、I74P、C76A、G75AおよびCΔ18)では増殖抑制効果が弱められたことから、V_{pr}による増殖抑制作用にはC末端が比較的重要であることが認められた。しかし動物細胞ではG2期阻害活性がなくなることが知られていたC末の変異体、R73A、R80AおよびR90Kはいずれも酵母においては強い増殖抑制活性を保持していた。一方で、酵母を用いた他のグループの解析から、今回の結果と同様にR80AおよびR90Kの変異体が増殖抑制

活性をもつことが報告されている {Chen, 1999 #226} {Yao, 2004 #246}。C76Aの変異体は*S. cerevisiae*における増殖抑制効果がなくなるという報告が既になされており、今回得られた結果とは矛盾した {Berglez, 1999 #247}。これらの食い違いの原因究明には、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

上記の結果はVprのC末端が酵母でも動物細胞でも重要であることを示唆するものである。しかしながら、いくつかのC末端に位置する変異体Vprが酵母でのみ増殖抑制効果を保持していた。動物細胞と酵母での結果に食い違いが出た理由として、増殖抑制に関わる未知のタンパク質とVprタンパク質との結合において、動物細胞においてのみVprのC末端が関与している可能性が考えられる。UNGは動物細胞においてVprによる増殖抑制活性とは関係なく結合することが知られている。そして今回の酵母の増殖抑制における結果でもUNGに結合できなくなることが報告されている変異体Vprは酵母における増殖抑制活性に特に相関しなかった。このため、増殖阻害活性に関係する未知のVpr結合タンパク質の候補としてUNG以外のタンパク質が関与しているものと考えられる。

(3) 変異体Vprの細胞内局在の解析

続いて、*S. cerevisiae*における変異体Vprが示す細胞内局在について解析を行なった。HIV-1によるマクロファージなどの非分裂細胞への感染においては、Vprが重要な働きを担っていることが示唆されており、Vprは単独で発現させた場合でも、核膜上もしくは核に局在する。動物細胞におけるVprによる増殖阻害活性と核局在とは相関性がないことがすでに報告されていたが、今回初めて、*S. cerevisiae*における増殖抑制活性と局在との関係を調べた。

酵母におけるVprの局在を調べるために、EGFP (enhanced green fluorescent protein)を野生型および変異型VprのN末に融合させた発現ベクターを作成し、酵母に形質転換後、その局在を調べた。またコントロールとしてEGFPのみを発現させた酵母を用いた。初めに抗GFP抗体を用いたウエスタンブロッティング法により、各変異型EGFP融合Vprの発現を確認した(Fig. 2-4-3, A)。その結果、発現量に差異は認められたものの、全ての変異型Vprで予想される分子量での発現が確認された。そこで、EGFP融合型の野生型Vprが酵母の増殖に与える影響を調べたところ、FLAG融合型のVprと同様に酵母の増殖阻害を引き起こすことが分かった。また Fig.2-4-2 で増殖阻害活性が弱くなることが認められた変異型

Vpr のいくつか(H71R、C76A、CΔ18)は、EGFP 融合型でも、野生型 Vpr に比べてその増殖阻害活性が弱いことが確かめられた(Fig. 2-4-3 B)。以上のことから、EGFP タンパク質を融合させても、Vpr の増殖阻害活性に影響はないことが示されたので、これら EGFP 融合型 Vpr を用いて、以降の細胞内局在の解析を行った。

酵母を発現誘導培地にて1時間培養後、細胞を固定し、DAPIでDNAを染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。EGFPのみを発現させた酵母では、細胞核および細胞質を含めた細胞全体にそのシグナルが検出された(Fig. 2-4-4, EGFP-vec)。野生型のVprを発現誘導した酵母では、そのシグナルは点の集合体としておおよそ核膜の周囲に集まっているように観察され、細胞質にはそのシグナルはほとんど観察されなかった。この野生型のようなEGFPの発現シグナルをここではNucタイプの局在と定義した。また抗Vpr抗体を用いて*S. cerevisiae*におけるVprの局在の解析を行った結果が他のグループによって報告されているが(Vodicka et al., 1998)、今回観察したEGFP融合型のVprの局在とほぼ一致することから、ここでみているEGFPシグナルはVprそのものであるとみなした。

本研究に用いた変異体Vprの中では、E25AおよびH71RおよびC未欠損変異の3つが野生型Vprの局在を変えることが報告されている。これら3つの変異体Vprを酵母に発現させたところ、すべて野生型Vprとはことなる局在を示し、核への局在が多いものの細胞質にも局在した。そして野生型Vprで見られたような点の集合体が核周囲に特に強く見られることはなかった。この発現のタイプをここではNuc+Cytoタイプと定義した。さらにC76AやR73AもこのNuc+Cytoタイプの局在を示した。以上の結果から、酵母におけるNuc-タイプの局在にはVprのC末およびN末の両方が重要であることが示唆された。

酵母でNuc+Cytoタイプの局在が見られたR73AやC76Aは、動物細胞では野生型と同様に核に局在することが知られている変異体であった。動物細胞における結果と酵母に対する作用に違いが生じた理由は明らかではないが、それぞれの細胞で核局在に関わるタンパク質が異なっている可能性がある。また酵母でも動物細胞でも核局在に関わるタンパク質が共通に存在しているとすれば、そのタンパク質とR73AやC76Aが酵母でのみ結合できなくなると考えられる。Importin- α は核内への物質輸送に関わるタンパク質であるが、動物細胞でも酵母でもVprと結合することが知られていることから、例えばimportin- α とR73AやC76Aが酵母においてのみ結合ができていない可能性が考えられる。

(4) 第4節まとめ

様々な変異体Vprが酵母の増殖に及ぼす影響、および各変異体の局在を解析した結果を (Table. 2-4-1)に示した。その結果、Vprによる*S. cerevisiae*における増殖阻害と核局在が独立に引き起こされることを今回初めて明らかにした。またH71RおよびC未欠損の変異Vprは酵母と動物細胞に共通に、増殖および局在の双方に関わっている重要なアミノ酸残基であることがわかった。その他にも、動物細胞と酵母の双方において増殖阻害に重要であるアミノ酸残基や(A3Q、I74P、C76A)、核局在に重要であるアミノ酸残基(E25K)を見出した。

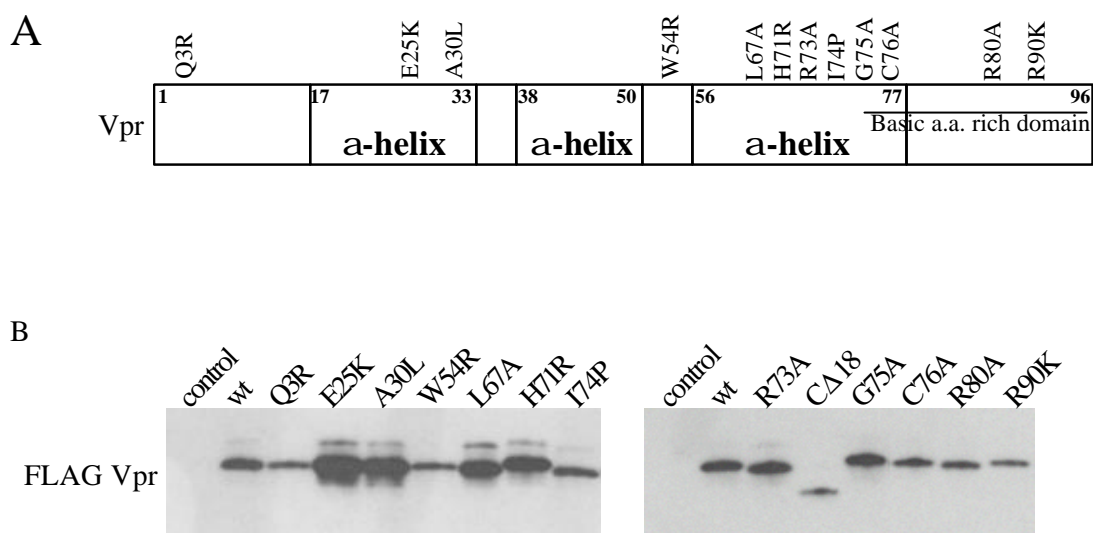


Fig. 2-4-1 Mutational analysis of the growth inhibitory activity of Vpr

A: Structure of Vpr. The mutated amino acids used in this study are indicated.

B: Yeast cells were transformed with control or wild-type/mutant Vpr plasmids. The expression of mutant forms of Vpr protein was examined by Western blotting, as shown in Fig. 2-2-1.

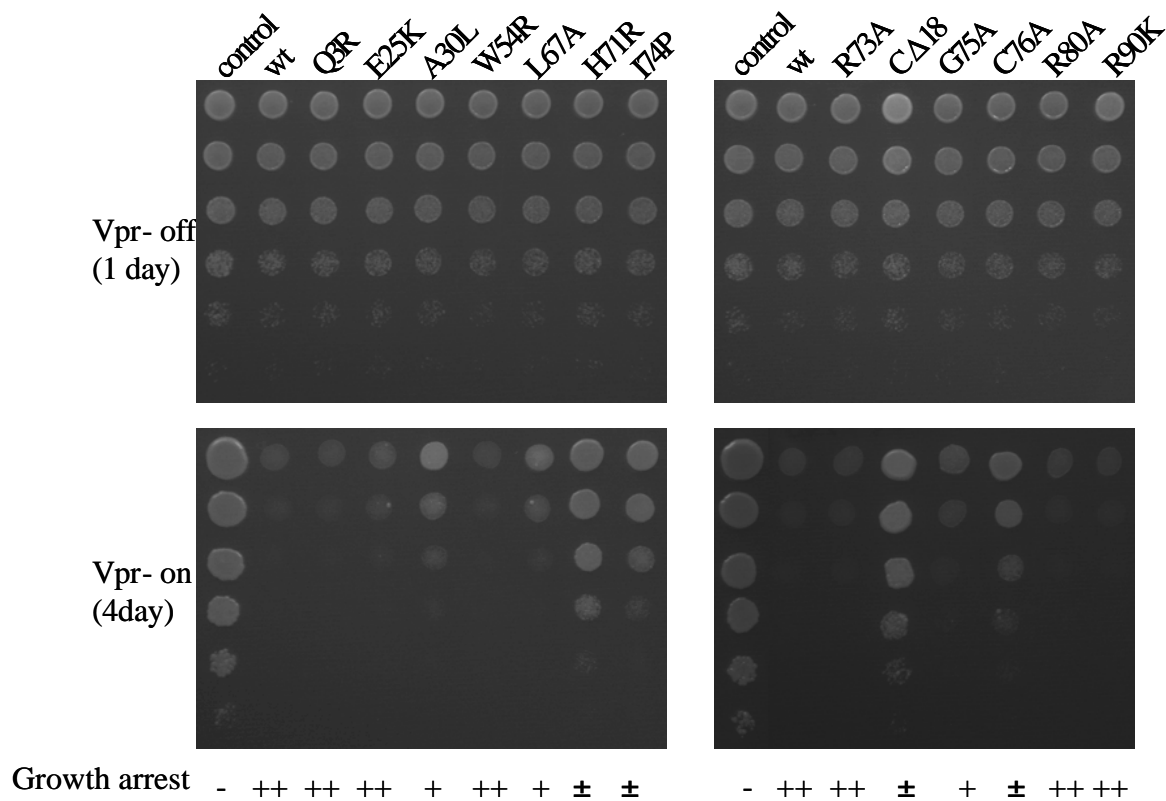


Fig. 2-4-2 The effects of mutant-Vpr on the yeast growth

The indicated yeast transformants were cultured in non-inducible medium overnight and were then harvested. Fivefold serial dilutions of yeast were spotted on either non-inducible (upper panels, Vpr-off) or inducible (lower panels, Vpr-on) agar plates and were cultured at 30°C for 1 day or 4 days, respectively. The strength of the growth inhibitory activities of each Vpr-mutant were estimated, and the results are shown in the Figure.

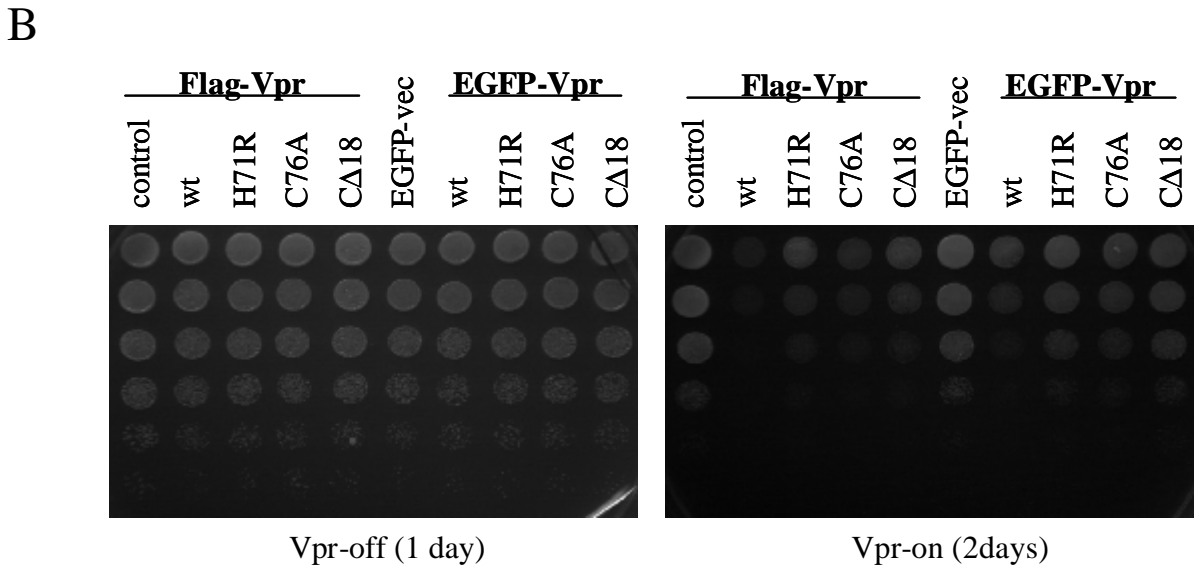
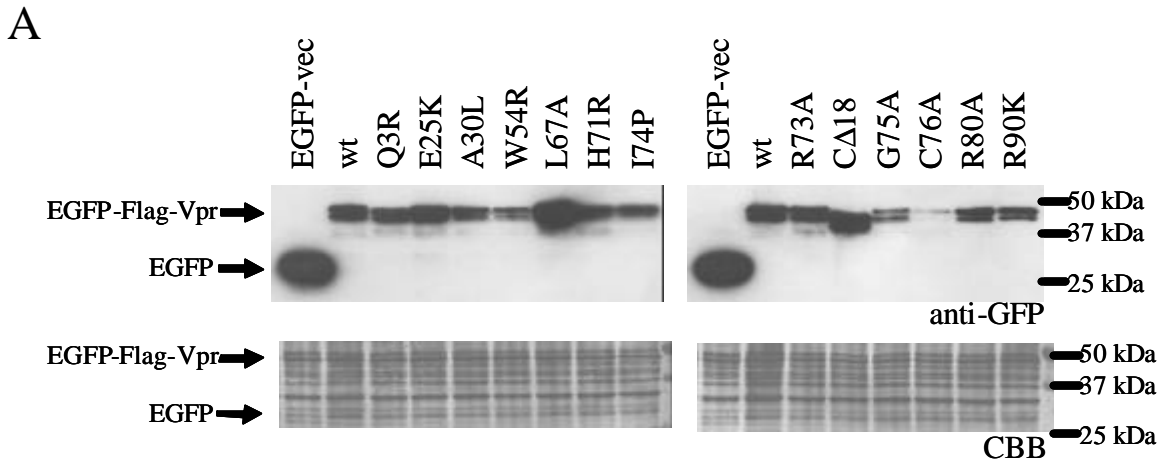


Fig. 2-4-5 Mutational analysis of the cellular localization of Vpr

A: The expression of EGFP-tagged wt/mutant Vpr was examined by the western blotting with anti-EGFP antibody. CBB stained filter is also shown as a loading control (bottom).

B: The effect of EGFP-tagged wt/mutant Vpr on the yeast cell growth compared to FLAG-tagged wt/mutant Vpr was determined as described in Fig. 2-4-2.

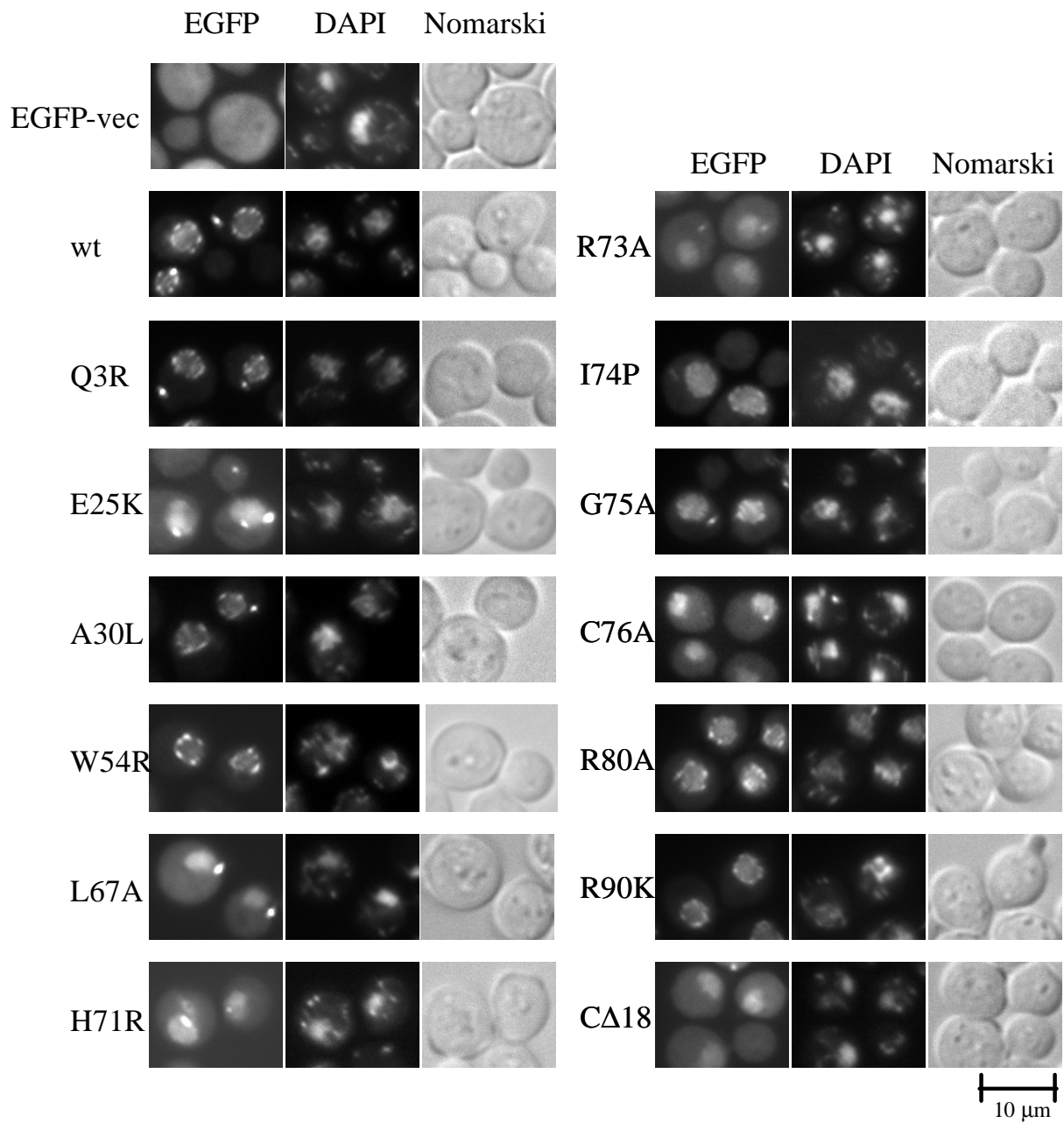


Fig. 2-4-4 Mutational analysis of the cellular localization of Vpr

Yeast cells transformed with EGFP or EGFP-Vpr expression plasmids (indicated in the Figure) were grown in non-inducible medium. After one hour of incubation in the inducible medium, cells were fixed and stained with DAPI for nuclear visualization. Signals of EGFP and DAPI were observed under fluorescence microscopy. Cells were viewed with Nomarski optics.

Table. 2-4-1 Summary of effects of mutant Vpr in *S. cerevisiae* and mammalian cells.

	<i>S.cerevisiae</i>		mammalian cells				references***
	growth arrest	localization	G2/M arrest	localization	apoptosis	UNG binding	
wt	++	Nuc	+	Nuc	+	+	
Q 3 R	++	Nuc	+		-		(1)
E 25 K	++	Nuc+Cyto	+	Nuc+Cyto	+	-	(2-5)
A 30 L	+	Nuc	-	Nuc	+		(2, 6-8)
W 54 R	++	Nuc	+		+	-	(2, 4)
L 67 A	+	Nuc+Cyto	+		-		(9)
H 71 R	±	Nuc+Cyto	-	Nuc+Cyto		-	(4, 10)
R 73 A	++	Nuc+Cyto	-	Nuc			(6)
I 74 P	±	Nuc	-		-		(11)
G 75 A	+	Nuc	±	Nuc			(6, 7, 12)
C 76 A	±	Nuc+Cyto	-	Nuc	-		(2, 12)
R 80 A	++	Nuc	-	Nuc	-		(2, 6, 8)
R 90 K	++	Nuc	-			+	(4, 5)
CA18*	+	Nuc+Cyto	-	Nuc+Cyto			(7)**

+, wild-type level, ±; modest level, -; almost no effect

A shadow box indicated the relieved effect of wild type function.

* Eighteen amino acids at the C-terminus were deleted with R73A and H78Tsubstitutions.

**Nineteen amino acids at the C-terminus were deleted.

***references are shown as follows;

(1)Somasundaran, 2002, (2)Gaynor, 2001, (3)Yao, 1995, (4)Selig, 1997 (5)Mansky;2001

(6)Di Marzio, 1995, (7)Mahalingam,1997 (8)Stewart, 1997, (9)Nishizawa, 2000

(10)Vodicka, 1998, (11)Nishizawa, 1999, (12)Mahalingam, 1995,

第5節 第2章考察

細胞周期調節機構の研究にこれまでも出芽酵母は用いられており、Vprは酵母の増殖も阻害したことから、今回酵母を用いてHIV-1 Vprによる増殖阻害機構解析を行った。

初めに、Vprによる増殖阻害がDNA傷害/複製チェックポイントを活性化させている可能性を考え、出芽酵母のチェックポイント変異株の増殖にVprが与える影響を調べた。今回解析を行ったタンパク質はMec1/Tel1 および Chk1/Rad53(動物細胞の ATM/ATR および Chk1/Chk2 ホモログ)であるが、現時点ではこれらのタンパク質を介さないDNAチェックポイントは知られていない。これらのタンパク質にVprが影響を与えていないという今回の結果は、酵母による増殖阻害はDNA傷害/複製チェックポイントを介さずに誘導していることを初めて示唆するものである。分裂酵母を用いた実験においてもVprによる増殖阻害はDNA傷害/複製チェックポイントを介していないことが報告されている {Elder, 2000 #250} {Elder, 2001 #249}。しかしながら、動物細胞ではS期中にVprが発現していることがその後のG2期停止に必要であることや {Watanabe, 2000 #248}、Vprによる増殖阻害がATRの活性化を伴うという最近の報告 {Roshal, 2003 #179} {Zimmerman, 2004 #180} を考え合わせると、動物細胞と酵母ではチェックポイントタンパク質またはチェックポイント活性化因子に対するVprの作用が異なっている可能性も考えられ、さらなる解析が必要であると考えている。またVprによる細胞増殖阻害に関わる細胞内因子を見出すことができれば、細胞周期研究を進めていく上でも非常に有用であると考えている。

続いて酵母におけるVprの働きと動物細胞における働きを比較し、また酵母における細胞増殖阻害活性と局在との関係を調べるために、点変異体Vprを用いた解析を行なった。その結果、動物細胞における様々な働きの中で酵母での増殖阻害活とで相関性のある働きは見出されなかったが、Vprの核局在とVprによる増殖阻害には*S. cerevisiae*でも動物細胞と同様に相関性がないことを初めて見出した。またいくつかのアミノ酸残基は、酵母と動物細胞で共通に増殖阻害または核局在に関わる重要なアミノ酸残基であることが示された。

Vprがウイルスの感染や増殖に重要な働きを担っているだけでなく、臨床におけるAIDSの発症(CD4陽性T細胞の減少)にも関わっていると考えられていることから、今後Vprの作用機作をより詳細に解明し、Vprの機能を抑えるような薬剤やタンパク質を見出すことができれば、臨床におけるHIV-1ウイルスの増殖およびAIDSの発症制御の研究を進めていく上で、非常に有用な知見を与えることができると考えている。

第6節 実験方法

(1) V_{pr}発現プラスミド

pME18Neo- FV_{pr}(Nishino et al., 1997)より*XhoI-NotI*サイトでFLAGタグがN末に融合したHIV-1_{NL4-3} V_{pr}フラグメントを切り出し、平滑端になるよう処理した。このフラグメントを、銅を添加することで酵母でのタンパク質の発現が誘導されてくるベクター-pYEX-BX (AmRad)の、平滑端処理を行なった*BamHI*サイトに導入した。このとき、逆向きに導入されたベクターを本実験におけるコントロールとして用いた。

第3節(4)のみ、V_{pr}の発現ベクターとしてガラクトースを添加することで酵母でのタンパク質の発現が誘導されるプラスミドpYES2(invitrogen)の*Hind III/XbaI*サイト(*HindIII*を平滑化)に、上述のpME18Neo- FV_{pr}より*XhoI-XbaI*サイト(*XhoI*を平滑化)で切り出したFLAGタグが融合したV_{pr}を組み込んだ。またこのときのコントロールとしてはフラグメントをもたないpYES2を用いた。

各点突然変異体V_{pr}の発現プラスミドは、Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて行なった。このときPCRで用いたプライマーをTable 2-6-1に示した。

(Table 2-6-1 変異体V_{pr}の作成に用いたPCR用プライマーの配列)

変異	位置	シーケンス
Q3R	5'	CGACAAGATATCTGAACGAGCCCCAGAAGACC
Q3R	3'	GGTCTTCTGGGGCTCGTTCAGATATCTTGTCG
A30L	5'	GAGCTTTTAGAGGAACCTTAAGAGTGAACCTTGTTAGACATTTTCCTAGG
A30L	3'	CCTAGGAAAATGTCTAACAAAGTTCACTCTTAAGTTCCTCTAAAAGCTC
E25K	5'	GGACACTAGAGCTTTTAGAGAACTTAAGAGTGAAGCTG
E25K	3'	CAGCTTCACTCTTAAGTTTCTCTAAAAGCTCTAGTGTCC
W54R	5'	CTTACGGGGATACTAGGGCAGGAGTGGAAG
W54R	3'	CTTCCACTCCTGCCCTAGTATCCCCGTAAG
L67A	5'	GCCATAATAAGAATTCTGCAACAAGCGCTGTTTATCCATTTTCAGAATTG
L67A	3'	CAATTCTGAAATGGATAAACAGCGCTTGTTGCAGAATTCTTATTATGGC
H71R	5'	CAACAACCTGCTGTTTATCCGTTTCAGAATTGGGTGTC
H71R	3'	GACACCCAATTCTGAAACGGATAAACAGCAGTTGTTG
R73A	5'	CTGCTGTTTATCCATTTTCGCAATTGGGTGTCGACATAGC
R73A	3'	GCTATGTCGACACCCAATTGCGAAATGGATAAACAGCAG
I74P	5'	GCTGTTTATCCATTTTCAGACCTGGGTGTCGACATAGCAG
I74P	3'	CTGCTATGTCGACACCCAGGTCTGAAATGGATAAACAGC
G75A	5'	GTTTATCCATTTTCAGAATTGCGTGTCGACATAGCAGAATAG
G75A	3'	CTATTCTGCTATGTCGACACGCAATTCTGAAATGGATAAAC
C76A	5'	GTTTATCCATTTTCAGAATTGGGGCTCGACATAGCAGAATAGG
C76A	3'	CCTATTCTGCTATGTCGAGCCCCAATTCTGAAATGGATAAAC
R80A	5'	GGGTGTCGACATAGCGCAATAGGCGTTACTCGAC
R80A	3'	GTCGAGTAACGCCTATTGCGCTATGTCGACACCC
R90K	5'	CTCGACAGAGGAGAGCAAAAAATGGAGCCAGTAG
R90K	3'	CTACTGGCTCCATTTTTTGCTCTCCTCTGTCGAG

またR73Aを作成する過程で、77番目のアミノ酸残基の後ろにチミジンが挿入され、78番目のTがHに、79番目が終止コドンに変異したクローンが見出された。そこで、本研究では、R73A、H78TおよびC末が欠損したこの変異体V_{pr}はC Δ 18と表記して実験に用いた。

EGFP融合V_{pr}発現ベクターは、pEGFP-C1 (Clontech)よりEGFPのORFを含む *NcoI/EcoRI* サイトで切り出し両端の平滑化を行い、Flagタグのついた野生型および変異型V_{pr}のそれぞれのN末にある*XhoI*サイトを平滑処理したサイトに挿入した。

(2) 菌株、培養条件

2章および4章で用いた*S.cerevisiae*の株は全てW303-1Aを親株として薬剤排出ポンプを破壊された酵母、ML30(Miyamoto et al., 2002)を用いた。3章で用いたチェックポイント変異株およびその親株(野生株)をTable 2-6-2に示した。

Table 2-6-2 実験に用いたチェックポイント変異株

strain	genotype		Gifted from	reference
Y300	wt	<i>Mat a ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 his3-11,15 can1-100</i>	Stephen J. Elledge	Yolanda Sanchez, 1996
Y301	<i>rad53</i>	Y300, <i>rad53-21</i>	Stephen J. Elledge	Yolanda Sanchez, 1996
Y306	<i>mec1</i>	Y300, <i>mec1-21</i>	Stephen J. Elledge	Yolanda Sanchez, 1996
Y658	<i>tell</i>	<i>tell::HIS3</i>	Stephen J. Elledge	Yolanda Sanchez, 1996
Y664	<i>tell/mec1</i>	<i>tell::mec1-21</i>	Stephen J. Elledge	Yolanda Sanchez, 1996
Y801	<i>Chk1</i>	Y300, <i>chk1::HIS3</i>	Stephen J. Elledge	Yolanda Sanchez, 1999
Y858	<i>Chk1/rad53</i>	Y300, <i>rad53-21 chk1::HIS3</i>	Stephen J. Elledge	Yolanda Sanchez, 1999
W303-1A	wt	<i>Mat a ade2-1 leu2-3,112 rad5-535 trp1-1 ura3-1 his3-11,15 can1-100</i>	Stephen P. Jackson	D. D's Amours, 2001
DDY004	<i>xrs2</i>	W303-1A, <i>xrs::LEU2</i>	Stephen P. Jackson	D. D's Amours, 2001
DDY006	<i>mre11</i>	W303-1A, <i>mre11::HIS3</i>	Stephen P. Jackson	D. D's Amours, 2001
DDY008	<i>rad50</i>	W303-1A, <i>rad50::TRP11</i>	Stephen P. Jackson	D. D's Amours, 2001
DDY022	<i>x/m/r</i>	W303-1A, <i>xrs::LEU2 mre11::HIS3 rad50::TRP11</i>	Stephen P. Jackson	D. D's Amours, 2001

酵母へのトランスフォーメーションは全て酢酸リチウム法によって行い、選択培地上にコロニーとして生えてきた酵母を用いていた。実験に用いた選択培地と発現誘導培地の組成を以下に示した(Table 2-6-3)。

(Table 2-6-3 選択培地および発現誘導培地の組成)

最終濃度 %(w/v)	試薬	選択培地	発現誘導培地
0.7	yeast nitrogen base		
2	glucose		
0.002	Adenine		
0.002	L-arginine		
0.002	L-histidine		
0.003	L-leucine		-
0.003	L-lysine		
0.002	L-methionine		
0.005	L-phenylalanine		
0.002	L-threonine		
0.003	L-tyrosine		
0.003	L-tryptophan		
0.0015	L-varine		
0.002	Uracil	-	-
1.5	agar	()	()
0.5 mM	CuSO4	-	

(3) ウェスタンブロッティング法

培養した菌体を遠心によって回収し、液体窒素を用いて冷凍させ、-80 で保存した。これにCelLytic-Y (SIGMA)に10 mM DTT(1,4-dithio-DL-threitol)および プロテアーゼ阻害剤 (complete protease inhibitor cocktail (Roche))を加え、室温で15分おくことで細胞を溶解させ、遠心して得られた上清画分を15%のアクリルアミドゲルを用いたSDS ページ電気泳動によって分離させた。PVDFメンブレン(MILLIPORE)に転写させた後、抗Flag抗体(M2、SIGMA) および抗GFP抗体(MBL)を用いてV_{pr}タンパク質の検出を行なった。

Rad53タンパク質の検出は細胞を回収後、NaOH溶液(2M NaOH、7.6 % 2-mercaptoethanol)で溶解し、60% trichloroacidでタンパク質を沈殿させ、アセトンで洗浄し乾燥させてサンプルを調製し、10%のアクリルアミドゲルおよび抗Rad53抗体(SANTA CRUZ)を用いて検出した。

(4) 細胞内局在の観察

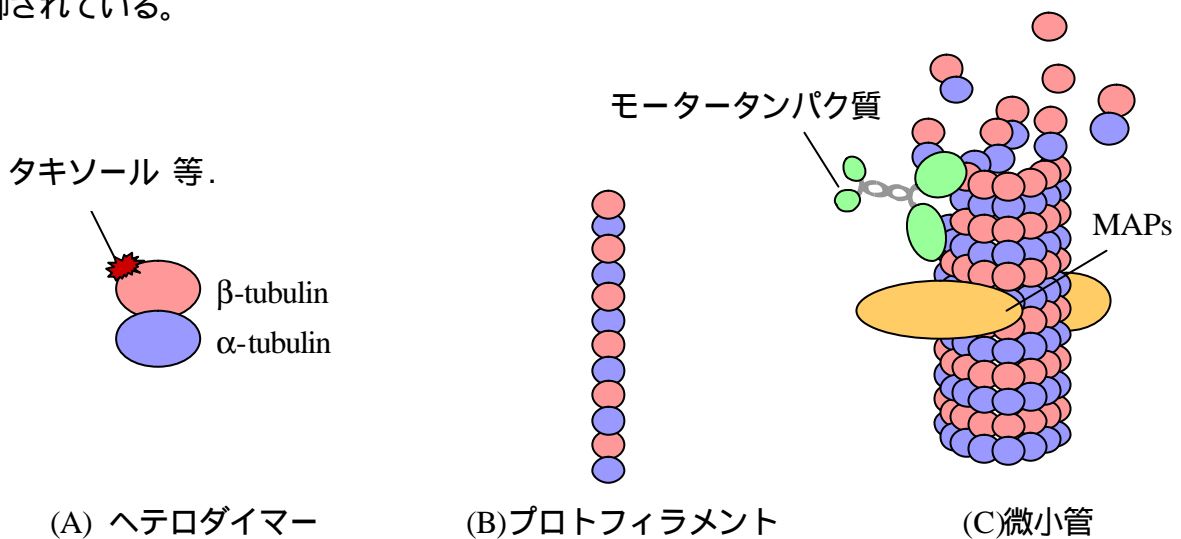
対数増殖期にある酵母を発現誘導培地に移し、1時間発現誘導を行なった。そこへ最終濃度が3.7%となるようにホルマリン溶液を加えて細胞を10分間固定させ、PBSで洗浄後、70%エタノールに移して4℃で1時間置いた。エタノールをPBSで洗浄後、4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 0.4 µg/ml in PBS)を用いて核を染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察を行なった。

第3章 Terpendole Eによる細胞周期分裂期阻害機構の解析

第1節 序論

(1) 微小管およびチューブリンタンパク質

微小管は直径 25 nm の管状の構造であり、分子量がおよそ 50 kDa の α 、 β チューブリンのヘテロダイマー(2量体)がその基本構成単位となっている。このヘテロダイマーが一本の直線状に並んでプロトフィラメントを形成し、これらのプロトフィラメント同士が円筒を作る形に 12~16 本並んで筒状の微小管を構成することで、微小管ネットワークが形成されている(Fig. 3-1-1)。微小管は常に重合と脱重合を繰り返して動的平衡状態を保っており、伸長速度が早いプラス端と伸長速度が遅いマイナス端に区別される。微小管の重合および脱重合は種々の微小管関連タンパク質(microtubule associated proteins: MAPs)や、微小管上を沿って移動するキネシンやダイニンなどのモータータンパク質(motor proteins)によって制御されている。



(Fig. 3-1-1) 微小管模式図

細胞周期のM期においては、間期に形成していた微小管ネットワークが消失し、代わりに染色体を等分配するための紡錘体(mitotic spindle)が形成される。そして分裂期が終わると、紡錘体は消失し再び微小管ネットワークが再形成される。これらの劇的な細胞形態の変化は、微小管の重合、脱重合に基づいて行われる。微小管の伸長(重合)や、短縮(脱重合)を阻害するような薬剤を細胞に処理すると、染色体の分配に必要な微小管のダイナミクス

が止められてしまうため、細胞分裂時に紡錘体を正しく形成できなくなる。その結果、紡錘体チェックポイントが解除されずに細胞周期は分裂期で停止する。このような微小管阻害剤としては、タキソール、ビンカルカロイド、コルヒシン、ベノミルなどがあげられる(Correia, 1991)。これらはすべて微小管の構成タンパクであるチューブリンに特異的に結合することが知られており、微小管の機能を解明する道具としても用いられてきた(Rieder and Palazzo, 1992; Waters et al., 1998)。さらに、タキソールやビンカルカロイドは臨床においても細胞増殖を盛んに行う癌細胞を標的とした抗がん剤として用いられている有用なM期阻害剤である。しかしながら、これらの薬剤はチューブリンに直接結合し、間期の微小管機能をも阻害する。その結果としてチューブリンをレールとして機能しているキネシンやダイニンなどのモータータンパク質の働きも阻害してしまう。それゆえに抗がん剤として用いられた場合には、神経系において時として重篤な副作用を起こすと考えられている(Schmidt et al., 1986)。従って、微小管に直接作用しないM期阻害剤の開発は重要であると考えられる。近年では、M期における微小管や分裂装置の制御を特異的に行なうタンパク質をターゲットとした薬剤として、分裂期特異的に働くキネシンモータータンパク質のひとつEg5を阻害する合成化合物monastrolが注目を集めている(Mayer et al., 1999)。

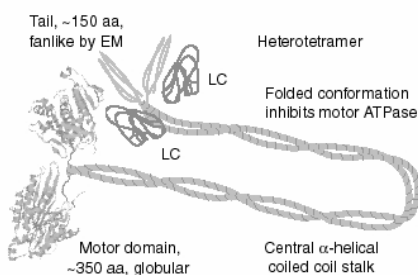
(2) モータータンパク質の働き

細胞分裂期における中心体の対極への移動や紡錘体の形成には、微小管のダイニンやキネシンなどのモータータンパクが重要な役割を果たしている。モータータンパク質はATP加水分解を行うことで得たエネルギーを使い、フィラメントに沿った運動を行なうタンパク質である。キネシンは微小管との結合部位であるモータードメインの相同性により10種類のキネシン様タンパク(kinesin related proteins: KRPs)ファミリーに分けられ、合計100種類以上からなる。これらのKRPsは微小管上の極性に沿って細胞内ベシクル、オルガネラ、染色体、動原体、中間径フィラメント、微小管、他のモータータンパクなどの細胞内物質を輸送するだけでなく(Hirokawa, 1998; Walczak and Mitchison, 1996)、細胞周期に応じた働きをもっており微小管の動的不安定性にも関与している。さらに分裂期における紡錘体の形成、染色体の整列および分配、軸索輸送、エンドサイトーシス、分泌、膜輸送などの働きも担っている。ここでは特に、代表的なキネシンであるKHCおよび、分裂期特異的に働くキネシンのひとつEg5について詳しく紹介する。

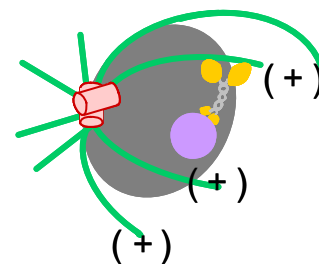
(3) KHCの構造および機能

最初に見出されたキネシンは、イカの神経軸索より発見されたKHC(conventional kinesinともいう)で(Vale et al., 1985)、分子量約12万の2つの重鎖および分子量約7万の軽鎖2本からなるタンパク質である。重鎖のN末端側約350アミノ酸が球状のモータードメインが微小管と結合し、続く500アミノ酸は α ヘリックスがコイル構造をとっている。そしてC末の約150アミノ酸が軽鎖を形成し細胞内の輸送物質と結合する(Fig. 3-1-2、3-1-3)(Bloom et al., 1988; Brady, 1985; Schnapp et al., 1985; Vale et al., 1985)。KHCは主に細胞周期間期に働いて、細胞内の小胞や細胞内小器官など輸送を行なっている。

In vitro におけるKHCの運動速度は、(約 $0.6 \mu\text{m} / \text{s}$)と速いのが特徴である(Cohn et al., 1989; Vale et al., 1996)。このとき α 、 β チューブリンのヘテロダイマーの大きさに相当する8 nmを1ステップとして、1ステップごとに1分子のATPを加水分解しながら進んでいき(Hua et al., 1997; Schnitzer and Block, 1997)、100ステップ進んだところで微小管から離れると考えられていることが知られている(Block et al., 1990)。また、このように1つまたは2つのモータードメインを含む分子が微小管から完全に離れることなくステップを踏みながらモータータンパクが進む動き方を processivity という。これに対して、一蹴りごとに微小管からモーター分子が完全に離れるような進み方を non processivity といっている。近年では processivity に関してより詳細な研究が行われている。速さの異なるキネシン分子のモータードメイン左右に持つキメラタンパク質を用いた実験の解析などにより、この processivity では左右のモーター分子を交互に用いていることが明らかになった(Kaseda et al., 2003)。またホモ2量体からなるモータードメインのいくつかは、左右のモーター分子が均等にステップを踏むのではなく、不均一にピッコを引いたようにして進むことが報告されている(Asbury et al., 2003)。



(Fig. 3-1-2 KHC 模式図)



(Fig. 3-1-3 KHC の細胞内の働き)

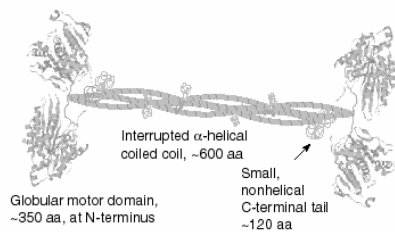
(4) Eg5の構造および機能

Eg5は最初 *Xenopus laevis* egg extractより見出されたタンパク質であり(Heald, 2000; Le Guellec et al., 1991)、キネシン様タンパク(KRPsのなかのbimC familyに属している(Goodson et al., 1994)。BimC familyは現在までに調べられている生物種で少なくとも1つはhomologueが見つかり、*Aspergillus nidulans*ではBimC(Enos and Morris, 1990)、*Schizosaccharomyces pombe*ではcut 7(Hagan and Yanagida, 1990)、*Saccharomyces cerevisiae*ではcin8pおよびkip1(Hoyt et al., 1992)、*Drosophila*ではKLP61F(Heck et al., 1993)、*Xenopus*(Le Guellec et al., 1991; Sawin et al., 1992)とhumanではEg5(Blangy et al., 1995)と呼ばれている。

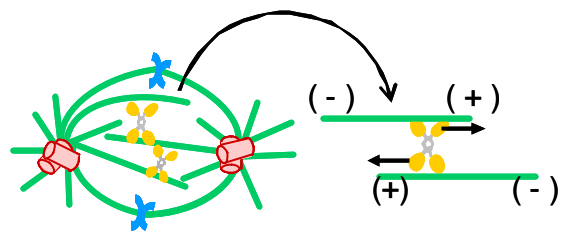
Eg5は球状のN末モータードメイン(head)、続いてcoiled-coilを形成していると考えられる α -helix stalk、nonhelicalなC末(tail)の3つのドメインから構成されており(Le Guellec et al., 1991)、ホモ4量体として存在する(Fig. 3-1-4)。C末にはbimCファミリーの多くに保存されている“bimC box”と呼ばれる約40の残基からなるアミノ酸配列があり、様々なリン酸化酵素のターゲットとなっている(Heck et al., 1993)。特にHeLa細胞においてはEg5の全長1057アミノ酸のうち、bimC boxにある927番目のスレオニンがCdc2によりリン酸化されることが*in vitro*の実験から明らかにされている(Blangy et al., 1995)。Eg5は細胞周期の間期では細胞質に局在しM期の前期では中心体に局在し、M期中期においては紡錘体上に局在する。Cdc2によるEg5のリン酸化は細胞周期依存的に行われており、特にM期で上昇しEg5の中心体への局在にこのリン酸化が必要であると考えられている。

Eg5のmotorドメインはKHCと60%程度と高いhomologyおよび40%程度のidentityを持ち(Kapoor and Mitchison, 1999)、KHCと同様に微小管のプラス端方向に向かうモータータンパク質であるが(Heald, 2000)、細胞内における役割や特徴が大きく異なっている。様々な方法でEg5の機能を阻害すると、細胞分裂期に必要な紡錘体形成が阻害され、染色体が微小管を取り囲むように放射状に広がった特徴的な「monoastral spindle」を呈して、細胞周期がM期で停止することが知られている。(Xenopus egg extract におけるEg5の immunodepletion(Sawin et al., 1992)、動物細胞におけるEg5抗体のマイクロインジェクション(Blangy et al., 1995; Gaglio et al., 1996; Sawin and Mitchison, 1995)やsiRNA処理(Goshima and Vale, 2003; Weil et al., 2002)など) これらのことから、Eg5は中心体分離および紡錘体形成に関わる重要なタンパク質であると考えられている。

細胞分裂期に先立ち中心体が複製されると、中心体から紡錘体を形成するための微小管が伸びていき、両極から伸びてきた微小管のプラス端とプラス端が互い違いに重なり合う。Eg5は両極から伸びてきた微小管に、4つのモータードメインのうちの2つずつを結合していると考えられている。Eg5の各モータードメインは微小管のプラス端方向に進むため、結果として両極の中心体が両脇に押し出されることになる(Fig. 3-1-5)。従って、Eg5は中心体の分離および紡錘体形成に重要な役割を果たしていると考えられている。一方、主に細胞周期の間期で働いているKHCは上述のように2つのモータードメインのみが微小管と結合し(微小管結合ドメイン)、反対側は輸送物質に結合しており(Fig. 3-1-3)、Eg5とは異なる働きをしている。



(Fig. 3-1-4 Eg5模式図)



(Fig. 3-1-5 Eg5の細胞内の働き)

In vitro の解析から、Eg5の運動速度は $0.063(\pm 0.01) \mu\text{m/s}$ とKHCの速度に比べて10-20倍程度遅いことが示されている(Lockhart and Cross, 1996)。この時、KHCがprocessive運動を行うのに対して、Eg5はATPの加水分解を一度行うと微小管から解離し、微小管を一步ずつ蹴り上げる様に進むnonprocessive運動を行うことが知られている。また、近年Eg5モータードメインの Mg-ATP 結合状態の結晶構造が解かれ、先に解かれていたKHCのモータードメインの立体構造と比較した結果、極一部の立体構造のみが違うことが明らかになった(Turner et al., 2001)。このように、Eg5とKHCはモータードメインに高いホモロジーを示すのにも関わらず、細胞内の機能や運動速度が大きく異なる原因は完全には解明されていない。

(5) 天然化合物terpendole E

Terpendole EはACAT (acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase) 阻害剤として一連のterpendole類(A~L)と共に、*Albophoma yamanashiensis*と名づけられた糸状菌の培養液より単離、構造決定された化合物であった(Tomoda et al., 1995)。今回、理化学研究所抗生物質研

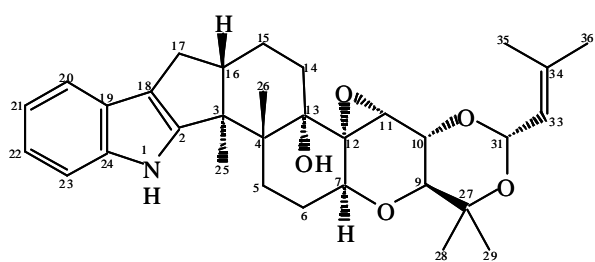
研究室において、温度感受性Cdc2変異株であるtsFT210細胞を用いた細胞分裂期阻害剤のスクリーニングから(Osada et al., 1997)、terpendole Eが分裂期阻害活性を有することを新たに見出した。そしてterpendole Eは一般的なM期阻害剤とは異なり、微小管には直接作用していないことが明らかになった。そこで、terpendole Eは既存の分裂期阻害剤とは作用機構の異なる新たなタイプの薬剤になりうると思え、本研究において詳細な作用機構解析を進めた。

第2節 G2/M期阻害剤としてのterpendole E

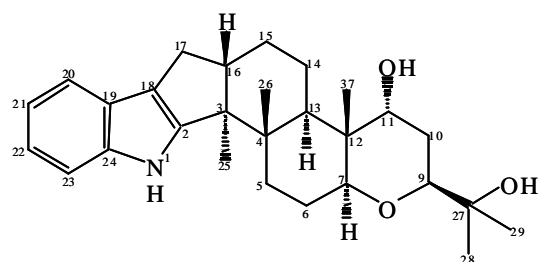
およそ 4000 株の微生物 2 次代謝産物より、温度感受性変異株である tsFT210 を用いて細胞分裂阻害剤のスクリーニングを行なった。tsFT210 細胞は非許容温度である 39 °C で培養すると細胞周期は G2/M 期に停止する (Fig. 3-2-2、B)。これを許容温度である 32 °C に移すと細胞周期は M 期へ進行し、4 時間後に G1 期入る (Fig. 3-2-2、C)。しかしながら、このとき微小管作用薬であるコルヒシンを加えると細胞周期は M 期に停止する (Fig. 3-2-2、D)。このスクリーニング系において、土壌分離系状菌 RK99-F33 の培養抽出液に G2/M 期停止活性が見出されたので精製を行った。その結果、すでに acyl-CoA: cholesterol *O*-acyltransferase (ACAT) 阻害剤としての報告のあった terpendole E であることが分かった。また同じ培養液中より terpendole H、terpendole I および terpendole C が見出された (Fig. 3-2-1)。

39 °C で培養した tsFT210 細胞を 32 °C へ移すと同時に精製した terpendole E を 50 μM 加えると細胞周期は G2/M 期に停止した (Fig. 3-2-2 E)。また 32 °C で非同調培養していた tsFT210 に terpendole E を 50 μM 加えた場合でも細胞周期は G2/M 期に停止した (Fig. 3-2-3 F)。

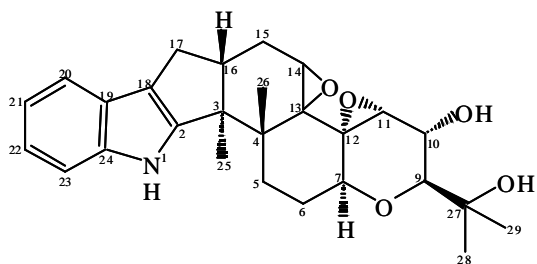
以上、terpendole E は ACAT 阻害剤として、一連の terpendole 類 (A~L) とともに既に報告されている物質であったが (Tomoda et al., 1995)、今回初めて細胞周期阻害活性を持つ化合物として再発見した。



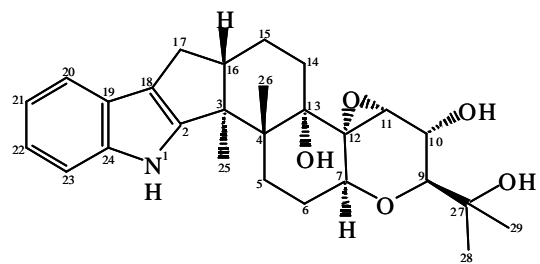
Terpendole C



Terpendole E



Terpendole H



Terpendole I

Fig. 3-2-1 The structure of terpendoles

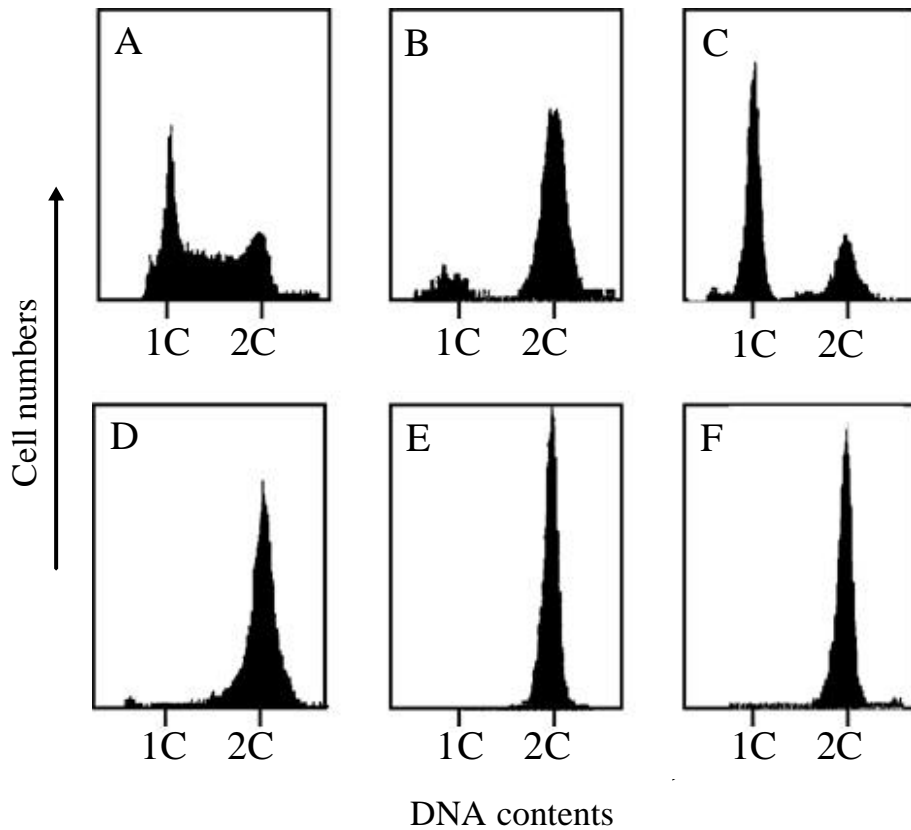


Fig. 3-2-2 Terpendole E inhibits the G2/M phase progression of tsFT210 cells
 DNA distribution of tsFT210 cells was analyzed by flow cytometry after propidium iodide staining. The cells were cultured at 32 °C (A) and synchronized at the G2/M boundary by incubation at 39 °C for 17 hours (B). When the cells were transferred at 32 °C to release them from G2 arrest, the cells pass through M phase and entered G1 phase after 4 hour (C). The cells were released from the temperature arrest in the presence of 10 μ M colchicine (D) or 50 μ M terpendole E (E). At 32 °C, the cell cycle progression was also monitored in the presence of 50 μ M terpendole E (F).

第3節 *in vitro* におけるチューブリン重合に対する影響

細胞を分裂期に停止させる化合物の多くは細胞骨格のひとつである微小管の構成タンパク質、チューブリン直接作用し、チューブリンの重合阻害または異常な重合安定化を引き起こすことが知られている。そこで初めにterpendole Eがチューブリン重合に及ぼす影響を検討した。

氷上の微小管溶液に1 mM GTPを加え、37 °Cに加温するとチューブリンが重合を開始し、溶液の濁度が上昇する。1 % DMSO (コントロール)を加え37 °Cに加温した直後のOD₃₅₀と、重合開始から40分後のOD₃₅₀変化量(Δ OD₃₅₀)を100 %の重合度(assembly)とし、各薬剤存在下での相対的な重合度(%)を求めた(Fig. 3-3-1)。チューブリンの重合安定化剤であるタキソール(20 μ M)を加えると重合反応の開始直後からチューブリンの重合が顕著に促進され、一方、チューブリンの重合阻害剤であるビンブラスチン (11 μ M)を加えると反応40分後においても重合がほとんど進まないことが確認された(Fig. 3-3-1)。一方、100 μ M のterpendole E存在下においてはコントロールと同程度の重合が見られた。以上の結果から、terpendole Eはタキソールやビンブラスチンとは異なりチューブリンの重合状態に直接影響を与えていないことが分かった。

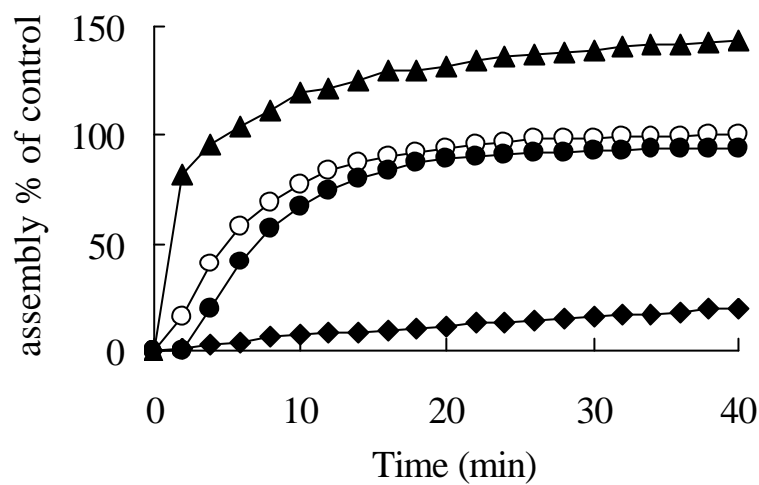


Fig. 3-3-1 *In vitro* microtubule polymerization assay

Microtubule assembly *in vitro* was monitored under the presence or absence of chemicals. Microtubules proteins (2 mg/ml) were incubated with 100 μ M terpendole E (open circle), 11 μ M vinblastine (closed diamond), 20 μ M taxol (closed triangle), or without chemical (open circle).

第4節 3Y1の細胞周期に与える影響

Terpendole EはtsFT210細胞を用いたスクリーニング系で単離されたものである。しかしtsFT210のような温度感受性変異株のみならず、他の培養細胞に対する作用が同じであること、即ち共通の作用機構を有することが生命現象の探索針「バイオプローブ」としてばかりでなく、癌を始めとする疾病の応用のためには不可欠である。そこで、ラット正常繊維芽細胞(3Y1)に対するterpendole Eの作用機構を解析することにした。

初めに3Y1細胞の細胞周期に与える影響を調べた。tsFT210のときと同様に、コルヒシンを10 μ M添加するとG₂/M期(2Cで停止した(Fig. 3-4-1)。次に、tsFT210で十分なG₂/M期阻害活性が確認された50 μ Mのterpendole Eを非同調系で培養した3Y1細胞に処理し24時間培養した。その結果、tsFT210で見られたほど顕著なG₂/M停止はみられなかったものの、G₂/Mへの蓄積が確認された(Fig. 3-4-1)。また濃度をあげて(75 μ M)terpendole Eを処理したところ、50 μ M処理時の結果とG₂/Mの割合はそれほど変わらず、また25 μ MではG₂/M期阻害はほとんど見られないことが分かった。以上の結果より、terpendole Eは3Y1細胞に対してもG₂/M期阻害を誘導することが確認されたため、以後3Y1細胞を用いて作用機構の解析を進めることとした。また、terpendole Eの類縁体であるterpendole C、terpendole Hおよびterpendole Iを処理した細胞は、50 μ Mおよび75 μ M処理時ではS期が減少しG₁期がやや蓄積する傾向が見られたものの、G₂/M期阻害活性は見出されなかった(Fig. 3-4-1)。

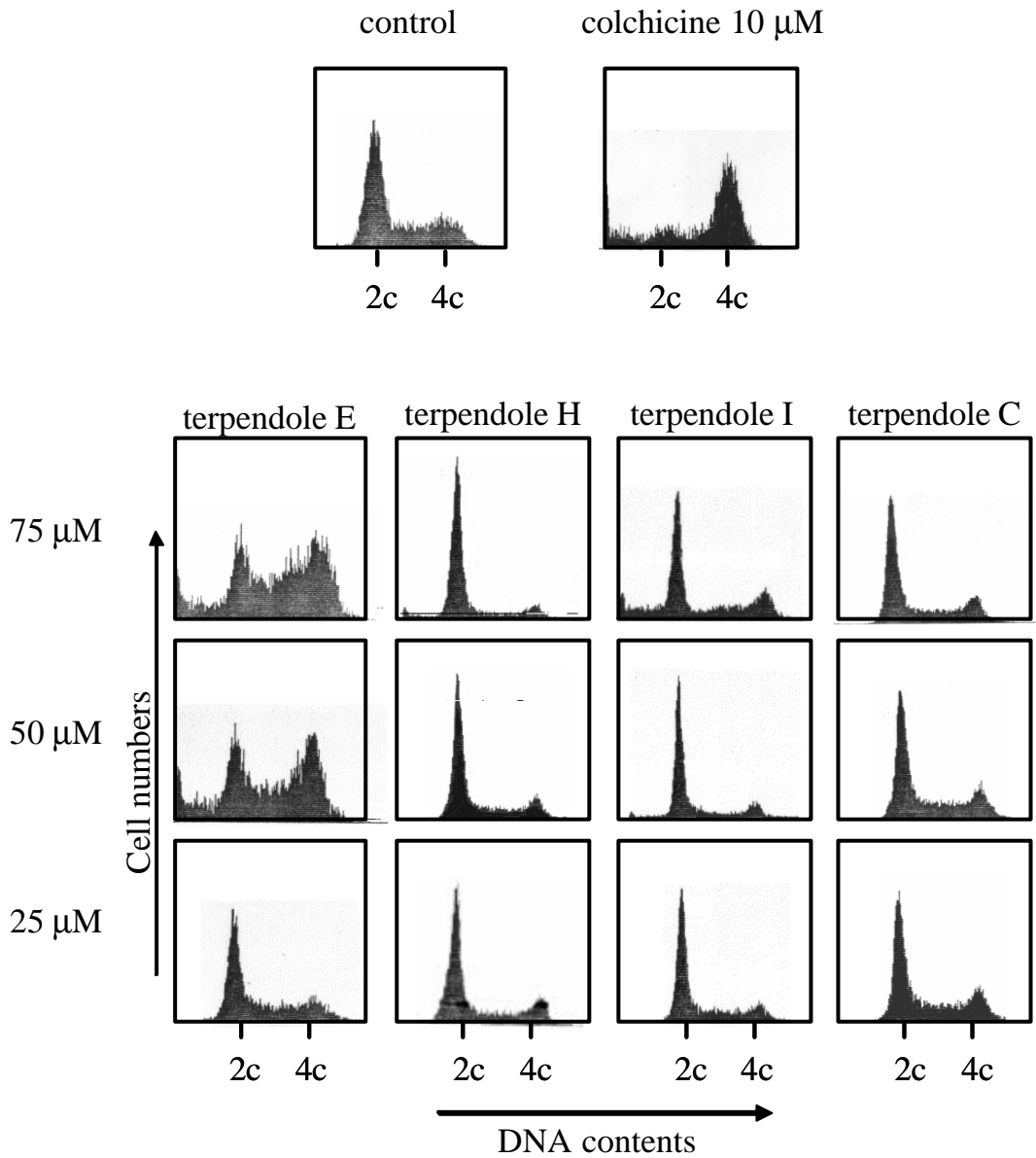


Fig. 3-4-1 Effects of terpendoles on the cell cycle in 3Y1 cell

DNA distribution of 3Y1 cells was analyzed by flow cytometry after propidium iodide staining. The cells were cultured in the presence of 1% DMSO(control) , 10 μM colchicine, or indicated concentrations of terpendole E, H, I, and C for 24 hours.

第5節 細胞骨格および中心体に与える影響

次にterpendole Eが細胞形態に与える影響を調べるために、3Y1にterpendole Eを処理後に細胞を固定し、チューブリンおよびDNAの細胞免疫染色を行った(Fig.3-5-1、I)。微小管作用薬であるピロネチンを細胞に処理すると、微小管ネットワークが崩壊する(Fig. 3-5-1、IC)。しかしながら、Terpendole Eを処理した細胞は薬剤未処理の間期の細胞と同様に、チューブリンの繊維構造およびネットワークが保たれている様子が観察された(Fig. 3-5-1、IA、IB)。この結果は、第3節でみられた*in vitro*におけるチューブリン重合に影響を与えないという結果と一致した。

分裂期には薬剤未処理の細胞では染色体の等分配に必要な紡錘体(mitotic spindle)が形成され、その中央の赤道面上に凝集した染色体が並列する(Fig. 3-5-1、IIA)。しかしながら、terpendole Eを処理した細胞では紡錘体極が消失し、細胞の中央から細胞表面に向けて放射状にチューブリンフィラメントが広がり(monoastral spindle)、その周囲に染色体が球状を描く様に存在するという特徴的な形態が観察された(Fig3-5-1、IIB)。以上のことより、terpendole EはDNAの複製およびチューブリンフィラメントの形成には影響を与えずに、紡錘体極の形成を阻害することが示唆された。またterpendole HおよびIを処理した細胞では紡錘体が正しく形成される正常な細胞分裂が認められた(Fig. 3-5-1、III)。

次に、紡錘体極を形成する中心体の主成分、 γ -チューブリンを染色することで中心体の位置を調べた。中心体複製はDNA複製より先に行われ、複製された2つの中心体が紡錘体形成の中心となり、M期の開始と共に2つの中心体は核膜上にそって対極なるように移動する。そして分裂期中期では2つの中心体が向かい合い、中心体から紡錘体極微小管が伸びることでM期に必要な紡錘体が形成される。薬剤を処理していない細胞では、metaphaseにおける中心体を対極の位置に2つ確認することができた(Fig. 3-5-1、IIC)。しかし、terpendole Eを処理した細胞では中心体を示すドット状の点が、細胞の中央に重なり合うようにして確認された(Fig. 3-5-1、IID)。このとき2つの中心体の距離を測定したところ、薬剤未処理の細胞のM期における中心体距離($4.95 \pm 1.04 \mu\text{m}$, $n=84$)のわずか12.5%程度($0.62 \pm 0.37 \mu\text{m}$, $n=113$)まで狭まることが明らかになった。

次に、Terpendole Eを3Y1細胞に処理することでM期に見られる特徴的な形態が、他の細胞でも共通にみられる現象かを確かめるための実験を行った。ヒト子宮頸ガン細胞であるHeLa細胞、およびヒト肺ガン細胞であるA549細胞にterpendole Eを24時間処理し、細胞免

疫染色により細胞形態観察を行った(Fig. 3-5-2)。その結果、3Y1細胞に薬剤を処理したときと同様に、分裂期における紡錘体の形成は見られず、2つの中心体を中央にした単極の紡錘体形成が認められた。また間期における微小管のネットワークは正常に保たれていた。以上の結果から、terpendole Eは細胞種によらずに中心体の分離および紡錘体形成を阻害する物質であることが示唆された。

さらに、癌細胞に対する増殖抑制効果を調べるために、terpendole Eを処理したHeLa細胞の増殖率をMTTアッセイ法によって調べた。その結果、24時間処理および48時間処理のいずれの場合においても十分な増殖抑制効果がみられ、それぞれの IC_{50} は38.1 μ Mおよび19.9 μ Mであった(Fig. 3-5-3)。

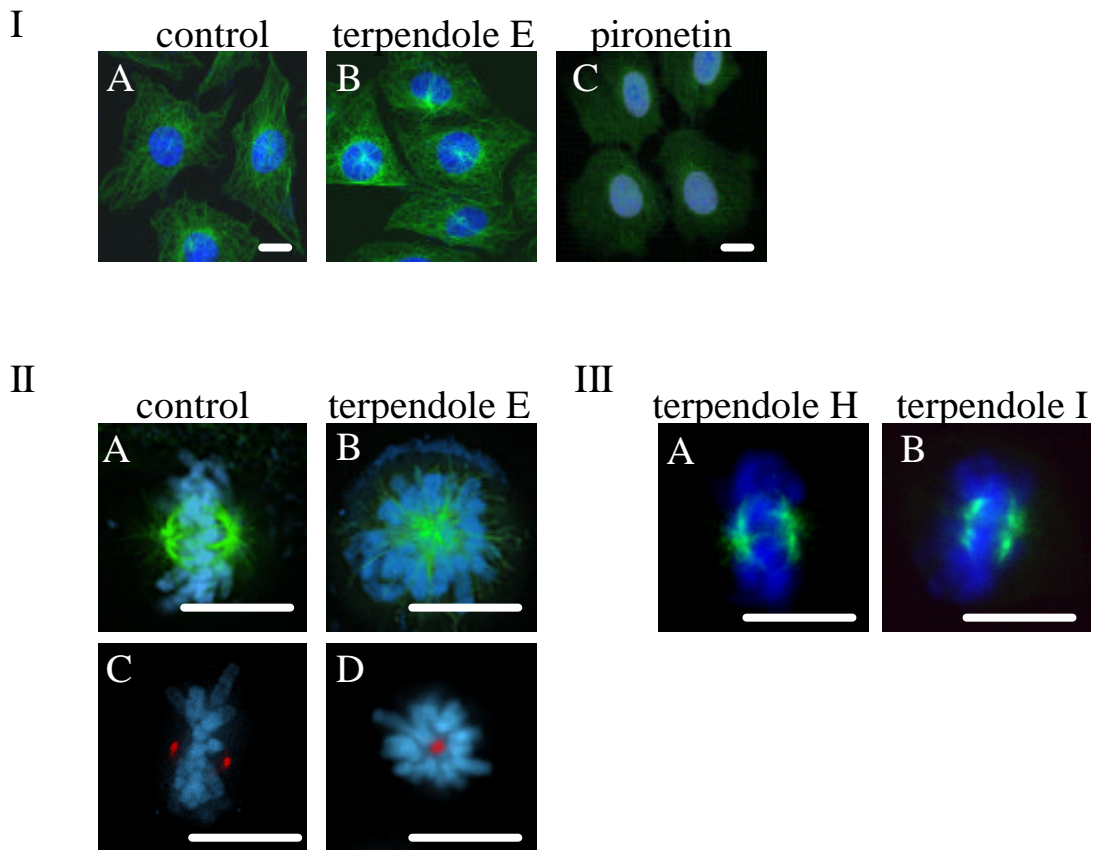


Fig. 3-5-1 Effects of terpendole E on Cell morphology

Immunofluorescence staining of β -tubulin (green) and DNA (blue) of 3Y1 cells treated with inhibitors. I; Cells in interphase were observed. 1 % MeOH (control, A) or 50 μ M terpendole E (B) were treated for 12 hours. 30 μ g/ml pironetin(C) was treated for 6 hours. II; Cells in mitosis without treatment (A and C) and terpendole E-treated cell (B and D). Normal bipolar spindle and DNA alignment at the metaphase plate of control cells (A and C) were replaced with a monoastral spindle surrounded by chromosomes in terpendole E-treated cells (B and D). Unseparated spindle poles in terpendole E-treated cells were observed by γ -tubulin staining(C and D). III; Cells treated with 50 μ M terpendole H or terpendole I showed normal bipolar spindles in mitosis. Scale bars indicate 10 μ m.

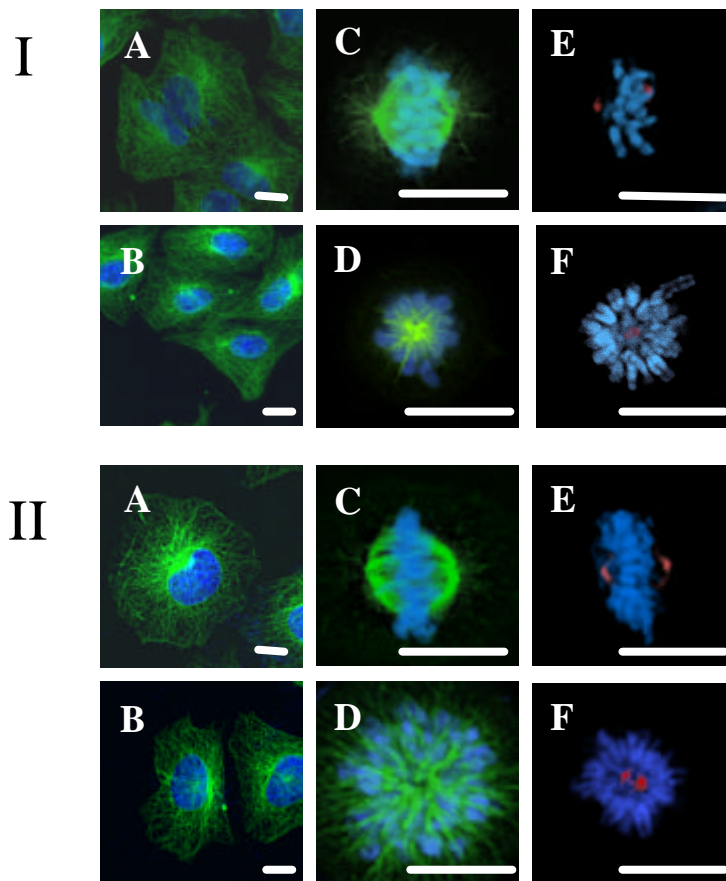


Fig. 3-5-2 Effects of terpendole E on Cell morphology

Three cell lines, A549(I), and HeLa(II), were used for the same experiments as shown in Fig. 3-5-1. Immunofluorescence staining of β -tubulin (green in [A]-[D]), γ -tubulin (red in [E] and [F]), and DNA (blue) of cells treated for 12 hours with 1 % MeOH (control) (A, C, and E) or 50 μ M terpendole E (B, D, and F). Cells in interphase were observed : without treatment (A) and terpendole E-treated cell (B). Cells in mitosis were observed (C-F). Unseparated spindle poles in terpendole E-treated cells were observed by γ -tubulin staining (F). Scales bars indicate 10 μ m.

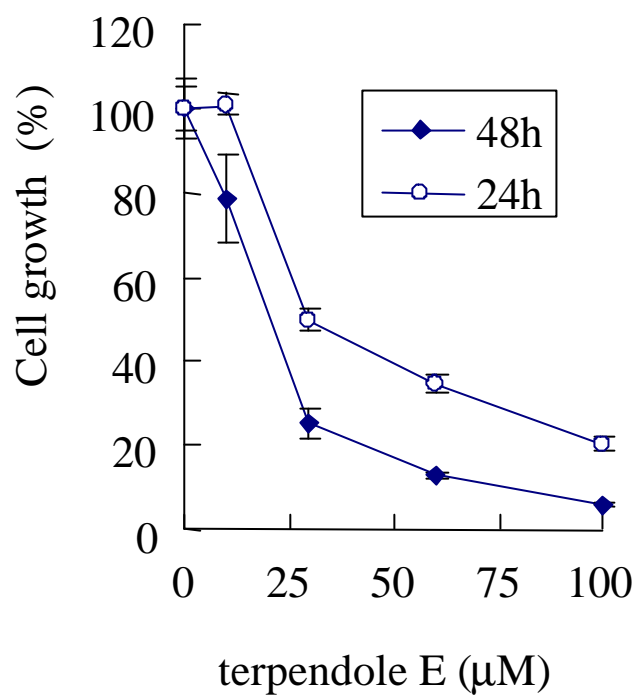


Fig. 3-5-3 terpendole E inhibits the growth of HeLa cells

8×10^3 cells/well for 24h assay or 4×10^3 cells/well for 48h assay were plated on the 96-well plates. After 12 hours cultivation, the indicated doses of terpendole E were added and further incubated for 24h or 48h. The MTT assay was performed to detect the proliferating cells.

第6節 キネシンモータータンパク質を用いたgliding assay

第5節までの結果から、terpendole Eはチューブリンネットワークには影響を与えずに、M期における中心体分離および紡錘体形成の阻害を誘導することが示された。そこで、中心体の分離および紡錘体形成に重要な働きを担うキネシンタンパク質、Eg5に着目し(Fig. 3-1-5)、terpendole Eの作用を検討することとした。実験ではEg5との比較検討をおこなうために、Eg5のモータードメインと高いホモロジーをもち、Eg5と同じく微小管の+端に向かって進むKHC (conventional kinesin)も用いて解析を行なった。

(1) 大腸菌におけるkinesinおよびEg5の発現・精製

Eg5は4量体を形成しているタンパク質であるが、全長を発現させて4量体を用いた解析を*in vitro*で行なうことは非常に困難であることが知られている。そこで、それぞれのキネシンタンパク質のモータードメインのN末にGSTを融合させたタンパク質を大腸菌に発現させ、モータードメインを用いた解析を行なった。Eg5のモータードメイン(1-439)のフラグメントにGSTを融合させたタンパク質Eg5(1-439)-GST(以降はE439GSTと表記)およびKHCのモータードメイン(1-430)のフラグメントにGSTを融合させたタンパク質KHC(1-430)-GST(以降はK430GSTと表記)を大腸菌で発現し精製した。

(2) Eg5の運動に対する影響

Gliding assayでは2量体を形成していると考えられるGST融合キネシンタンパク質のGSTがガラス面と結合することでモータータンパク質が固定される。ここへ微小管溶液を加えるとモータータンパク質と相互作用することで微小管がモータータンパク質上に固定される。ATPを加えることで微小管はATPを加水分解し、得られるエネルギーを用いて運動するが、このときの様子を暗視野顕微鏡で観察した(Fig. 3-6-1)。初めに、微小管がほどよく固定され、観察しやすい条件を探るために、実験に用いるE439GSTおよびE430GSTの濃度を検討した。その結果、どちらのタンパク質も低濃度(0.06 mg/ml以下)は微小管がほとんど固定されず、高濃度(0.15 mg/ml)以上では微小管が過剰に結合してしまい観察が困難になることから、0.1 mg/mlが適切であると判断し、以後この濃度で実験を行った。

E439GSTの運動速度を解析したところ、薬剤非存在下(terpendole E = 0 μ M)では 0.042 ± 0.0084 (μ m/s)であった(Fig. 3-6-3)。Terpendole Eを加えると、その濃度依存的にE439GSTの運動が阻害され、運動速度に対する IC_{50} は 14.5μ Mであった(Fig. 3-6-2)。

次に、terpendole EによるEg5の運動の阻害が可逆的であるか検討した。この時のterpendole Eの濃度は、Fig. 3-6-3の結果より十分な阻害活性が認められた 50μ Mで行った。その結果、terpendole Eを洗いながすことによってE439GSTの運動性が、薬剤処理前と同じ程度まで回復した。このことから、terpendole Eによる阻害は可逆的であることが示された(Fig. 3-6-3)。

terpendole Eが、Eg5以外のキネシンを阻害するかを調べるために、KHC(K430GST)に対する影響を調べた。薬剤非存在下でのK430GST運動速度は $0.63 (\pm 0.077) \mu$ m/sであった。次にterpendole Eによる影響を調べたところ、Eg5の運動阻害が十分に確認された 100μ Mの高濃度においても $0.65 (\pm 0.093) \mu$ m/sであり、K430GSTの運動阻害は見られなかった (Fig. 3-6-2)。

(3) 他のterpendole類縁体がE439GSTおよびK430GSTの運動に与える影響

Terpendole EのEg5に対する阻害作用が、terpendole Eと同様にACAT阻害活性を持つ他のterpendole類でもみられる現象であるか調べるために、terpendole C、terpendole Hおよびterpendole IがE439GSTの運動に及ぼす影響を調べた。この時、terpendole E 100μ Mにおいて、Eg5の運動に対する阻害を十分に示していること、および一連のterpendole系の薬剤が水に溶けにくく、 100μ M以上の濃度域においては凝集物が生じたため、全て薬剤濃度は 100μ Mで行った。その結果、terpendole C、terpendole Hおよびterpendole Iの 100μ MにおけるEg5の運動速度は、薬剤非存在下が $0.042 (\pm 0.0084) \mu$ m/sであるのに対して、それぞれ $0.044 (\pm 0.010) \mu$ m/s、 $0.0392 (\pm 0.050) \mu$ m/sおよび $0.0386 (\pm 0.0039) \mu$ m/sであった。このことから、terpendole C、terpendole Hおよびterpendole IはいずれもEg5の運動を阻害せず、Eg5の運動阻害はterpendole Eによってのみ引き起こされることが分かった(Fig.3-6-4)。またterpendole C、terpendole Hおよびterpendole Iは細胞周期分裂期阻害活性を持たない化合物であったことから、terpendole Eによる細胞周期分裂期阻害はEg5の運動を阻害するためであることが示唆された。

次にE439GSTの運動に対する阻害が見られなかったterpendole C、terpendole Hおよびterpendole IがK430GSTの運動に影響を与えるか調べた。薬剤未処理のK430GSTが示す運動

速度が $0.63 (\pm 0.077) \mu\text{m/s}$ であるのに対して、terpendole C、terpendole Hおよびterpendole Iを $100 \mu\text{M}$ 処理しても、 $0.62 (\pm 0.16)$ $0.56 (\pm 0.10) \mu\text{m/s}$ 、 $0.602 (\pm 0.050) \mu\text{m/s}$ であった(Fig. 3-6-5)。このことから、いずれのterpendoleもKHCに対する運動阻害を示さず、terpendole Eが特異的にEg5の運動を阻害することが明らかになった。

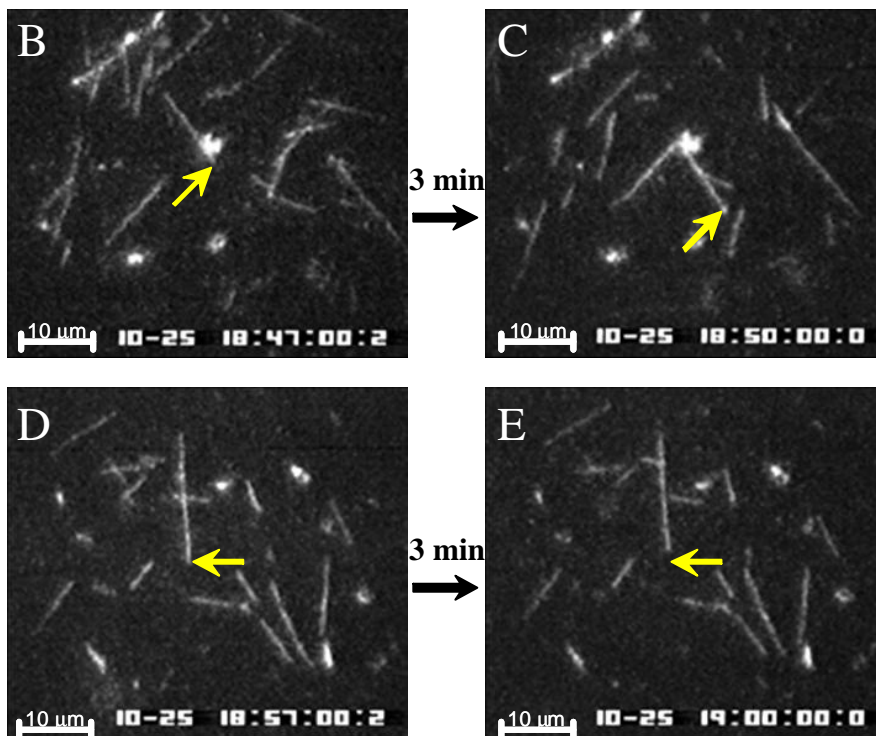
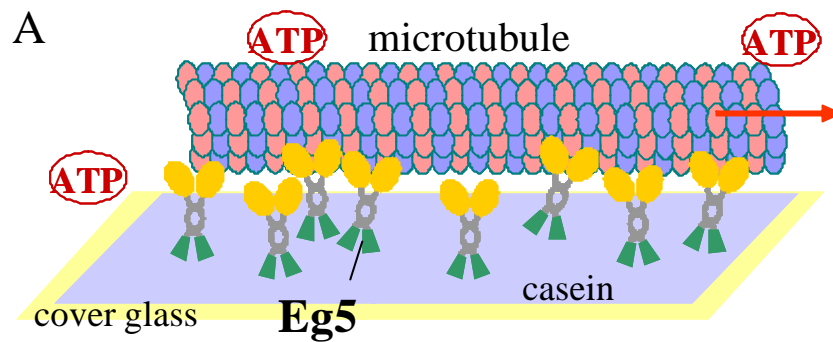


Fig. 3-6-1 The model illustration of *in vitro* motility assay with dark field microscopy

E439GST or K430GST molecules were attached on the glass surface. Polymerized microtubules placed on the glass moved with the minus end leading (A). The movement of microtubules was recorded onto VTR, and the speed was measured. The movement of the microtubules driven by E439GST was about 7.6 μm during 3 min (B and C). In the presence of terpendole E (50 μM), the movement was drastically reduced, and the movement was about 1.4 μm during 3 min (D and E).

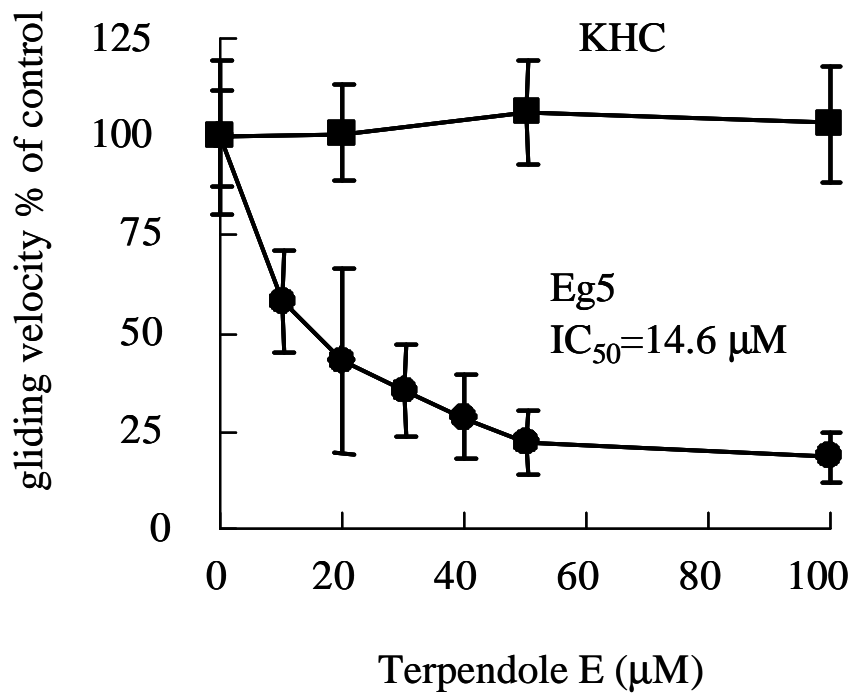


Fig. 3-6-2 Terpendole E inhibits microtubule motility driven by Eg5 *in vitro*

Terpendole E inhibits the microtubule gliding driven by Eg5, E439GST with a dose-dependent manner (closed circle), but not by KHC, K430GST(closed square).

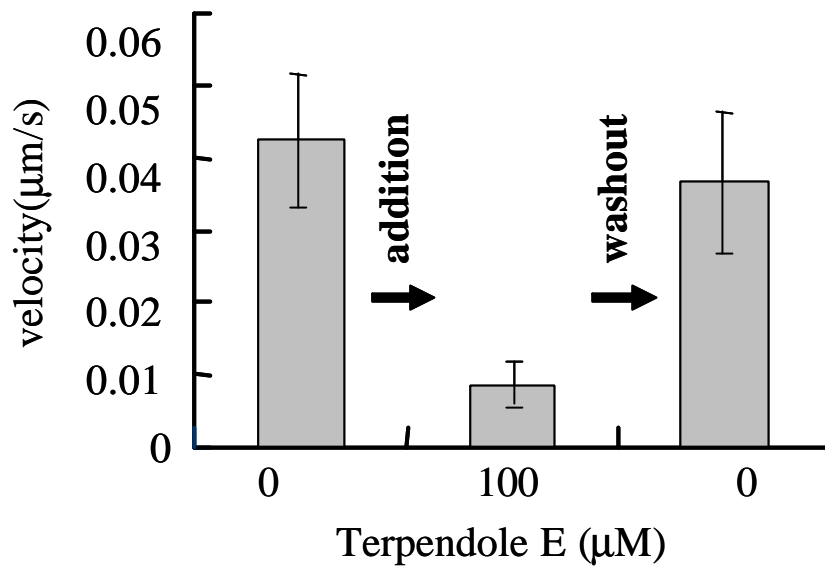


Fig. 3-6-3 Terpendole E reversibly inhibits the microtubule motility driven by Eg5(E439GST)

For the wash experiment, we measured Eg5-driven microtubule gliding in the absence of terpendole E (left column) and then added 100 μM terpendole E into the chamber (middle column). After incubation for 15 min, the drug was depleted from the assay chamber and gliding velocity was immediately measured again (right column).

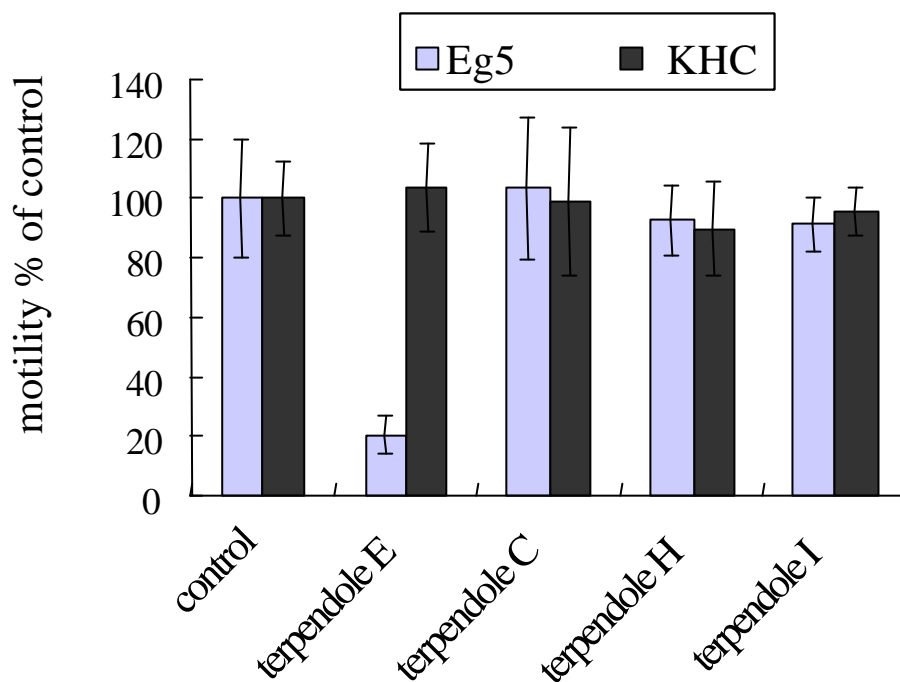


Fig. 3-6-4 Terpendole E specifically inhibits microtubule motility driven by Eg5 *in vitro*

100 μ M drug were tested in microtubule motility driven by Eg5(E439GST) or KHC(K430GST) *in vitro*. The graphs indicated the motility activity of each kinesin (Eg5 or KHC) with 1% MeOH or 100 μ M each drugs.

第7節 ゴルジ体輸送に与える影響

Terpendole Eが細胞内の物質輸送に関わる他のモータータンパク質も阻害している可能性を考え、細胞内の物質輸送に与える影響を調べた。Brefeldin Aはゴルジ体の構造を可逆的に阻害する薬剤であり、brefeldin Aを細胞に処理するとゴルジ層とトランスゴルジネットワークが崩壊して、逆輸送(retrograde)によって物質が移動し、小胞体、リソソームおよびエンドソームにゴルジ体が溶け込むことが知られている(Klausner et al., 1992)。またbrefeldin Aを処理した細胞からbrefeldin Aを取り除くと、順輸送経路(anterograde)によって、ゴルジ層構造が再形成される。このゴルジ体の順輸送には主に微小管モータータンパク質であるキネシンが、逆輸送には主に細胞質ダイニンが関わっていることから、これらの輸送がterpendole Eによって阻害されるかを検討した。このときBrefeldin Aによって誘導される順輸送および逆輸送は、ゴルジ体の構成成分であるmannosidase IIの染色により調べた。

まず初めにコントロールとしてメタノールを細胞に前処理した後、brefeldin Aを処理したところ8分後にはゴルジ層構造はほぼ完全になくなることが分かった(Fig. 3-7-1 A)。次にterpendole Eを細胞に前処理し、brefeldin Aを添加したところコントロールでみられた結果とほぼ同等にゴルジ層構造の消失がみられた(Fig. 3-7-2 B)。さらに、brefeldin Aを細胞から洗い流した後、コントロールとしてのメタノールを処理した場合にはゴルジ体の層構造が再形成されたことが確認され、terpendole Eを処理した場合でも同様にゴルジ体層構造の再形成が確認された(Fig. 3-7-1 CおよびD)。以上の結果より、terpendole Eは細胞内の物質輸送に関わっているEg5以外のモータータンパク質の働きは阻害されないことが示唆された。

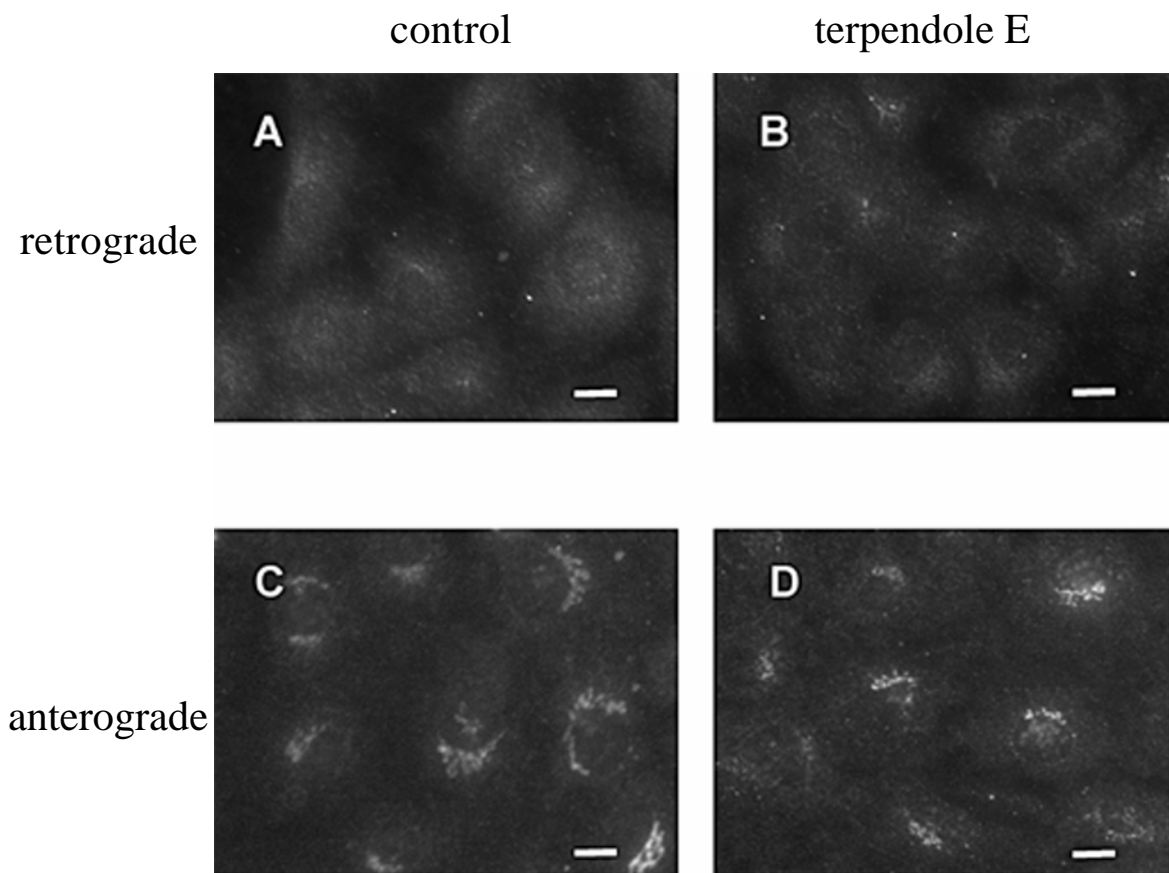


Fig. 3-7-1 Terpendole E affected neither retrograde nor anterograde trafficking of mannosidase II, a Golgi-Resident Protein

Retrograde (A and B) and anterograde (C and D) trafficking of mannosidase II were followed with NRK cells treated with the vehicle, 0.5 % MeOH (A and C) or 100 μ M terpendole E (B and D). Results at 8 and 60 min after the induction of retrograde and anterograde trafficking are shown respectively. Scales bars indicate 10 μ m.

第8節 キネシンモータータンパク質のATPase活性に与える影響

第6節のgliding assayにおいて、terpendole EがEg5の運動を阻害していることが明らかになったので、次にモーターの駆動力となっているATPase活性に与える影響を調べた。前述のように、モータータンパク質はATPを加水分解するエネルギーを使って微小管上を移動する。一方、gliding assayでは微小管を動かす速度に注目していたが、実際には一本の微小管に同時にいくつものモータータンパクが働く多分子集合体が見られる現象を捕らえていたと考えられる。そこで、微小管上のモーター1分子ずつの動きがより反映された現象をみるために次にATPase活性に対する薬剤の影響を解析した。

ATPase活性測定のためのリン酸標準曲線の作製

リン酸濃度を0~200 μM とした反応溶液にマラカイトグリーン試薬を加えて反応させ、波長650 nmの吸光度を測定し標準曲線を作製した。その結果、xを650 nmにおける吸光度、yを反応溶液中のリン酸濃度 [μM] とした場合の標準曲線は

$$y = 373.79x - 69.6 \quad (R^2=0.9992) \quad (\text{式})$$

となった。そこで、以後の実験においてはこの式を用いて、単位時間あたりの吸光度量変化を Δa [$/s$] とし、Eg5の濃度を b [μM] としたときに、1分子のモーターが1秒間に分解する分子数ATPase [s^{-1}] を c として、

$$c = 373.8 \times \Delta a \div b \quad (\text{式})$$

として、ATPase (s^{-1})を求めた。

(2) 微小管存在下におけるEg5のATPase活性に与える影響

Eg5やKHCを含めたキネシンタンパク質は、それ単独ではATPase活性をそれほど示さないが、微小管と結合することによってATPase活性が触媒され、急速にATPの取り込み、加水分解およびADPの放出が誘導されることで、運動活性を示すことが知られている。そこで、まず微小管存在下におけるEg5およびKHCのATPase活性に与える影響を調べた。

薬剤を処理しない状態ではEg5のATPase活性は、 $2.07 s^{-1}$ であった。そこでterpendole Eを添加すると、濃度依存的な阻害が見られ、薬剤100 μM におけるATPase活性は $0.56 s^{-1}$ と26.9%

にまで抑えることが分かった(Fig. 3-8-1)。またこのときの IC_{50} は $22.8 \mu M$ であった。このことから、terpendole EはEg5の運動活性および微小管存在下におけるATPase活性を阻害することが明らかになった。

(3) 微小管存在下におけるKHCのATPase活性に与える影響

Gliding assayでterpendole Eによる阻害はみられなかったKHCに関してもATPase活性に与える影響を検討した。薬剤を何も処理しない状態のATPase活性は $9.2 \pm 1.5 s^{-1}$ であった。次に、Eg5に対する阻害が充分に見られた $100 \mu M$ のterpendole Eを加えて測定したところ、 $10.4 \pm 1.5 s^{-1}$ であった。以上の結果より、terpendole EはKHCのATPase活性には影響を与えないことが示された。(Fig. 3-8-1)

(4) 微小管非存在下におけるEg5のATPase活性に与える影響

上述のようにEg5などのモータータンパク質が示すATPase活性は微小管とモータータンパク質が結合することによって、急激(100倍程度)に触媒されATPの加水分解から得られるエネルギーを用いて運動を行なうことが知られている。さらに、これらのモータータンパク質は微小管非存在下においても若干のATPase活性を持つことが知られている(Lockhart and Cross, 1996)。Terpendole Eが直接Eg5に作用することでEg5の機能を阻害しているならば、E439GST単独のATPase活性がterpendole Eによって阻害される可能性がある。そこで微小管非存在下におけるEg5のATPase活性を測定した。微小管非存在下におけるE439GSTが示すATPase活性は非常に弱く検出が困難だったため、第8節ではE439GST濃度を $0.3 \mu M$ で行ったのに対して、ここでは $4 \mu M$ で行った。その結果、微小管非存在下におけるEg5のATPase活性は $0.021 \pm 0.0045 s^{-1}$ と非常に弱かったものの、terpendole Eを $100 \mu M$ 加えた場合は $0.015 \pm 0.0053 s^{-1}$ と、およそ71.1%程度にまで抑えることが明らかになった。

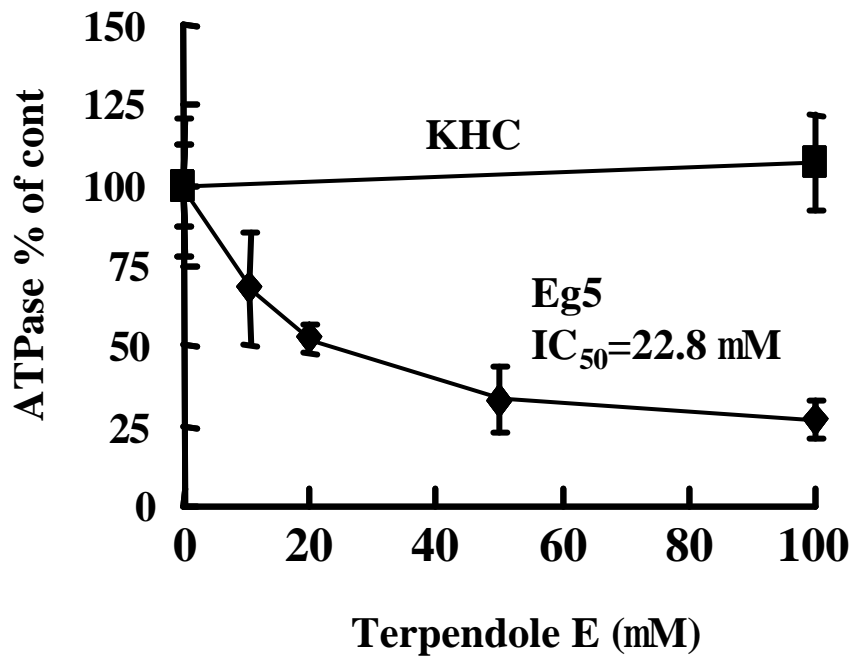


Fig. 3-8-1 Terpendole E inhibits the microtubule stimulated ATPase activity of Eg5 in a dose dependent manner

ATPase activity with microtubules of E439GST(diamond) or K430GST(square) in the presence of terpendole E were measured as the release of phosphate from the γ position of ATP using malachite green.

第9節 Eg5と微小管との結合性にterpendole Eが与える影響

第7節および第8節より、terpendole EがEg5のglidingおよびATPase活性を阻害することが明らかになった。しかし微小管非存在下でのATPase活性阻害がそれほど顕著ではないことから、他の原因によってもEg5の運動阻害を引き起された可能性がある。そこで、Eg5と微小管との結合性が薬剤によって変化するかを検討した。薬剤存在下で微小管とEg5を混ぜた後、超遠心を行うことで微小管とともに沈殿画分に落ちてくるEg5量と微小管に結合せずに上清にくるEg5量との比較で行った。独立に行った9回の実験のうち代表的な3回の結果をFig. 3-9-1に示した。これらの結果をデンストメーターで解析したところ、薬剤未処理時(control)における沈殿側および上清側のEg5量の平均を各100%とすると、terpendole E存在下ではそれぞれ $100 \pm 21.0\%$ 、 $95 \pm 36\%$ であった。そこで、今回の実験条件であるATP存在下においてはterpendole Eが、Eg5と微小管との結合性に影響を与えている可能性は少ないと考えた。

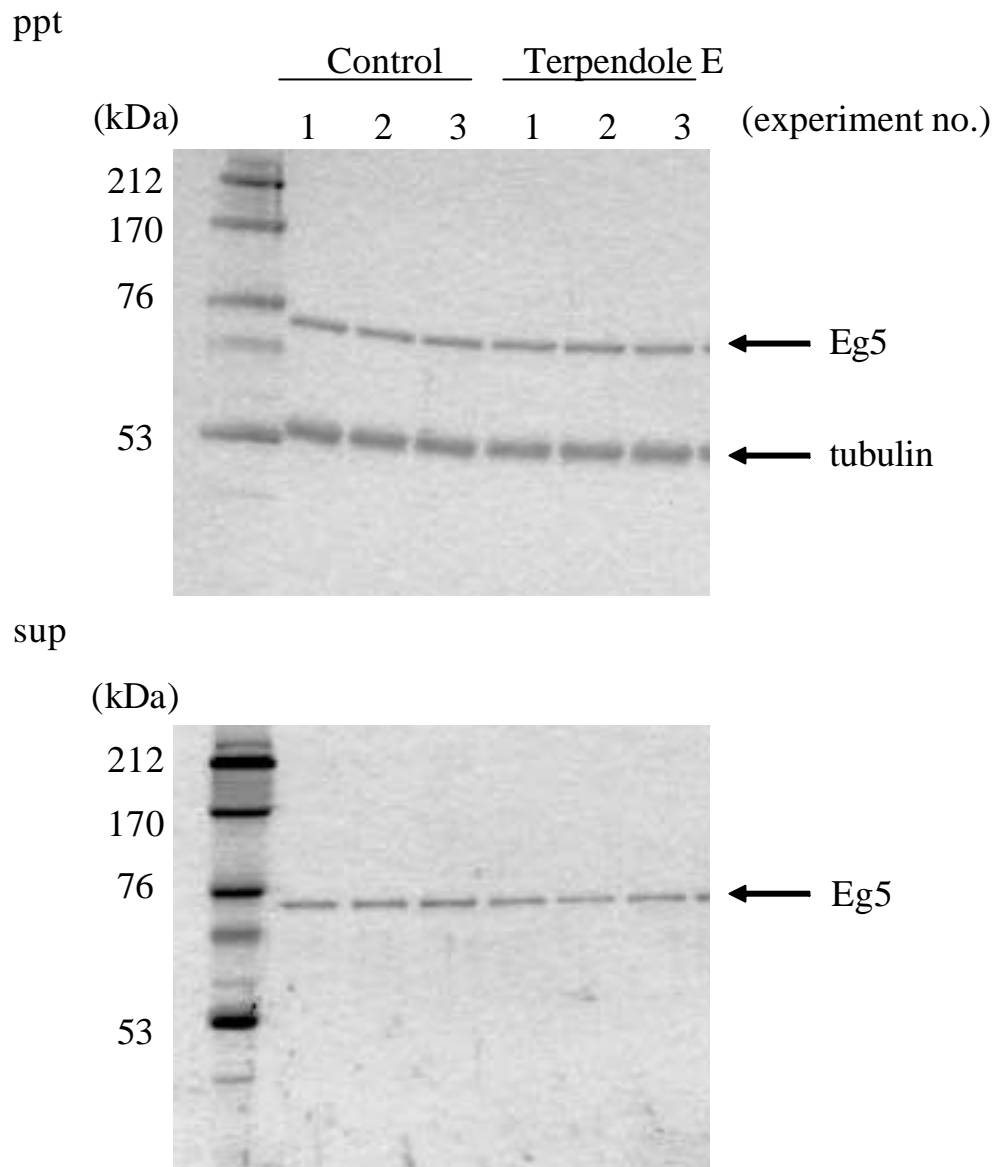


Fig. 3-9-1 terpendole E dose not alter the interaction between Eg5 and microtubule in the presence of ATP

Microtubules and E439GST were mixed in the presence or absence (methanol) of 100 μ M terpendole E and then ultracentrifugated to separate microtubule-bounded (upper panel, ppt)Eg5 or unbounded Eg5(lower panel, sup) .

第10節 他のACAT阻害剤が細胞周期に与える影響

Terpendole Eを含めた一連のterpendole類化合物はACAT (acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase)の阻害剤として見出されていたものである。terpendole EによるEg5の阻害がACATの阻害を介した作用ではないことを確認するために、terpendole類以外のACAT阻害剤としてFR179254(Fig. 3-10-1 A)(Tanaka et al., 1998)を用いて、細胞周期の進行に与える影響および細胞形態に与える影響を調べた。その結果、FR179254は細胞周期をG2/M期に停止させる活性はもたず(Fig. 3-10-1 B)、また紡錘体微小管を伴ったM期の進行が認められた(Fig. 3-10-1 C)。このことから、terpendole EによるG2期阻害活性はACAT阻害活性を介したものであることが示唆された。

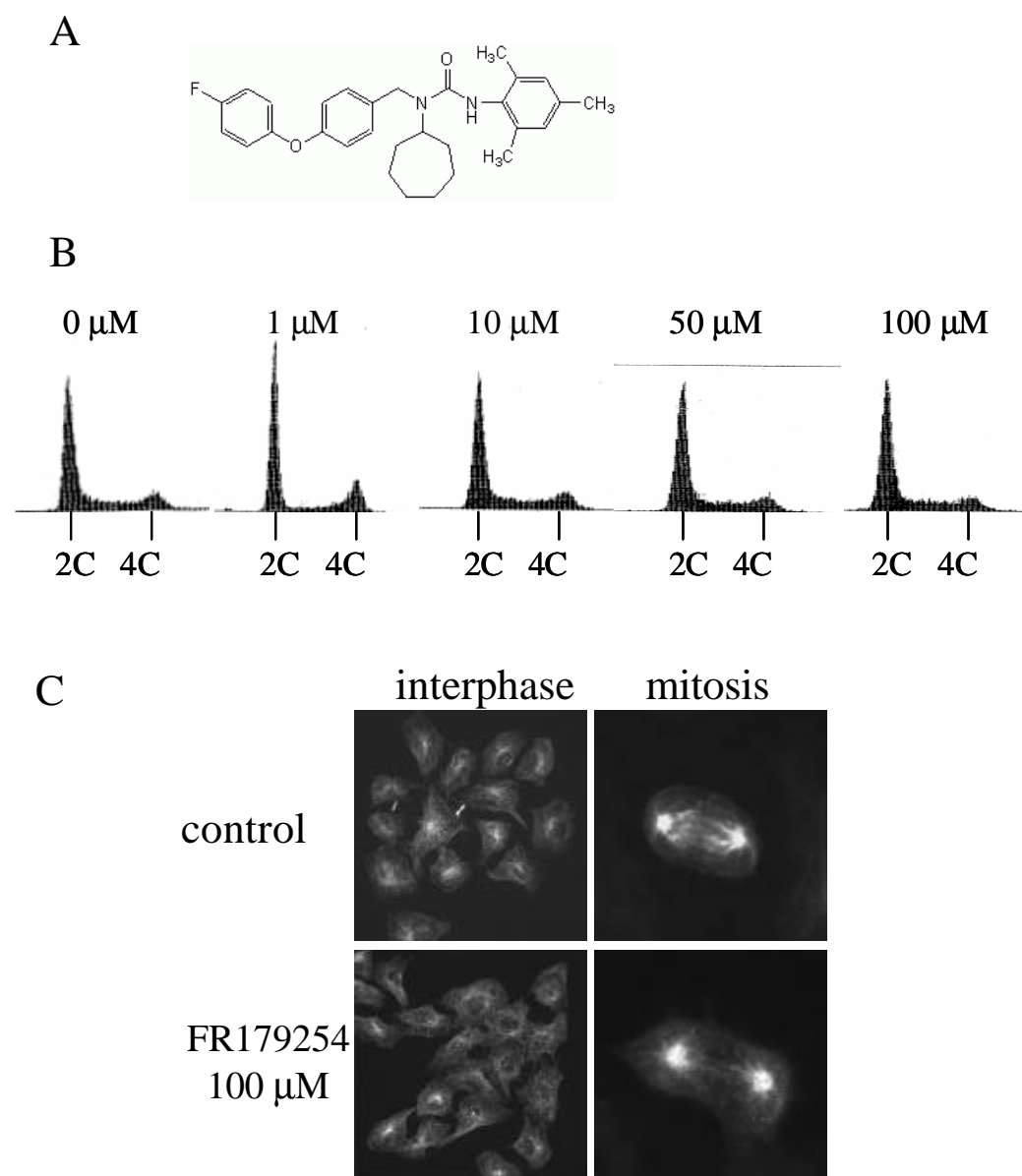


Fig. 3-10-1 ACAT inhibitor (FR179254) dose not inhibit mitosis.

A: the structure of FR179254

B: DNA distribution of 3Y1 cells treated with FR178254 for 24 hours was analyzed by the same way as described in the caption of Fig. 3-4-1.

C: Immunofluorescence stainig of b-tubulin of 3Y1 cells treated for 24 hours with DMSO(control) or 100 μM FR179254. Cells in interphase or mitosis were observed.

第11節 第3章考察

本章において、糸状菌の代謝産物より見出された化合物terpendole Eが、既存の微小管作用薬とは異なり、チューブリンに直接作用しなかったことから新たなタイプの薬剤になると考え、詳細な作用機構解析を行った。

始めにterpendole Eを処理した細胞を免疫染色法により観察したところ、2つの特徴が確認された。1つ目に、間期にある細胞のチューブリンのネットワークは影響を受けていないことが明らかになり、このことは*in vitro*におけるチューブリンの重合には影響を与えないという結果とも一致した。2つ目に、分裂期にある細胞のみに薬剤処理による変化が見られ、染色体の等分配に必要な紡錘体極が消失し、かわりに単一の紡錘体極が形成されていた。この形態が、微小管モータータンパク質の中で分裂期特異的に働くキネシンEg5の機能を阻害したときに現れる特徴と非常に良く似ていた。Eg5は分裂期に必要な2つ中心体の対極への分離および紡錘体形成に重要な働きを担うタンパク質であることが知られていた。そこでterpendole Eが実際にEg5に影響を及ぼしているか検討を行った。

まずEg5のモータードメインとGSTとの融合タンパク質(E439GST)を大腸菌に発現させ精製し、terpendole EがE439GSTの運動に与える影響をgliding assayにより調べた。その結果、terpendole Eは濃度依存的にE439GSTの運動を阻害することが明らかになった。この作用がEg5に対する特異的な作用であるかを調べるためにKHCのモータードメインとGSTとの融合タンパク質(K430GST)を作成し、同様の実験を行なった。Eg5とKHCのモータードメインは高いホモロジーを持つのににもかかわらず、terpendole EはK430GSTの運動を阻害しなかった。

さらに、terpendole Eがその他のモータータンパク質の運動阻害に関わっているかを調べるために、Brefeldin Aが誘導するゴルジ層構造の分解および再構築に対する影響をゴルジ体の構成タンパク質のひとつであるマンノシダーゼIIを染色することにより調べた。その結果terpendole EはマンノシダーゼIIIに関わる順輸送および逆輸送には影響を及ぼさないことが分かった。さらにterpendole Eの類縁体であるterpendole C、terpendole H、terpendole IIは全て細胞周期G2/M阻害活性を示さず、Eg5の運動阻害活性も持たなかった。わずかな構造の違いで、このようにEg5に対する顕著な特異性が現れたことは非常に興味深いことである。

Terpendole EがE439GSTの運動阻害およびATPaseの活性を阻害した機構としては、

terpendole EがEg5に直接結合している可能性を考えている。その理由としては、第8節で示されたように、terpendole Eが微小管非存在下においても、E439GSTのATPase活性を阻害したからである。一方で、この阻害活性はE439GSTの運動阻害および微小管存在下におけるATPaseの活性阻害に比べると非常に弱いものである。そのため、Eg5分子内におけるATPase活性阻害だけで運動阻害を引き起こしているとは言い切れない。

Terpendole Eのように微小管を直接阻害せずにM期で、特異的に細胞周期の進行を阻害する薬剤は、基礎的な生命現象を解明していく上で重要な役割を果たすだけでなく、臨床においても特異性の高い治療薬として用いられることが期待されている。実際、Eg5阻害剤としてのterpendole Eを報告してからも、様々なグループによってEg5の阻害剤のスクリーニングが意欲的に行われ、いくつかのEg5阻害剤があらたに見出されている(Brier et al., 2004; DeBonis et al., 2004)。さらに、Eg5の阻害剤がマウスの腫瘍抑制効果を発揮したという報告もあり(Sakowicz et al., 2004)、Eg5阻害剤の臨床における重要性が示されている。Eg5のみならず、M期で特異的に働くその他のキネシンやダイニン、ミオシンなどのモータータンパク質、スピンドル形成に働くタンパク質などの阻害剤を見出していくことができれば、臨床における抗癌剤の標的タンパク質としての有力な候補になると考えている。さらに生体における分子機能を解明していく上で、terpendole Eなどの特異的なタンパク質阻害剤は、Eg5の機能解明や紡錘体形成に関わる研究を進めていく上で重要なツールとして用いられることが期待されると考えている。

第12節 実験方法

(1) フローサイトメトリーを用いた細胞周期阻害剤のスクリーニング

温度感受性Cdc2変異をもつマウス乳癌細胞tsFT210(Osada et al., 1997)を5%ウシ血清を含むRPMI1640培地中にて32 °Cで培養後、制限温度である39 °Cで17時間培養し、G2期へ同調させた。その後薬剤を添加し同時に許容温度である32 °Cへ移して4時間培養後、細胞を回収した。非同調の実験では32 °Cで17時間培養後、薬剤を添加してからさらに32 °Cで17時間培養し、細胞を回収した。このときいずれの場合も細胞は12穴プレートに 2×10^5 cellsずつまき32 °Cで培養した。回収した細胞をPI(propidium iodide)で染色後フローサイトメトリーを用いて細胞周期の解析を行なった。

(2) チューブリン精製

チューブリンタンパク質はShelanskiらの方法を用いて、牛脳より精製した(Shelanski et al., 1973)。屠場よりon iceにて持ち帰ったウシ脳を、滅菌処理した生理食塩水(0.9 % NaCl)で洗った。ピンセットを用いて硬膜や血管を取り除いた後、脳1gあたり0.5 mlの1 mM PMSF (SIGMA) を含むRB buffer (100 mM Mes, pH 6.8, 1 mM EGTA, 0.5 mM $MgCl_2$)を加え、ミキサーで破碎後、テフロンベッスル型ガラスホモジナイザーで5回ホモジナイズし、20,000 × gで60分遠心した。この上清に3分の1量のグリセロールおよび終濃度1 mM のGTPを加え、37°Cで30分間チューブリン重合を行った。そして30 °C、100,000 × gで60分遠心を行い、重合タンパク質を沈殿させ上清を捨て、RB bufferを加えて氷上にて沈殿をよく懸濁し、30分間脱重合を行った後、4°C、100,000 × gで30分遠心した。再び上清の3分の1量のグリセロールおよび1 mM GTPを加え、37 °Cで30分間重合反応させた後、30 °C、100,000 × gで60分遠心し、沈殿をRB bufferで懸濁させ、4°Cで30分反応し脱重合させた後に100,000 × gで30分遠心し、上清に微小管溶液を得た。そしてタンパク質濃度を定量した。*In vitro*のチューブリン重合反応には、この微小管溶液を用いた。

続いてphosphocellulose (PC) column(Whatman, Cation exchanger P11)にてチューブリン結合タンパク質を除去した。Elution buffer (100 mM Mes, pH 6.8, 1 mM EGTA, 0.5 mM $MgCl_2$, 1 mM GTP) で平衡化させたPCカラムに微小管溶液を静かに乗せ(カラム1 mlにつき微小管

溶液3mgまでとした)、elution bufferにて溶出させた。この溶出液をおよそ1 mlずつのフラクションに分け、カラムから溶出されると同時に、10 μ lのfraction buffer (0.9 M MES、11 mM、1 mM EGTA、100 mM GTP)および5 μ lの100 mM GTPを加え、タンパク定量を行い、液体窒素中また-80°Cにて保存した。

(3) *in vitro*微小管重合アッセイ

チューブリン結合タンパク質を含む微小管溶液を氷中で溶解し、最終濃度が2 mg/mlになるようにRB bufferで希釈、脱気した。ここへGTP(最終濃度が1 mM)および、各薬剤を添加し(1 % (v/v)以下)添加した。このチューブリン溶液を4 °Cから37 °Cに加温させることで微小管重合反応を開始させ、吸光波長350 nmの濁度を指標に経時的に重合度を評価した。

(4) 細胞培養

ラット正常繊維芽細胞3Y1、ヒト肺ガン細胞A549、ヒト子宮頸ガンHeLa細胞およびラット正常腎臓細胞NRKは全て10 %牛胎児血(fetal bovine serum)を含むイーグルDMEM培地中、5 % CO₂存在下、37 °Cで培養した。

(5) 細胞周期の解析

対数増殖期にある3Y1細胞(ラット正常繊維芽細胞)を12 well dish(SUMILON)に 5×10^3 cells/well となるように播種し、12時間後に薬剤を1% (v/v)で添加した。薬剤添加から24時間後にトリプシン処理により細胞を回収後、PBS(0.2 % KCl、0.2 % KH₂PO₄、2.9 % Na₂HPO₄12H₂O、8 % NaCl)にて洗浄し、propidium iodine溶液(50 μ g/ml propidium iodide、0.1 % クエン酸ナトリウム、0.2 % Nonident P-40)を添加し、約30分暗所で放置した。その後、flow cytometry(Beckman Coulter)を用いて細胞周期を解析した。

(6) 細胞免疫染色

細胞をカバーガラス(24 mm \times 24 mm)上に 2×10^4 cells/wellとなるように播種し、12時間後

に薬剤を1% (v/v)で添加した。薬剤処理後12時間後に細胞をPBSで洗浄し、3.7%ホルムアルデヒドを加え5分間室温に置くことで細胞を固定化した。次いで、0.2% (v/v) Triton X-100を含むPBS bufferで5分間処理し作用させ細胞膜を溶解させた。1% BSAを含むPBSで洗浄後、抗 β -チューブリン抗体(Amersham pharmacia biotech)を37°Cで1時間作用させた。PBSで洗浄後、FITC標識抗マウス IgG抗体(kirkegaard)を37°Cで45分間、暗所にて反応させ、PBSで十分に洗浄後蛍光顕微鏡を用いて観察した。また、アクチンの観察にはrhodamine phalloidine (Molecular Probe)を、DNAはHoechst 33258(SIGMA)により染色した。また中心体の染色には抗 γ チューブリン抗体を用いた。

(7) Brefeldin Aによって誘導されるゴルジ体の輸送に与える影響

(7-1) Brefeldin Aが誘導する逆行輸送に与える影響

カバーガラス上に播いたNRK細胞にterpendole E 100 μ Mを添加し60分間培養した後、10 μ g/mlのbrefeldin Aを添加した時間を0分として細胞を固定した。2、4、6分後にも細胞を回収し、固定した。

(7-2) Brefeldin A除去によって誘導される順輸送に与える影響

カバーガラス上に播いたNRK細胞に10 μ g/mlのbrefeldin Aを添加し30分間培養し、さらにterpendole E 100 μ Mを添加して60分間培養した。次いでBrefeldin Aを取り除くためにPBSに十分洗浄を行い、再びterpendole Eを添加し60分後に細胞を固定した。

ゴルジ体の染色は、いずれも抗マンノシダーゼII抗体(clone 53FC3、Berkeley Antibody Co.)およびAlexa 488 goat anti-mouse (Molecular Probes)を用いて行なった。

(8) kinesinおよびEg5の大腸菌発現

(8-1) 発現ベクター

モータードメインの作製は、Eg5およびconventional kinesinのそれぞれのモータードメインを含む領域(xenopus Eg5の1-437アミノ酸、rat conventional kinesinの1-430アミノ酸)のC末端に(Fig.2-1)GSTタンパクを融合させることでモーター活性を保持したタンパク質が得られるという報告に従って作製した(Crevel et al., 1997; Lockhart and Cross, 1996)。

Eg5のモータードメインはヒト白血病細胞HL60細胞より得られたcDNAライブラリーを鋳型にして、*Nde*I制限酵素サイト(CATATG)を含む領域、(5'-GGCCATATGGGCGTCGCAGCCAAATTCGTCTG-3')および*Nco*I制限酵素サイト(CCATGG)を含む(5'-ATCCATGGACAACTCTGTAACCCTATTCAG-3')をプライマーとして用いPCR法によりクローニングした。その結果、human kinesin like spindle protein HKSP (HK SP) mRNA(ACCETION no.U37426)のうち、第一コドンの前にCAT塩基の挿入、および440番目コドンの第二塩基から、442番目コドンの第一塩基にかけて、*Nco*I制限酵素サイト(CCATGG)を含むEg5遺伝子を得た。

KHCのモータードメインは東京大学豊島研究室より頂いた*D.melangaster* kinesin heavy chain mRNA complete cds (ACCETION no.M24441)を鋳型に、第一コドンの直前に*Nde*I制限酵素サイト(CATATG)を含む領域、(5'-CCTGTAAGCCATATGTCCGCGGAACGAG-3')をN末側プライマーとして、コドン430番目の第二塩基からコドン432番目の第一延期にかけて*Nco*I制限酵素サイト(CCATGG)を含む(5'-CCTGCTCGTTCCATGGCAACCGATGC)をC末プライマーとしてPCRを行うことで得た。ただし、373番目のLeuのコドンがCTTからCTUに変換されているものを用いた。

GSTはpGEX-6P-2(Amaersham Pharmacia Biotech)より*Nco*Iサイトを含むプライマー(5'-GGCCATGGCCCCTATACTAGGTTATTG-3')および、*Hind*IIIサイト(AAGCTT)を含むプライマー(5'-GGAAGCTTTCAGTCACGATGCCGCGCTCG-3')を用いてPCRを行うことで得た。発現ベクターにはpRSET-B (INVITROGEN)を用い、*Nde*Iサイトから*Hind*IIIサイト中にEg5/conventional kinesin-GSTを導入した。

(8-2) 発現誘導

2種類のキネシンの発現および精製はすべて同条件下で行った。それぞれのキネシン発現ベクターを大腸菌(BL21)にトランスフォーメーションし、10 mlのglucose 培地(0.5% グルコースを含むLB培地(1%(w/v) tryptone、0.5 %(w/v) yeast extract (BECTON DIKISON)、1 % (w/v) NaCl (Wako)、50µg/ml Ampicillin)で一晩、37 °Cで培養後、遠心しグルコースを含む上清を取り除き、回収した大腸菌を500 ml のLB 培地(グルコースなし)に移し37 °Cで再び培養した。OD₆₀₀が1.0になったところで温度を30 °Cに下げ、さらに30分培養してから0.4 mM IPTG (SIGMA) を加え4時間発現誘導を行った。

(8-3) 精製

大腸菌の培養液を4℃、4800 rpmで7分間遠心し上清を取り除いた。沈殿をwash buffer (20 mM Pipes、pH6.9、2 mM MgCl₂)で懸濁したのち再び遠心し上清を捨て操作を2回繰り返した。沈殿にlysis buffer(20 mM Pipes pH 6.9、5 mM β-Mercaptoethanol、5mM MgCl₂、1 mM PMSF、10 μg/ml pepstatin、10 μg/ml leupeptin、10 μg/ml antipain)を加えて氷上で懸濁し、氷中で冷やしながら超音波処理で細胞を破壊したものを2℃、80000rpmで15分間遠心した。続いて上清に150 mM NaClを含むlysis bufferで平衡化したグルタチオンアガロースビーズを15% (v/v) ぐらいになるように加えて4℃で30分間回転させ、GST融合タンパク質をアガロースビーズに結合させた。30分後に2℃、3000 rpmで2分間遠心して上清を捨てビーズに結合しない不要なタンパク質を取り除いた。次いでビーズに150 mM NaClおよび10 μM ATPを含むlysis bufferで静かに懸濁下の地に遠心により上清を取り除くことでビーズを3回洗った。30 mMのグルタチオン溶液(150 mM NaCl、10 μM ATP、30 mM グルタチオン、in lysis buffer、pH 6.8)を500 μl加えて、13000 rpm で3分遠心させて上清に目的タンパク質、Eg5-GSTおよびconventional kinesin-GSTを得た。最後のグルタチオン溶出は2-3回繰り返した。タンパク定量を行なうことで精製されたタンパク濃度を測定した。

(8-4) 微小管との結合を用いた精製

(8-3)で得られたキネシン溶液(Eg5-GSTおよびconventional kinesin-GST)のうち、より純度の高い活性成分(ATP存在下で微小管上を動くことのできるもの)を精製するために、続いて微小管との結合による精製を行った。

始めに、キネシンダイマーとチューブリンダイマーがモル比で1対1 となる量のチューブリンを重合させた。2 mg/mlのチューブリン溶液に、1 mM GTP、2.5 mM MgCl₂、10% DMSOを加えて37℃で30 min反応させたのち、重合したチューブリンに20 μM Taxolを加え安定かさせた。この重合チューブリン(微小管：microtubule; MT)にグルタチオン溶出(8-3)で得られたキネシン溶液(K430GST/E437GST)を混ぜ、さらに500 μM AMP-PNPを加え室温で15分反応させることで、微小管にキネシンを吸着させた。27℃、75000rpmで15分間遠心を行い、微小管に結合できなかったkinesinを取り除いた。微小管精製溶液 (40 mM NaCl、7 mM ATP、7 mM MgCl₂、200 mM K-Acetate、10 μM Taxol in BRB80 (RBR80: 80 mM Pipes、pH 6.8、1 mM MgCl₂、1 mM EGTA)) で沈殿を丁寧に懸濁させ室温に15分間置いた。25℃、85000 rpmで15分間遠心を行い、上清に活性のあるEg5-GSTまたはconventional kinesin-GST

を得た。

(9) gliding assay

(9-1) 微小管の調製

2 mg/mlのチューブリン 100 μ lに1 mM GTPおよび2.5 mM $MgCl_2$ 、10% DMSOを加えて37 $^{\circ}C$ で30分間重合させた後、20 μ MのTaxolを加えて安定化させた。

(9-2) カゼインの調製

カゼイン用溶液 (20 mM Tris, pH 8.8, 200 mM NaCl) にカゼインを適量加え十分に溶かしてから、4 $^{\circ}C$ 、100000 rpmにて20分遠心させることでカゼインの飽和溶液を得た後、タンパク定量を行った。尚、カゼインは用事調製した。

(9-3) gliding assay

はじめにスライドガラス、グリース、セロハンテープ、カバーガラスを用いてflow chamberを作った。そこへ100 μ g/ml のE439GSTまたはK430GSTを15 μ l流し込み、5分間おいてスライドガラスに吸着させた。次いで、0.5 mg/mlのカゼインを25 μ l加え5分間置いて、スライドガラス面のblockingを行った。25 μ l のMB(Motility buffer : 20 mM Pipes, pH 6.8, 4 mM $MgSO_4$, 1 mM EGTA, 2 mM EDTA, 10 μ M ATP, 0.5 % mercaptoethanol)で2回、chamberを洗い、そこに10 μ M Taxolを含む MB(TMB)で希釈した微小管、15 μ lを2回に分けて流し入れた。5分後に25 μ lのTMBで2回洗い、浮遊の微小管を取り除いた。そこへ1 mM ATPを含むTMB(ATMB)を加え(25 μ lを2回)微小管を動かした。この後薬剤を含むATMBをさらにchamberに流し入れることで、微小管の運動に与える阻害効果を検討した。運動の観察は暗視野顕微鏡(Nikon)を用いて行い、速度解析にあたっては、CCDカメラ(Nikon)を用いてビデオ画像として記録して行った。

(10) ATPase活性の測定

(10-1) リン酸標準曲線の作成

検量線は、0.5 M リン酸標準溶液(molecular probe)を用いて作製した。このリン酸標準溶

液を、実際の測定に用いるbuffer(20 mM pipes、pH 6.8、5 mM MgCl₂)で、0、10、50、100、150、200 μMとなるように希釈し、リン酸溶液 : 0.6 M PCA (過塩素酸、perchloric acid) : 0.3 M PCA: マラカイトグリーン試薬 = 1:1:18:20となるように混合して、25 °Cで25分間反応させたのち、650 nmの波長を用いて吸光度を測定した。そして、650 nmの波長の吸光度と、反応溶液中のリン酸濃度との関係を示す検量線を作製した。マラカイトグリーン試薬は、0.1 % NaMoO₄ (ナカライ特級)、0.03 % Malachite Green Oxalate(ナカライ)、0.5 % Triton X-100 (Wako)、0.7 M HCl(Wako)としたものを用いた。

(10-2) 微小管存在下におけるATPase活性

(10-2-1) 微小管の調製

2 mg/mlのチューブリン100 μlに1 mM GTPおよび2.5 mM MgCl₂、10% DMSOを加え、37 °Cで30分反応させることで重合させた後、20 μMのtaxolを加えて安定化させた。室温に戻した25%のサッカロース溶液900 μl の上に重合したチューブリンを静かに乗せ、75000 rpmで20分遠心し、上清を静かに取り除くことで含まれた余分なGTPおよび重合しなかったチューブリンタンパク質を取り除き、沈殿をbuffer B(20 mM Pipes pH 6.8、5 mM MgCl₂、1 mM EGTA、10 μM taxol)で懸濁し、タンパク定量を行った。

(10-2-2) ATPase活性の測定

(8-4)より得られた0.3 μMのE437GSTまたはK430GSTを、(10-2-1)より得られた4 μMの微小管および薬剤を 1.5mlチューブ中で混合し(25 °C)、ATP 1 mMを加え(time = 0 s)、1分おきに5 μl取り出し、ただちに5 μl の0.6 M PCAを加えて反応を停止させた。遠心で沈殿物を除去し、混合溶液と0.3 M PCAおよびマラカイトグリーン試薬の比がそれぞれ1:9:10になるようにマラカイトグリーン試薬を加えて、25 °Cで30分反応させた後、波長が650 nmの光吸収を測定することでリン酸濃度を測定し、各条件におけるATPase/s/dimerを求めた。グラフの各プロットは、実験を3回以上行った値を示している。

(10-3) 微小管非存在下におけるATPase活性の測定

(8-4)より得られた4 μMのEg5 および薬剤をチューブの中で混合し(25 °C)、以降は10.2の方法と同様に行った。

第4章 総括

単細胞生物である酵母から多細胞生物である人に至るまでその一つ一つの細胞はすべて細胞周期という制御機構に従い分裂を繰り返している。その仕組みは共通するところが多く、多くの遺伝子が酵母でも人でも共通に存在していることが明らかになっている。事実、cdc2(cdk1)などといった細胞周期に関与する重要な遺伝子は、酵母の変異株を用いた研究より単離されてきた。酵母を用いた研究を行う利点としては、増殖サイクルが早いこと、変異株の作成が容易であること、変異体の導入が効率よく行えることなどがあげられる。酵母を用いた研究は、特に細胞分裂システムなど生命現象の根源に関わるような広く保持された現象を問う上では非常に有用であると考えている。

本研究第2章では、HIV-1 Vprによる細胞増殖阻害機構の解析を酵母を用いて行った。Vprの酵母での作用点と動物細胞での作用点が必ずしも同じではないことが示唆されたが、酵母でも動物細胞でも共通にVprによる増殖抑制や核局在に関与する機構が存在する可能性が示された。このことは未だ明らかにされていないVprの細胞増殖に関わる重要なタンパク質が、酵母と人で共通に存在している可能性をも示唆しており、今後の研究が期待されている。同時にVprの標的タンパク質の解明を行うことは、未知なる生体分子の解明につながると期待している。

一方、生体分子の機能解明にあたり、これまでは目的とするタンパク質のアンチセンスDNAの発現、抗体注入、変異型タンパク質の過剰発現などの手法、個体レベルでの解析にはノックアウトマウスを用いた研究が広く行われている。さらに近年ではRNAiの技術が普及しタンパク質の発現制御が簡便に行われるようになってきている。しかし、これらは全てタンパク量そのものを大きく変動させる方法であり、生体本来の役割あるいはバランスを見失っている可能性がある。そこで、特異性の高い阻害剤をバイオプローブとして用いることができれば、特定の時間に特定のタンパク質の活性制御を行うことができる。従って、細胞透過性の低分子化合物は、細胞生物学の研究を進めていく上で、生体機能解明に重要な役割を果たすことのできる非常に優れたツールになると考えている。

本研究第3章においては、M期に特異的に働くキネシンタンパク質、Eg5の阻害剤terpendole Eを見出し、Eg5を阻害することで細胞周期をM期に停止させることを明らかにした。Terpendole Eのように、細胞透過性の低分子化合物で、Eg5などの細胞周期特異的に働くタンパク質を阻害するような薬剤は、抗がん剤などとしての臨床での応用が非常

に期待されていると考えている。また Eg5 のみならず、M 期特異的にはたらくキネシナンパク質やその他のモータータンパク質も、臨床応用を念頭に置いた研究を行う上で非常に興味深い標的分子になると考えている。

参考文献

- Agostini, I., Navarro, J. M., Rey, F., Bouhamdan, M., Spire, B., Vigne, R., and Sire, J. (1996). The human immunodeficiency virus type 1 Vpr transactivator: cooperation with promoter-bound activator domains and binding to TFIIB. *J Mol Biol* 261, 599-606.
- anonymous1) (1981). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR - Morbidity & Mortality Weekly Report* 30, 305-308.
- anonymous2) (1981). Pneumocystis pneumonia --Los Angeles. *MMWR - Morbidity & Mortality Weekly Report* 30, 250-252.
- Bakkenist, C. J., and Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., *et al.* (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.
- Bashir, T., Dorrello, N. V., Amador, V., Guardavaccaro, D., and Pagano, M. (2004). Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature* 428, 190-193.
- Berglez, J. M., Castelli, L. A., Sankovich, S. A., Smith, S. C., Curtain, C. C., and Macreadie, I. G. (1999). Residues within the HFRIGC sequence of HIV-1 vpr involved in growth arrest activities. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 287-290.
- Berkhout, B., Silverman, R. H., and Jeang, K. T. (1989). Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* 59, 273-282.
- Blangy, A., Lane, H. A., d'Herin, P., Harper, M., Kress, M., and Nigg, E. A. (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* 83, 1159-1169.
- Block, S. M., Goldstein, L. S., and Schnapp, B. J. (1990). Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature* 348, 348-352.
- Bloom, G. S., Wagner, M. C., Pfister, K. K., and Brady, S. T. (1988). Native structure and physical properties of bovine brain kinesin and identification of the ATP-binding subunit polypeptide. *Biochemistry* 27, 3409-3416.
- Borisy, G. G., and Taylor, E. W. (1967). The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. *J Cell Biol* 34, 535-548.

- Bouhamdan, M., Benichou, S., Rey, F., Navarro, J. M., Agostini, I., Spire, B., Camonis, J., Slupphaug, G., Vigne, R., Benarous, R., and Sire, J. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein binds to the uracil DNA glycosylase DNA repair enzyme. *J Virol* *70*, 697-704.
- Brady, S. T. (1985). A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature* *317*, 73-75.
- Brier, S., Lemaire, D., Debonis, S., Forest, E., and Kozielski, F. (2004). Identification of the protein binding region of S-trityl-L-cysteine, a new potent inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. *Biochemistry* *43*, 13072-13082.
- Brown, E. J., and Baltimore, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* *14*, 397-402.
- Bukrinsky, M. I., Sharova, N., McDonald, T. L., Pushkarskaya, T., Tarpley, W. G., and Stevenson, M. (1993). Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 6125-6129.
- Cantwell, A. R., Jr. (1982). Variably acid-fast bacteria in vivo in a case of reactive lymph node hyperplasia occurring in a young male homosexual. *Growth* *46*, 331-336.
- Carson, C. T., Schwartz, R. A., Stracker, T. H., Lilley, C. E., Lee, D. V., and Weitzman, M. D. (2003). The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *Embo J* *22*, 6610-6620.
- Chen, M., Elder, R. T., Yu, M., O'Gorman, M. G., Selig, L., Benarous, R., Yamamoto, A., and Zhao, Y. (1999). Mutational analysis of Vpr-induced G2 arrest, nuclear localization, and cell death in fission yeast. *Journal of Virology* *73*, 3236-3245.
- Cohen, E. A., Dehni, G., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1990a). Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J Virol* *64*, 3097-3099.
- Cohen, E. A., Terwilliger, E. F., Jalinoos, Y., Proulx, J., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1990b). Identification of HIV-1 vpr product and function. *J Acquir Immune Defic Syndr* *3*, 11-18.
- Cohn, S. A., Ingold, A. L., and Scholey, J. M. (1989). Quantitative analysis of sea urchin egg kinesin-driven microtubule motility. *J Biol Chem* *264*, 4290-4297.
- Correia, J. J. (1991). Effects of antimetabolic agents on tubulin-nucleotide interactions. *Pharmacol Ther* *52*, 127-147.
- Crevel, I. M., Lockhart, A., and Cross, R. A. (1997). Kinetic evidence for low chemical processivity in *ncd* and *Eg5*. *Journal of Molecular Biology* *273*, 160-170.
- de Noronha, C. M., Sherman, M. P., Lin, H. W., Cavrois, M. V., Moir, R. D., Goldman, R. D., and Greene, W. C. (2001). Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science* *294*, 1105-1108.

- DeBonis, S., Skoufias, D. A., Lebeau, L., Lopez, R., Robin, G., Margolis, R. L., Wade, R. H., and Kozielski, F. (2004). In vitro screening for inhibitors of the human mitotic kinesin Eg5 with antimitotic and antitumor activities. *Mol Cancer Ther* 3, 1079-1090.
- Di Marzio, P., Choe, S., Ebright, M., Knoblauch, R., and Landau, N. R. (1995). Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *Journal of Virology* 69, 7909-7916.
- Dunphy, W. G., Brizuela, L., Beach, D., and Newport, J. (1988). The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 54, 423-431.
- Enos, A. P., and Morris, N. R. (1990). Mutation of a gene that encodes a kinesin-like protein blocks nuclear division in *A. nidulans*. *Cell* 60, 1019-1027.
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-396.
- Fouchier, R. A., Meyer, B. E., Simon, J. H., Fischer, U., Albright, A. V., Gonzalez-Scarano, F., and Malim, M. H. (1998). Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex. *J Virol* 72, 6004-6013.
- Gaglio, T., Saredi, A., Bingham, J. B., Hasbani, M. J., Gill, S. R., Schroer, T. A., and Compton, D. A. (1996). Opposing motor activities are required for the organization of the mammalian mitotic spindle pole. *Journal of Cell Biology* 135, 399-414.
- Gallay, P., Hope, T., Chin, D., and Trono, D. (1997). HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9825-9830.
- Gautier, J., Minshull, J., Lohka, M., Glotzer, M., Hunt, T., and Maller, J. L. (1990). Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* 60, 487-494.
- Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., and Maller, J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* 54, 433-439.
- Gaynor, E. M., and Chen, I. S. (2001). Analysis of apoptosis induced by HIV-1 Vpr and examination of the possible role of the hHR23A protein. *Exp Cell Res* 267, 243-257.
- Goodson, H. V., Kang, S. J., and Endow, S. A. (1994). Molecular phylogeny of the kinesin family of microtubule motor proteins. *J Cell Sci* 107 (Pt 7), 1875-1884.
- Goshima, G., and Vale, R. D. (2003). The roles of microtubule-based motor proteins in mitosis: comprehensive RNAi analysis in the *Drosophila* S2 cell line. *J Cell Biol* 162, 1003-1016.

- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., and Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* *305*, 1425-1431.
- Gu, J., Emerman, M., and Sandmeyer, S. (1997). Small heat shock protein suppression of Vpr-induced cytoskeletal defects in budding yeast. *Mol Cell Biol* *17*, 4033-4042.
- Hagan, I., and Yanagida, M. (1990). Novel potential mitotic motor protein encoded by the fission yeast *cut7+* gene. *Nature* *347*, 563-566.
- He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D. O., and Landau, N. R. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *Journal of Virology* *69*, 6705-6711.
- Heald, R. (2000). Motor function in the mitotic spindle. *Cell* *102*, 399-402.
- Heck, M. M., Pereira, A., Pesavento, P., Yannoni, Y., Spradling, A. C., and Goldstein, L. S. (1993). The kinesin-like protein KLP61F is essential for mitosis in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology* *123*, 665-679.
- Heinzinger, N. K., Bukinsky, M. I., Haggerty, S. A., Ragland, A. M., Kewalramani, V., Lee, M. A., Gendelman, H. E., Ratner, L., Stevenson, M., and Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 7311-7315.
- Hereford, L. M., and Hartwell, L. H. (1974). Sequential gene function in the initiation of *Saccharomyces cerevisiae* DNA synthesis. *J Mol Biol* *84*, 445-461.
- Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* *279*, 519-526.
- Horejsi, Z., Falck, J., Bakkenist, C. J., Kastan, M. B., Lukas, J., and Bartek, J. (2004). Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation. *OncoGene* *23*, 3122-3127.
- Hoyt, M. A., He, L., Loo, K. K., and Saunders, W. S. (1992). Two *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-related gene products required for mitotic spindle assembly. *Journal of Cell Biology* *118*, 109-120.
- Hoyt, M. A., Totis, L., and Roberts, B. T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* *66*, 507-517.
- Hua, W., Young, E. C., Fleming, M. L., and Gelles, J. (1997). Coupling of kinesin steps to ATP hydrolysis. *Nature* *388*, 390-393.
- Huang, X. H., Nishida, H., Tomoda, H., Tabata, N., Shiomi, K., Yang, D. J., Takayanagi, H., and Omura, S. (1995).

Terpendoles, novel ACAT inhibitors produced by *Albophoma yamanashiensis*. II. Structure elucidation of terpendoles A, B, C and D. *J Antibiot (Tokyo)* *48*, 5-11.

- Iordanskiy, S., Zhao, Y., Dubrovsky, L., Iordanskaya, T., Chen, M., Liang, D., and Bukrinsky, M. (2004). Heat shock protein 70 protects cells from cell cycle arrest and apoptosis induced by human immunodeficiency virus type 1 viral protein R. *J Virol* *78*, 9697-9704.
- Jowett, J. B., Planelles, V., Poon, B., Shah, N. P., Chen, M. L., and Chen, I. S. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *Journal of Virology* *69*, 6304-6313.
- Kapoor, T. M., and Mitchison, T. J. (1999). Allele-specific activators and inhibitors for kinesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 9106-9111.
- Kaseda, K., Higuchi, H., and Hirose, K. (2003). Alternate fast and slow stepping of a heterodimeric kinesin molecule. *Nat Cell Biol* *5*, 1079-1082.
- Kino, T., Gragerov, A., Slobodskaya, O., Tsopanomalou, M., Chrousos, G. P., and Pavlakis, G. N. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) accessory protein Vpr induces transcription of the HIV-1 and glucocorticoid-responsive promoters by binding directly to p300/CBP coactivators. *J Virol* *76*, 9724-9734.
- Kitagawa, R., Bakkenist, C. J., McKinnon, P. J., and Kastan, M. B. (2004). Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev* *18*, 1423-1438.
- Klausner, R. D., Donaldson, J. G., and Lippincott-Schwartz, J. (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* *116*, 1071-1080.
- Kobayashi, T., Masuma, R., Omura, S., and Watanabe, K., (1995). *Materials for the fungus flora of Japan* (47). *Mycosciece* *35*, 399-401
- Le Guellec, R., Paris, J., Couturier, A., Roghi, C., and Philippe, M. (1991). Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA that encodes a kinesin-related protein. *Molecular & Cellular Biology* *11*, 3395-3398.
- Le Rouzic, E., Mousnier, A., Rustum, C., Stutz, F., Hallberg, E., Dargemont, C., and Benichou, S. (2002). Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *J Biol Chem* *277*, 45091-45098.
- Lee, J. H., and Paull, T. T. (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* *304*, 93-96.
- Lee, M. G., and Nurse, P. (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* *327*, 31-35.
- Lewis, P., Hensel, M., and Emerman, M. (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell

cycle. *Embo J* 11, 3053-3058.

- Li, R., and Murray, A. W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66, 519-531.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X. S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., *et al.* (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14, 1448-1459.
- Lockhart, A., and Cross, R. A. (1996). Kinetics and motility of the Eg5 microtubule motor. *Biochemistry* 35, 2365-2373.
- Lu, Y. L., Spearman, P., and Ratner, L. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J Virol* 67, 6542-6550.
- Lum, J. J., Cohen, O. J., Nie, Z., Weaver, J. G., Gomez, T. S., Yao, X. J., Lynch, D., Pilon, A. A., Hawley, N., Kim, J. E., *et al.* (2003). Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J Clin Invest* 113, 1547-1554.
- Macreadie, I. G., Castelli, L. A., Hewish, D. R., Kirkpatrick, A., Ward, A. C., and Azad, A. A. (1995). A domain of human immunodeficiency virus type 1 Vpr containing repeated H(S/F)RIG amino acid motifs causes cell growth arrest and structural defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2770-2774.
- Macreadie, I. G., Thorburn, D. R., Kirby, D. M., Castelli, L. A., de Rozario, N. L., and Azad, A. A. (1997). HIV-1 protein Vpr causes gross mitochondrial dysfunction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 410, 145-149.
- Mahalingam, S., Ayyavoo, V., Patel, M., Kieber-Emmons, T., Kao, G. D., Muschel, R. J., and Weiner, D. B. (1998). HIV-1 Vpr interacts with a human 34-kDa mov34 homologue, a cellular factor linked to the G2/M phase transition of the mammalian cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3419-3424.
- Mansky, L. M., Preveral, S., Selig, L., Benarous, R., and Benichou, S. (2000). The interaction of vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 In vivo mutation rate. *J Virol* 74, 7039-7047.
- Margottin, F., Bour, S. P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K., and Benarous, R. (1998). A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* 1, 565-574.
- Marin, M., Rose, K. M., Kozak, S. L., and Kabat, D. (2003). HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* 9, 1398-1403.
- Masui, Y., and Markert, C. L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 177, 129-145.
- Mayer, T. U., Kapoor, T. M., Haggarty, S. J., King, R. W., Schreiber, S. L., and Mitchison, T. J. (1999). Small molecule

inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen.[see comment]. *Science* 286, 971-974.

- Miyamoto, Y., Machida, K., Mizunuma, M., Emoto, Y., Sato, N., Miyahara, K., Hirata, D., Usui, T., Takahashi, H., Osada, H., and Miyakawa, T. (2002). Identification of *Saccharomyces cerevisiae* isoleucyl-tRNA synthetase as a target of the G1-specific inhibitor Revertin. *J Biol Chem* 277, 28810-28814.
- Mochan, T. A., Venere, M., DiTullio, R. A., Jr., and Halazonetis, T. D. (2004). 53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 3, 945-952.
- Morellet, N., Bouaziz, S., Petitjean, P., and Roques, B. P. (2003). NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR. *Journal of Molecular Biology* 327, 215-227.
- Nishino, Y., Myojin, T., Kamata, M., and Aida, Y. (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.
- Nishizawa, M., Kamata, M., Mojin, T., Nakai, Y., and Aida, Y. (2000). Induction of apoptosis by the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 occurs independently of G(2) arrest of the cell cycle. *Virology* 276, 16-26.
- Nishizawa, M., Myojin, T., Nishino, Y., Nakai, Y., Kamata, M., and Aida, Y. (1999). A carboxy-terminally truncated form of the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 retards cell proliferation independently of G(2) arrest of the cell cycle. *Virology* 263, 313-322.
- Nurse, P. (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* 256, 547-551.
- Osada, H., Cui, C. B., Onose, R., and Hanaoka, F. (1997). Screening of cell cycle inhibitors from microbial metabolites by a bioassay using a mouse cdc2 mutant cell line, tsFT210. *Bioorg Med Chem* 5, 193-203.
- Popov, S., Rexach, M., Ratner, L., Blobel, G., and Bukrinsky, M. (1998). Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *J Biol Chem* 273, 13347-13352.
- Re, F., Braaten, D., Franke, E. K., and Luban, J. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *Journal of Virology* 69, 6859-6864.
- Rieder, C. L., and Palazzo, R. E. (1992). Colcemid and the mitotic cycle. *J Cell Sci* 102 (Pt 3), 387-392.
- Sakowicz, R., Finer, J. T., Beraud, C., Crompton, A., Lewis, E., Fritsch, A., Lee, Y., Mak, J., Moody, R., Turincio, R., *et al.* (2004). Antitumor activity of a kinesin inhibitor. *Cancer Research* 64, 3276-3280.
- Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., Liu, D., Tetzlaff, M., and Elledge, S. J. (1999). Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* 286, 1166-1171.
- Sanchez, Y., Desany, B. A., Jones, W. J., Liu, Q., Wang, B., and Elledge, S. J. (1996). Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* 271, 357-360.

- Sawin, K. E., LeGuellec, K., Philippe, M., and Mitchison, T. J. (1992). Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor.[see comment]. *Nature* 359, 540-543.
- Sawin, K. E., and Mitchison, T. J. (1995). Mutations in the kinesin-like protein Eg5 disrupting localization to the mitotic spindle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4289-4293.
- Schmidt, R. E., Grabau, G. G., and Yip, H. K. (1986). Retrograde axonal transport of [125I]nerve growth factor in ileal mesenteric nerves in vitro: effect of streptozotocin diabetes. *Brain Res* 378, 325-336.
- Schnapp, B. J., Vale, R. D., Sheetz, M. P., and Reese, T. S. (1985). Single microtubules from squid axoplasm support bidirectional movement of organelles. *Cell* 40, 455-462.
- Schnitzer, M. J., and Block, S. M. (1997). Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step. *Nature* 388, 386-390.
- Segura-Totten, M., and Wilson, K. L. (2001). Virology. HIV-breaking the rules for nuclear entry. *Science* 294, 1016-1017.
- Selig, L., Benichou, S., Rogel, M. E., Wu, L. I., Vodicka, M. A., Sire, J., Benarous, R., and Emerman, M. (1997). Uracil DNA glycosylase specifically interacts with Vpr of both human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus of sooty mangabeys, but binding does not correlate with cell cycle arrest. *Journal of Virology* 71, 4842-4846.
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., and Malim, M. H. (2003). The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* 9, 1404-1407.
- Shelanski, M. L., Gaskin, F., and Cantor, C. R. (1973). Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 765-768.
- Shelanski, M. L., and Taylor, E. W. (1967). Isolation of a protein subunit from microtubules. *J Cell Biol* 34, 549-554.
- Shiloh, Y., and Kastan, M. B. (2001). ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv Cancer Res* 83, 209-254.
- Somasundaran, M., Sharkey, M., Brichacek, B., Luzuriaga, K., Emerman, M., Sullivan, J. L., and Stevenson, M. (2002). Evidence for a cytopathogenicity determinant in HIV-1 Vpr. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9503-9508.
- Stewart, S. A., Poon, B., Jowett, J. B., and Chen, I. S. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest. *Journal of Virology* 71, 5579-5592.
- Strebel, K., Klimkait, T., Maldarelli, F., and Martin, M. A. (1989). Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 vpr protein. *J Virol* 63, 3784-3791.
- Takai, H., Tominaga, K., Motoyama, N., Minamishima, Y. A., Nagahama, H., Tsukiyama, T., Ikeda, K., Nakayama, K., and Nakanishi, M. (2000). Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes*

Dev 14, 1439-1447.

- Tanaka, A., Terasawa, T., Haghara, H., Sakuma, Y., Ishibe, N., Sawada, M., Takasugi, H., and Tanaka, H. (1998). Inhibitors of acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase (ACAT). Part 1: identification and structure-activity relationships of a novel series of substituted N-alkyl-N-biphenylmethyl-N'-arylureas. *Bioorg Med Chem* 6, 15-30.
- Tomoda, H., Tabata, N., Yang, D. J., Takayanagi, H., and Omura, S. (1995). Terpendoles, novel ACAT inhibitors produced by *Albophoma yamanashiensis*. III. Production, isolation and structure elucidation of new components. *Journal of Antibiotics* 48, 793-804.
- Turner, J., Anderson, R., Guo, J., Beraud, C., Fletterick, R., and Sakowicz, R. (2001). Crystal structure of the mitotic spindle kinesin Eg5 reveals a novel conformation of the neck-linker. *Journal of Biological Chemistry* 276, 25496-25502.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., and Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *Embo J* 22, 5612-5621.
- Vale, R. D., Funatsu, T., Pierce, D. W., Romberg, L., Harada, Y., and Yanagida, T. (1996). Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature* 380, 451-453.
- Vale, R. D., Reese, T. S., and Sheetz, M. P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42, 39-50.
- Vodicka, M. A., Koepp, D. M., Silver, P. A., and Emerman, M. (1998). HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev* 12, 175-185.
- von Schwedler, U., Kornbluth, R. S., and Trono, D. (1994). The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6992-6996.
- Walczak, C. E., and Mitchison, T. J. (1996). Kinesin-related proteins at mitotic spindle poles: function and regulation. *Cell* 85, 943-946.
- Wang, L., Mukherjee, S., Jia, F., Narayan, O., and Zhao, L. J. (1995). Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat. *J Biol Chem* 270, 25564-25569.
- Waters, J. C., Chen, R. H., Murray, A. W., and Salmon, E. D. (1998). Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *J Cell Biol* 141, 1181-1191.
- Wei, W., Ayad, N. G., Wan, Y., Zhang, G. J., Kirschner, M. W., and Kaelin, W. G., Jr. (2004). Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* 428, 194-198.

- Weil, D., Garcon, L., Harper, M., Dumenil, D., Dautry, F., and Kress, M. (2002). Targeting the kinesin Eg5 to monitor siRNA transfection in mammalian cells. *Biotechniques* 33, 1244-1248.
- Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A., and Strebel, K. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol* 66, 7193-7200.
- Withers-Ward, E. S., Jowett, J. B., Stewart, S. A., Xie, Y. M., Garfinkel, A., Shibagaki, Y., Chow, S. A., Shah, N., Hanaoka, F., Sawitz, D. G., *et al.* (1997). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with HHR23A, a cellular protein implicated in nucleotide excision DNA repair. *J Virol* 71, 9732-9742.
- Yao, X. J., Subbramanian, R. A., Rougeau, N., Boisvert, F., Bergeron, D., and Cohen, E. A. (1995). Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J Virol* 69, 7032-7044.
- Zhao, Y., Cao, J., O'Gorman, M. R., Yu, M., and Yogev, R. (1996). Effect of human immunodeficiency virus type 1 protein R (vpr) gene expression on basic cellular function of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Virol* 70, 5821-5826.
- Zhao, Y., Chen, M., Wang, B., Yang, J., Elder, R. T., Song, X. Q., Yu, M., and Saksena, N. K. (2002). Functional conservation of HIV-1 Vpr and variability in a mother-child pair of long-term non-progressors. *Virus Research* 89, 103-121.
- Zou, L., and Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542-1548.

謝辞

本研究を行うにあたり、多大なるご指導、御鞭撻を賜りました慶應義塾大学理工学部教授、井本正哉博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました理化学研究所、中央研究所、長田抗生物質研究室主任、長田裕之博士に心から感謝の意を表します。本論分の執筆にあたり多大なる御指導を賜りました慶応大学理工学部教授、梅沢一夫博士に心より感謝致します。本論分の遂行にあたり御指導御鞭撻を賜りました慶應義塾大学理工学部助教授、松本緑博士に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、日々御鞭撻を賜りました、理化学研究所、中央研究所、長田抗生物質研究室、渡邊信元博士ならびに臼井健郎博士に謹んで感謝の意を表します。また terpendole E の単離・精製を行い、御供与してくださいました理化学研究所、中央研究所、抗生物質研究室の植木雅志博士に深く感謝致します。

モータータンパク質の解析にあたり、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻 豊島陽子教授、矢島潤一郎博士に感謝致します。またチューブリンタンパク質の精製をはじめとして、様々な面で御協力いただきました豊島研究室の皆様に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、様々な御指導を賜りました理化学研究所、中央研究所、長田抗生物質研究室の所先輩方に深く感謝致します。本論分の執筆にあたり多大なる御指導を賜りました慶應義塾大学理工学部助手、田代悦博士に心から感謝致します。日々の研究を進めるにあたり、常に励まし支えてくださいました井本研究室の皆様に心から御礼申し上げます。

最後に、大学院に進学し研究を続けることを許してくれ、様々な面で支えてくれた家族に心から感謝致します。