

13. HIV-1 Gag 蛋白の細胞質内輸送経路の解析

分担研究者 森川裕子 (北里大学 生命科学研究所)

研究要旨

HIV-1 Gag 蛋白発現の酵母細胞から細胞壁を除去して培養すると、Gag 粒子が産生される。Gag 蛋白の輸送経路の概要を理解する目的で、酵母のエンドソーム経路輸送蛋白欠損株及びエンドソーム小胞形成及び輸送欠損/変異株を用いて網羅的に解析した。形質膜からのエンドソーム小胞形成に関与する蛋白質群の欠損あるいは変異 (end3, 4, 5, 6) 株では、Gag 蛋白は細胞内の膜画分に mis-sorting し、粒子産生量は減少した。初期及び後期エンドソームの t-SNAREs (Tlg2, Pep12) の欠損株においても、Gag 蛋白は mis-sorting され、粒子産生が低下した。しかしながら、リソソームの t-SNARE (Vam3) 欠損株では Gag 蛋白輸送及び粒子産生は正常に進行した。後期ゴルジ体から後期エンドソームへの輸送蛋白質 Vps10、逆に、後期エンドソームから後期ゴルジ体への輸送蛋白質群 (Vps35, 29)、また、後期エンドソームにおいて腔内への膜陥入に関与する輸送蛋白質 Vps23 (TSG101 ホモログ) は、本細胞系での Gag 蛋白形質膜輸送には不要であった。

A. 研究目的

HIV の主構造蛋白である Gag 蛋白は、cytosol での蛋白合成後、形質膜に targeting し、多量体形成により Gag 粒子を形成して出芽する。近年、このようなウイルス蛋白の輸送や粒子形成・出芽に細胞骨格蛋白やエンドソーム経路の関与が示唆されている。我々はこれを検証する目的で、まず宿主遺伝子改変が可能な真核細胞すなわち酵母細胞を宿主とした Gag 粒子産生系を完成させた。本研究では、酵母のエンドソーム輸送蛋白質の欠損株及びエンドソーム小胞の形成及び輸送の欠損/変異株を用いて、Gag 蛋白の輸送経路を網羅的に解析した。

B. 研究方法

1. Gag 蛋白発現 plasmid と酵母変異株
HIV-1 gag 遺伝子 cDNA を URA3 あるいは TRP 遺伝子を選択マーカーとして有する YEp 型 (ori 2 μ) シャトルベクターの GAP プロモーター下流に挿入した。これらの plasmid をエンドソーム経路の輸送蛋白質群 (図 1) をそれぞれ欠損させた *S. cerevisiae* (S. Emr 博士及び H. Reizman 博士より分与) に導入した。

図 1. 使用したエンドソーム経路輸送蛋白質欠損/変異株

野生株	
t-SNARE 欠損株	
Tlg2 (-)	初期エンドソーム t-SNARE の欠損
Pep12 (-)	後期エンドソーム t-SNARE の欠損
Vam3 (-)	液胞/リソソーム t-SNARE の欠損
Vps 欠損株	
Vps23 (-)	TSG101 homologue の欠損
Vps45 (-)	Tlg2 及び Pep12 と結合する輸送蛋白の欠損
Vps10 (-)	TGN-to-endosome の輸送蛋白欠損
Vps29 (-)	endosome-to-TGN の輸送蛋白欠損
Vps35 (-)	endosome-to-TGN の輸送蛋白欠損
end (エンドソーム小胞形成及び輸送) 欠損/変異株	
end3-1	
end4/Sla2 (-)	talin homologue の欠損
end5-1	Vrp1 の変異
end6 (-)	Rvs161/167 の欠損

2. 酵母細胞のスフェロプラスト化と Gag 粒子の精製

形質転換した酵母細胞を uracil あるいは tryptophan dropout の SD 培地で培養した。細胞壁を常法に従って zymolyase により消化した後、1M sorbitol 添加の等張 YPD 培地で培養した。その培養上清から常法に従い、蔗糖密度勾配遠心により Gag 粒子を精製した。Gag 粒子の検出は、抗 CA 抗体を用いた Western blot で行った。

3. Gag 蛋白の膜親和性

Gag 蛋白発現の酵母スフェロプラスト細胞を超音波破碎し、その遠心上清を膜粗画分として membrane floatation 実験に用いた。floatation 溶媒には 70%/65%/10%蔗糖の step gradient を用いた。分画後、Western blot で Gag 抗原を検出した。

4. Gag 蛋白の細胞内局在

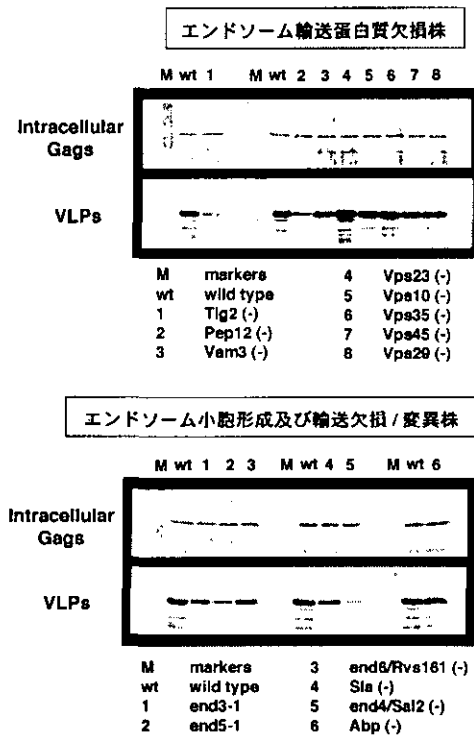
Gag 蛋白発現の酵母細胞をホルマリンで固定し、常法に従って細胞壁を除去した。膜を Triton X-100 で処理した後、抗 CA 抗体・抗 Pep12 (後期エンドソームマーカー) 抗体・抗 Vps10 (後期ゴルジ体マーカー) 抗体・抗 H⁺-ATPase (液胞マーカー) 抗体で反応させた。

C. 研究結果

1. Gag 粒子産生量

エンドソーム経路の輸送蛋白質群 (t-SNARE family と Vps family) のそれぞれの欠損株を用いて、HIV-1 Gag 蛋白を発現させたところ、いずれの細胞でも細胞内 Gag 発現量に差はなかった。これらの細胞をスフェロプラスト化し、Gag 粒子の産生量を調べたところ、初期及び後期エンドソームの t-SNAREs (Tlg2, Pep12) の欠損株では Gag 粒子の産生量低下が認められた。一方、リソソームの t-SNARE (Vam3) 欠損株では粒子産生量の低下はなかった (図 2 上)。

図 2. HIV-1 Gag 蛋白の発現と粒子形成



近年、後期エンドソームを中心とした Gag 輸送経路が示唆されている。そこで、後期

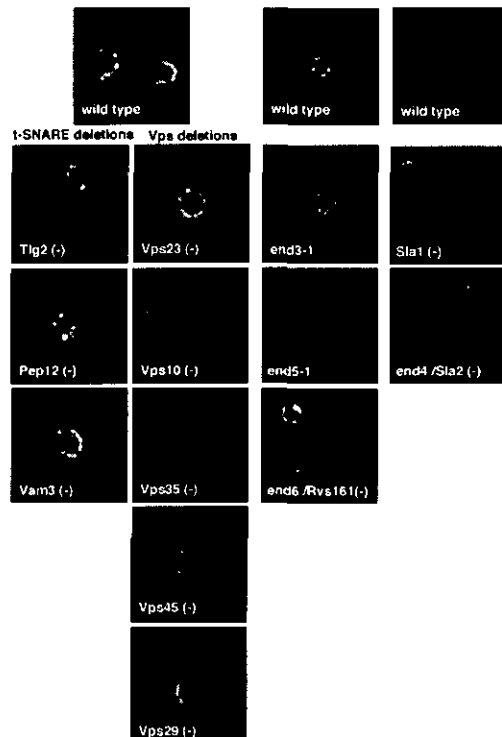
ゴルジ体から後期エンドソームへの輸送蛋白質 Vps10、逆に、後期エンドソームから後期ゴルジ体への輸送蛋白質群 (Vps35, 29)、また、後期エンドソームにおいて腔内への膜陥入に關与する輸送蛋白質 Vps23 (TSG101 ホモログ) の欠損株を用いて調べたところ、これらいずれの細胞でも Gag 粒子産生量に低下は認められなかった (図 2 上)。

形質膜から初期エンドソームの輸送経路を調べる目的で、エンドソーム小胞の形成及びその輸送に關与する蛋白質の欠損/変異株を用いた。調べた多くの細胞で、Gag 粒子産生量の減少が観察された (図 2 下)。

2. Gag 蛋白の細胞内局在

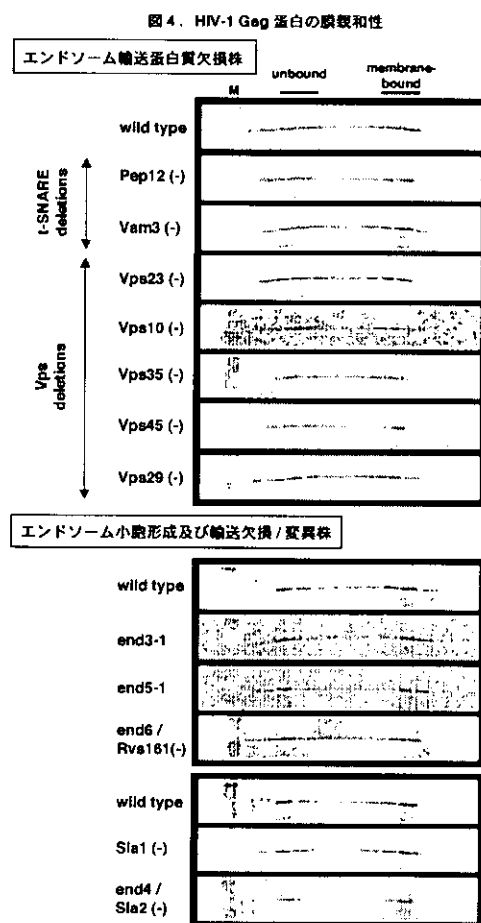
抗 CA 抗体で Gag 蛋白の細胞内局在を調べた。Gag 粒子産生量が減少しなかった細胞では、Gag 抗原は主として形質膜に一致して検出された。これに対し、粒子産生量が低下した細胞では、Gag 抗原は細胞質に broad に存在し、かつ、大小の顆粒状構造物として観察された (図 3)。現在、細胞内小器官特異的マーカー抗体を用いて、その局在の同定を行っている。

図 3. エンドソーム経路輸送蛋白質欠損/変異株における HIV-1 Gag 蛋白の局在



3. Gag 蛋白の膜親和性

Gag 蛋白は cytosol で合成され、膜に結合する。Gag 蛋白の局在に異常が認められた細胞では、Gag 蛋白が膜に結合しているのか否かを明らかにする目的で、membrane floatation 実験を行った。しかしながら、いずれの細胞でも membrane-bound Gag と unbound Gag の量比に大きな差はなかった (図 4)。



D. 考察

本研究では、HIV-1 Gag 蛋白の細胞内輸送経路の概要を理解する目的で、一連のエンドソーム経路 (形質膜→エンドソーム小胞→前期エンドソーム→後期エンドソーム→リソソーム) における欠損及び変異株、すなわち、エンドソーム経路輸送蛋白欠損株及びエンドソーム小胞形成及び輸送欠損/変異株を収集し網羅的に解析した。野生株の細胞では Gag 蛋白は形質膜に targeting し、Gag 粒子を産生するのに対し、初期及び後期エンドソーム t-SNAREs

(Tlg2 及び Pep12) 欠損細胞では、Gag 蛋白が細胞内の膜分画に mis-sorting し、粒子産生量が顕著に低下した。しかしながら、リソソームの t-SNARE (Vam3) 欠損株では Gag 蛋白の形質膜輸送及び粒子産生は正常に進行した。これに対し、形質膜からの endocytosis すなわちエンドソーム小胞の形成・輸送に関する蛋白質群 (end3, 4, 5, 6) を欠損あるいは変異させた細胞では、その効果の大小は様々であったが、多くの場合、粒子産生量が減少した。これらの結果より、Gag 蛋白の細胞内輸送は、後期エンドソームから上流に位置する輸送経路を経るものと考えられた。

近年、レトロウイルスの粒子出芽の宿主因子としてエンドソーム経路の輸送蛋白質群 (後期エンドソームの輸送蛋白質 TSG101 や エンドソーム小胞形成に関する AP50 等) が明らかされている。これら宿主因子は Gag 蛋白の L domain との結合を指標に単離され、粒子出芽を促進する。事実、これら宿主因子との結合を決定する HIV-1 Gag p6 領域 PTAP/PPPYY 配列を欠損あるいは変異させると、粒子は出芽するものの遊離せず、形質膜にとどまる現象が観察される。本研究では、このような粒子の放出低下を期待し、後期エンドソーム経路の輸送蛋白質 (Vps) 群の欠損株を用いた。しかしながら、Vps23 (後期エンドソームにおいて腔内への膜陥入に関与する輸送蛋白質 TSG101 の酵母ホモログ) 欠損株では粒子産生量の減少は認められなかった。また、Vps10 (後期ゴルジ体から後期エンドソームへの輸送蛋白質)、逆に、Vps35 及び 29 (後期エンドソームから後期ゴルジ体への輸送蛋白質群) の欠損細胞においても粒子産生量低下は観察されなかった。

HIV の L domain 効果 (p6 領域の PTAP/PPPYY 配列の欠損あるいは変異により、粒子は出芽するものの遊離せず、形質膜にとどまる現象) は接着細胞やマクロファージ系細胞で顕著であるものの、リンパ球系細胞ではほとんど認められないことが報告されている。この事実と相関するかのよう、HIV 感染細胞を観察すると、マクロファージ系細胞では HIV 粒子はエンドソーム内に出芽、一方、リンパ球系細胞

では形質膜から出芽していることが明らかとなっている。我々は本研究事業において、酵母スフェロプラスト細胞からの HIV-1 Gag 粒子産生系を確立し、その粒子出芽が形質膜からおこることを報告している。これらを包括的に考えると、酵母からの Gag 粒子産生系は、マクロファージ系細胞よりむしろリンパ球系細胞を擬態している可能性が高いと思われる。

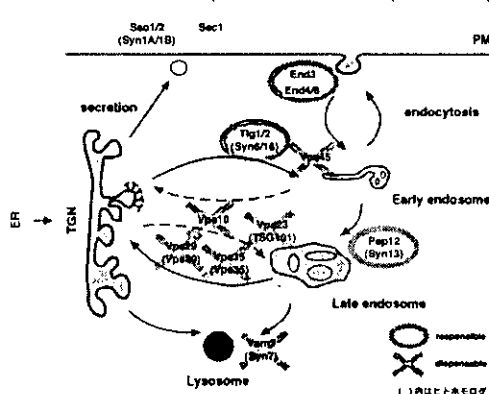
E. 結論

初期及び後期エンドソームの t-SNAREs の欠損により、Gag 蛋白は細胞内膜分画に mis-sorting され、粒子産生が低下した。このような Gag 蛋白の形質膜輸送にはリソソームの t-SNARE は不要であった。

後期ゴルジ体から後期エンドソームへの輸送蛋白質群、逆に、後期エンドソームから後期ゴルジ体への輸送蛋白質群、また、後期エンドソーム自体において腔内への膜陥入に関与する輸送蛋白質 TSG101 ホモログは、本細胞系での Gag 蛋白形質膜輸送には不要であった。

形質膜でのエンドソーム小胞形成に関与する蛋白質群の欠損あるいは変異は、多く場合、Gag 蛋白の mis-sorting となり、粒子産生を低下させた (図 5)。

図 5. Endosomal molecules responsible for intracellular transport of HIV-1 Gag



F. 知的所有権の取得状況
なし

G. 研究発表

論文発表

1. Milan V. Nermut, Wei-Hong Zhang, Garry Francis, Fedor Ciamporx, Yuko Morikawa, and Ian M. Jones.

Time course of Gag protein assembly in HIV-1-infected cells: a study by immunoelectron microscopy.

Virology 305: 219-227 (2003)

2. Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Yuko Morikawa, Maya Isogai, Ai Kawana-Tachikawa, Takashi Odawara, Tetsuya Nakamura, Fernanda Grassi, Brigitte Autran, and Aikichi Iwamoto.

Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55gag virus-like particles activate dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in Gag-specific CD8⁺ T cells by cross-presentation of DCs.

J. Virol. 77: 10250-10259 (2003)

学会発表

1. 森川裕子、後藤俊幸、百瀬文隆

酵母アクチン変異株及びエンドソーム輸送変異株を用いた HIV-1 Gag 蛋白の細胞内輸送経路の解析

第 51 回日本ウイルス学会、京都、2003/10/16-18

2. 永田恭介、百瀬文隆、森川裕子、三林正樹、杉山賢司、滝沢直己、沼尻明子、川口敦史、内藤忠相

インフルエンザウイルスゲノムの転写・複製に関わる宿主因子

第 51 回日本ウイルス学会、京都、2003/10/16-18

3. 百瀬文隆、森川裕子、永田恭介

宿主因子 RAF-2p48/UAP56 と相互作用するインフルエンザウイルス NP アミノ末端領域の機能解析

第 51 回日本ウイルス学会、京都、2003/10/16-18

4. 森川裕子、後藤俊幸、百瀬文隆

HIV-1 Gag 蛋白の細胞内輸送経路

第 26 回日本分子生物学会年会、神戸、2003/12/10-13

5. 百瀬文隆、森川裕子、永田恭介

宿主因子 RAF-2p48/NPI-5/UAP56 と相互作用するインフルエンザウイルス NP アミノ末端領域の機能解析

第 26 回日本分子生物学会年会、神戸、2003/12/10-13

14. HIV アクセサリー蛋白質の機能解析

分担研究者 足立昭夫（徳島大学大学院医学研究科ウイルス病原学分野）

研究要旨 HIV の複製機構および病原性発現機序の解明のため、アクセサリー蛋白質の系統的、網羅的解析を行なっている。本年度は HIV-1 Vif を中心に研究を行い、以下の成果を得た。――(1) 細胞内で合成された Vif の多くは半減期 30 分程度で分解される。この分解速度は許容細胞、非許容細胞など、細胞の種類によらない。他の HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpu、Vpr、Nef の半減期は 3.5 時間程度である。(2)速やかに分解される Vif は細胞質内可溶性分画に存在し、細胞骨格にある Vif は比較的安定で蓄積する傾向にある。(3)過剰の Vif 発現は子孫ウイルスの感染性に抑制的に働く。(4)Vif の細胞内分解はプロテアソーム阻害剤で阻害される。(5)Vif はポリユビキチン化される。(6)Vif の安定的発現には Vif 中の β -ストランド構造（アミノ酸残基 63-70 および 86-89）が重要である。―― これらから、HIV-1 Vif はプロテアソーム分解により適度に発現量を調節され、子孫ウイルス粒子の感染性を至適に保っていると考えられる。細胞骨格に存在する Vif の生物学的意義は不明である。

A. 研究目的

HIV には他のレトロウイルスには存在しない 5 種類のアクセサリー蛋白質（Vif、Vpx、Vpr、Vpu、Nef）があり、ウイルス複製や病原性発現に重要な役割を果たしている。しかし、特定の細胞でしか機能しないこと、また、様々な活性があることなどから、アクセサリー蛋白質の作用機序の全体像は未だ不明である。本研究では、系統的かつ網羅的な変異体解析を基本手法とし、さらに新たな実験系を構築することで HIV のアクセサリー蛋白質の機能解明を目指している。本年度は HIV-1 Vif に集中して解析を行なった。

B. 研究方法

1. プラスミド HIV-1 の感染性分子クローン pNL432 から遺伝子工学的手法により一連の Vif 変異体を構築した。Vif の高発現にはサブゲノミッククローン pNL-A1 を使用した。Vif のポリユビキチン化はユビキチン発現ベクター-pcDNA3.1-HA-Ub を用いて検討した。

2. 細胞とトランスフェクション 293T、HeLa および H9 細胞を使用し、リン酸カルシウム法、リポフェクトアミン法あるいはエレクトロポレーション法でトランスフェクションを行なった。
3. パルスチェイス免疫沈降法 細胞を ^{35}S -メチオニンと ^{35}S -システインで 5 分間パルスラベルし、適当時間チェイスした後、可溶化分画した。可溶化サンプルを特異抗体で免疫沈降した後 SDS-PAGE で分離し、フルオログラフィーによって定量した。
4. ウエスタンブロット法 細胞を可溶化分画し、常法によるウエスタンブロット解析を行なった。
5. ユビキチン化の検出 Vif 高発現プラスミド、ユビキチン発現プラスミドを単独あるいは混合してトランスフェクトした。プロテアソーム阻害剤存在化における細胞内ユビキチン化 Vif の量を抗 Vif 抗体による免疫沈降/抗 HA 抗体によるウエスタンブロット法で解

析した。

6. 逆転写酵素活性 ウイルス粒子の逆転写酵素活性は ^{32}P -dTTP を用いて常法で行なった。

C. 研究結果

1. Vif は細胞の種類によらず速やかにプロテアソーム分解される。 我々は既に、Vif の過剰発現が子孫ウイルス粒子の感染性を低下させることを示している (Akari, H. et al., submitted)。トランスフェクト後の 293T (許容細胞)、H9 (非許容細胞)、HeLa (許容細胞) をパルスラベル/免疫沈降法により調べた結果、いずれの場合も Vif は半減期 30 分程度で分解された。ただし、細胞骨格にある Vif は比較的安定で蓄積する傾向にあった。プロテアソーム阻害剤 MG-132 は細胞内 Vif の分解を抑制した (293T 細胞)。一方、リソソーム分解阻害剤である Bafilomycin A1 や EST、また、カルパインシステムの阻害剤 Calpeptin は抑制しなかった。さらに、Vif がユビキチン化されるかどうかを検討した。Vif やユビキチン発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクトし、一定時間培養後、MG-132 存在下でのユビキチン化 Vif 量を免疫沈降/ウエスタンブロット法で測定した。MG-132 存在下での培養時間が長いほどポリユビキチン化される Vif 量が増大した。
2. β -ストランド構造の形成は Vif 発現量の制御とその機能に重要である。 我々は既に、Vif の 88 および 89 番目のアミノ酸残基が Vif の発現量保持とウイルス感染性に必須であることを観察していた (Fujita, M. et al., 2003. J. Virol. 77: 1626-1632)。これらの残基は β -ストランド構造上 (アミノ酸残基 86-89) にあると推定されることから、この領域および隣接する β -ストランド構造 (アミノ酸残基 63-70) の重要性を欠失体により解析した。その結果、これら二つの β -ストランド構造上にあるアミノ酸 (残基 64-67 および

86-89) は Vif 発現量の維持とウイルス感染性に必須であったが、構造外のアミノ酸 (残基 90-93) は不必要であった。Vif 発現量が野生株よりさらに低下する欠失体はプロテアソームによる分解速度が極めて速い。また、この分解もプロテアソーム阻害剤 (MG-132 および clasto-Lactacystin β -Lactone) で抑制された。

3. Vif の急速なプロテアソーム分解は HIV-1 アクセサリー蛋白質中でユニークである。 4 種の HIV-1 アクセサリー蛋白質のプロテアソーム分解の速度を上記パルスラベル/免疫沈降法で調べた (293T 細胞)。Vpu、Vpr、Nef の半減期は 3.5 時間程度であるのに対し Vif は約 30 分と極端に短かった。MG-132 によるプロテアソーム分解の抑制効果も Vif が最も大きかった。

D. 考察

本年度の研究成果により Vif のプロテアソーム分解のウイルス学的意義はほぼ明確になったと言える (Fujita, M. et al., submitted)。HIV-1 は適当な少量の Vif を細胞内で発現させることで効率良く複製伝播するよう進化してきたように見える。発現量はプロテアソーム分解で調節されることが明らかになるとともにこれに関与する Vif 内構造も同定された。ただ、Vif の細胞内局在と機能との関係は未だ不明である。

E. 結論

Vif は非許容細胞内に存在する APOBEC3G の抗ウイルス効果を無効にする。このメカニズムに関しては、APOBEC3G のプロテアソーム分解の誘導や APOBEC3G translation の阻害などの報告があり、完全なコンセンサスは得られていない。我々の得ている成績は Vif-APOBEC3G 複合体がプロテアソームにより共に分解されるという仮説を支持しない (未発表)。Vif による APOBEC3G の抗ウイルス活性の阻害のメカニズムを解明することは創薬の観点からも極めて

重要である。今後、Vif 立体構造の解明と表裏一体のテーマとして解析を続けたい。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Fujita, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Miyaura, M., Koyama, A.H., Sakai, K., and Adachi, A. 2003. Amino acid residues 88 and 89 in the central hydrophilic region of human immunodeficiency virus type 1 Vif are critical for viral infectivity by enhancing the steady-state expression of Vif. *Journal of Virology* 77: 1626-1632.
 - (2) Nishimura, M., Maeda, M., Yasunaga, J., Kawakami, H., Kaji, R., Adachi, A., Uchiyama, T., and Matsuoka, M. 2003. Influence of cytokine and mannose binding protein gene polymorphisms on human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) provirus load in HTLV-I asymptomatic carriers. *Human Immunology* 64: 453-457.
 - (3) Fujita, M., Yoshida, A., Sakurai, A., Tatsuki, J., Ueno, F., Akari, H., and Adachi, A. 2003. Susceptibility of HVS-immortalized lymphocytic HSC-F cells to various strains and mutants of HIV/SIV. *International Journal of Molecular Medicine* 11: 641-644.
 - (4) Koyama, A., Irie, H., Kato, A., Nagai, Y., and Adachi, A. 2003. Virus multiplication and induction of apoptosis by Sendai virus: role of the C proteins. *Microbes and Infection* 5: 373-378.
 - (5) Ueno, F., Shiota, H., Miyaura, M., Yoshida, A., Sakurai, A., Tatsuki, J., Koyama, A.H., Akari, H., Adachi, A., and Fujita, M. 2003. Vpx and Vpr proteins of HIV-2 up-regulate the viral infectivity by a distinct mechanism in lymphocytic cells. *Microbes and Infection* 5: 387-395.
 - (6) Koyama, A.H., Adachi, A., and Irie, H. 2003. Physiological significance of apoptosis during animal virus infection. *International Reviews of Immunology* 22: 341-359.
 - (7) 足立昭夫、上野史子、藤田美歌子 2003. HIV-1, 2. 新世紀の感染症学, 日本臨床社 (下巻) 497-502.
- ##### 2. 学会発表
- (1) Fujita, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Akari, H., and Adachi, A. (2003) Proteasome-degradation of HIV-1 Vif: mutational analysis. The 2003 Cold Spring Harbor meeting on retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA.
 - (2) Sakaguchi, T., Uchiyama, T., Sugahara, F., Watanabe, H., Adachi, A., and Yoshida, T. (2003) Systematic study of virus-like particle formation by Sendai virus proteins: acceleration of release by C protein and possible involvement of host factors. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, Japan.
 - (3) 小山一、Piroozmand Ahmad、藤田美歌子、足立昭夫、會田浄、入江宏 (2003) 単純ヘルペスウイルス感染細胞における HMGB1 蛋白の挙動. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都.
 - (4) 菅原文博、坂口剛正、内山恒夫、足立昭夫、吉田哲也 (2003) ウイル

- ス様粒子を用いたセンダイウイルス出芽の解析. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都.
- (5) 藤田美歌子、櫻井明子、吉田亜希子、Jere Abhay Jagdish、Ahmad Piroozmand、小山一、明里宏文、足立昭夫 (2003) HIV-1 Vif 蛋白質はプロテアソーム分解に高感受性である. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都.
- (6) 磯貝まや、藤井陽一、藤田美歌子、足立昭夫、竹森利忠、横田 (恒次) 恭子 (2003) HIV-1 Nef 発現が樹状細胞機能に及ぼす影響の解析. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都.
- (7) 藤田美歌子、吉田亜希子、櫻井明子、Jere Abhay Jagdish、Ahmad Piroozmand、小山一、足立昭夫 (2003) HIV-2 Vpx は逆転写反応に関与する. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都.
- (8) 藤田美歌子、櫻井明子、吉田亜希子、Jere Abhay Jagdish、Ahmad Piroozmand、小山一、明里宏文、千葉智樹、田中啓二、足立昭夫 (2003) HIV-1 Vif 蛋白質のプロテアソーム分解とその生物学的意義. 第 26 回日本分子生物学会年会、神戸.
- (9) 小山一、島田佳子、Ahmad Piroozmand、藤田美歌子、入江宏、足立昭夫 (2003) ウイルス感染細胞におけるアポトーシスの誘導と HMGB1 蛋白質の挙動. 第 26 回日本分子生物学会年会、神戸.

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
協力研究報告書

15. HIV-1 Vif タンパク質機能の分子機構に関する研究

協力研究者 明里宏文（国立感染症研究所 筑波医学実験用霊長類センター・エイズ研究センター）

研究要旨：昨年度の研究結果より、HIV-1 Vif はウイルス粒子内においてウイルスプロテアーゼによる Gag 前駆体第一切断部位における processing (P2/NC) のみを特異的に阻害することが示された。重要なことに、この作用は apobec-3G を発現していない permissive 細胞由来ウイルスでも認められることから、apobec-3G とは独立した新たな Vif 機能であると考えられる。本年度は上記 Vif 作用に係る機序についてより詳細な解析を行なった。その結果、① Vif のウイルス取り込みと processing 阻害活性は異なった領域によって規定されており、② Vif のウイルス取り込みは processing 阻害活性に必要であるが十分ではなかった。以上のことより、Vif は単にウイルスに取り込まれる過程で Gag 前駆体と結合したために受動的に processing 阻害活性を示すのではなく、結合領域と機能領域を持つ機能体として P2/NC に合目的に作用することでウイルス複製過程に何らかの役割を示すことが示唆された。

A. 研究目的

Vif タンパク質は、宿主細胞依存性に HIV-1 の感染性を増強することから、以前より宿主因子の存在が指摘されていたが、昨年 Malim らのグループより CEM15, すなわち apobec-3G (Apo) が同定され脚光を浴びている。Apo はその cytidine deaminase 活性により cDNA へ G→A 変異を誘導し DNA 伸長反応を阻害する。一方 Vif は Apo の細胞内分解を促進するとともにウイルス粒子への取り込みを阻害することで抗 Apo 活性を示すとされている。しかし、Vif の役割ははたして抗 Apo 活性のみで説明できるのだろうか？ 実際、高折らの報告では mouse Apo は human Apo と同様に HIV-1 に hypermutation を誘導するにもかかわらずその感染性抑制効果は顕著に低いことから、その cytidine deaminase 活性自体がウイルス感染性低下に直接関与しているとは考えにくい。従って、他のアクセサリ蛋白同様に Vif が複数の機能を有することは想像に難くない。

我々はこれまでの研究より、Vif がウイルス粒子内においてウイルスプロテアーゼによる Gag 前駆体の P2/NC processing を特異的に阻害することを明らかにした（論文投稿中）。重要なことに、この作用は Apo を発現していない細胞

で産生されたウイルスでも認められることから、Apo と独立した新たな Vif 機能であると考えられた。本研究では上記 Vif 作用をより詳細に検討し、その分子機構を明らかにすることを目標とした。

B. 研究方法

HIV-1 Vif タンパク質発現ベクターである pNL-A1 またはその各種 Vif 変異体発現ベクターを、感染性分子クローンである pNL4-3 と共にエレクトロポレーション法により H9 細胞へ遺伝子導入し、24 時間後ウイルスおよび導入細胞を回収した。ウイルスタンパク質は Western blotting 法により解析を行った。

C. 研究結果

Vif タンパク質発現ベクターである pNL-A1 を感染性分子クローンである pNL4-3（またはその vif 欠損変異体）と共に Vif 要求性細胞である H9 細胞へ co-transfection することにより、ウイルス産生細胞へ Vif タンパク質を過剰量（通常の数倍～10 倍程度）発現させると、この細胞由来ウイルスでは p2/NC 間の processing が阻害される結果 CA-p2-NC±p1 からなる Gag 中間体 p33/34 が認められる (Fig. 1)。

この原因について以下のように予想した。すなわ

ち、① Vif は Gag 前駆体の NC 領域に結合することが報告されている。従って、Vif は Gag 前駆体 NC 領域と結合して virion に取り込まれる、② Vif が結合した Gag では p2/NC processing site が cryptic となり、protease によるアクセスが阻害される、③ その結果、CA-p2-NC±p1 からなる Gag 中間体 p33/34 が産生される、というものである。

そこで本作業仮説を実証するため、各種 Vif 欠失変異体 (Fig. 2-1) を用いて検討を行なったところ、興味深いことに予想と異なる結果が得られた。

まず一連の Vif 変異体のウイルス取り込み効率を検討したところ、M4 (Δ 23-99) 及び M5 (Δ 75-114) では細胞内発現は wild-type とほぼ同様であるのに対し、ウイルスへの取り込みが著明に低下していた。しかしその周辺の変異体である M3 (Δ 23-74), M6 (Δ 110-141) 及び M1 (Δ 4-45), M2 (Δ 23-43), M7 (Δ 144-149) では取り込み効率には影響が見られなかった (Fig. 2-2)。以上のことから、75-109aa を含む領域に Vif のウイルス取り込み効率を規定する領域が存在すると考えられた。

次に、これらのウイルスについて p2/NC processing 阻害効率を p33/34 量を指標として解析したところ、M2 では wild-type と同様の阻害活性を示したが、その周辺を含む変異体 M1, M3 では阻害活性が著明に低下していた (Fig. 2-3)。従って、4-23aa を含む領域に processing 阻害を規定する領域が存在すると考えられた。

これらの結果を総合すると、(i) vif のウイルス取り込みが傷害される (M4, M5) と中間体も検出されない。ところが、(ii) M1, M3 はウイルス取り込みが傷害されていないにも関わらず processing 阻害活性が著明に低下していた。すなわち、Vif のウイルス取り込みは processing 阻害活性には必要であるが十分ではないことが示された。以上のことより、Vif は単に P2/NC 近傍に結合して protease によるアクセスが阻害された結果プロセッシングを阻害するのではないことが強く示唆された。

D. 考察

本研究より、Vif はそのウイルス取り込みを規定する領域 (75-109aa) と processing 阻害を規定する領域 (4-23aa) に分けられること、そして Vif がウイルスに取り込まれるだけでは processing 阻害活性を発現するには不十分であることが明らかとなった。この結果は我々の予想、すなわち Gag 前駆体 NC 領域と結合してウイルス粒子に取り込まれることがそのまま単純に processing 阻害活性を発揮することに直結しているだろうという考えに反するものであった。このことから、Vif N 末端領域は独立して p2/NC 間の processing を何らかの方法により阻害していると考えられる。これまでの報告では Vif 機能に関与するドメインとして、EW88, 89 (ユビキチン化に関与)、SLQYLA144-149 (E3 ubiquitin ligase complex である Cull1-SCF との interaction) が報告されているが、N 末端側についてはその機能は全く未知のままであった。その原因の一つとして、N 末端領域がインテグラーとそのゲノムが重なっているため、単純に Vif だけに変異を導入することが難しいことがあげられる。本研究では、Vif を in-trans でウイルス産生細胞へ供給することによりこの問題を解消することが出来た。

今後は、Vif N 末端領域に焦点を絞り、この processing 阻害に係る分子機構およびそのウイルス複製過程への影響についてさらに詳細な解析を行なっていきたい。

E. 結論

本研究結果より、Vif は単にウイルスに取り込まれる過程で Gag 前駆体と結合したために受動的に processing 阻害活性を示すのではなく、結合領域と機能領域を持つ機能体として P2/NC に合目的に作用することでウイルス複製過程に何らかの役割を示すことが示唆された。この知見は、抗 apobec-3G 因子としての Vif とは異なる新規 Vif 機能の解明に重要な知見となるとともに、Vif 作用をベースとしたウイルス成熟過程を阻害する新規抗 HIV 薬の開発に資するものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kao S, **Akari H**, Khan MA, Dettenhofer M, Yu X-F, Strebel K: Human immunodeficiency virus type 1 Vif is efficiently packaged into virions during productive but not chronic infection. **Journal of Virology** 77, 1131-1140, 2003.

(2) Sugimoto C, Tadakuma K, Otani I, Moritoyo T, **Akari H**, Ono F, Yoshikawa Y, Sata T, Izumo S, Mori K: *Nef* gene is required for robust productive infection of simian immunodeficiency virus in T-cell-rich paracortex in lymph nodes. **Journal of Virology** 77, 4169-4180, 2003.

(3) Fujita M, Yoshida A, Sakurai A, Tatsuki J, Ueno F, **Akari H**, Adachi A: Susceptibility of HVS-immortalized lymphocytic HSC-F cells to various strains and mutants of HIV/SIV. **International Journal of Molecular Medicine** 11, 641-644, 2003.

(4) Bour SP, **Akari H**, Miyagi E, Strebel K: Naturally-occurring amino acid substitutions in the HIV-2 ROD envelope glycoprotein regulate its ability to augment viral particle release. **Virology** 309, 85-98, 2003.

(5) Lee WW, Nam KH, Terao K, **Akari H**, Yoshikawa Y: Age-related increase of peripheral CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) T lymphocytes in cynomolgus monkeys: Longitudinal study in relation to thymic involution. **Immunology** 109, 217-225, 2003.

(6) Ueno F, Shiota H, Miyaura M, Yoshida A, Sakurai A, Tatsuki J, Koyama AH, **Akari H**, Adachi A, Fujita M: Vpx and Vpr proteins of human immunodeficiency virus type 2 up-regulate the viral infectivity by a distinct mechanism in lymphocytic cells. **Microbes and Infection** 5, 387-395, 2003.

(7) Nguyen KL, Llano M, **Akari M**, Miyagi M, Poeschla EM, Strebel K, Bour S: Codon optimization of the HIV-1 *vpu* and *vif* genes stabilizes their messenger RNA and allows for highly efficient Rev-independent expression. **Virology**, in press.

(8) **Akari H**, Fujita M, Kao S, Khan MA, Shehu-Xhilaga M, Adachi A, Strebel K: High level expression of Human immunodeficiency virus type 1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of Gag precursor at the p2/NC processing site. Submitted.

2. 学会発表

(1) Fujita M, Sakurai A, Yoshida A, **Akari H**, Adachi A: Proteasome-degradation of HIV-1 Vif: mutational analysis. Cold Spring Harbor meeting on Retroviruses, May 2003.

(2) 李永仲、吉川泰弘、**明里宏文**: HIV-1 Vif 蛋白の機能ドメイン解析。第 5 1 回日本ウイルス学会学術集会、2003 年 10 月。

(3) 藤田美歌子、桜井明子、吉田亜希子、小山西、**明里宏文**、足立昭夫: HIV-1 Vif 蛋白質はプロテアソーム分解に高感受性である。第 5 1 回日本ウイルス学会学術集会、2003 年 10 月。

(4) 原正幸、佐多徹太郎、棚林清、**明里宏文**、山田章雄、向井隼三郎: 新型 SRV/D の分離・同定とウイルス検出法の確立。第 5 1 回日本ウイルス学会学術集会、2003 年 10 月。

G. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

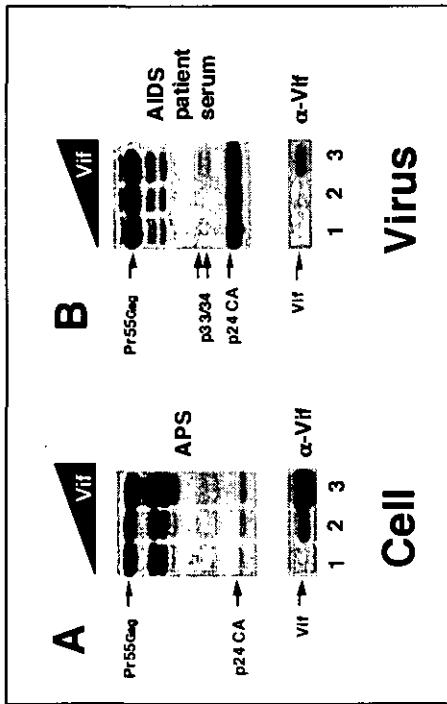


Figure 1. VifはGag前駆体のプロセシングを部分的に阻害する。

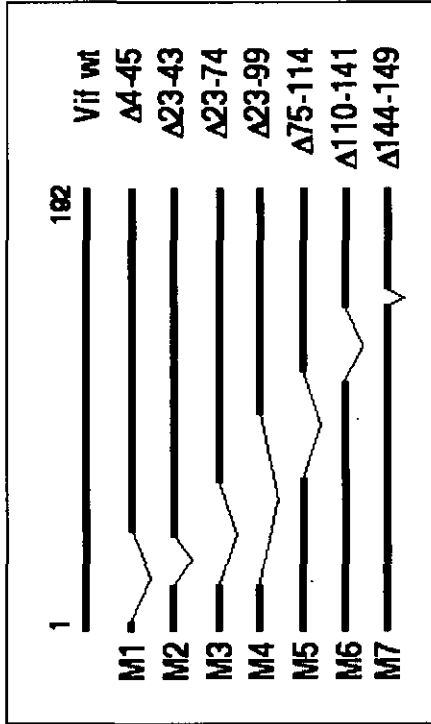


Figure 2-1. Vif欠変異体の模式図

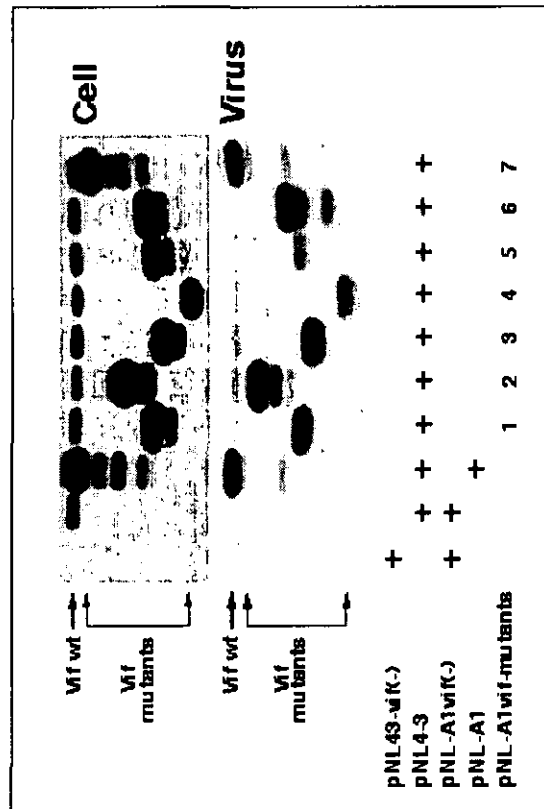


Figure 2-2. Vif中心領域はウイルスパッケージング効率を規定している。

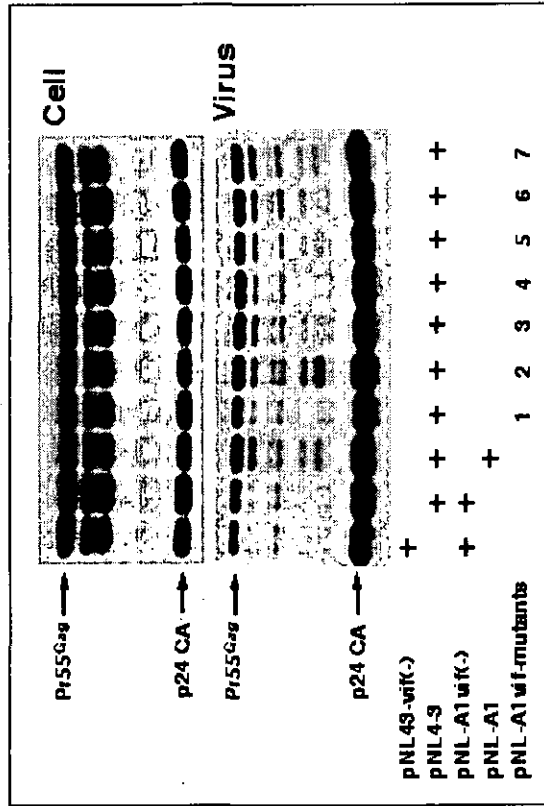


Figure 2-3. VifのパッケージングはP2/NCプロセシング阻害作用に必要だが必ずしも十分ではない。

16. HIV-1 Vpr による宿主細胞周期のかく乱機構に関する研究

主任研究者 佐藤 裕徳 国立感染症研究所

研究要旨 HIV-1 のアクセサリ-蛋白 Vpr は宿主細胞周期が G2 期から M 期に進行するのを抑制する (G2 arrest)。この現象は種特異的であり、ヒト、サルの細胞では見られるが、マウスなどに由来する培養細胞では見られない。一方、下等真核生物の分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) では Vpr による G2 arrest が認められる。昨年度は、分裂酵母モデル系を用いた分子遺伝学的実験により、ヒト 14-3-3 β が Vpr による G2 arrest の誘導に関与する可能性を示したが、本年度はさらに、それ以外のヒト 14-3-3 ファミリー蛋白の中にも同様の機能を有するものがあることを見出した。これらの知見は、Vpr による宿主細胞周期のかく乱の分子機構解明に役立つことが期待されると共に、Vpr の機能阻害を介した HIV の増殖抑制や AIDS の発症阻止に向けた方策の開発にも結びつくことが期待される。

分担研究者 増田 道明 獨協医科大学医学部・
教授

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) のアクセサリ-蛋白 Vpr は宿主細胞周期の G2 期から M 期への進行を抑制する (G2 arrest)。この機能は HIV-1 の複製に対して促進的に働くと考えられており、Vpr は抗 HIV 治療の有効な標的となる可能性がある。しかし、Vpr が G2 arrest を誘導するメカニズムについては不明の点が多い。

Vpr はヒトやサルだけでなく、下等真核生物の分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) にも G2 arrest を誘導する。分子遺伝学的解析に適した分裂酵母モデル系を用いた研究により、Vpr による G2 arrest には Wee1 や Rad24 等の宿主因子が必要であることが示された (Masuda et al., 2000)。Rad24 は 14-3-3 ファミリー蛋白の分裂酵母ホモログである。昨年度の研究により、ヒト 14-3-3 β が分裂酵母の *rad24* 遺伝子欠損を補完し、Vpr による G2 arrest 誘導に対する感受性を賦与することを示した。今年度はその成果をさらに発展させるために、 β 以外のヒト 14-3-3 ファミリー蛋白が同様の機能を持つ可能性を検討することを目的として実験を行った。

B. 研究方法

HIV-1 NL4-3 株 (徳島大学・足立昭夫博士より分与) の *vpr* 遺伝子を PCR により増幅して分裂酵母用発現ベクター pREP-1 の *nmt1* プロモータの下流にクローニングし、pREP1-vpr (チアミンの除去により Vpr の発現誘導可能な発現プラズミド) を構築した。一方、GenBank に登録された種々のヒト 14-3-3 mRNA の塩基配列に基づいて作成したプライマーを用いて、ヒト由来株化培養細胞 (HeLa, HEK293) の mRNA あるいは

ヒト脳 mRNA (Clontech 社) を鋳型として RT-PCR を行い、14-3-3 γ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 θ および σ の cDNA を単離した。各 cDNA を分裂酵母用プラズミド pAUR224 のサイトメガロウイルスプロモータの下流にクローニングし、一連の 14-3-3 発現プラズミドを構築した。分裂酵母の *rad24* 遺伝子欠損株 (東京大学・岡山博人博士より分与) に pREP1-vpr を導入したものに pAUR-14-3-3 γ ~ σ のいずれかをさらに導入し、aureobacillin 選択により形質転換株を得た。pAUR-14-3-3 β の形質転換株は昨年度作成したものをを用いた。これらの形質転換株をチアミン存在下および非存在下で培養し、G2 arrest の誘導を *cdc* phenotype の有無により判定した。また、Bleomycin 処理を行い、DNA 傷害による G2 チェックポイント機構の誘導の有無を調べた。ヒト 14-3-3 蛋白と分裂酵母ホモログの系統樹は、neighbor-joining 法により作成した。

C. 研究成果

分裂酵母で Vpr を発現させると G2 arrest の誘導に伴い細胞の伸長 (*cdc* 表現型) が認められる。一方、*rad24* 遺伝子を欠損した分裂酵母変異株では Vpr の発現に伴う *cdc* 表現型が見られない。この変異株に種々のヒト 14-3-3 の cDNA を導入し発現させたところ、その一部において DNA 傷害による G2 チェックポイント機構の誘導および Vpr による G2 arrest への感受性が回復し、*cdc* 表現型を示すようになった (表 1)。すなわち、昨年度示したように 14-3-3 β が *rad24* の欠損を補完して Bleomycin や Vpr に対する反応性を賦与するのに加えて、14-3-3 ζ も同様の機能が認められた。また、14-3-3 ϵ を導入した株でも Bleomycin や Vpr への反応性が若干回復したが、その程度は顕著ではなかった。

表 1. 分裂酵母における Vpr と Bleomycin による G2 arrest 誘導の有無

		Vpr	Bleomycin	
野生株		+	+	
Rad24 欠損株	Ctrl.	—	—	
	14-3-3	β	+	+
		γ	—	—
		ε	±	±
		ζ	+	+
		η	—	—
		θ	—	—
σ	—	—		

アミノ酸配列に基づく系統樹を作成すると、弱い補完作用を示した 14-3-3 ε は Rad24 と比較的近縁であることが示された (図 1)。一方 14-3-3 β ととは必ずしも Rad24 と近縁にあるわけではないが、相互に近い関係にあることが示された。

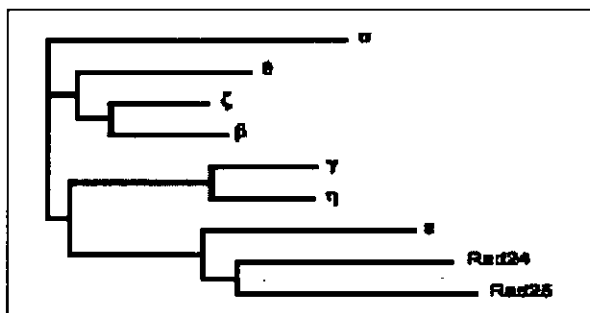


図 1. 14-3-3 ファミリー蛋白および分裂酵母ホモログのアミノ酸配列に基づく系統樹比較

D. 考察

Vpr による分裂酵母の G2 arrest には 14-3-3 の分裂酵母ホモログ Rad24 が必須である (Masuda et al., J. Virol., 2000)。14-3-3 ファミリー蛋白は哺乳動物の脳に豊富な蛋白として見つかったが、現在では種々の細胞で発現されることが明らかになっている。ヒト 14-3-3 ファミリー蛋白は今までに 7 種類が報告されており、種々の細胞内シグナル伝達における役割が見出されている。その中には細胞周期制御に関与する可能性が示されているものもある。例えば WEE1 は細胞周期の G2 期から M 期への進行に対するブレーキと

なるが、14-3-3 β はリン酸化 WEE1 に結合し、WEE1 の分解を抑制するという報告がある (Wang et al., Cell Growth Differ., 2000)。また、CDC25 は核内において M 期への進行を促進するアクセルとして機能するが、14-3-3 はリン酸化 CDC25 に結合し CDC25 の核内移行を抑制するというモデルも提唱され (Peng et al., Science, 1997)、それを支持する知見がその後も報告されている。

今回の実験結果から、14-3-3 β および γ は分裂酵母の rad24 欠損変異を補完し、Vpr による G2 arrest の誘導に対する感受性を賦与することが明らかとなった。これは、ヒト細胞においてもこれらの 14-3-3 蛋白が Vpr による G2 arrest に関与することを示唆する。Vpr による G2 arrest の誘導が 14-3-3 による WEE1 の安定化や CDC25 の核内移行の阻害を介するかは不明であり、今後の検討を要する。

14-3-3 は一般にリン酸化セリンを有する蛋白と結合する。一方、Vpr の Ser79 のリン酸化が G2 arrest 誘導に重要である可能性が報告されている (Zhou & Ratner, J. Virol., 2000)。従って、14-3-3 がリン酸化 Vpr と直接結合する可能性も考えられ、今後検証していく予定である。

E. 結論

Vpr による G2 arrest の誘導メカニズムに関する本研究および今後のより詳細な研究は、Vpr の作用機構を標的とした新たな抗 HIV 治療に向けた技術の開発につながるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Matsuda M, Matsuda N, Watanabe A, Fujisawa R, Yamamoto K, Masuda M. Cell cycle arrest induction by an adenoviral vector expressing HIV-1 Vpr in bovine and feline cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 311(3):748-753, 2003.

2. 学会発表

(1) 松田 真理, 山本 勝彦, 藤澤 隆一, 増田 道明. レーザースキャニングサイトメータを用いた HIV-1 Vpr の細胞周期への影響の解析. 日本ウイルス学会第 51 回学術集会, 京都, 平成 15 年 10 月.

17. HIV 及びその関連ウイルスの増殖機構及び増殖制御に関する研究

- HIV 粒子のプロテオーム解析 -

協力研究者 三隅将吾 熊本大学・大学院医学薬学研究部・薬学生化学 助教授

研究要旨：本研究における HIV 粒子のプロテオーム解析は、感染性ウイルス粒子より調製した蛋白質群を分析対象として、ウイルス複製に必須である新規の蛋白質や翻訳時・後修飾を明らかにすることによって、蛋白質分子レベルでウイルス複製の素過程を理解することを目的とする。本解析は、遺伝子・ゲノム情報からでは予測できない HIV-1 ウイルス粒子の真の姿を理解することができる有効な手段であり、ひいては抗 HIV 薬開発のための新規標的分子の発見につながると期待される。現在までに以下のような知見を得ることができた。

1) HIV-1 ウイルス粒子内の一部の p24 capsid 蛋白質は、そのアミノ末端 Pro₁ がホルミル化の修飾を受けていることが明らかになった。ホルミル化 HIV-1 p24 capsid 蛋白質のウイルス複製における意義・役割は、現在解析中であるが、HIV-1 p24 間の相互作用に重要な役割を担っていることが知られており、このホルミル化と core 形成およびその disassembly との関連性が示唆される。

2) ウイルス粒子内に宿主由来の peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophilin A (CyPA) の 2 個の isoform を同定した (pIs 6.40, 6.53)。これらの内 CyPA_{6.53} は、アミノ末端がアセチル化を受けていることが同定された。さらに、CyPA は、ウイルス粒子外にも同定され (pI 6.88)、この CyPA_{6.88} は、ウイルス粒子が出芽後、成熟化する際にウイルス粒子内からウイルス粒子外へ再分布することがわかった。

3) 現在、HIV-1_{LAV-1} 及び HIV-1_{JRFL} を対象としたウイルス粒子のプロテオームマッピングを進行中である。

A. 研究目的

蛋白質は、ゲノムから転写・翻訳された後、その機能に直接影響する様々な翻訳時・後修飾を受けるものが多く存在することが知られている。つまり、疾患のメカニズムの解明のためにヒトゲノムに存在する約 3 万の遺伝子を解析するのみでは困難であるということである。また、細胞内での mRNA の発現量と蛋白質の産生量は必ずしも一致せず、蛋白質の安定性や、蛋白質-蛋白質相互作用は遺伝子を見ているだけでは解明できない。このようなことから、蛋白質を網羅的に分析するプロテオーム解析は注目されている。

このような状況のもと我々は、これまでに i) N-ミリスチル化蛋白質のアミノ酸配列決定法の確立や、ii) HIV-1 protease の自殺阻害機構の解明及び、iii) AIDS ワクチンの創製に mass spectrometry を駆使し、AIDS 研究において一貫して蛋白質の側から解析してきた。

このことを活かし、本研究では、ウイルス粒子中の蛋白質のプロテオーム解析をおこなうために、HIV 粒子の精製から手がけ、精製したウイルス粒子中の宿主蛋白質の同定や蛋白質の翻訳時・後修飾の解析することにより、蛋白質分子レベルでウイルスの複製過程を理解することを目的とする。

B. 研究方法

1) 精製ウイルス粒子の調製

HIV-1 持続感染細胞 (CEM/LAV-1、CEM-CCR5/JRFL) の培養上清をフィルター濾過後、超遠心し、ウイルスと microvesicle 混合物を得たのち、得られた沈査をズブチリンで処理し、さらに SepharoseCL-4B カラムを用いてゲル濾過した精製ウイルスを可溶化しプロテオーム解析の試料とした。

2) 2次元ゲル電気泳動及び染色法

二次元電気泳動は、一次元目を固定化

pH ゲル(pH6-11L)で、二次元目をアクリルアミドゲル(12-14%)で行い、銀染色およびサイプロロビーで染色した。

3) Peptide mass fingerprint (PMF) 法および Post source decay (PSD) による蛋白質の同定・解析

最終的に蛋白質の同定はトリプシンによる酵素処理、MALDI TOF-MS による質量分析、及びデータベース検索により作製した。

C. 実験結果

HIV-1 粒子の HIV 粒子のプロテオーム解析を行うにあたりウイルス粒子のみを得る必要がある。そこで HIV-1 持続感染細胞 (CEM/LAV-1) の培養上清中に、ウイルス粒子とともに放出される microvesicle を除去するために、超遠心により得られたウイルス沈査からゲル濾過によって血清由来のアルブミンを除去後、ズブチリシンを作用させることにより、microvesicle をほぼ完全に除去することに成功した。ただし、この時、得られたウイルス粒子は、同時にウイルス表面の gp120 もズブチリシンにより除去されているが、ウイルス粒子内のウイルス構成蛋白質には影響がなかった。本研究では、ウイルスの複製に必須であるウイルス粒子内の構成蛋白質の同定とその翻訳時・後修飾の同定を目的としているためこのズブチリシン処理ウイルス粒子を以下のプロテオーム解析のサンプルとして用いプロテオーム解析を行った。その結果、Fig. 1 に示すような HIV-1_{LAV-1} 粒子の 2D-PAGE MAP 作製することができ、ウイルス粒子内に 24 個の蛋白質による特異的なスポットが観察された (尚、Fig. 1 は subtilisin 未処理のウイルス粒子の 2D gel パターンに、subtilisin 処理のウイルス粒子の 2D gel パターン及び miclovesicle のみの 2D gel パターンを重ね合わせたもの)。そのうち、ウイルス由来 (9 個) 及び宿主由来 (2 個) の蛋白質を現在までに同定した。

これらの内、我々はまず spot6 に注目し詳細な解析を行ったところ、PMF 及び PSD 解析の結果から、spot6 は HIV-1 p24 由来のスポットであることを同定した。さらに、spot6 の PMF 作製の際、HIV-1_{LAV-1}p24 の N 末

端 tryptic peptide (1-18) の理論値から分子量が約 28 異なる分子量 2044 の tryptic peptide が得られ、この peptide は、2D gel を銀染色した場合だけでなく、クーマシーブリリアントブルーR250 でも得られることから銀染色による副生成物ではないことを確認した (Fig. 2A)。0.6 N HCl 処理により 2044 のピークが消失したこと及び PSD による解析から、N 末端 Pro がホルミル化されていることが判った (Fig. 2B)。

次に、我々は spot 7, 8, 25 について詳細な解析をおこなった。その結果、spot 7 及び 8 よりウイルス粒子内には等電点の異なる 2 つの cyclophilin A (CyPA) isoform (pIs 6.40, and 6.53) が取り込まれていることが判った (Fig. 3)。これら isoform の内、pI 6.53 の isoform は、N 末端がアセチル化を受けていることが N 末端 tryptic peptide(1-18) の PSD 解析及び N-acylamino acid releasing enzyme を用いて明らかとなった (data not shown)。さらに spot 25 の解析により pI 6.88 の isoform は、subtilisin 処理により 2D gel 上からそのスポットが消失するとともに (Fig. 3)、実際に電子顕微鏡を用いたウイルス粒子の解析から (Fig. 4) ウイルス粒子表面に存在することが明らかとなった。

われわれは同時に、R5 ウイルスとして知られる HIV-1_{JRF1} 株を対象としたプロテオーム解析を行っている。本解析によって、HIV-1_{JRF1} 株においても HIV-1_{LAV-1} 株と同様に少なくとも等電点の異なる 3 つの isoform でウイルス粒子に取り込んでいることが確認された (Fig. 5)。

D. 考察

HIV-1 p24 のアミノ末端 Pro₁ は、Asp₅₁ と salt bridge を形成することにより HIV-1 p24 間の相互作用に必要な β -hairpin 構造形成に重要な役割を担っていることが知られており (Gitti et al., Science 273 (1996) 231 -235)、HIV-1 p24 のアミノ末端がホルミル化されることにより β -hairpin 構造形成が阻害され、その結果、HIV-1 p24 間の相互作用が弱められ、ウイルスが宿主細胞へ感染後、HIV-1 p24 core が disassembly される際にホルミル化が寄与

している可能性が示唆された。さらに、本研究によりウイルス粒子には 3 つの CyPA isoform が存在し、その内、明確なウイルス学的な意義は明確ではないが CyPA6.53 はアミノ末端がアセチル化を受けウイルス粒子内に存在することが明らかとなった。また、HIV-1 持続感染細胞 (CEM/LAV-1) の細胞表面には、CyPA が発現していないことが FACS 分析により明らかにすることができたことから、CyPA6.88 はウイルス粒子が成熟することに伴って、ウイルス粒子内からウイルス粒子外へ移行することが示唆された。また、HIV-1 粒子における CyPA の少なくとも 3 つの isoform の存在は、HIV-1_{JM74} 株においても観察されたことから、HIV-1 におけるその普遍性が示唆された。なお、ウイルス複製におけるこの意義については現在解析中である。

E. 結論

プロテオーム解析は、ウイルス複製に必須である新規の蛋白質や翻訳時・後修飾を同定することにより蛋白質分子レベルでウイルスの複製過程を理解する上で有効な手段になり得る。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Misumi, S., Takamune, N., and Shoji, S. 2003. Proteomics of HIV-1 virion, *BIOMEDICAL AND PHARMACEUTICAL APPLICATIONS OF PROTEOMICS*. Chapter 14. Kluwer Academic Publisher.
- 2) Misumi, S., Endo, M., Mukai, R., Tachibana, K., Umeda, M., Honda, T., Takamune, N., and Shoji, S. 2003. A novel cyclic peptide immunization strategy for preventing HIV-1/AIDS infection and progression. *J. Biol. Chem.* 278:32335-32343.
- 3) 三隅将吾, 高宗暢暁, 庄司省三. 2003. HIV-1 感染および病態進行を阻止する新規環状ペプチドワクチンの開発に向かって —HIV-1 コレセプターに対する自己抗体誘導による HIV-1 感染阻害—*医学のあゆみ* 207: 67-72.
- 4) Misumi, S., Takamune, N., Ohtsubo, Y., Waniguchi, K., and Shoji, S. in press. Zn²⁺

binding to cysteine-rich domain of extracellular human Immunodeficiency virus type-1 Tat protein is associated with Tat protein-induced apoptosis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*.

- 5) Misumi, S., T. Fuchigami, N. Takamune, I. Takahashi, M. Takama, and S. Shoji. 2002. Three isoforms of cyclophilin A associated with human immunodeficiency virus type 1 were found by proteomics using two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J. Virol.* 76:10000-10008.
- 6) Fuchigami, T., S. Misumi, N. Takamune, I. Takahashi, M. Takama, and S. Shoji. 2002. Acid-labile formylation of amino terminal proline of human immunodeficiency virus type 1 p24gag was found by proteomics using two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293:1107-1113.
- 7) 庄司省三、三隅将吾, 2002. HIV-1 粒子のプロテオーム解析. *日本臨床* 60、636-640

Fig. 1 2D Gel Image of HIV-1_{LAV-1}

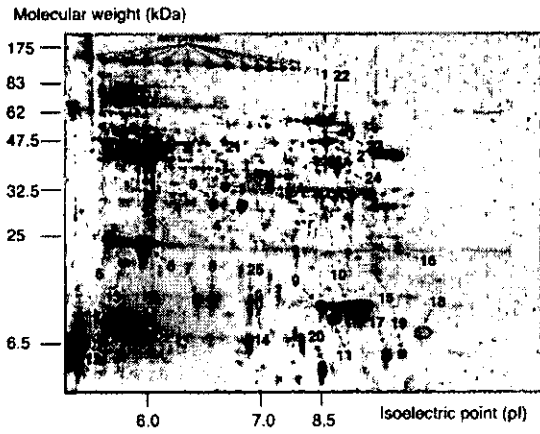


Fig. 3 2D Gel Image Analysis

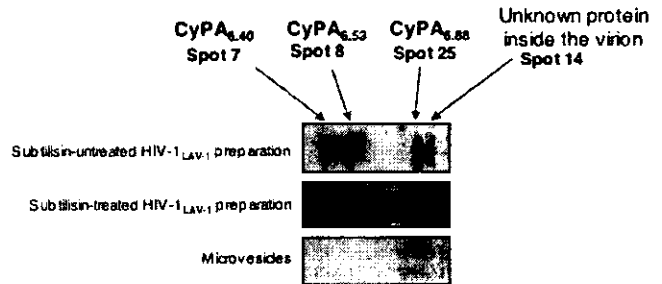


Fig. 2A Formylation of HIV-1 p24 Capsid

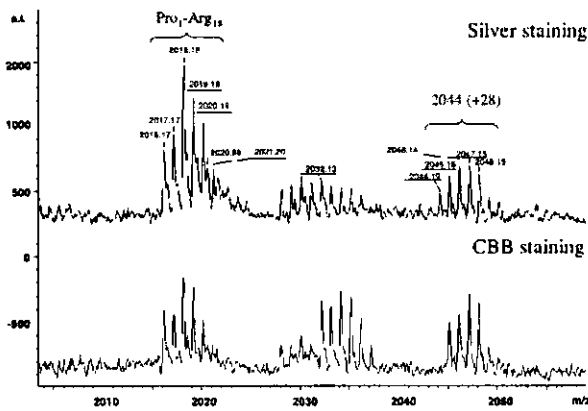


Fig. 4 Immunoelectron Microscopic Analysis

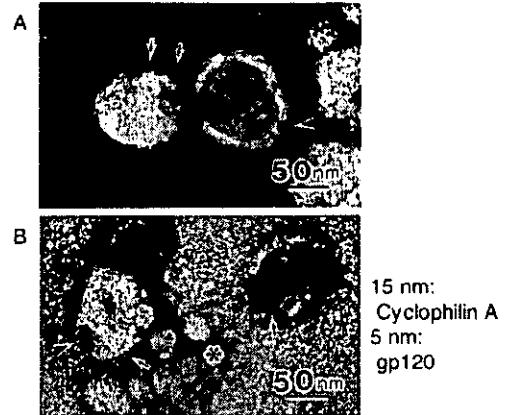


Fig. 2 B Formylation of HIV-1 p24 Capsid

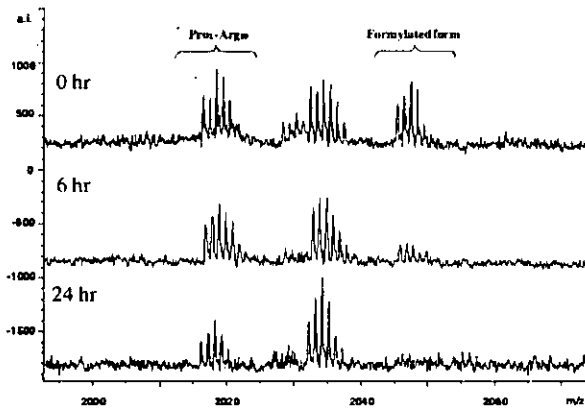
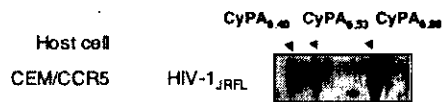


Fig. 5 Isoforms of Cyclophilin A in HIV-1_{JRFL}



18. HIV 逆転写酵素の基質選択性制御に関する研究

主任研究者： 佐藤 裕徳 国立感染症研究所 遺伝子解析室
研究協力者： 横山 勝 同上

研究要旨：本研究では、逆転写酵素 (RT) の機能調節に関わる可能性のある細胞質因子として ATP に注目し、生理濃度 ATP が精製 RT の基質選択性に及ぼす影響を調べた。ATP は、RT の可逆的非競合阻害 (混合阻害) 因子として働き、基質親和性の昂進と基質アナログ (抗 HIV 薬) 親和性の低下を誘起した。ATP の薬剤親和性低下の効果は、RT 耐性変異導入により顕著に昂進した。一方、耐性変異導入 RT は、ATP 非存在下では薬剤感受性であった。以上の結果は、ATP が RT の基質選択性と薬剤感受性を Trans に制御する働きをもつこと、ATP 効果と耐性変異の協調で初めて高度の薬剤耐性が発現することを示唆する。

A. 研究目的

ATP は、細胞質に mM 濃度で存在し、種々の蛋白質の活性発現に重要な役割を果たす。また、レトロウイルス逆転写反応の逆反応であるピロリン酸分解反応に関わるとの報告がある。本研究では、細胞質での逆転写反応中に逆転写酵素 (RT) と直接相互作用してその機能を調節する可能性のある細胞質因子として ATP に注目し、生理的濃度の ATP が RT の基質選択性に及ぼす影響を生化学的手法を用いて調べた。

B. 研究方法

- 1) ヌクレオチド：NTPs, dNTPs, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTPs}$, poly(rA)・p(dT)₁₂₋₁₈, (Pharmacia Biotech Inc), ddNTPs (TAKARA), AZTTP, D4TTP, 3TCTP (Moravek Biochemicals) を用いた。
- 2) 逆転写酵素 (RT) の発現と精製：東南アジア流行株 HIV-1 subtypeE の感染性分子クローン 93JP-NH1 (薬剤感受性株)、と ERT-mt6 (基質アナログ高度多剤耐性) (Sato et al., J. Virol., 2001) を用い、RT p51, p66 サブユニット配列を pQE9(QIAGEN)に導入し大腸菌を用いて別個に発現し、Ni 親和性クロマトグラフィーとゲルろ過により活性型 His-p51/p66 ヘテロ 2 量体 RT を精製した。
- 3) RT 活性測定： $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ を基質とし Poly(rA) p(dT)₁₂₋₁₈ への $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTMP}$ 取り込み量を測定した。37°C, 10 分間の反応において 1.0 nmol の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{TMP}$ 取り

込みに必要な酵素量を 1 unit と定義した。

- 4) 薬剤感受性試験：精製 RT 標品の逆転写活性を 50% 阻害する基質アナログの濃度を IC₅₀ と定義した。この際、鋳型として、Poly(rA) または M13 ファージ ssDNA を用いた。
- 5) 定常状態の反応速度解析：Poly(rA) p(dT)₁₂₋₁₈ を鋳型/プライマーとした 37°C, 20 分間の逆転写反応において、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ 基質濃度 [S] [nmol] と RNA/DNA への $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{TMP}$ 取り込み速度 [v] [nmol/min] との関係測定し、ミカエリス・メンテンモデルに従い酵素の基質親和性、および触媒素反応速度の尺度となる反応速度定数 (K_m , k_{cat}) を求めた。また、[S] [v] 曲線およびラインウィーバー・パークプロットを用いて逆転写反応影響因子の作用機序を解析し、影響因子の酵素親和性の指標となる反応速度定数 (K_i) を求めた。

C. 研究結果

- 1) 高比活性 ($>10^5$ units/mg protein) を示す p51/p66 ヘテロ 2 量体 RT を、1 l 大腸菌培養液から >4 mg 回収する系を作った (Fig.1)。
- 2) 多剤耐性株 ERT-mt6 RT のヌクレオチド類似体 IC₅₀ は、薬剤感受性株 93JP-NH1 RT の IC₅₀ に比べ、1.8~4.4 倍増加した (Table 1)。しかし、以前として薬剤に高度感受性であり、ERT-mt6 ウイルスの薬剤高度耐性 (ヌクレオチド類似体 IC₅₀ が >400 倍増加) を十分説明できなかった。

- 3) ATP 濃度依存的に AZTTP に対する IC_{50} が増加した。この変化は、特に多剤耐性株由来 RT で顕著に認められ、増加率は 400 倍に達した (Fig.2)。耐性変異と ATP が協調することで、初めて RT の高度薬剤耐性が観測された。
- 4) [S] [v] 曲線およびラインウィーバー・バークプロットにより、ATP 濃度依存的に V_{max} と K_m 低下が観測された (Fig.3)。ATP は RT の非競合阻害 (混合阻害) 因子と考えられる (Fig.4)。ATP の K_i^{ATP} は 1.4mM (dTTP-RT 複合体) または 6.1mM (dTTP 非結合時の RT) であった。
- 5) 薬剤感受性株および多剤耐性株由来 RT とともに、ATP 濃度依存的に、 K_m , k_{cat} が減少した (Fig. 5)。ATP には、基質親和性を高め、DNA 合成速度を低下させる働きがあると考えられる。
- 6) ATP 濃度依存的に、AZTTP および d4TTP の K_i が増加した。この変化は、特に多剤耐性株由来 RT で顕著に認められた (Fig.6)。ATP 効果と耐性変異が協調すると、基質アナログ親和性を大きく低下させる働きがあると考えられる。

D. 考察

精製 RT の種々の基質アナログに対する IC_{50} の解析から、RT 耐性変異導入のみでは高度の薬剤耐性は発現しないことが判明した (Table 1)。ウイルスに認められる高度耐性の発現には、耐性変異と協調して RT 構造を変化させる細胞因子が必要と考えた。そこで逆転写の場である細胞質に豊富に存在するとされる ATP に注目し、生理的濃度の IC_{50} 値への影響を調べた。その結果、ATP は、耐性変異と協調して酵素の薬剤感受性を劇的に低下させることが見いだされた (Fig.2)。

続いて、ATP と薬剤耐性変異の作用機序を反応速度解析により検証した。その結果、ATP は、RT の非競合型活性阻害 (混合阻害) 因子として働き、RT の ①基質親和性を高める (K_m 低下)、②DNA 伸張速度を低下させる (k_{cat} 低下)、③基質アナログ親和性を低める (K_i 低下) などの効果を誘起することが示唆された (Fig. 3, 4)。③の効果は耐性変異により顕著に昂進した。ATP は、RT の基質結合部位とは異なる部位に結合して酵素構造と活性変

化を誘起する allosteric effector としての性質をもつ。HIV の高度薬剤耐性の発現には、RT 耐性変異と ATP 結合に伴う構造変化の協調が必要と考えられる。

E. 結論

ATP は HIV-1 RT の非競合阻害因子として基質選択性の向上効果をもつことを示した。また、抗 HIV 薬剤耐性株の精製 RT は、ATP 非存在下では薬剤感受性であることを示した。今後、RT-ATP 相互作用の阻止によりウイルス薬剤感受性と変異性の人為制御 (ウイルス弱毒化) が可能か否かについて検証したい。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Matsuoka-Aizawa S, Sato H, Hachiya A, Tsuchiya K, Takebe Y, Kimura S, Oka S. Isolation and Molecular Characterization of a Nelfinavir (NFV)-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 That Exhibits NFV-Dependent Enhancement of Replication. *J. Virol.* 77: 318-27, 2003.
- (2) 佐藤裕徳. 耐性獲得とウイルスの進化. 現代医療社特集: HIV 感染症 - 基礎と臨床, 第 35 巻 6 号, pp33-38, 2003.

2. 口頭発表

- (1) 佐藤裕徳, 富田宏美, 横山勝: HIV-1 逆転写酵素のアロステリック調節機構の進化. 第 51 回ウイルス学会総会, 2003 年, 京都.
- (2) 久保嘉直, 田中勇悦, 佐藤裕徳, 山本直樹: CD4-independent HIV-1 感染に対する cyclodextrin の阻害効果. 第 51 回ウイルス学会総会, 2003 年, 京都.
- (1) 横山勝, 富田宏美, 佐藤裕徳: HIV-1 逆転写酵素の核酸選択性制御と薬剤耐性の機構. 第 16 回日本エイズ学会総会, 2003 年, 神戸.

H. 知的所有権の取得状況

なし