

課題番号 : 25指111
研究課題名 : HIV-1 感染によるクロマチンゲノムメンテナンスとゲノム不安定性
主任研究者名 : 志村 まり
分担研究者名 : 該当 なし

キーワード : HIV 感染、ゲノム不安定性、再構成ヌクレオソーム、ウイルス蛋白質 Vpr、染色体異常

研究成果 : 抗エイズ薬の普及により、HIV 感染者の死亡例は激減した。一方、悪性腫瘍の増大が注目されるようになってきている。感染者予後に大きな影響を与える悪性腫瘍の原因解明が期待されるが、現時点では不明な点が多い。HIV 関連リンパ腫は非感染リンパ腫と比べて、遺伝子制御が異なる可能性を、本年、論文及び新聞発表した (Matsunaga et al, *AIDS*, 2014)。特に感染者 DNA のプロモーター領域の hypomethylation 傾向が特徴的である。DNA の hypomethylation はゲノム不安定性との関連が示唆されていることから、感染者のクロマチンゲノムメンテナンスは通常と異なる可能性が考えられた。本研究では、染色体異常を誘導する HIV-1 蛋白質 Vpr の分子機序について、クロマチン動態へ焦点を絞り解明している。申請者は、Vpr は細胞核の不溶画分、染色体上に強い結合で存在すること、Vpr は DNA と結合することを明らかにしている (Shimura et al, *JCB*, 2011; Tachiwana et al, *Can Res*, 2006)。さらに、Vpr はヒストン蛋白質との結合が著明であることを予備的に得ている。これらの仮説を基に、Vpr のクロマチン(核)局在様式、さらに、HIV 感染によるゲノム不安定性が許容されるクロマチン動態を明らかにしたい。

【結果】本年度は、以下の点が再現よく明らかとなった。細胞実験では、HH3-GFP および HH4-GFP の安定発現細胞株を Vpr 発現誘導細胞および Mock 細胞で作成に成功した。次に、再構成ヌクレオソーム(試験管内で作製した精製ヌクレオソーム)とリコンビナント HStag-Vpr での結合実験を試みた。再構成ヌクレオソームは monomer, 12mer、さらに H3H4 からなる subnucleosome (細胞内ヌクレオソーム構成時に存在するフォーム) について、それぞれ Vpr との結合実験を行った。結果、いずれにおいても、Vpr は再構成ヌクレオソームと結合を示唆した。さらに HStag に対する抗 M2 抗体によりスーパーシフトが確認されたため、Vpr と再構成ヌクレオソームは直接結合すると考える。

【考察】今回の結果より、Vpr がヌクレオソームを構成している DNA を足場としている可能性は高い。既に Vpr が DNA と結合することは発表済みである (Tachiwana et al, *Can Res*, 2006)。次に、Vpr-ヌクレオソーム複合体が、ヒストン蛋白質の異所性局在を誘導する可能性は否定できない。本年度の予定になかったが、Vpr 発現細胞で染色体転座を高頻度に再現よく確認している。高頻度な染色体転座の機序には、染色体構造異常が基礎に存在する背景が考えられる。既に論文発表している、ヒストンアセチル化によるヘテロクロマチン HP1 の喪失により (Yamagishi et al, *Nature* 2009; Shimura et al, *JCB*, 2011)、ヘテロクロマチン構造の破綻もその一つ考える。Vpr による複数機序の総合が、クロマチン構造異常のトリガーとなり、染色体断裂や転座が誘導される可能性は否定できないと考える。

Subject No. : 25-indicated-111

Title : HIV-1 induced chromatin genome maintenance and genomic instability

Researchers : Mari SHIMURA

Key word : HIV-1, genomic instability, Vpr, chromatin, reconstitutive nucleosomes

Abstract : HIV-1 infection becomes chronic infection after the introduction of anti-retrovirus therapy, which can be used to control viral production for extended periods, improving patient prognosis. However, malignant tumors have frequently reported in HIV-1-infected patients. Malignant tumor extremely decreases a quality of life of HIV-1-infected patients. Clarifying a mechanism of HIV-1 related malignancy became one of the major issues to overcome. Recent studies including ours findings suggested that HIV-1 infection caused different gene regulation in B-cell lymphomas (Matsunaga et al, *AIDS*, 2014). Especially, DNA hypomethylation tendency in CG islands of promotor region was characteristically observed with HIV-infected cases. Previous findings suggested that DNA hypomethylation was related to genomic instability as well as maintenances on chromosome structures. In this study, we focused chromatin maintenances by HIV-1 Vpr, which induces chromosome abnormalities, such as DNA double strand breaks and centromere abnormality resulting in premature sister chromatid separation (Tachiwana et al, *Can Res*, 2006; Yamagishi et al, *Nature* 2009; Shimura et al, *JCB*, 2011). These findings suggested that Vpr tightly attached to chromatin in insoluble fraction, and recently we figured out that Vpr bound to histones in insoluble fraction. The second year of this project, we have clarified two phenomena. One is for a study using newly established cell lines, which expressing histone H3-EGFP or H4-EGFP in Vpr stable transfectant (MIT-23) or its mock transfectant. The other study was for a binding ability *in vitro* between reconstitutive nucleosomes and recombinant ST-tagged-Vpr. We prepared subnucleosomes, monomer and 12-mer of nucleosomes. Vpr bound to all kinds of nucleosomes. Addition of anti-tag antibody (M2) to nucleosome-Vpr mixture showed band supershift clearly, suggesting that Vpr directly bound to nucleosomes. Our data suggested that Vpr might bind to DNA of nucleosomes or to nucleosomes via DNA. We further hypothesize that Vpr could alter nucleosomes structure. This could be happened locally, since relatively large amount of histones are existed at nuclei. Our previous finding indicated that Vpr especially localized at centromere region, and eliminated kinetochore proteins and centromere heterochromatin protein HP1. Even minor alteration by Vpr, however, it could be an initiation of chromosome structural abnormality. Vpr-induced chromosome structural abnormality may potentially exist, which answers centromere abnormality, PCS and DNA double strand breaks.

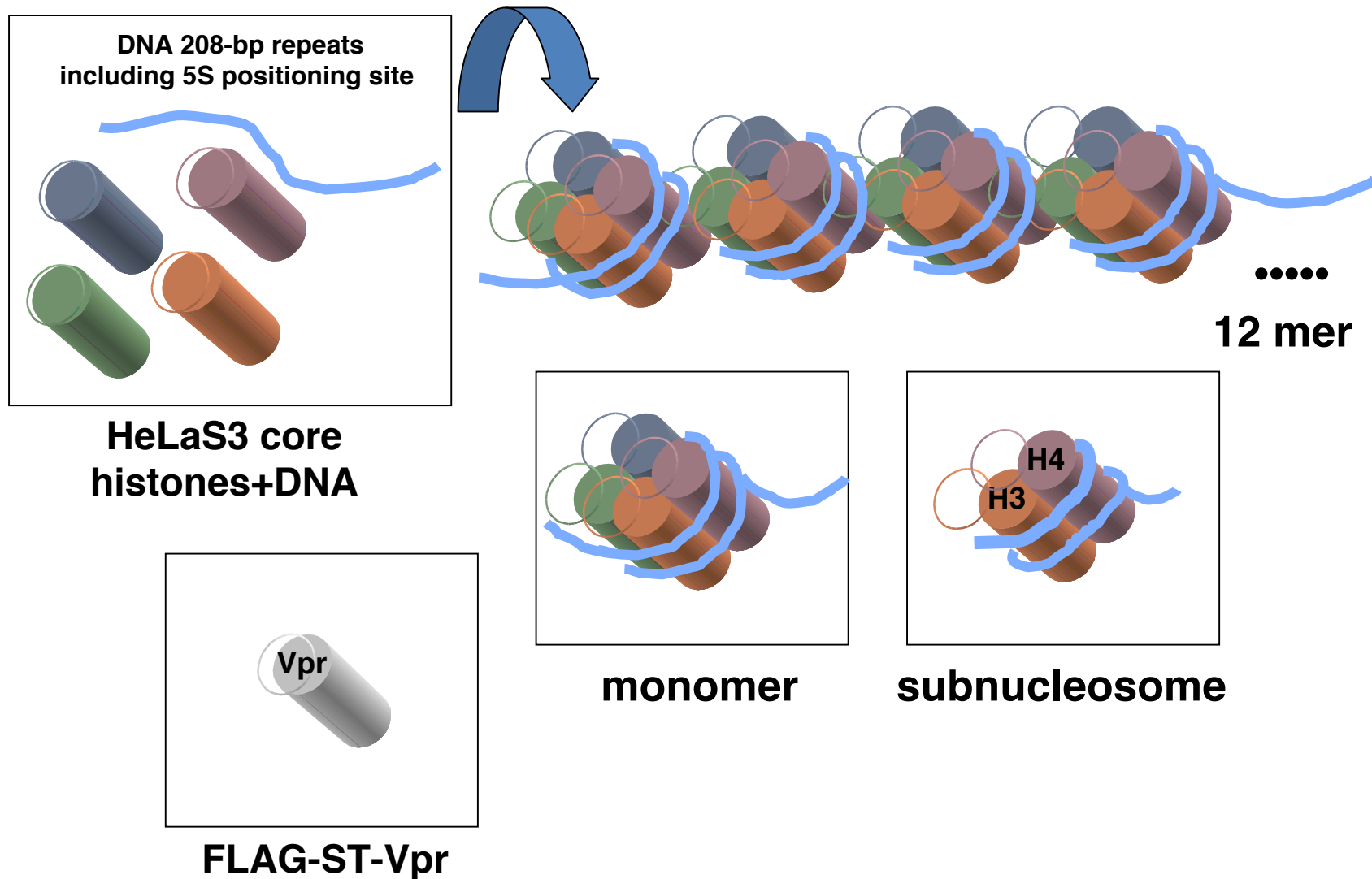
HIV-1感染によるクロマチンゲノム メンテナンスとゲノム不安定性

25指111

研究所難治性疾患研究室

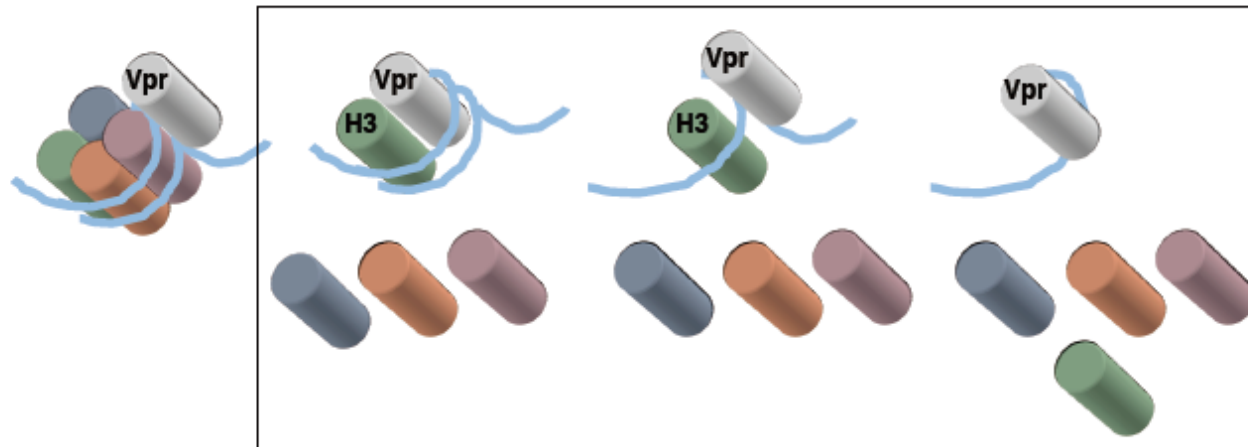
志村まり

再構成ヌクレオソームの作成

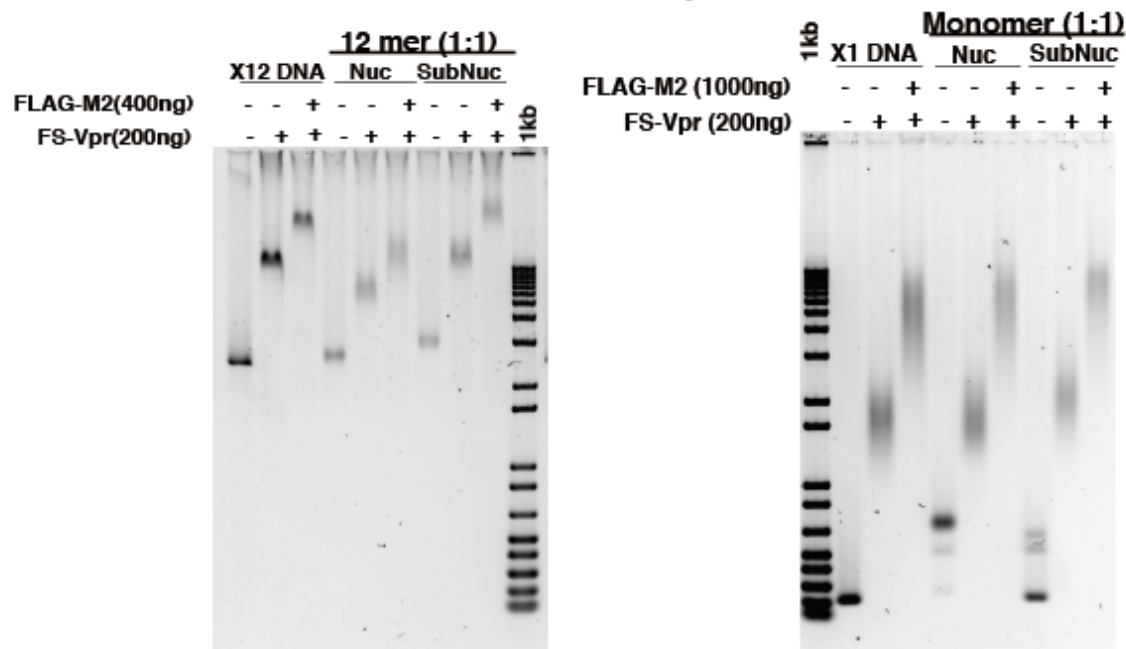


Under the guidance of Ura K., Osaka Univ.

再構成ヌクレオソームとVpr の結合 (仮説)



再構成ヌクレオソームとVpr の結合実験



研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 25指111

研究課題名： HIV-1感染によるクロマチンゲノムメンテナンスとゲノム不安定性

主任研究者名： 志村 まり

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
DNA methylation profiling can classify HIV-associated lymphomas.	Matsunaga A, Shimura M, et al	AIDS	28:503-510	2014

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
エピジェネティクス解析によるエイズ関連悪性リンパ腫の病態理解	松永章弘, 志村まり他	第36回日本分子生物学会	神戸	12月, 2013
メチル化アレイ測定データの分布に基づくサンプル品質管理及び人種差を考慮したプローブフィルタリングの妥当性の検討	松永章弘, 志村まり他	日本人類遺伝学会第58回大会	宮城	11月, 2013

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
国立国際医療研究センター、悪性リンパ腫調査-HIV感染で特有パターン発見	血液内科萩原将太郎、研究所志村まり	日刊工業新聞	新聞, HP	1/7/2014

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当無し				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。