

は15年程前にTjianらによってSV40 late geneを活性化する因子として見つかったHLH-Zip型の転写因子である。その後の研究で、TGF-betaやCaspase 9, Angiotensinogenなどの遺伝子プロモーターにAP-4の結合サイトが存在することが報告されたが、相互作用因子をはじめ詳細な遺伝子発現制御機構については一切報告がない。AP-4結合サイトがLTR TATA box近傍に存在し、またその配列が良く保存されていることから、AP-4がHIVの転写において何らかの作用を及ぼしている可能性が推察された。

(倫理面への配慮)

本研究には該当せず。

## B. 方法

1. 細胞株とその培養：HIV非感染細胞株CEM, HL-60, JurkatとHIV潜伏感染細胞株ACH2, U1細胞を用いた。これらの培養は通常の方法で行い、HIV潜伏感染を維持するために20 $\mu$ MのAZTを培地に加えた。また、ヒト腎由来繊維芽細胞293細胞株も使用した。
2. プラスミッド：AP-4 cDNAとMycタグを発現するpMyc-AP-4を作成した。pCMV-TatとpNL4-3はそれぞれTat発現およびHIVのフルサイズゲノムを含むプラスミッドである。TBPを発現するpCMV-TBPは田村教授より供与された。その他、種々のAP-4変異体発現プラスミッドを新たに作成した。HIV-1 LTRの制御下にluciferase遺伝子を発現するCD12-lucは以前の報告にあるものを用いた。そのAP-4部位に変異を加えた種々のプラスミッドを新たにsite-directed mutagenesis法で作成した。これらの塩基配列を定法で決定した。
3. 組み換え蛋白とその精製：GST融合AP-4蛋白を産生するpGEX-AP-4プラスミッドを作成し、GST-AP-4蛋白を大腸菌で産生させ、GSHアガロースカラムで精製した。
4. 抗体とウェスタンブロットおよび免疫沈降：AP-4に対する抗体は家兎にGST-AP-4

蛋白を免役して作成した。ウェスタンブロットは、細胞抽出液を10% SDS-PAGEで展開後、PVDF膜に転写し、定法に基づいて一次抗体および二次抗体を反応させ、SuperSignal (Pierce社)を用いて蛍光発色によって蛋白バンドを検出した。クロマチン免疫沈降法は、種々の処理を行った細胞に最終濃度1%となるようにフォルムアルデヒドを加え、SDS-lysis bufferで細胞を処理後、超音波処理によってクロマチンを破碎し、各種抗体を室温で2時間および4 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。その後、protein Gビーズを加えて免疫沈降を行い、フォルムアルデヒドによる架橋反応を65 $^{\circ}$ C6時間の熱処理によって逆転させ、DNAをQiagen spin columnを用いて精製後、AP-4結合領域を含むHIV LTR部分のDNA(-176 to +61)をPCRで増幅し、AP-4が結合しているHIV DNAを検出した。

5. in vitro DNA結合反応：EMSA法を用いた。すなわち、HIV-1 LTR上の配列(-42~+4)を含む合成オリゴDNAを放射線標識したプローブを用いて細胞核抽出液とin vitroで反応したものをアクリルアミドゲル電気泳動し、DNA-蛋白複合体を観察した。
6. 遺伝子導入とルシフェラーゼアッセイ：細胞への遺伝子導入はFugene-6を用いた市販のトランスフェクション試薬を使用した。ルシフェラーゼアッセイは、dual-luciferase assay kitを用いて行った。内部対照としてのpRL-TK制御下にあるRenilla luciferase遺伝子と種々のHIV-1 LTR-Lucプラスミッドを同時に細胞内導入し、Renilla luciferaseの値を基準に標準化したLuc活性を比較した。
7. 細胞株とウイルス産生の定量：培養細胞上清へのHIV産生量の定量は、HIV-1 p24 antigen ELISA kit (Cellular Products社)を用いた。また、siRNA実験では、HIV産生プラスミッドpNL4-3と共にAP-4をノックダウンするための合成siRNAをLipofectamine 2000を用いて細胞内に導入した。

## C. 結果

### 1. AP-4 は HIV の転写を負に制御する

AP-4 が HIV の転写に及ぼす影響を T 細胞および単球系細胞を用いて Luciferase assay にて調べた。その結果、AP-4 は basal レベルでの転写と Tat や TNF-alpha による HIV の転写活性を強く抑制した。LTR の AP-4 サイトを変異させた変異型 LTR においては抑制作用は認められなかった。実際に内在性の AP-4 が抑制因子として機能しているか否かを調べるために、AP-4 に対する siRNA を細胞に導入した結果、HIV の転写活性が逆に上昇した。以上の結果から、AP-4 は HIV 転写の抑制因子として機能している事が明らかとなった。

AP-4 は HLH-Zip 型の転写因子であり、N 末に DNA 結合に関わる HLH ドメインと dimerization に関わる leucine repeat (LR)、C 末には Q,P-rich と acidic ドメインが存在する。HIV 転写抑制における AP-4 の機能ドメインを調べるために、種々の変異型 AP-4 を作製しその効果を検討した。その結果、HLH ドメインを除いた変異型 AP-4 では抑制効果が認められなかったことから、HIV 転写の抑制には DNA との結合が必須であることがわかった。

### 2. AP-4 による HIV 転写抑制機構

AP-4 がどのような機構で HIV の転写を抑制しているか解析を進めた。AP-4 の結合サイトが TATA box の近傍に存在することから、AP-4 が TBP の TATA box への結合を阻害している可能性が推察された。この点を AP-4 の組み換え蛋白を作製し EMSA にて検討した結果、AP-4 は TBP の TATA box への結合を濃度依存的に抑制した。AP-4 と TBP の拮抗作用は *in vivo* においても確認でき、AP-4 による HIV の転写阻害作用は TBP の強制発現によって解除された。

AP-4 による HIV 転写の抑制が TATA box のマスキングのみに依存しているか否かを調べるために、LTR 上の AP-4 の結合サイトを TATA

box から離して AP-4 の効果を検討した。そのために、本来の AP-4 結合サイトを変異させた LTR に、TATA box から様々な距離の所に新たに AP-4 サイトを挿入した変異型 LTR を作製し Luciferase assay を行った。その結果、野生型 LTR にはおとるものの、AP-4 サイトを TATA box から離れた位置に挿入した LTR においても AP-4 による阻害効果が認められた。以上の結果から、AP-4 は TBP のマスキング以外にも、何らかのメカニズムで HIV 転写を抑制していることが推察された。

近年、転写の抑制機構において HDAC によるクロマチンレベルでの転写抑制が注目されている。そこで、AP-4 による HIV 転写抑制機構における HDAC の関与を検討した。AP-4 と HDAC が結合する可能性を推察し免疫沈降法にて調べた結果、AP-4 は内在性の HDAC1、および 2 と結合することが認められた。実際に、AP-4 による抑制作用に HDAC が関与しているか否かを確認するために、HDAC の阻害剤である TSA を用いて検討した結果、TSA 処理により AP-4 による HIV の転写阻害作用は解除された。

### 3. HIV 潜伏感染細胞 LTR 上での AP-4 結合のダイナミズム

実際の HIV 感染細胞内での AP-4 と TBP、HDAC の動態を調べるために、HIV 慢性潜伏感染細胞である ACH2 と U1 細胞を用いてクロマチン免疫沈降法を行い検討した。その結果、未刺激状態の細胞においては LTR への恒常的な AP-4 と HDAC1 の結合が認められ、TNF-alpha で細胞を刺激すると、LTR から AP-4 と HDAC1 が遊離し、逆に TBP と pol II が LTR にリクルートされてくること、さらにヒストンのアセチル化がおこっていることが認められた。AP-4 の結合サイトを変異させた LTR を細胞に導入しクロマチン免疫沈降を行った結果、HDAC1 が LTR にリクルートされてこなかったことから、AP-4 が HDAC1 を LTR にリクルートしていることが推察された。

#### 4. HIV 複製に対する AP-4 の抑制効果

HIV 複製に対する AP-4 の効果を検討するために、Jurkat T 細胞に pNL4-3 を導入し p24 ELISA assay を行った。その結果、AP-4 は basal レベルでのウイルス複製とともに TNF-alpha による HIV の複製を抑制した。他方、AP-4 siRNA を pNL4-3 とともに細胞に導入すると HIV の複製は逆に上昇した。

以上の結果から、AP-4 が TATA box のマスキングと HDAC のリクルートによって HIV の転写を負に制御していることが明らかとなった。HIV 慢性潜伏感染細胞において、未刺激の状態では AP-4 が TATA box をマスキングすると同時に HDAC を LTR にリクルートしていること、TNF- $\alpha$  の刺激が入ると AP-4 が LTR から遊離し代わりに TBP と pol II が LTR にリクルートされた結果を考え合わせると、感染細胞内での AP-4 の動態が HIV の潜伏感染維持に重要な役割を担っている可能性が推察される。

#### D. 考察

多施設の臨床研究より感染者体内での HIV 量が AIDS の発症および薬剤耐性ウイルスの出現頻度と高く相関することが明らかになった。このことから、HIV 複製を抑制することで AIDS 発症が遅延し、HAART 療法の有効性が向上することが予測された。しかし、血中ウイルス量が検出限界以下になってもなお潜伏感染細胞が存在することが問題となっている。従って、AIDS 発症を食い止めるには潜伏感染細胞のプロウイルスからの転写レベルで活性化を阻止することが必須であると考えられる。一方で、潜伏感染細胞からのウイルス複製をよびおこし、HAART と組み合わせることによって潜伏感染細胞を排除しようとする臨床治験が実施されている。休止期にある HIV 感染 T 細胞に対し HDAC1 阻害剤 valproic acid や IL-7 を用いた結果、いずれの場合も潜伏感染細胞が有意に減少したことを報告している。しかしながら、HAART で用いる抗ウイルス剤の多くは脳などの組織への移行が充分でない（サンクチュリア）ことから、このような治

療法ではたとえ末梢血中のウイルス量が減らすことができても、かえって脳内の HIV を増やす可能性があるため、長期間の治療効果を厳密に評価する必要がある。

AIDS 治療は HAART 療法により新たな段階を迎えるに至ったが、HIV は感染者の体内に潜伏感染し続ける性質を持つため、現在の治療法が AIDS 発症防止に対しても長期間有効であるという保証はなく、また副作用や薬剤耐性ウイルスの出現など多くの課題が残されており、次世代の AIDS 治療薬・発症予防薬の開発が急務となっている。さらなる HIV の転写調節機構の解明は、新たな AIDS 治療法の開発につながることを期待できる。

#### E. 結論

転写因子 AP-4 は HIV の感染細胞内での潜伏感染の維持に必須の役割を演じている。この事実は今後 HIV 感染細胞を除去するための治療法を開発するための重要な視点を提供する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Victoriano, A. F. B., Asamitsu, K., Hibi, Y., Imai, K., Barzaga, N.G., and Okamoto, T.: Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Replication in Latently Infected Cells by a Novel IKK Inhibitor. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50: 547-555, 2006.
- 2) Sanda, T., Asamitsu, K., Ogura, H., Iida, S., Utsunomiya, A., Ueda, R., and Okamoto, T. Induction of cell death in adult T-cell leukemia cells by a novel I $\kappa$ B kinase inhibitor, *Leukemia* 20: 1-9, 2006.
- 3) Katagiri, D., Hayashi, H., Victoriano, A. B., Okamoto, T. and Onozaki, K.: Estrogen Stimulates Transcription and Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1). *Int Immunopharm.* 6: 170-181, 2006
- 4) Okamoto, T., Sanda, T., and Asamitsu, K. NF- $\kappa$ B signaling and carcinogenesis. <Review> *Curr. Pharm. Design*, 2006 (in press).
- 5) Imai, K. and Okamoto, T.: Transcriptional repression of human immunodeficiency virus type 1 by AP-4. *J. Biol. Chem.*, 281: 12495-12506, 2006.

- 6) Inoue, Y., Itoh, Y., Abe, K., Okamoto, T., Daitoku, H., Fukamizu, A., Onozaki, K., and Hayashi, H. Smad 3 is acetylated by p300/CBP to regulate its transcriptional activity. *Oncogene*, 2006 (in press).
- 7) Okamoto, T. NF- $\kappa$ B and rheumatic diseases. <Review> *Drug Targets – Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 2006 (in press)
- 8) Kanazawa, S., Ota, S., Sekine, C., Tada, T., Otsuka, T., Okamoto, T., Sonderstrup, G, Peterlin, B.M.: Aberrant MHC class II expression in mouse joints leads to arthritis with extra-articular manifestations similar to rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006 (in press).
- 9) Hamano T., Matsuo K., Hibi Y., Victoriano, A-F, B., Takahashi N., Mabuchi Y., Soji T., Irie S., Sawanpanyalert, P., Yanai H., Hara T., Yamazaki S., Yamamoto N., and Okamoto T.: A single nucleotide synonymous mutation in *gag* gene controlling human immunodeficiency virus type 1 virion production. *J. Virol.* 2007 (in press)..

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願中)

特許出願日 平成18年7月21日

ヒト関節リウマチの病態を再現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物

(特願 2006-510787)

# HIV-1 粒子形成機構と宿主因子

分担研究者 森川裕子（北里大学 生命科学研究所）

## 研究要旨

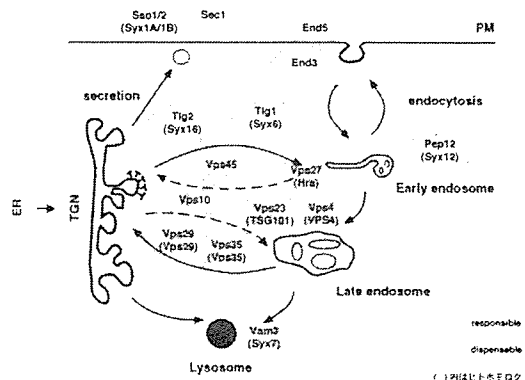
エンドソーム輸送経路の遺伝子欠損変異酵母株を用いた半網羅的解析で見いだしたHIV-1 Gag粒子形成に関する責任宿主因子が真の責任宿主因子か、ヒト細胞で検証するとともに、その分子機序を解析した。1) それら宿主因子のヒトホモログであるSyntaxin6 (トランスゴルジ~初期エンドソームに分布、分泌輸送経路を制御)、Syntaxin12 (初期~後期エンドソームに分布、エンドソーム輸送経路を制御)、Syntaxin16 (トランスゴルジに分布、トランスゴルジの) をover-expressionさせると粒子産生量が増加した。一方、N末端半分あるいはC末端半分のconstructを共発現させるとdominant-negativeに粒子産生を阻害した。2) Syntaxin6及び12をRNA干渉でdepleteしたところ、HIV粒子産生が低下した。3) 共免疫沈降により、Gag蛋白のMA及びCA領域がSyntaxin6のC末端半分が相互作用することが判明した。一方、Syntaxin12との相互作用は検出できなかった。しかし、共発現細胞ではGag蛋白とこれらSyntaxinが部分的に共局在した。4) RNA干渉でSyntaxin12をdepleteするとGag蛋白は核周辺領域に、Syntaxin6をdepleteすると細胞周辺部に蓄積するようになり、Gag蛋白の細胞内局在が変化した。以上の結果より、酵母細胞の遺伝子欠損変異株を用いてHIV Gag粒子形成の責任宿主因子として特定した分子のヒトホモログSyntaxin6及び12がヒト細胞でもHIV Gag蛋白細胞内輸送の責任宿主因子であり、Gag蛋白がそれらSyntaxinで制御されるエンドソーム輸送経路と分泌輸送経路という2つの異なる膜輸送経路を経て輸送されることが明らかとなった。

### 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、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 Gag 蛋白の細胞内輸送や粒子出芽にエンドソーム輸送経路の関与が示唆されている。本研究では、i) この Gag 蛋白細胞内輸送経路を同定する、ii) その経路における Gag 蛋白細胞内輸送の責任宿主因子を特定する、iii) その分子機序を解明することを目的とした。これに先立ち、我々は Gag 粒子の形成出芽が忠実に再現され、かつ各遺伝子の変異・破壊株が既に作出されている酵母細胞を用いて、Gag 蛋白細胞内輸送経路の概要を把握することを試みた。すなわち、Gag 蛋白細胞内輸送経路エンドソーム輸送蛋白質群 (target membrane に存在し膜融合に関与する Syntaxin 群、後期エンドソームの輸送蛋白質 Vps 群、形質膜からのエンドサイトーシスに関与する End 蛋白質群) の欠損あるいは変異酵母細胞株を用いて Gag 蛋白細胞内輸送経路を半網羅的に解析したところ、Syntaxin (Pep12: 初期~後期エンドソームの Syntaxin、Tlg1 及び 2: トランスゴルジ~初

期エンドソームの Syntaxin) を欠損させると Gag 蛋白質は retargeting し粒子産生が顕著に低下することを見出した。そこで本研究では、酵母細胞で特定したこれら Syntaxin が HIV 粒子産生における真の責任宿主因子か、ヒト細胞で検証するとともに、その分子機序を解析した。

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



### B. 研究方法

1) DNA の構築

HIV-1 の発現には HIV-1 cDNA クローン (pNL43 株) と pol 領域欠損のクローン (pNL43/PR(D25N)ΔBal)、免疫染色用として Gag-GFP で pol 領域欠損のクローン (pNL43/Gag-GFP&ΔPol) を用いた。また Gag 蛋白領域を pCI ベクターの Flag-tag 下流に挿入し、共免疫沈降に用いた。

Syntaxin6 (トランスゴルジ～形質膜の Syntaxin、酵母細胞で同定した Tlg1 のヒトホモログ)、Syntaxin12 (初期～後期エンドソームの Syntaxin、酵母細胞で同定した Pep12 のヒトホモログ)、Syntaxin16 (トランスゴルジ～初期エンドソームの Syntaxin、酵母細胞で同定した Tlg2 のヒトホモログ) の cDNA を CMV プロモーターをもつ pCMV-Tag2B あるいは pcDNA3 ベクターの Flag-tag 下流に挿入した。またこれら Syntaxin cDNA を pcDNA3 ベクターの Myc-tag 下流に挿入し、共免疫沈降に用いた。

## 2) RNA 干渉

RNA 干渉実験には 70-80% の knock-down 効率が保証された 19mer の Syntaxin siRNA (B-Bridge 社) を final 100nM で用いた。real time RT-PCR による標的 Syntaxin mRNA の定量及び Western blot による Syntaxin の検出により、用いた siRNA の knock-down 効率を確認した。

## 3) 細胞と transfection

Lipofectamine2000 (Invitrogen 社) を用いて 293T 及び HeLa 細胞に上記の DNA あるいは siRNA を transfection した。

## 4) 産生ウイルス粒子の検出

Transfection 48 時間後の培養上清中に含まれる HIV-1 p24CA 量を ELISA キット (Zeptomatrix 社) で定量した。また、この培養上清を filter でろ過し 20% sucrose cushion を用いてウイルス粒子を濃縮した後、Western blot を行った。

## 5) Western blot

Gag 蛋白の検出には抗 HIV-1 p17MA 及び p24CA 抗体、over-expression の Flag-Syntaxin、Myc-Syntaxin の検出にはそれぞれ抗 Flag 抗体、抗 Myc 抗体を用いた、内在性の Syntaxin には抗 Syntaxin6 及び 12/13 抗体を用いた。

## 6) 共免疫沈降

Gag-Flag と Myc-Syntaxin を共発現させ、抗 Flag 抗体と抗 Myc 抗体を用いた共免疫沈降を行った。

## 7) 共焦点レーザー顕微鏡

Transfection 36 あるいは 48 時間後に細胞を 3.7% パラホルムアルデヒドで固定し、0.1% Triton X-100 で処理した後、抗 HIV-1 p17MA あるいは p24CA 抗体、抗 Flag 抗体、抗 Syntaxin6 及び 12/13 抗体、及び抗オルガネラマーカ抗体 (抗 EEA1 抗体、抗 CD63 抗体等) で染色した。また、Gag-GFP の pol 領域欠損クローン (pNL43/Gag-GFP & ΔPol) を用いた。

## (倫理面への配慮)

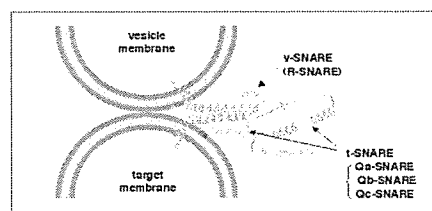
本研究では HIV 患者からの臨床材料を用いた実験を含まないため、生命倫理に対する措置を講じなかった。実験遂行上の安全対策は、遺伝子組換え実験については二種省令・二種告示に従った。

## C. 研究結果

膜小胞輸送は「donor compartment からの小胞出芽→小胞の target compartment への輸送→小胞膜と target 膜のドッキングと膜融合」からなる一連の過程である。SNARE family はこの最終段階である「小胞膜と target 膜のドッキングと膜融合」を制御する分子群であり、真核細胞では種を超えて保存され、細胞内の様々な膜小器官に分布するにも拘らず、小胞膜と target 膜の特異性を選別する (図 2)。

図 2. Syntaxin Family Homology

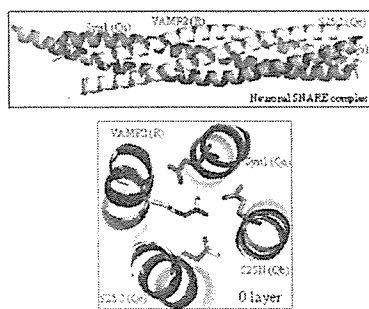
Species	Localization									
	PM				End		TGN/early End		Golgi	ER
Mammal	Syx1	Syx2	Syx3	Syx4	Syx12/13	Syx7	Syx6	Syx15	Syx5	Syx18
Yeast	Sso1	Sso2			Pop12	Vom3	Tlg1	Tlg2	Sed5	UFE1



SNARE は多くの場合 N 末端半分に複数のコイル構造を、C 末端半分に SNARE 領域と呼ばれる 1 つのコイル構造と膜貫通領域をもち、構造的に酷似する。SNARE はこの SNARE domain のアミノ酸から R-SNARE, Q-SNARE に分類され、Q-SNARE は Qa-,

Qb-, Qc-SNARE に細分される。R-SNARE は v-SNARE とも呼ばれ小胞膜に、一方 Q-SNARE は t-SNARE とも呼ばれ target 膜に存在し、ドッキングと膜融合における SNARE 複合体はこれらの R-SNARE (VAMP 群), Qa-SNARE (Syntaxin 群), Qb-SNARE 及び Qc-SNARE (SNAP 群等) の SNARE 領域で形成される heterotetramer である (図 3)。

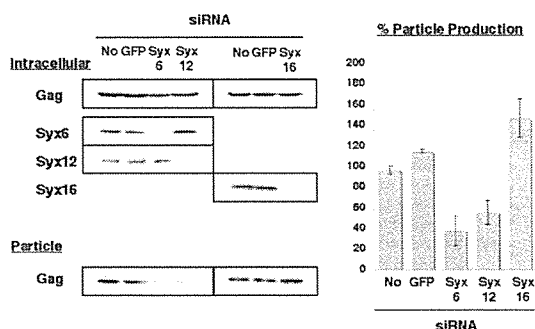
図 3. SNARE 複合体の構造



1) RNA 干渉による Syntaxin の depletion  
Syntaxin6, 12, 16 の mRNA を標的とする 19mer の siRNA を 293T 細胞に transfection した。Real time RT-PCR 及び Western blot により内在性 Syntaxin の depletion を確認した。調べた範囲内では off-target 効果は認められなかった。

pNL43 あるいは pNL43/PR(D25N)ΔBal を co-transfection したところ、Syntaxin6 あるいは 12 を deplete すると HIV 粒子産生量が顕著に減少し、Syntaxin16 を deplete すると逆に粒子産生量が増加することが判明した (図 4)。

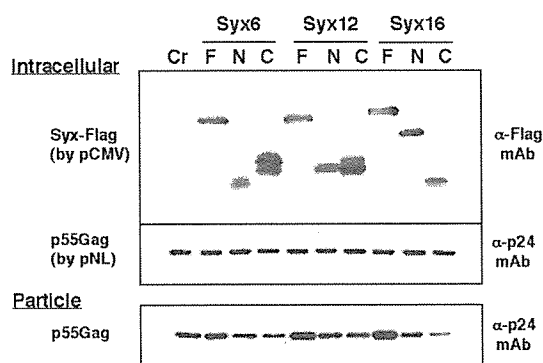
図 4. Syntaxin depletion と HIV 粒子産生量制御



2) Syntaxin の over-expression  
Syntaxin6, 12, 16 はいずれも N 末端半分

コイル構造を、C 末端半分に SNARE 領域と膜貫通領域をもつため、これら Syntaxin を N 末端半分と C 末端半分にわけ over-expression させた。pNL43 あるいは pNL43/PR(D25N)ΔBal を transfection した細胞に Syntaxin (full-size) を共発現させると HIV 粒子産生量が増加した。逆に、Syntaxin (N 末端半分、C 末端半分) を共発現させると、粒子産生量が減少することが判明した (図 5)。これは N 末端半分、C 末端半分といった機能不全 Syntaxin による dominant-negative 効果と推測された。

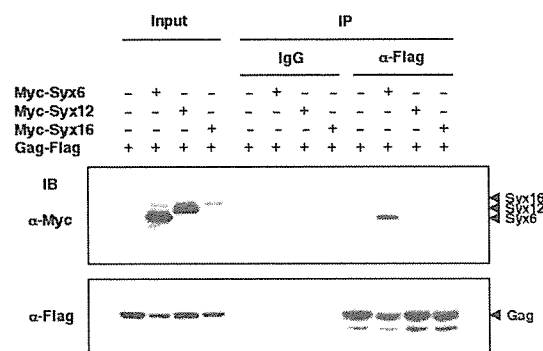
図 5. Over-expression of Syntaxin (Full, N'-half, C'-half)



3) Gag 蛋白と Syntaxin の相互作用

まず Myc-Syntaxin6, 12, 16 それぞれを Gag-Flag 蛋白と共発現させ、抗 Myc 抗体と抗 Flag 抗体を用いた共免疫沈降を行った。抗 Flag 抗体で Gag-Flag 蛋白を免疫沈降したところ、Myc-Syntaxin6 の共沈が認められたが、Myc-Syntaxin12, 16 の共沈は検出できなかった (図 6)。

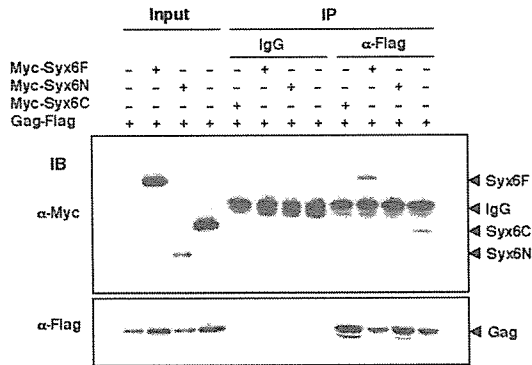
図 6. Syntaxin と Gag 蛋白の結合



次に、Syntaxin6 を N 末端半分 (N 末端コ

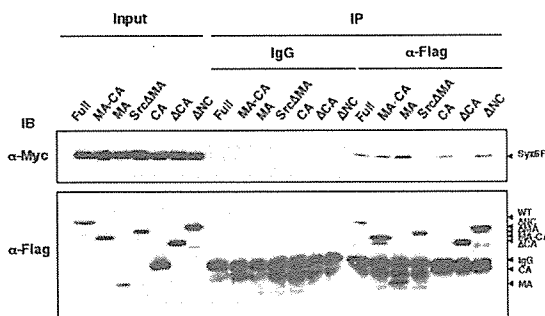
イル構造領域)とC末端半分(SNARE領域と膜貫通領域)にわけ、これら Syntaxin 断片を Gag-Flag 蛋白と共発現させ、同様の共免疫沈降を行った。Gag-Flag 蛋白を免疫沈降したところ、Myc-Syntaxin6 のC末端半分断片との共沈が認められた(図7)。

図7. Syntaxin 6 の Gag 蛋白 との結合領域



Gag 蛋白(MA-CA-p2-NC-p1-p6 からなる polyprotein) の各 domain 欠損変異体(横浜市立大、梁博士より分与)を Syntaxin6 と共発現させ、同様に共免疫沈降を行った。抗 Flag 抗体でこれらの domain 欠損 Gag 蛋白断片を免疫沈降したところ、MA あるいは CA のいずれかの領域が欠損すると Myc-Syntaxin6 との反応性が失われるものの、MA 及び CA 断片のいずれとも相互作用することが判明した(図8)。

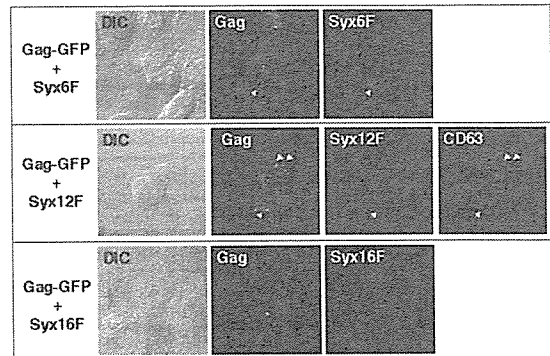
図8. Gag 蛋白の Syntaxin 6 との結合領域



4) Gag-GFP 蛋白と Syntaxin の細胞内局在  
Gag-GFP の pol 領域欠損クローン(pNL43 /Gag-GFP&ΔPol)と Flag-Syntaxin を HeLa 細胞に co-transfection し、共焦点レーザー顕微鏡で調べた。共発現細胞では Gag-GFP 蛋白とこれら Syntaxin が部分的に共局在した。こ

うした部分的な共局在は Syntaxin12 発現細胞で観察されたが、Syntaxin6 あるいは 16 発現細胞ではわずかであった。Gag-GFP 蛋白はむしろエンドソームマーカーである EEA1 や CD63 と共局在する傾向が強かった(図9)。

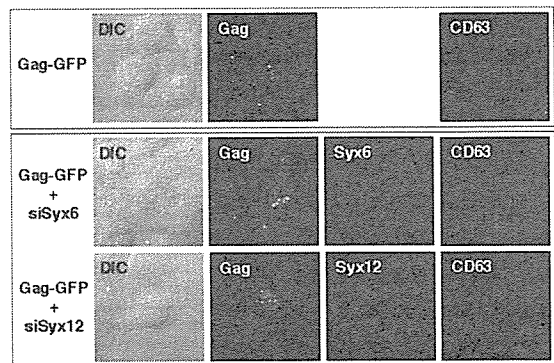
図9. Gag-GFP 蛋白と Syntaxin の細胞内局在



5) Syntaxin-depleted 細胞における Gag-GFP 蛋白あるいは P17MA 蛋白の細胞内局在

Gag-GFP の pol 領域欠損クローン(pNL43 /Gag-GFP&ΔPol)と Syntaxin6 あるいは 12 の siRNA を HeLa 細胞に co-transfection し、共焦点レーザー顕微鏡で調べた。Syntaxin12-depleted 細胞では Gag-GFP 蛋白が核周辺領域に蓄積する傾向が認められた。これに対し、Syntaxin6-depleted 細胞ではむしろ細胞周辺部に局在した。しかしいずれの場合もエンドソームマーカー(EEA1 と CD63)と共局在する傾向が強かった(図10)。

図10. Syntaxin-depleted 細胞における Gag-GFP 蛋白の局在



Gag 蛋白は粒子出芽に伴って p17MA, p24CA, p7NC, p6 に切断され、多くの抗 p17MA 抗体はその切断された p17MA 蛋白のみと反応し、未切断の Gag 蛋白と反応しない。



そこで Gag-GFP 発現クローンを pNL43 に変え、抗 p17MA 抗体を用いて Syntaxin-depleted 細胞における粒子出芽の場を共焦点レーザー顕微鏡で調べた。切断 p17MA 蛋白は Syntaxin12-depleted 細胞では核周辺領域に、Syntaxin6-depleted 細胞では細胞周辺部に蓄積しており、共にエンドソームマーカー (EEA1 と CD63) と共局在した。この結果は Syntaxin-depleted 細胞においても p17MA 蛋白の局在は Gag-GFP 蛋白の局在と一致する、すなわち、Gag-GFP 蛋白の蓄積部位で出芽がおこっていることを示している。これらの確認には電子顕微鏡による観察が必要と思われた。

#### D. 考察

膜融合は target 膜に存在する t-SNARE (Syntaxin と SNAP) と小胞膜に存在する v-SNARE (VAMP) の SNARE 領域による 4 本束コイル複合体形成 (Qa-SNARE + Qb-SNARE+Qc-SNARE+R-SNARE) で制御される反応である (図 3)。本研究で対象とした 3 つの Syntaxin のうち、Syntaxin12 は Syntaxin12 (Qa-SNARE) -SNAP25 (Qb-, Qc-SNARE) -VAMP2 (R-SNARE) の SNARE 複合体を形成し、主として初期エンドソームの膜融合を制御する。一方、Syntaxin6, 16 は Syntaxin16 (Qa-SNARE) -Vti1a (Qb-SNARE) -Syntaxin6 (Qc-SNARE) -VAMP4 (R-SNARE) の SNARE 複合体を形成し、主としてトランスゴルジの膜融合を制御する。しかし Syntaxin6 は Qa-SNARE としても機能し、Syntaxin6 (Qa-SNARE) -SNAP25 (Qb-, Qc-SNARE) -VAMP2 (R-SNARE) の複合体形成とトランスゴルジから形質膜への分泌小胞輸送への関与が明らかになっている。本研究では、エンドソーム輸送経路と分泌輸送経路のそれぞれの SNARE 分子を RNA 干渉で deplete すると HIV 粒子産生が低下し (図 4)、逆に over-expression させると粒子産生量が増加したことから (図 5)、この 2 つの Syntaxin がヒト細胞における Gag 蛋白の細胞内輸送の責任宿主因子であり、Gag 蛋白がエンドソーム輸送経路と分泌輸送経路という 2 つの異なる膜輸送経路を経て輸送されうると考察された。これに対し、Syntaxin16 の場合は depletion 及び over-expression のいずれでも粒子産生の増加が認められた。この理由は不明であるが、Syntaxin16 は膜輸送の選別

中核装置であるトランスゴルジの SNARE 分子であり、depletion 及び over-expression のいずれの場合にもトランスゴルジ以降の膜輸送機構が perturb された可能性が考えられた。

Syntaxin16 (Qa-SNARE) -Vti1a (Qb-SNARE) -Syntaxin6 (Qc-SNARE) -VAMP4 (R-SNARE) の SNARE 複合体においては、Syntaxin6 は Qc-SNARE として機能する分子であり、近年の研究では Qc-SNARE の代表である SNAP25C との相同性が示唆されている。本研究では Gag 蛋白と 3 つの Syntaxin との相互作用を調べたところ、Syntaxin6 (Qc-SNARE) との相互作用は認められたが、Syntaxin12 (Qa-SNARE) とは、i) それが部分的に Gag 蛋白と共局在するにも拘らず (図 9)、ii) 共免疫沈降でもその相互作用は検出できなかった (図 6)。この理由として、Gag 蛋白と Syntaxin の相互作用はそれがあっても一過的であり、安定的な複合体を形成しないためと考えられた。もう 1 つの可能性として、i) SNARE 複合体 (Qa-SNARE+Qb-SNARE+Qc-SNARE+R-SNARE) 形成において、Syntaxin16 (Qa-SNARE) の counterpart は Syntaxin6 (Qc-SNARE) であり、一方 Syntaxin12 (Qa-SNARE) の counterpart は SNAP25C (Qc-SNARE) であること、ii) Syntaxin6 は SNAP25C と相同性が高いこと、iii) いずれの場合も Gag 蛋白は Qa-SNARE とは相互作用を示さなかったことから、Syntaxin12 (Qa-SNARE) -SNAP25 (Qb-, Qc-SNARE) -VAMP2 (R-SNARE) の SNARE 複合体に対しては、Gag 蛋白は SNAP25C と相互作用するのではないかと思われる。いずれの場合においても、その相互作用が直接結合によるものなのか、間接的なものかを pull-down 等で明らかにすることが必要である。

SNARE 複合体の構成分子 (Qa-, Qb-, Qc-, R-SNARE) は assembly により複合体を形成して「小胞膜と target 膜のドッキングと膜融合」を制御し、その後 disassembly により再利用される。本研究では、Gag 蛋白を免疫沈降すると Syntaxin6 の共沈が観察された。が、その免疫沈降物には Syntaxin16 は含まれていなかった。これは Syntaxin16 (Qa-SNARE) -Vti1a (Qb-SNARE) -Syntaxin6 (Qc-SNARE) -VAMP4 (R-SNARE) のような SNARE 複合体の Syntaxin6 と Gag 蛋白が相互作用するのではなく、disassembly した

Syntaxin6 と親和する可能性が考えられる。別の可能性として、Gag 蛋白はトランスゴルジにおいて Syntaxin16 と複合体を形成している Syntaxin6 とは相互作用せず、トランスゴルジから形質膜への分泌小胞輸送に関与する Syntaxin6 (Qa-SNARE)-SNAP25 (Qb-, Qc-SNARE) -VAMP2 (R-SNARE) 複合体の Syntaxin6 と相互作用したため、Syntaxin16 が共免疫沈降されなかったと考えられた。

近年 HIV 粒子出芽の責任宿主因子として class E Vps 蛋白 (TSG101, AIP1/ALIX 等) が特定された。しかしながら、Gag 蛋白がどのような細胞内輸送経路を経てその粒子出芽の場 (形質膜や細胞内膜小器官) に到達するのか、その責任宿主因子は何なのかは解明されていない。本研究により Gag 蛋白がエンドソーム輸送経路と分泌輸送経路という2つの異なる膜輸送経路を経て輸送されることが明らかとなった。これは Gag 蛋白の細胞内輸送が単一ではなく複数存在することを意味する。これは HIV 制御の点から見れば厄介ではある。しかし予想外なことにこの両経路をそれぞれ RNA 干渉法で遮断した場合、Gag 蛋白はいずれの場合もエンドソームマーカー (EEA1 と CD63) との一致を示したものの、エンドソーム輸送経路遮断では核周辺領域に、分泌輸送経路を遮断では細胞周辺部に蓄積し、その局在は互いに異なった (図 10)。これは両経路によるネットワークが相互流動的でない可能性を示唆する。

#### E. 結論

酵母遺伝子欠損あるいは変異株を用いて HIV Gag 粒子形成の責任宿主因子として特定された Syntaxin のヒトホモログがヒト細胞においても Gag 蛋白細胞内輸送の責任宿主因子として機能すると結論された。

#### F. 知的所有権の取得状況 なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. S. Sakuragi, J.-I. Sakuragi, Y. Morikawa, & T. Shioda.  
Development of a rapid and convenient method for the quantitation of HIV-1

budding.

Microbes Infect. 8: 1875-1881 (2006)

##### 2. 森川裕子

酵母を用いた動物ウイルスの研究  
ウイルス 56: 9-16 (2006)

##### 学会発表

1. N. Tsurutani, T. Goto, I. S. Ohno, & Y. Morikawa.

Identification of host cellular machinery for HIV-1 Gag trafficking.

CSH Meeting, 2006年、米国

2. N. Tsurutani, T. Goto, I. S. Ohno, & Y. Morikawa.

Identification of host cellular machinery for HIV-1 Gag trafficking.

ASCB Meeting, 2006年、米国

3. F. Momose, A. Kawaguchi, A. Iwamatsu, Y. Morikawa & K. Nagata.

Stimulation of influenza virus RNA synthesis by a host factor RAF-2 that is bound to viral nucleoprotein and the genome RNA.

第13回ICNSV, 2006年、スペイン

森川裕子, 後藤俊幸

4. HIV 非ミリスチル化 Gag 蛋白によるドミナントネガティブな粒子形成出芽の阻害機構

第54回日本ウイルス学会, 2006年、名古屋

4. 鶴谷直美, 百瀬文隆, 森川裕子

HIV Gag 蛋白の細胞内輸送及び粒子形成における責任宿主因子の関与

第54回日本ウイルス学会, 2006年、名古屋

6. 酒巻望, 大庭賢二, D.M. Zahidunnabi, 稲垣好雄, 山岡昇司, 森川裕子, 山本直樹

HIV 感染細胞障害性を示す NK 細胞活性化の条件検討について

第54回日本ウイルス学会, 2006年、名古屋

7. 百瀬文隆, 川口敦史, 森川裕子, 永田恭介  
宿主因子 RAF-2p36 に依存したインフルエンザウイルス RNP の形成促進

第54回日本ウイルス学会, 2006年、名古屋

8. Y. Morikawa

Dominant negative inhibition of HIV particle production by the non-myristoylated form of Gag

第20回日本エイズ学会, 2006年、東京

研究協力者報告書

HIV の増殖・変異の制御に関する研究

- 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、ウイルス粒子を構成する蛋白質のうちウイルス複製に必須である新規細胞性蛋白質及び翻訳時・後修飾を明らかにすることによって、HIV の増殖・変異に関する未知の制御過程を解明し、新たな作用機序を持つ抗 HIV 薬を開発するための科学基盤を提供することにある。以下に本年度の研究成果を報告する。

これまでに、HIV-1 は少なくともウイルス粒子内に 6 種以上の isoform (p24-a, p24-b, p24-c, p24-d, Nicked p24-e, Nicked p24-f) が存在し、p24-a のアミノ末端側に位置する Ser16 は特異的にリン酸化を受けていることが、alkaline phosphatase を用いた脱リン酸化実験により明らかした。この Ser16 に変異を導入すると、野生株よりも変異を導入されたウイルスの出芽効率は上昇していたが、ウイルスの感染性は低下した。このリン酸化 Ser とその隣にある Pro 残基からなる配列は、peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) の一つによって特異的に認識される可能性があるために、p24 コアの立体構造の変化に PPIase が影響する可能性があるため、さらなる解析が必要と考えられる。これらの研究成果は、脱核過程においてウイルス p24 コアが崩壊するための分子メカニズムとして 1) ホルミル基、2) リン酸化、3) p24C 末端の Nick の導入といった、3 つの因子が寄与していることを示唆しており、タンパク質レベルでウイルス粒子を直接解析することによってはじめて得られる重要な情報である。

A. 研究目的

本研究の目的は、microvesicle を除去することによって高度に精製された HIV-1 粒子を調製後、プロテオーム解析を行い、粒子成分を明らかにし、最終的にその生物学的意義を明らかにすることによって、新規複製阻害剤開発のための分子基盤を構築することである。平成 18 年度の到達目標として、以下の 3 つの目標を設定した。

- 1) 6 つの isoform から構成される HIV-1 CA コアのウイルス学的意義解明
- 2) HIV-1 粒子中の 4 種の cyclophilin A (CyPA) isoform のウイルス学的意義解明
- 3) p24(CA)N 末端ホルミル化のウイルス学的意義解明

4) HIV-1 複製の未知制御因子の検索

B. 研究方法

**1) 精製ウイルス粒子の調製**

●ズブチリシン法

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シンで処理し精製ウイルスを調製した。

●CD45 法

Anti-CD45-microbeads をウイルスと microvesicle 混合物に加え、microvesicle 表面の CD45 を介して microvesicle を除去

することにより精製ウイルスを調製した。

### 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(pH 6-8)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ルビーで染色した。

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

タンパク質の同定は酵素消化物の MALDI TOF-MS による質量分析、及びデータベース検索とともに、ESI-Q-TOF による酵素消化産物の MS/MS 解析を行った。

## C. 実験結果

### 1) 6つの isoform から構成される HIV-1 CA コアのウイルス学的意義解明に関して

HIV-1 粒子のプロテオーム解析の結果、JRFL および LAV-1 株共に、ウイルス粒子内に少なくとも 6 種類の p24 isoform が存在することを明らかにした。その内、intact p24 と比べ分子量が小さい p24 isoform を、trypsin を用いて MALDI TOF-MS により解析したところ、C 末端が切断された isoform であることが判り、nicked-p24-e (pI 6.71, 約 22kDa) および nicked-p24-f (pI 6.71, 約 21kDa) と命名した。さらに、分子量が同じで等電点が異なる 4 種の p24 isoform (p24-a (pI 6.71), p24-b (pI 6.79), p24-c (pI 6.90), p24-d (pI 6.91)) のうち、p24-a のアミノ末端 Ser は特異的にリン酸化を受けていることが alkaline phosphatase を用いた脱リン酸化実験により明らかとなり、このリン酸化 Ser とそれにつづく Pro 残基から構成される phosphorylated Ser-Pro 配列(図 1)に、CyPA や FK506 結合タンパク質(FKBP)とは異なるタイプであるパルブリファミリーに属する PPIase の WW モチーフが結合し、最終的に PPIase 活性によって p24 の構造変化が誘導

される可能性が示唆され、現在 siRNA 等を用いた詳細な解析を進めている。Pr55 の配列中に Ser-Pro もしくは Thr-Pro 配列は 5 箇所存在し、そのうち 4 つは p24 に集中している。これまでに報告されている p24 コアの立体構造から判断して、我々がプロテオーム解析によって検出したリン酸化 Ser 部位は、PPIase が p24 に接近しやすい位置に存在すると考えている(図 2)。

### Proline Cis/trans Isomerization of the Peptidyl-Prolyl ( $\omega$ ) Bond of the Serine-proline Motif

#### -pSer16-Pro17-

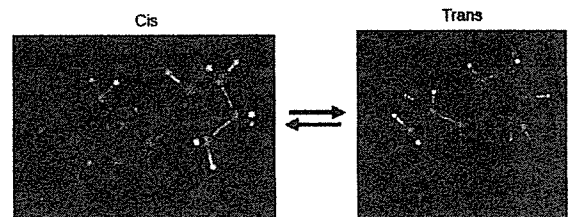


図 1 Phosphorylated Ser-Pro cis-trans 回転。

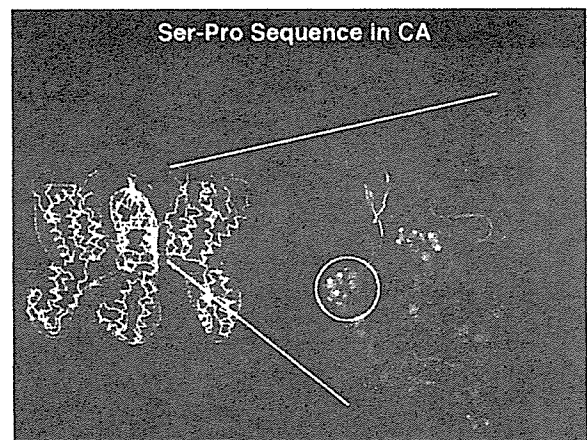


図 2 プロテオーム解析によって検出された phosphorylated Ser-Pro の位置。図中○の部分 phosphorylated Ser-Pro に相当する。

### 2) p24(CA)N 末端ホルミル化のウイルス学的意義解明に関して

これまでの LAV-1 株及び JRFL 株のプロテ

オーム解析から、ウイルス粒子内で前駆体タンパク質 Pr55 が HIV-1 protease によって切断を受けた後、約 30% の HIV-1 p24 のアミノ末端がホルミル化を受けていることを densitometric analysis によって明らかにしてきた。したがって、ウイルスが出芽する際に、細胞性のホルミル化酵素を粒子内に取り込んでいる可能性を示唆するため V5-tag および His-Tag の結合した p17-p24 組換えタンパク質をウイルス産生細胞に発現させ、p17-p24 組換えタンパク質がミリスチル化を受け、ラフトへ移行することができれば、ウイルス粒子内へ取り込まれホルミル基転移酵素をウイルス粒子内より分離するためのプローブとして使用できるのではないかと考え、現在解析を進めている。

#### D. 考察

6 種類以上の HIV-1 p24 isoform がウイルス粒子内に存在する。これらの isoform は、ホルミル化、リン酸化、さらに限定切断といった翻訳後修飾を受けていることを明らかにすることができた。これらの結果は、ウイルス粒子を直接タンパク質レベルで解析することによってはじめて得られるものであり、ウイルスのゲノム情報だけでは明らかにすることができなかった結果である。これらの結果を以下のように考察してみた。

ウイルス粒子内の p24 アミノ末端ホルミル化は、HIV-1 粒子内で p17-p24 が HIV-1 protease によって切断を受けた後はじめて修飾されることになることから、ホルミル基転移酵素は、ウイルス粒子内へとりこまれている可能性が高い。ホルミル化を受けた p24 の Pro1 は、Asp51 との salt bridge

の形成が困難となり、p24 のアミノ末端に存在する  $\beta$  シート構造が変化する。この際に、p24 六量体によって形成されるリングの入り口を塞ぐ位置で存在していた p24 のアミノ末端ドメインが移動し、リングの入り口を開口するような位置に移動する可能性が Molecular Operating Environment (MOE) を用いた解析により示唆された。コアを形成する p24 のうちおよそ 30% がホルミル化を受けることが我々によって明らかにされ、それに伴いウイルス粒子内のコアを形成するリングの入り口は、他のタンパク質などがリング内の空間にアクセスしやすいように変化すると考えられる。

つぎに、p24 のアミノ末端に存在する Ser-Pro 配列の Ser 残基が細胞内の kinase によりリン酸化を受け、この phosphorylated Ser-Pro を特異的に認識する PPIase が p24 六量体のリング内に入り込むことによって Ser-Pro 間の結合の共鳴安定性を効果的に低下させ、最終的にペプチド結合の cis-trans 間の回転バリアを低下させることになり、trans 型のペプチド結合を形成させることになると考えられる。

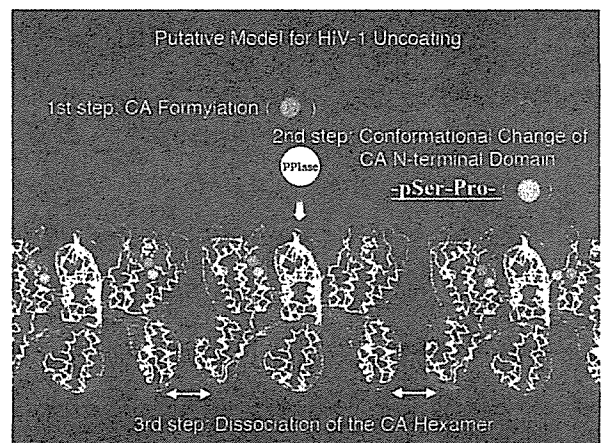


図3 Putative Model for HIV-1 Uncoating

一般に、X-Pro 配列は、cis 型ペプチド結合を形成する方が安定であると考えられることからすると周辺構造への影響は大きいものと考えられ、p24 六量体の安定性が低下する可能性が示唆される。p24 のアミノ末

端側（151 残基付近まで）は六量体の形成には重要なドメインを含んでいることから、PPIase が p24 の phosphorylated Ser-Pro 配列へ結合することによって、脱核の際のコアの崩壊のための一つの因子として働いていると示唆された。さらに、p24 のアミノ末端側（151 残基付近まで）の安定性が低下すると必然的に p24 のカルボキシル末端の構造の安定性も低下することが予想され、結果的に、六量体リング同士の相互作用が弱くなり最終的に、p24 コアの十分な崩壊が誘導されるのではないかと考えられる（図 3）。

#### E. 結論

プロテオーム解析により、ウイルス粒子内に約 30%存在するホルミル化 p24、リン酸化 Ser や Nicked p24 は、ウイルス粒子内に存在することにより、HIV-1 ホストエントリーにおける脱核のための因子として寄与していることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1) Immunoreactive cycloimmunogen design based on conformational epitopes derived from human immunodeficiency virus type 1 coreceptors: cyclic dodecapeptides mimic undecapeptidyl arches of extracellular loop-2 in chemokine receptor and inhibit human immunodeficiency virus type 1 infection. Shogo Misumi, Nobutoki Takamune, and Shozo Shoji. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 2006 *in press*

##### 口頭発表

- 1) Proteome analyses of HIV-1 virions by using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) Mutsumi Inoue, Naomi Hasegawa, Shogo Misumi, Nobutoki Takamune, Shozo Shoji. 20th IUBMB international Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006, abstract p.208
- 2) HIV-1 Capsid (CA) 翻訳後修飾のプロファイリング 井上睦美、三隅将吾、高宗暢暁、庄司省三 *日本エイズ学会誌* Vol. 8 No. 4 p. 338 (2006)

HIV-1 Vif 機能制御：Vif 新規機能探索

分担研究者 明里宏文（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター）  
研究協力者 李永仲

研究要旨：HIV-1 Vif はウイルス粒子にパッケージされ、Gag p2/NC プロセッシングを特異的に制御する一方、過剰な Vif パッケージングによりウイルス成熟過程を阻害し、結果としてウイルス感染性を抑制する。今年度はこの作用機序について詳細な解析を行った。その結果、Vif Trp11 および Gln12 が Gag p2/NC processing 阻害およびそれによるウイルス感染性抑制作用に係る determinant であること、また本作用は APOBEC3 の制御作用とは全く独立した Vif 機能であることが明らかとなった。

A. 研究目的

HIV-1 Vif は PBL やマクロファージにおける感染性ウイルス形成に必須の蛋白である。近年の研究で、Vif は用量依存性に宿主抗ウイルス因子 APOBEC3 のウイルス粒子への取り込みを阻害することがよく知られている。ところで Vif の steady-state level は厳密に制御されており、生理的レベルの数倍程度過剰量の Vif が HIV 粒子にパッケージングされるだけで、virion Vif はウイルス感染性を抑制する（以下本現象を v-Vif 効果と呼ぶ）。本研究では、この作用機序について解明すると共に、本作用を応用したウイルス制御法開発の可能性について検討することを目的として、この作用を規定する領域の決定および Vif による APOBEC3 制御機能との関連性について検討を行なった。

B. 研究方法

HIV-1 Vif タンパク質発現ベクターである pNLA1-43Vif を基に、site-directed mutagenesis 法により導入した一連の Vif N 末端欠失・点変異体発現ベクターを作成した。これらを HIV-1 分子クローンである pNL4-3 Δenv もしくは pNL4-3 Δenv Δvif と共に H9 細胞または HeLa 細胞へ遺伝子導入し、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。ウイ

ルス感染性は LuSIV 細胞を用いた single-round infectivity assay により評価した。また粒子形態については電子顕微鏡による解析を行なった。

C. 研究結果

1) 過剰な Vif パッケージングにより感染性を欠失したウイルス粒子を電子顕微鏡にて解析したところ、ドーナツ型の未成熟ウイルス粒子が認められた。この形態は PR 阻害や p2/NC 間の cleavage が傷害される Gag 変異体による欠損型粒子と類似していた（図 1）。

2) 昨年度の研究結果より、v-Vif 効果を決定する領域は N 末端側の 10-13 アミノ酸残基にあることが示されたことから、今年度は引き続きこの領域の各種アラニン変異体を用いた解析を行なった。昨年度の予備的実験結果をより確証付けるため、各種変異体の用量依存性について検討したところ、どの変異体も細胞内発現レベルやウイルス粒子内取り込み効率は同程度であるにも関わらず、W11A/Q12A double mutant のみが v-Vif 効果を欠失することが明らかとなった（図 2）。

3) v-Vif 効果は APOBEC3 の発現に関連した細胞種に非依存性に認められる。しかし v-Vif 効果が抗 APOBEC3 機能と全く独立したものなのか、それとも関連性があるのか、まだ明快な答えは

得られていない。そこで、本研究において作成した各種 Vif 変異体を用いて検証を行なった。

Vif 発現コンストラクトである pNLA1-43Vif を pNL4-3vif(-) と共に H9 細胞に co-transfect することにより Vif を in-trans で供給すると、最適な Vif 発現量においてウイルス感染性が最高となる。このような条件下で、欠失変異体 (M シリーズ) を H9 細胞に発現させたところ、M-1 を除いた他の変異体は感染性増強効果が著しく低下していることが判明した (図 3A)。さらに同様な最適条件下で M-3 領域における各種アラニン点変異体について検討を行なったところ、1 アミノ酸残基置換では数倍程度の感染性増強効果が見られたが、2 アミノ酸残基置換ではどの組み合わせであってもほぼ完全に感染性増強効果を失っていた (図 3B)。これらの結果を表 1 にまとめた。この結果より、v-Vif 効果を規定する領域と抗 APOBEC3 効果に関わる領域は全く異なることが示された。

さらに、Vif と APOBEC3G との結合について免疫共沈降法を用いて検討したところ、全ての Vif 欠失変異体 (M シリーズ) は APOBEC3G と同程度に結合することが明らかとなった (図 4)。

以上の結果より、v-Vif 効果は抗 APOBEC3 効果とは全く独立した Vif 機能であることが明らかとなった。

#### D. 考察

現在第一の Vif 機能である抗 apobec 作用についてはその解明が進んでいる一方、v-Vif 効果についてはその詳細は不明であった。本研究により感染抑制作用のメカニズムが解明されたのみならず、Vif N 末端側が抗 apobec 作用と独立して v-Vif 効果を規定していたことから、他のアクセサリ ー 蛋白 同 様 Vif も multi-functional であることが証明された。興味深いことに、現在知られている抗 APOBEC3 効果に関わる領域 (zinc-finger domain, BC box, Cul5 box) は全て C 末端領域に存在する。一方、v-Vif 効果に関わる領域は本研究より N 末端側の WQ11, 12 であった。これらの残基を含む領域は Pol-Integrase と 遺 伝 子 領 域 が 重 複 し て お り その配列が HIV-1 サブタイプ間で非常に良く保存されていることから、HIV-1 のライフサイクルに重要な役割を担っているものと考えられ

る。さらに今後その意義について解析を進めていく予定である。

本成果から、HIV 自体の機能を応用して、ウイルス粒子成熟過程を特異的に阻害するという新たな発想によるエイズウイルス制御法開発への応用が期待される。特に今回明らかとなった Vif 機能を規定する領域は、Pol-Integrase と 遺 伝 子 が 重 複 し て お り、さ ら に Integrase C 末端側は機能的にも必須の領域であることから変異が生じ難いため、本効果を応用した新規抗 HIV-1 薬は耐性株の出現を抑える可能性が考えられ意義深いと考えられる。

#### E. 結論

Vif Trp11 および Gln12 が Gag p2/NC processing 阻害およびそれによるウイルス感染性抑制作用に係る determinant であること、また本作用は APOBEC3 の制御作用とは全く独立した Vif 機能であることが明らかとなった。今後は本作用の HIV-1 ライフサイクルへの役割と併せて、新規抗 HIV 薬への開発に向けて研究を進めていきたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Kobayashi M, Tomonaga M, Izumi T, Fukunaga K, Sasada A, Abudu A, Miyauchi Y, Akari H, Iwai K, Uchiyama T: Ubiquitination of APOBEC3 proteins by the Vif-Cullin5-ElonginB-ElonginC complex. *Virology* 344, 263-266, 2006.

##### 2. 学会発表

1) 李永仲、飯島沙幸、明里宏文: Identification of a new functional domain in the N-terminus of HIV-1 Vif for modulating Gag processing. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (平成 18 年 11 月)

2) 李永仲、飯島沙幸、明里宏文: HIV-1 Vif 蛋白における Gag p2/NC プロセッシング制御に関わる新規機能ドメイン. 第 20 回日本エイズ学会学術集会 (平成 18 年 12 月)

##### 3. 知的所有権の出願、登録状況

なし



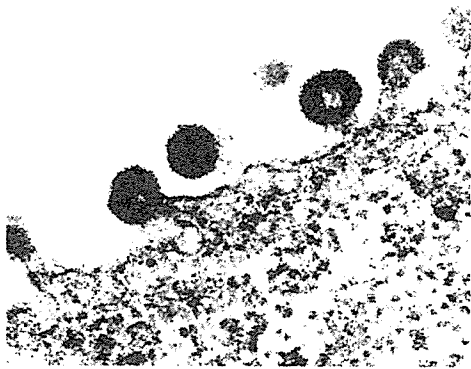


図 1 : 過剰 v-Vif による未成熟 HIV-1 粒子の電顕像

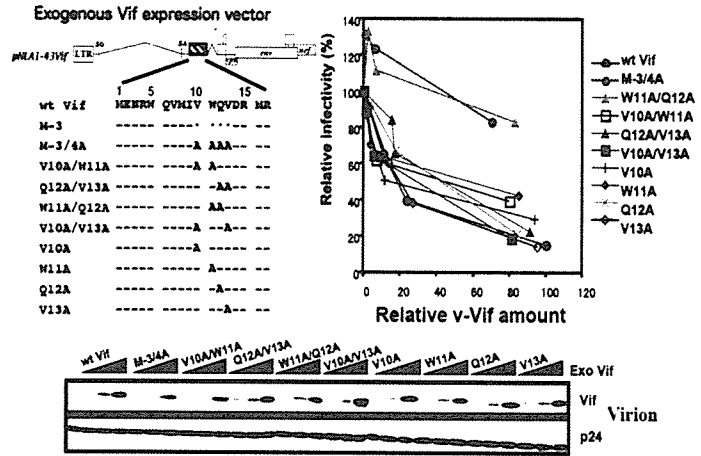


図 2 : Vif 各種アラニン点変異体を用いた v-Vif 効果決定領域の解析

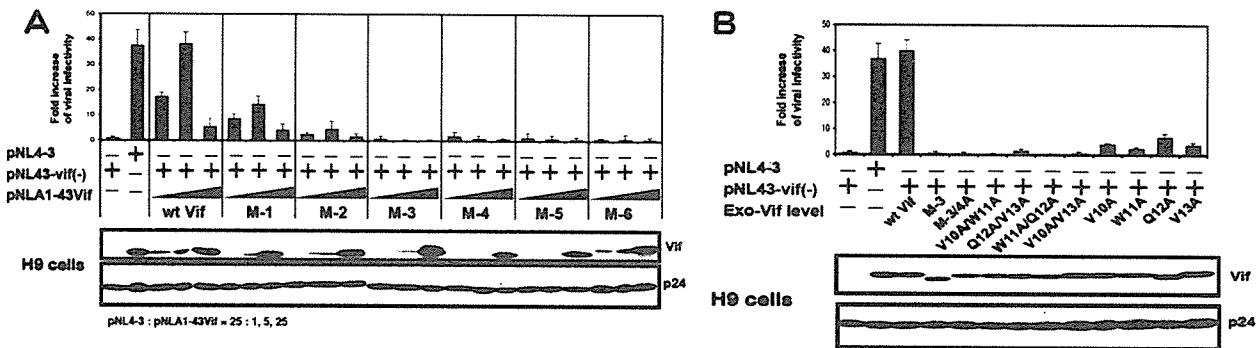


図 3 : Vif N 末端領域各種変異体におけるウイルス感染性増強効果に関する解析



図 4 : 免疫共沈降法による A3G と Vif N 末端領域欠失変異体の結合解析

	Effect of each Vif mutant on viral infectivity	
	Enhancing activity	Suppressive activity
wild type Vif	++	++
M-1	+	++
M-2	-	+
M-3	-	-
M-4	-	+
M-5	-	++
M-6	-	++

	Effect of each Vif mutant on viral infectivity	
	Enhancing activity	Suppressive activity
M-3/4A	-	-
V10A/W11A	-	++
Q12A/V13A	-	++
W11A/Q12A	-	-
V10A/V13A	-	++
V10A	+	++
W11A	-	++
Q12A	+	++
V13A	+	++

表 1 : Vif N 末端領域各種変異体におけるウイルス感染性増強・抑制効果のまとめ

## HIV-1 Vpr 機能制御：Vpr 誘導細胞周期異常の機構解明

分担研究者 増田 道明 獨協医科大学・微生物学講座・教授

研究要旨：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)。この現象は、組込み前のプロウイルス DNA の安定化や LTR の転写活性の増強等を介して、HIV-1 の増殖促進に寄与すると考えられている。しかし、Vpr による G2 arrest の誘導機構については不明の点が多い。本年度は、分裂酵母を用いた分子遺伝学的実験や、アデノウイルスベクターおよび siRNA を用いたヒト培養細胞の遺伝子発現操作により、シグナル伝達分子の一種である 14-3-3 が Vpr による G2 arrest の誘導に関与することを示した。現在、G2 arrest や細胞増殖抑制作用に拮抗する化学物質のスクリーニングを、分裂酵母系を用いて行っている。また、HIV-1 と同様レンチウイルスに属する他の種々のウイルスのアクセサリ蛋白が Vpr 様の機能を持つ可能性について、分裂酵母を用いた解析を行った。その結果、HIV-2、FIV、BIV、EIAV が酵母細胞の増殖を抑制するアクセサリ蛋白を持つことが分かった。一部の蛋白については、増殖抑制に G2 arrest が関与する可能性も示唆された。

### A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) がコードする Vpr は多様な機能を持つアクセサリ蛋白である。特に、宿主細胞周期の G2 期から M 期への進行を抑制する (G2 arrest) 作用は、組込み前のプロウイルス DNA の安定化や LTR の転写活性の増強等を介して、HIV-1 の増殖に対して促進的に働くと考えられている。しかし、Vpr が G2 arrest を起こすメカニズムについては不明の点が多い。

本研究は、種々のモデル実験系を活用しながら、HIV-1 Vpr と機能的あるいは物理的に相互作用する宿主因子を同定し、その相互作用が G2 arrest の誘導につながる機序を明らかにすることを目的としている。

### B. 研究方法

#### 【分裂酵母を用いた実験】

*nmt1* プロモータ (チアミン非存在下で活性化) の下流に HIV-1<sub>NL4-3</sub> の *vpr* 遺伝子を持つ pREP1-*vpr* (Masuda et al., 2000) を、HA タグおよび His タグのついた Wee1 (HA-Wee1) を発現する分裂酵母株 (O'Connell 博士より分与) に導入し、細胞周期や Wee1 発現への影響を解析した。HIV-1 臨床分離株 (#16 および #17) 由来の *vpr* 遺伝子についても同様に解析した。HA-Wee1 を発現し、*rad24*、*chk1*、*cds1* 等のチェックポイント変異を有する分

裂酵母株にも pREP1-*vpr* を導入し、同様の解析を行った。

Total RNA を鋳型とした RT-PCR により、7 種類のヒト 14-3-3 遺伝子 cDNA をクローニングした。14-3-3 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 、 $\theta$  および  $\sigma$  は HeLa 細胞由来、14-3-3 $\gamma$  は HEK293 細胞由来、14-3-3 $\eta$  はヒト脳由来である。各 cDNA を pAUR224 の CMV プロモータの下流に挿入し、7 種類のヒト 14-3-3 発現プラスミドを構築した。これらの発現プラスミドを HA-Wee1 を発現する *rad24* 変異株に導入し、その効果を検討した。

HIV-2<sub>ROD</sub> の *vpr* および *vpx*、FIV の *orfA*、BIV の *vprw* および *vpy*、EIAV の *S2* といったアクセサリ蛋白遺伝子を pREP-1 ベクターの *nmt1* プロモータの下流にそれぞれクローニングしたプラスミドを構築して分裂酵母に導入し、発現誘導条件下での細胞増殖への影響を解析した。

【ヒト培養細胞を用いた実験】ヒト胎児肺由来 MRC5 細胞に Vpr と EGFP を共発現するアデノウイルスベクター Ad-VIG (Matsuda et al., 2003) を感染させた。一部の実験では、ベクター感染の 24 時間前に 14-3-3 に対する siRNA (Santa Cruz 社) を導入した。14-3-3 蛋白の発現はウエスタン法により解析した。細胞周期プロファイルは細胞を PFA 固定後

に核を DAPI で染め、レーザースキャニングサイトメータで観察した。

14-3-3 $\beta$  と EYFP の融合蛋白を発現するプラスミドベクターを構築した。これを、HeLa 細胞にトランスフェクションして Ad-VIG を感染させることにより、Vpr の発現が 14-3-3 $\beta$  の細胞内局在に与える影響をレーザー共焦点顕微鏡にて解析した。さらに、14-3-3 $\beta$  と EYFP の融合蛋白に SV40 T 抗原由来の核移行シグナル (NLS) を付加したものを発現するプラスミドベクターも構築して HeLa 細胞に導入し、細胞周期への影響を解析した。

### C. 研究成果

Vpr は分裂酵母においても細胞周期の G2 arrest を誘導すること、その際、Wee1 や Rad24 等の宿主因子が必須であることを以前報告した (Masuda et al., 2000)。今回の研究により、分裂酵母において Vpr を発現させると、Wee1 蛋白のリン酸化と発現量増加が起こることが示された。HIV-1 の臨床分離株#17 由来の Vpr を発現させると、分裂酵母の G2 arrest 誘導に伴い、やはり Wee1 蛋白のリン酸化と発現量増加が起こった。一方、臨床分離株#16 由来の Vpr は G2 arrest を誘導せず、Wee1 蛋白のリン酸化や発現量増加も認められなかった。

Vpr による G2 arrest を起こさない *rad24* 変異株の分裂酵母では、Wee1 蛋白の基礎発現量の顕著な低下が認められた。Vpr を発現させると、Wee1 のリン酸化や若干の増加は認められるものの、Wee1 蛋白の絶対量は野生株で Vpr を発現した際に比べて明らかに少なかった。興味深いことに、*rad24* 変異株にヒト 14-3-3 $\beta$ 、 $\epsilon$ あるいは $\zeta$ の発現プラスミドを導入すると、Wee1 の基礎発現量や Vpr 発現時の増加レベルが野生株と同程度にまで回復した。

アデノウイルスベクター Ad-VIG を用いて MRC5 細胞に Vpr を発現させると細胞周期の G2 arrest が起こる。しかし、siRNA を用いて 14-3-3 $\beta$ あるいは $\zeta$ の発現を抑制した条件で Ad-VIG を感染させた場合は、G2 arrest の誘導が認められなかった。14-3-3 $\epsilon$ に対する siRNA で処理した場合には、無処理の場合と同様、Vpr による G2 arrest が起こった。

HeLa 細胞において、14-3-3 $\beta$ は通常細胞質

内に局在するが、Vpr の発現に伴い 14-3-3 $\beta$  の核局在が認められるようになった。14-3-3 $\beta$  に NLS を付加したものを HeLa 細胞で発現させると、Vpr の発現が無くても 14-3-3 $\beta$  の核局在が認められるようになり、それに伴って G2 arrest が誘導された。

HIV-1 と同様レンチウイルス科に属する HIV-2 の Vpr および Vpx、FIV の OrfA、BIV の Vpw および Vpy、EIAV の S2 といったアクセサリ蛋白の発現を分裂酵母で誘導したところ、一過性の細胞増殖抑制が認められた。一部の蛋白については、発現時に酵母の *cdc* 表現型が出現し、G2 arrest の誘導が示唆された。

### D. 考察

分裂酵母において Vpr は Wee1 のリン酸化と発現量の増加を誘導することが示された。臨床分離株由来の Vpr の解析から、G2 arrest の誘導と Wee1 のリン酸化および増加は相関することが示された。また、Wee1 は細胞周期のエンジンに対してブレーキとして働く分子であることを考えると、Vpr は Wee1 というブレーキの増強を解して G2 arrest を誘導することが推察される (図 1)。

Rad24 は哺乳動物の 14-3-3 ファミリー蛋白のオルソログであり、分裂酵母における Vpr 誘導 G2 arrest に必須であることが以前の研究により示されている。本研究では、Rad24 やヒト 14-3-3 が分裂酵母における Wee1 の安定発現に重要であること、ヒト 14-3-3 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ は *rad24* 変異を補完し、Vpr による G2 arrest 誘導に対する分裂酵母の感受性を回復させることがわかった。さらに、14-3-3 $\beta$ と $\zeta$ は、ヒト細胞における Vpr による G2 arrest の誘導にも必須であった。興味深いことに、ヒト細胞においては、Vpr による G2 arrest に伴い、14-3-3 $\beta$ の核局在が見られた。14-3-3 $\beta$ に NLS を付加し、強制的に核内で発現させた場合にも G2 arrest が誘導された。従って、Vpr は何らかの機序により 14-3-3 $\beta$ の核移行を促し、それが核蛋白である WEE1 の upregulation に寄与することによって G2 arrest を誘導する可能性が示唆された。

HIV-1 以外の種々のレンチウイルスも、分裂酵母の増殖を抑制するアクセサリ蛋白をコードしており、その機序には細胞周期

の G2 arrest が関与している可能性が示された。すなわち、宿主細胞 G2 arrest の誘導は、レンチウイルスの複製における共通の戦略として、進化上保存されてきたものである可能性が考えられる。

### E. 結論

HIV-1 Vpr による G2 arrest の誘導には、分裂酵母においてもヒト細胞においても、14-3-3 依存的な Wee1 のリン酸化と増加が関与すると考えられる。また、宿主細胞の G2 arrest を誘導するアクセサリ蛋白は、レンチウイルスの進化において保存されており、複製の至適化を司る重要な分子である可能性がある。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

(1) Matsuda, M., Tanaka, H., Yamazaki, S.,

Suzuki, J., Tanaka, K., Yamada, T., and Masuda, M. HIV-1 Vpr induces G2 cell cycle arrest in fission yeast associated with Rad24/14-3-3-dependent, Chk1/Cds1-independent Wee1 upregulation. *Microbes and Infection*. 8:2736-2744, 2006.

#### 2. 学会発表

(1) 増田道明、中村祐介. アクセサリ蛋白 Vpr を標的とする抗 HIV 薬の分裂酵母を用いたスクリーニング. 日本ウイルス学会第 54 回学術集会, 横浜, 平成 18 年 11 月.

(2) 松田真理、中村祐介、藤澤隆一、増田道明. レンチウイルスアクセサリ蛋白が細胞周期に与える影響—分裂酵母を用いた解析. 日本ウイルス学会第 54 回学術集会, 名古屋, 平成 18 年 11 月.

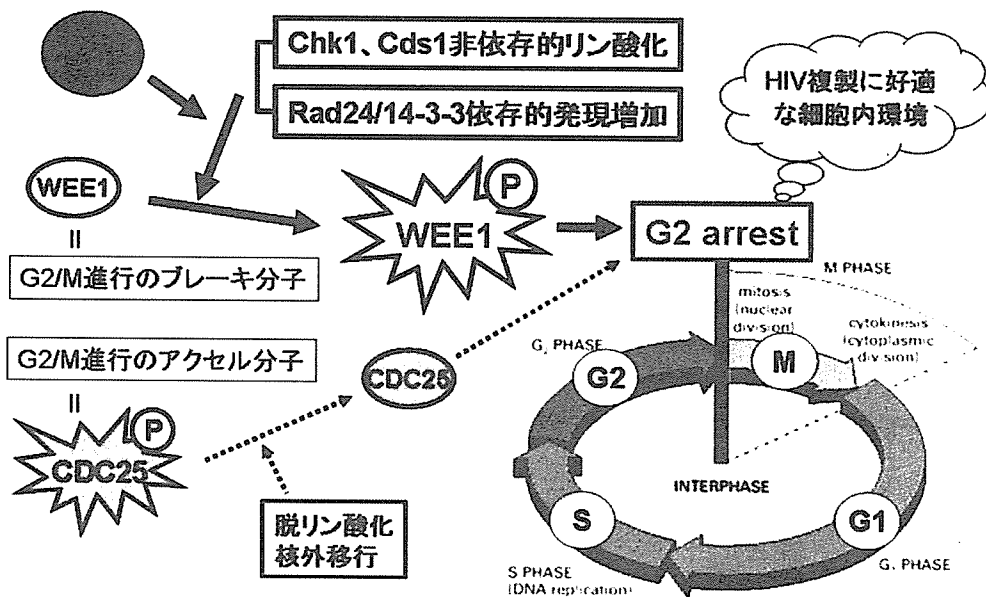


図 1