

		て つか たか ふみ
氏 名		手 塚 貴 文
学 位		博 士 (医学)
学位記番号		新大院博(医)第25号
学位授与の日付		平成17年 3月23日
学位授与の要件		学位規則第4条第1項該当
博士論文名		Visualization of a Functional KSHV Episome-Maintenance Protein LANA in Living Cells (KSHV の維持蛋白である LANA の生細胞中での機能の視覚化)
論文審査委員	主査 教授	山 本 達 男
	副査 教授	藤 井 雅 寛
	副査 教授	下 條 文 武

博士論文の要旨

カポジ肉腫は以前より知られた疾患であるが、1994年エイズ患者のカポジ肉腫から分離され、1996年ゲノム配列が決定されたウイルスはヘルペスウイルスに属し発癌性を有することが強く疑われており、カポジ肉腫や他のB細胞腫瘍〔primary effusion lymphomas (PEL)、multicentric Castleman's disease等〕との関連が示唆されている。

このウイルスは Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) と命名されたが、KSHV のウイルス蛋白の一つに latency-associated nuclear antigen (LANA) と呼ばれるものがある。LANA は PEL から樹立された細胞株の核内から発見された特異的な蛋白で、EBウイルスの EBNA-1 に類似していることからウイルスエピゾームの維持に関係していると考えられており、実際、ヒト生細胞が分裂する時に、エピゾームとして KSHV の DNA 複製部位(origin of DNA replication, oriP)を含んだプラスミドを維持する働きがあるといわれている。更に、LANA はヒト細胞内で KSHV が持続感染することに対し、重要な役割を担っていると考えられている。しかし、LANA が実際どのような働きをしているのか、生細胞中での働きはどういったものかなど明らかになっていない部分も多い。

我々は、この研究で LANA と、蛍光性で緑色に発色する蛋白(GFP)との融合蛋白(GFP-LANA)を作製し、①融合蛋白である GFP-LANA も LANA の野生株(wild-type LANA)と同様にヒト生細胞中でウイルスエピゾームを維持できるか、②GFP-LANA を使って生細胞中での LANA の動態を観察することにより機能解析に利用できないか、について検討した。

GFP-LANA を安定して発現する細胞株をヒト B 細胞を使って作製し、ウエスタンブロット法で確認した。その細胞株を用いて行った実験で、GFP-LANA は、wild-type LANA と同様に分裂期の染色体に強固に結合し、ヒト B 細胞中で3週間以上にわたって oriP を含んだ KSHV のプラスミドを選択的に維持した。更に分裂中期の2つの娘細胞で、GFP-LANA は、エピゾームに結合し、ほぼ同程度の量に分離されていることが視覚的に確認できた。

自然な状態では、KSHV ウイルスはヒト細胞中で1細胞あたり10~100コピーし

か存在しない為、細胞分裂時にウイルスも均等に分離されることは、ウイルスの恒久的な感染維持にとって非常に重要なことである。従って、このことは細胞分裂の際、LANA が KSHV のウイルスゲノムと結合し一緒に動くことによって、娘細胞へのゲノムの分配が等しく行われるようにし、加えて感染維持に寄与しているのではないかということ推察させる。以上のことより GFP-LANA は、生細胞中での LANA の機能や物力学的な解析をするのに有用な道具になりうると考えられた。

審査結果の要旨

本研究は、カポジ肉腫の原因ウイルスと考えられる KSHV のウイルス蛋白 LANA の機能を解析することを目的として行なわれたものである。カポジ肉腫から分離された KSHV はヘルペスウイルスに属し発癌性を有することが強く疑われている。LANA はウイルスエピゾームの維持に関係していると考えられており、KSHV がヒト細胞中で持続感染することに対し重要な役割を担っていると考えられているが、生細胞中での働きに関しては明らかになっていない部分も多い。申請者らは、蛍光性の蛋白 GFP と LANA との融合蛋白を作製し、LANA の機能解析を行なった。GFP-LANA は LANA と同様に分裂期の染色体に強固に結合し、ヒト B 細胞中で 3 週間以上にわたって KSHV プラスミドを存続させた。さらに、分裂中期の 2 つの娘細胞中で、GFP-LANA が KSHV エピゾームに結合してほぼ同程度に分配されていることを視覚的に確認した。

以上、本研究は生細胞中での LANA の機能解析に GFP-LANA が有用であることを示した点に学位論文としての価値を認める。