

HIV-1 およびインフルエンザウイルスのゲノムRNA 核外輸送機構の解明に基づく創薬

所 属 国立感染症研究所感染病理部

研究者 高橋秀宗

研究要旨 HIV-1 のゲノム RNA 核外輸送機構の解明に基づく創薬のために、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 観察技術により、HIV-1 Rev と宿主 Crm1 の結合を可視化することに成功した。Rev と Crm1 の結合による FRET は細胞の核内、核膜で起きていること、レプトマイシン B により阻害できることが判明した。この Rev-Crm1 の結合は、蛍光顕微鏡のみならず、フローサイトメトリーでも検出可能になった。また活性型 Ran を強制発現させることでさらに強い FRET を得ることができ、Rev と Crm1 の結合を阻害する分子、薬剤のスクリーニングに用いることが可能であると考えられた。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所 感染病理部
飛梅実
- (2) 大阪大学微生物学研究所 松田道行
- (3) (株) イムノヘルス ジャパン
森山雅美
- (4) (株) 大道産業 山口靖雄

A. 研究目的

HIV-1 ウイルスゲノムの核外輸送、粒子への取り込みを阻害する薬剤の開発、分子の同定を目標として、Rev 及び Crm1 の細胞内局在を観察し、細胞内での結合を FRET の技術を用いて可視化し、さらに動態をリアルタイムに観察できるプローブを作成した。HIV-1 の遺伝子産物である Rev は HIV-1 RNA ゲノムに位置する Rev response element

(RRE)配列に結合しウイルス RNA を核外へ輸送する。Rev 単独ではウイルス RNA を核外へ輸送できず、宿主細胞に存在するタンパク質を利用する。Crm1 は importin β ファミリーに属するレセプタータンパク質であり、Rev と結合しウイルス RNA を核外へ輸送することが判明している。また Crm1 と直接結合し分子輸送を阻害する抗生物質の一種であるレプトマイシン B を用いて Rev と Crm1 の会合により生ずる FRET を阻害できるかどうかを検討した。生細胞での観察を可能にすることは将来的に薬剤のスクリーニングを考えた場合、薬剤の非特異的な効果、たとえば細胞毒性等による細胞死の影響を排除できる。また可視化することで薬剤のウイルスゲノム輸送に与える影響をダイレクトに観察でき得られる情報量が

増えると考えられた。さらに薬剤スクリーニングの段階でも特別な計測機器を必要とせず既存の光学機器で対応可能である。

B. 研究方法

① 細胞培養

細胞内局在を観察する細胞としてヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa 細胞を用いた。各細胞を直径 35mm のガラスボトムを有する培養皿に播き、作成した発現プラスミドを fugene 6 を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後に培地をフェノールレッド不含の無血清培地に置換した。培地交換の 4 時間後に観察した。

② 細胞の観察

観察には zweiss 社製 AXIObart200M 蛍光顕微鏡を用い、ローパー製 CCD カメラを用いて画像取り込みを行った。解析にはモレキュラーデバイス社のメタモルフソフトウエアを用いた。各蛍光分子に対応した光学フィルターはオメガ社の物を用いた。CFP の取り込みには 440AF21 励起、455DRLP ダイクロイックミラー、480AF30 蛍光フィルターを用いた。YFP の取り込みには 485DF22 励起、505DRLP ダイクロイックミラー、535DF35 蛍光フィルターを用いた。対物レンズは 20 倍を使用し、キセノンランプからの光を 0.1 秒照射した。

FRET の観察には HeLa 細胞を用いた。トランスフェクション試薬 Fugene 6 を用いて、Rev-CFP、Crm1-YFP をコトランスフェクションした。24 時間後培養液を血清、フェノールレッド不含の培養液に置換し、4 時間後より観察を開始した。CFP の取り込みには 440AF21 励起、455DRLP ダイクロイック

クミラー、480AF30 蛍光フィルターを用いた。YFP の取り込みには 485DF22 励起、505DRLP ダイクロイックミラー、435DF35 蛍光フィルターを用いた。また FRET の像を撮影するため、440AF21 励起、455DRLP ダイクロイックミラー、535DF35 蛍光フィルターのセットを用いた。レプトマイシン B 添加前に FRET が目的の細胞で観察できることを確認した。レプトマイシン B 添加後の FRET 画像の推移を経時的に観察した。

③ FRET プロープの作成

Rev 及び Crm1 の細胞内での動態を可視化するため、蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現する系の構築を行った。Rev と融合発現する蛍光タンパク質として CFP (Cyan fluorescence protein) を用いた。CFP は励起波長 433 nm であり、475 nm の蛍光を発する。発現ベクターとして β アクチンプロモーターを持つ pCAGGS を用いた。Rev 蛋白質の N 末、または C 末に CFP を有する 2 種類の発現ベクターを構築した。Crm1 との結合を起こさない Rev 変異体を作成し、同様に N 末、C 末に CFP を有するベクターを作成した。

Crm1 の融合蛍光蛋白質として YFP (Yellow fluorescence protein) を用いた。YFP は励起波長 470 nm であり、530 nm の蛍光を発する。発現ベクターは上記の Rev と CFP 融合蛋白質発現に用いた pCAGGS を用いた。同様に Crm1 の N 末、C 末に YFP を融合させたベクターを構築した。

④ FRET を観察する最適なプロープの選択

今回用いる CFP と YFP による FRET の観察

では、CFP と YFP が近接した時に CFP 励起波長の光を当てることにより、CFP は 475 nm 付近の蛍光を発する。この 475 nm 付近の光は YFP の励起波長に相当することから CFP を励起することで YFP の蛍光を得ることができる。この FRET はドナーとアクセプターに相当する CFP、YFP の距離に依存し、非常に近接した場合のみ得ることができる。CFP 融合タンパクと YFP 融合タンパクのそれぞれが結合することが明らかである分子同士においてであっても、複合体中の CFP と YFP の距離が離れてしまうと

FRET が観察できない。よって最も効率よく FRET が観察できるプローブの選択を行った。また、2 分子 FRET の効率はドナー側の CFP とアクセプター側の YFP の発現量にも依存する。プローブの選択と同時に、最適な CFP と YFP の発現比についての検討を行った。CFP の蛍光による YFP の蛍光を正確に捉えるためには、CFP 励起波長により YFP 蛍光チャンネルに漏れこむ蛍光、YFP 励起波長により CFP 蛍光チャンネルに漏れこむ蛍光の影響を除外しなければならない。そのため CFP 単独発現細胞、YFP 単独発現細胞を準備し、各チャンネルへの蛍光の漏れを補正する係数を算出した。CFP の発する蛍光により励起される YFP の蛍光

(FRET) を撮影するため、440AF21 励起、455DRLP ダイクロイックミラー、535DF35 蛍光フィルターの設定を用いた。このフィルターセットで得られた画像データ及び上記補正係数から実際に起きている FRET 値を算出した。観察する細胞は HeLa 細胞を用いた。Fugene 6 により Rev および Crm1 発現ベクターをトランスフェクションし、FRET を数値化した。

⑤ Rev 及び Crm1 の細胞内での結合に由来する FRET の観察

最適なプローブの組み合わせと発現比を選択し、細胞内での Rev 及び Crm1 の会合部位の検索を行った。最適なペアのプローブを HeLa 細胞にコトランスフェクションした。24 時間後にフェノールレッド、血清不含の培養液に交換し、4 時間後に観察に用いた。観察には 60 倍対物レンズを用いて、細胞内での局在について検討した。

⑥ Ran-GTP 発現プラスミドの作成

薬剤スクリーニングを目標とした場合、薬剤の効果を示すシグナルが強いほど判定が容易になる。高いシグナルを持った Rev、Crm1 の FRET 検出系は本研究の要となる。低分子 G 蛋白質ファミリーに属する Ran は、エネルギー依存的に細胞質から核内への輸送に積極的に関与していることが知られており、Rev と Crm1 の結合に由来する FRET 効率を増強できるかについて検討した。ヒト cDNA ライブラリーよりスタートコドンまたはストップコドンを含み Xho I サイト、Not I サイトを持つプライマーを用いて PCR 法にて Ran cDNA を増幅した。増幅した PCR 産物を TA クローニングベクターである pCR-TOPO に挿入し、シークエンスを行いヒト Ran 遺伝子であることを確認した。また、恒常的に GTP フォームである Ran を作出するため、Ran 遺伝子に変異を導入した。変異の挿入には、変異を含んだ前後 10 塩基を含む相補的な配列を持つ合成 DNA を作成し、pfu 酵素を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応の後 Dpn I 酵素を用いて変換前の配列を持つテンプレート DNA を消

化し、JM109 コンピテント細胞へトランスフォームした。得られたコロニーから DNA を抽出し、目的の遺伝子配列が挿入されているのをシーケンスにより確認できたもの実験に用いた。変換前の遺伝子配列を持つ Ran (wtRan)、変換後の遺伝子を持つ Ran (ActiveRan) を pCAGGS ベクターの XhoI、NotI サイトへ挿入した。

⑦ FRET 効率の評価

観察する細胞は HeLa 細胞を用いた。Fugene 6 を用いて、wtRan、ActiveRan、及び Crm1-YFP、Rev-CFP をコトランスフェクションした。トランスフェクション後 24 時間後に培養液を血清、フェノールレッド不含のものに換え、4 時間後より観察を開始した。CFP の取り込みには 440AF21 励起、455DRLP ダイクロイックミラー、480AF30 蛍光フィルターを用いた。YFP の取り込みには 485DF22 励起、505DRLP ダイクロイックミラー、535DF35 蛍光フィルターを用いた。また FRET の像を撮影するため、440AF21 励起、455DRLP ダイクロイックミラー、535DF35 蛍光フィルターのセットを用いた。撮影後の画像データより、wtRan 存在下、activeRan 存在下での FRET 値の比較を行った。

⑧ 蛍光顕微鏡以外の機器での FRET 検出
フローサイトメトリー法では、流路中を流れる細胞個々にレーザー光を照射し、反射した蛍光、散乱光を検出し、個々の細胞の大きさ等の情報を得ることができる。細胞内での分子の局在等の情報を得ることはできないが、多数の細胞についての解析を短時間で行うことができる点が優れている。

また FRET が起きている細胞、起きていない細胞を分離回収することができるため、Rev-Crm1 結合の阻害分子の同定を進めるような研究に有用である。本研究では、短波長のレーザーを使用できる FACS Aria を用いて、Rev-Crm1 の会合による FRET を検出できるかについて検討した。解析に用いる細胞は 293F 細胞を用いた。293F 細胞はヒト腎臓由来の浮遊細胞であり、無血清培地に馴化されている。トランスフェクション試薬 293fectin を用いて、Rev-CFP、Crm1-YFP 発現プラスミドを導入し、24 時間後に解析を行った。解析には FACS Aria を使用した。CFP の励起には 407 nm のバイオレットレーザーを用い、蛍光の検出には 470 nm の蛍光フィルターを用いた。YFP の検出には 488 nm のブルーレーザーを照射し 530 nm の蛍光を検出した。FRET の検出には 407 nm のレーザーを照射し、530 nm の蛍光を検出した。FRET の値は FRET/CFP の計算式より ratio を算出し、ratio の mean intensity を測定した。

(倫理面への配慮)

特に患者試料の使用や動物実験を行っていない。

C. 研究結果

① Rev と Crm1 の局在

Rev は細胞内において細胞質に多く局在していた。また Crm1 も同様に多くを細胞質に認めた。Crm1 と結合することのできない mutant Rev (mRev) は核小体に凝集していることがわかった。mRev と同時に Crm1 を発現させると、Rev と同様に Crm1 の一部も核小体に凝集した。Rev にペプチドタグを融合させた分子を免疫染色によって検出して

も局在について同様の結果を得た。

② FRET プローブの選択

今回作成した FRET 用プローブは Rev の N 末に CFP を融合した Rev-CFP、Rev の C 末に CFP を融合した Rev-CFP、Crm1 の N 末に YFP を融合した YFP-Crm1、及び Crm1 の C 末に Venus を融合した Crm1-YFP である。Rev と Crm1 のペアの組み合わせを変えてトランスフェクションし FRET の値を調べた (図 2)。最も高い FRET の値を示すペアは CFP-Rev、Crm1-YFP のペアであり、CFP-Rev : Crm1-YFP = 1 : 5 の発現比でトランスフェクションした場合に最も高い FRET ratio = 0.08 を示した。他のペアでの FRET ratio は 0.02 から 0.06 と低い値であった。

③ FRET の局在

FRET ratio 0.08 を示す CFP-Rev、Crm1-Venus のペアを用いて生きた細胞中のどこで Rev と Crm1 の結合に由来する FRET が起きているかについて検討したところ、核内及び核膜に一致して FRET が観察された。細胞内で Crm1 の核内から細胞質へ、細胞質から核内への移行にかかわっている Ran の Rev-Crm1 の結合に由来する FRET へ与える影響について検討した。wtRan の強制発現系においては CFP-Rev および YFP-Crm1 による FRET の値には大きな変化は認められなかった。しかしながら GTP フォームである activeRan を導入することで、およそ 2 倍の Ratio 0.16 程度の FRET 値を得ることができた。

④ 薬剤による Rev/Crm1 FRET の阻害

レプトマイシン B 添加前及び添加後の画像データを 1 分間隔で取得した。レプトマイシンは 10 µg/ml の濃度で添加した。添加前には核内及び核膜周囲で観察されていた FRET の像は添加後 5 分後より急速に減衰し始め、9 分後には認められなくなった。

⑤ フローサイトメトリーによる FRET の検出

FACSAria を用いても CFP-Rev、Crm1-YFP のペアによる FRET は検出可能であった。他のペアでは蛍光顕微鏡での観察と同様に低い値であった。

D. 考察

HIV-1 Rev はウイルスゲノム RNA を核内から細胞質へ輸送するのに必須のタンパクである。ウイルスゲノム RNA のウイルス粒子への取り込みは細胞膜直下であると考えられており、ウイルスゲノム RNA の輸送を遮断した場合にはウイルス粒子の感染性は消失すると考える。現在存在する AIDS 治療薬は HIV-1 の pol 遺伝子由来産物である逆転写酵素、およびプロテアーゼに対する阻害剤である。これらの薬剤を 3 剤組み合わせ投与するカクテル療法は劇的な治療効果を挙げている。しかしながら、最近の報告ではこれらの薬剤に耐性を持つウイルスの存在が証明されるのと同時に、感染初期より耐性ウイルスを持つ患者の存在が明らかとなった。このことは、初期感染時での耐性ウイルスの存在、すなわち耐性ウイルスの蔓延が現実問題となったことを示す。新規の薬剤の開発、また特に既存の薬剤とは違った標的をもつ薬剤の開発が急務である。

Rev を標的とした AIDS 治療薬は存在しないが、Rev は HIV-1 の増殖には必須のタンパクであり、Rev を抑える薬剤を創出することで AIDS 治療の効果増強に貢献できるものとする。

Rev 単独ではウイルス RNA を核外へ輸送できず、宿主細胞に存在するタンパク質を利用する。Crm1 は importin β ファミリーに属するレセプタータンパク質で HIV-1 Rev と結合し、ウイルス RNA を核外への輸送に関与する。上記の実験から、Rev、Crm1 共に多くは細胞質に存在するが、相互の結合は核内から核膜にかけて起きていることが示された。これは核内で Rev-Crm1-RNA ゲノムの複合体が形成されて後、細胞質へ輸送されることを示唆する。また GTP 結合型の活性化 Ran を同時に強制発現することで、Rev-Crm1 の結合を示す FRET の値が増強したことから、Rev-Crm1-RNA ゲノムの複合体形成は GTP 型 Ran によって誘導されることが示された。HIV-1 RNA ゲノムの核外輸送にはこのように多くの分子が介在していることが示唆される。Rev、Crm1 共に多くは細胞質に存在するが、相互の会合は核内から核膜にかけて起きていることが示された。Rev-Crm1 の結合に由来する FRET を観察する系では、Rev-Crm1 の結合を直接または間接的に阻害する薬剤、分子のスクリーニングに有効であるとする。また、0.08 という FRET レシオの値は過去の報告と比較しても遜色ない値であり、検出も比較的容易である。

タンパク間結合の阻害を誘導する薬剤やタンパク分子について FRET を用いてスクリーニングするということは、FRET が起きている状態から FRET の消失を検出するこ

とになるため、高い FRET 値が要求される。活性型 Ran の補完により、さらに良好な FRET 値を得ることも可能になっており、スクリーニングに十分な感度を持っていると考える。

レプトマイシン B は直接 Crm1 に作用し、核内から細胞質への移動を阻害する。我々の作成した FRET プローブは Crm1 の機能を阻害することで、核内、核膜で観察された FRET が消失した。過去の報告よりレプトマイシン B は Rev 依存的な HIV-1 ゲノム RNA 輸送を阻害することが知られている。今回の実験では、RNA ゲノム輸送の阻害を FRET の消失という形で捉えられており、RNA ゲノム輸送の阻害分子、薬剤のスクリーニングに有効な系であることが示唆された。

また、今回作成したプローブでは、蛍光顕微鏡のみならず、フローサイトメトリーを用いても FRET の検出が可能であった。FacsAria を用いた計測では、FRET/CFP ratio の mean intensity はおよそ 9.7 であり、FRET が起きない状態の 7.4 に比べ有意な差をもっている。また、FACS Aria は細胞のソート機能を備えており、任意の細胞群を分取することが可能である。Rev-Crm1 の会合を阻害する分子を同定する場合、cDNA ライブラリーを FRET が起きている細胞群に導入し、FRET が消失した細胞を分離し、導入された遺伝子を検索することが可能になると考えられた。

E. まとめ

HIV-1 Rev と宿主因子 Crm1 の細胞内局在を免疫染色等により観察した。生細胞中で Rev と Crm1 の結合を FRET の技術を用いて

可視化することに成功した。作製したプローブを用いて検討した結果、Rev-Crm1の結合は細胞の核内、核膜で起きていること、レプトマイシンBによって阻害されることが判明した。この Rev-Crm1 の結合に由来する FRET は、蛍光顕微鏡のみならず、フローサイトメトリーでも検出可能であった。また GTP 型 activeRan を強制発現することでさらに強い FRET 値を得ることができ、Rev-Crm1 の結合を阻害する分子、薬剤のスクリーニングに用いることが可能であると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ueno, T. Tokunaga, K. Sawa, H. Maeda, M. Chiba, J. Kojima, A. Hasegawa, H. Shoya, Y. Sata, T. Kurata, T. Takahashi, H. Nucleolin and the packaging signal, ψ promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Microbiol Immunol* 48(2), 111-118, 2004.

Takahashi, H. Sawa, H. Hasegawa, H. Nagashima, K. Sata, T. Kurata, T. Topoisomerase I dissociates human Immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) reverse transcriptase from genomic RNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 1073-1078, 2004.

Harada T, Tatsumi M, Takahashi H, Sata T, Kurata T, Kojima A. Specific reactions between purified HIV-1 particles and CD4(+)cell membrane fragments in a cell-free system of virus fusion or entry. *Microbes Infect* 6(5), 421-428, 2004.

Hasegawa H, Katano H, Tanno M, Masuo S, Ae T, Sato Y, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T,

Sata T. BCL-6-positive human herpesvirus 8-associated solid lymphoma arising from liver and spleen as multiple nodular lesions. *Leuk Lymphoma* 45(10):2169-2172, 2004

Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. *Journal of Medical Virology*, 2004. *J Med Virol.* ;75(1):130-6. 2005

Terai K, Matsuda M. Ras binding opens c-Raf to expose the docking site for mitogen-activated protein kinase kinase. *EMBO Rep.* 2005 ;6(3):251-5.

Kurokawa K, Itoh RE, Yoshizaki H, Nakamura YO, Matsuda M. Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol Biol Cell.* 2004;15(3):1003-10

Takaya A, Ohba Y, Kurokawa K, Matsuda M. RalA activation at nascent lamellipodia of epidermal growth factor-stimulated Cos7 cells and migrating Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell.* 2004;15(6):2549-57.

Aoki K, Nakamura T, Matsuda M. Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Biol Chem.* 2004;279(1):713-9.

Iwasaki T, Inoue S, Tanaka K, Sato Y,

Morikawa S, Hayasaka D, Moriyama M,
Ono T, Kanai S, Yamada A, Kurata T.
Characterization of Oita virus 296/1972 of
Rhabdoviridae isolated from a horseshoe bat
bearing characteristics of both lyssavirus and
vesiculovirus. Arch Virol.;149(6):1139-54.
2004.

Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H,
Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa

H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H.
Synthetic double-stranded RNA Poly(I:C)
combined with mucosal vaccine protects
against influenza virus infection. J Virol.
79(5):2910-9. 2005.

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し