

平成19年度厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

課題番号 H19-政策創薬-一般-001

**宿主細胞の細胞内免疫機構に基づく
新規エイズ治療薬の開発**

総括・分担研究報告書

平成20年3月

主任研究者 山本 直樹

国立感染症研究所・エイズ研究センター・センター長

研究組織

研究者名	所属	役職
山本 直樹	国立感染症研究所・エイズ研究センター	センター長
梁 明秀	国立感染症研究所・エイズ研究センター	第一グループ長
澤崎 達也	愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター	准教授

目次

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

主任研究者: 山本 直樹 (国立感染症研究所・エイズ研究センター).....	1
--	---

II. 分担研究報告書

1 HIV 感染におけるサイトカイン制御因子 SOCS1 の果たす役割

山本 直樹 (国立感染症研究所・エイズ研究センター).....	13
---------------------------------	----

2 宿主微小管ネットワークおよびユビキチンシグナルを介した

HIV-1 Gag 細胞内輸送の分子機構の解明

梁 明秀 (国立感染症研究所・エイズセンター).....	19
------------------------------	----

3 宿主細胞側機能的リン酸化タンパク質の同定および解析

澤崎 達也 (愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センター).....	25
-----------------------------------	----

III 業績一覧 (2007)..... 29

IV 刊行物別刷 (抜粋)..... 33

I. 総括研究報告書

宿主細胞の細胞内免疫機構に基づく新規エイズ治療薬の開発

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者：山本 直樹（国立感染症研究所・エイズ研究センター長）

研究要旨：SOCS1は、HIV-1p55Gagのマトリックス(MA)やヌクレオキャプシド(CA)タンパク質と直接結合し、効率よくウイルス産生を促進した。siRNAを使いSOCS1発現を抑えると、Gagはその細胞内輸送やアセンブリーが抑制され、最終的にはリソソームで消化された。さらに、SOCS1はHIV-1p55Gagのモノユビキチン化を促進させることにより、Gagタンパク質が宿主微小管ネットワークを介して効率的に形質膜へターゲットされることが明らかとなった。さらに網羅的なHIVタンパク質リン酸化宿主プロテインカイネースの探索を可能とする、コムギ無細胞タンパク質合成系による宿主プロテインカイネースライブラリーの作成とAlphaScreenによる高感度、ハイスループット検出系の開発に成功した。以上の知見は、HIV-1感染におけるGagの細胞内輸送分子機構と宿主細胞側機能的リン酸化タンパク質の同定をはじめて解明したものであり、AIDSや関連疾患の治療における新しい治療法の確立につながる可能性がある。

分担研究者（2名）：

梁 明秀 国立感染症研究所エイズセンターグループ長（宿主微小管ネットワークおよびユビキチンシグナルを介したHIV-1Gag細胞内輸送の分子機構の解明）

澤崎達也 愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター 准教授（宿主細胞側機能的リン酸化タンパク質の同定および解析）

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス タイプ1 (HIV-1)の感染においては、ウイルスと細胞間の複雑な相互作用や因子同士のかかわりがある

ことが分かっている。細胞因子とHIV-1との分子間相互作用は私たちがウイルス増殖の仕組みだけでなく、感染した細胞で起こる細胞内増殖機構を理解するために必須である。HIV-1の感染によって抑制、又は促進される細胞遺伝子の特徴は、ウイルスと細胞間の相互作用や、ウイルス増殖に必要な標的分子を特定することに大いに貢献すると思われる。

HIV-1Gagは前駆タンパク質p55Gagとして合成された後、ウイルス性プロテアーゼによって、マトリックス(MA/p17)、キャプシド(CA/p24)、ヌクレオキャプシド(NC/p7)とp6、さらにSP1とSP2とよばれる分子量

の小さなペプチドから成る断片に切断される。MA のミリスチル化した N-terminal の部位は、プラズマ膜への Gag 標的を促進し、一方 CA と NC は Gag の multimerization を促進する。

HIV 感染症の成立には宿主タンパク質と HIV タンパク質間の相互作用が必須であり、そのものがウイルスの増殖・生活環、および病原性発現機構に重要な役割を果たす。また、感染にともなう宿主個体のウイルスに対する細胞内免疫応答機構の 1 つとして、宿主因子によるウイルスタンパク質の修飾、ウイルス-宿主タンパク質複合体の形成について考慮する必要がある。そのために、それらの質的、時間的、空間的な関係を十分に理解する必要がある。

一方、近年、宿主細胞のアクチンや微小管(microtubule)などの細胞骨格系が HIV-1 粒子形成に重要な役割を果たす事が示唆されている。実際に HIV-1Gag は微小管モータ Kif4 タンパク質と結合することが知られている。また、HIV-1Gag タンパク質ユビキチン化修飾は、Gag の細胞内輸送や粒子形成に関与する可能性も提示されている。しかし、それらの関連因子の同定や、詳細な分子機構の解明は未だ成されていない。

最近我々はサイトカインシグナル抑制因子 SOCS1 が HIV-1 感染 T 細胞において特異的にその発現が誘導され、HIV-1 Gag タンパク質と複合体を形成することにより、ウイルス粒子タンパク質の細胞内輸送と感染性ウイルス粒子の形成に重要な役割を果たすことを明らかにした (Ryo et al., PNAS, 2008)。これらの結果は SOCS1 が HIV-1 複製の後期過程の形成における重要な宿主因子であることを示唆している。一方で、SOCS1

がどのようなメカニズムで細胞内 Gag タンパク質の輸送を調節しているか、このプロセスに関わる詳細な分子機構は明らかではなかった。我々は本研究において、SOCS1 を分子マーカーとすることにより、HIV-1Gag の細胞内輸送分子メカニズムの解明を試みた。その結果、HIV-1Gag/SOCS1 複合体は、微小管を介した宿主輸送系により細胞膜へターゲットされること、また、そのためには SOCS1 による Gag のユビキチン化修飾が必須であることが明らかとなった。

HIV はヒト細胞内のタンパク質を利用し、複製・増殖を行っていることがわかってきており、最近、HIV タンパク質が細胞内で宿主プロテインカインースによりリン酸化されていることがわかってきた。このリン酸化は、細胞内の主要シグナル伝達機構として、タンパク質輸送や転写・複製機構を制御していることから、HIV はそのリン酸化を通じてタンパク質輸送などの宿主細胞内機能を利用しているものと想像されている。そのため、HIV タンパク質をリン酸化する宿主プロテインカインースの網羅的な探索は、細胞内 HIV 増殖機構の解明だけでなく、抗エイズ創薬を進める上で必須なアプローチである。しかし、ヒトゲノム上には 518 種類のプロテインカインースがコードされており、細胞内から HIV タンパク質をリン酸化するプロテインカインースを探索することは不可能である。そこで、本研究では我々が開発してきた真核型コムギ無細胞蛋白質合成系を用いてプロテインカインースライブラリーの構築を行い、in vitro で HIV タンパク質をリン酸化する宿主タンパク質の探索を可能とする系の開発

を目指した。

B. 研究方法

定量 PCR、immunoblotting 解析、ELISA

定法により行った。

HIV-1 感染実験

培養液中のウイルスコピー数の定量を行った。HIV-RNA は QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を用いて抽出し、ABI7300 Real-Time PCR system (PE Biosystems) で定量した。

Gene reporter assay

野生型 HIV-LTR (pLTR-luc) をコントロールとした luciferase expression construct、または full-length プロウイルスベクターを使用した。

Electron Microscopy

pNL4-3 とコントロールベクターまたは SOCS1 発現型で感染させた 293T 細胞を glutaraldehyde で固定し、電子顕微鏡で観察した。形質導入した 293T 細胞は 2.5% glutaraldehyde で固定後、TEM で観察。

免疫染色

pNL4-3 分子クローンを発現させた各種細胞を 3%ホルマリンで15分間、続いて-20℃の100%メタノールで15分間固定後、5%ヤギ血清を用いてブロッキングを行い、抗 HIV-1 p24 マウスモノクローナル抗体、抗 SOCS1 ウサギポリクローナル抗体を、室温で2時間反応させた。続いて、Alexa488 および Alexa568 2次抗体で処理し、DAPI 染色を行った。マウント後、共焦点顕微鏡で観察した。

GST pulldown analysis

C-末端 FLAG-tagged p55 Gag (codon-optimized) を 293T に発現させ、細

胞抽出液と GST-fused SOCS1 を混合後、遠心により結合タンパク質を回収した。

Microtubule spin-down assay

pNL4-3 とコントロールベクターまたは SOCS1 発現型で感染させた 293T 細胞の細胞抽出液を、Taxol および GTP 存在下で重合させた、ウシ微小管と混合後、50000rpm で超遠心を行い、ペレットを微小管結合分画とした。その後、各種タンパク質を SDS-PAGE 法およびウエスタン法にて同定した。

プロテインカイネースタンパク質ライブラリーの構築

MGC と FANTOM クローン、そして我々の研究室でクローニングされた合計 410 種類の完全長プロテインカイネース遺伝子をもつ大腸菌から PCR 法を用いて、鋳型 DNA の構築を行い、コムギ無細胞タンパク質合成系によりプロテインカイネースタンパク質ライブラリーの構築を行った。また、ビオチン化に必要な配列を N 末端に付加し、ビオチンリガーゼ BirA とビオチンを上記無細胞系に加えることにより、ビオチンでラベルした基質タンパク質を得た。

基質タンパク質のリン酸化

AlphaScreen 法により検出した。さらに、PKC ζ による HIV-Gag タンパク質のリン酸化は、上記無細胞系で合成された、HIV-全長 Gag、およびそのプロセッシングフォームを用いた in vitro kinase アッセイ系により行った。

(倫理面への配慮)

研究にはヒト末梢血、実験動物を使用するため、下記の点を留意して実験を行った。

1. 末梢血は、医師が問診した上で健康に問題ないと判断した場合に限り、医師が採血

している。採血に伴う身体への危険性はあるが、これは通常の診療行為を越えるものではない。

2. 動物実験は、「動物愛護の精神」を遵守し、極力動物の苦痛軽減を配慮して行った。放射線照射、細胞移植、採血、剖検の際は、必ず腹腔より十分量のネンブタールを注入し、動物が眠っていることを確認してから行っている。これは動物実験における実験処置に対する倫理基準のカテゴリーB（動物に対してほとんど不快感を与えないと思われる実験）レベルの実験に相当する。

C. 研究結果

I. HIV-1 感染における SOCS1 の関与

1. SOCS1 は HIV-1 の感染によって誘導され、Posttranscriptional Mechanism により HIV-1 の増殖を促進する。

HIV-1 増殖に関わる遺伝子と細胞内経路を解明するため、私たちは HIV-1 に感染した human T cell line (MOLT-4) と非感染コントロール細胞を使い SAGE で解析した。その結果、SOCS1 は HIV-1 の感染によって up-regulate される遺伝子であることが示された。さらに SOCS1 は、二人の患者から得られた peripheral blood mononuclear cells (PBMC) の細胞内でも up-regulate されていた。次に HIV-1 の分子クローンである pNL4-3 や、pcDNA-myc-SOCS1 を 293T 細胞に感染させ、上清中に放出されたウイルス量を観察した。そして、anti-p24 抗体を使い ELISA を行った結果、野生型 SOCS1 は感染させるウイルス量に比例して上清中のウイルス増殖の促進が認められた。反対に、SH2 ドメインや SOCS box を欠損させた変異型は野生型と同レベルのウイルス増殖促進

能を欠いており、その両方のドメインが促進のために必須であることが分かった。さらに、もう一つの SOCS box protein である SOCS3 は、並行して行われた実験の結果、HIV-1 増殖に関与しないという結果になり、SOCS1こそが HIV-1 増殖に不可欠であることが示された。

次に、平行して、cell lysate とウイルス粒子を使った immunoblotting analysis を行った。ELISA の結果と同様、野生型 SOCS1 の発現型は SH2 や SOCS box の変異型と違い、明らかに量に比例して細胞中 Gag protein レベル、特に CA (p24)、や中間産物である MA-CA (p24) CA-NC (p39) の上昇を促した。この上昇傾向は上清中の HIV-1 粒子の増殖に伴って見られることが分かった。

transmission electron microscopy (TEM) による観察で、SOCS1 を発現させた細胞中には、コントロールと比較して、きわめて大量の健康な成熟ウイルス粒子が PM 表面上に検出された。

gene reporter assay の結果、興味深いことに、SOCS1 over expression はウイルスの転写に影響を及ぼさなかった。

2. SOCS1 と HIV-1 Gag Protein との相互作用

次に SOCS1 は HIV-1Gag に直接接合し得るのか否かを検証してみた。C-末端 FLAG-tagged p55 Gag (codon-optimized) と GST-fused SOCS1 で GST pulldown analysis を行ったところ、p55 Gag は GST-SOCS1 と共に特異的に沈殿物を生成することが分かった。更なる研究により、myc-tagged SOCS1 と内因性 SOCS1 は共に 293 T 細胞中の Gag-FLAG と結合し、免疫性

沈殿物を生じることが分かった。また、様々な SOCS1 変異体を GST pull-down analysis により観察した結果、N-末端と SH2 ドメインの両方を欠損している変異型は p55 に接合せず、N-末端か SH2 ドメインのどちらか一方が正常であれば 293T 細胞の SOCS1 が Gag に結合する能力は失われないことが分かった。

Gag と SOCS1 の細胞内での所在を明らかにするため、光学顕微鏡を用いて観察したところ、内因性の SOCS1 は HIV-1 粒子の増殖中においても Gag protein と細胞質内で結合することが分かった。

3. SOCS1 は Gag の構造を安定化させ plasma membrane への移動を促進する

anti-p24 で免疫染色を行ったところ、overexpress した SOCS1 は PM に結合する Gag の割合を増やすことが分かった。また、野生株の細胞より、SOCS1 を発現させた細胞は細胞質内の Gag のレベルははるかに低かった。

Pulse-chase analysis の結果 SOCS1 は、上清中の p24 と同様に細胞中の p55 Gag polyprotein を安定化させることが示された。

4. SOCS1 の欠損は HIV-1 粒子の増殖と Gag の動きを阻止する

pNL4-3 や SOCS1 の siRNA を形質移入した細胞は、HIV-1 粒子と細胞内 Gag protein の量がどちらとも減少していた。さらに、核周囲の Gag は、SOCS1 の抑制によって PM への Gag の移動も抑制される際、プロテアゾームよりむしろ、リソソームによって消化されることが示された。

5. SOCS1-HIV-1Gag 複合体は微小管に沿って局在する

SOCS1/HIV-1Gag 共発現 Cos-1 細胞をそれぞれの抗体および、抗 alpha-tubulin 抗体を用いて 3 重染色を行い、共焦点顕微鏡にて観察したところ、SOCS1-HIV-1Gag 複合体は宿主微小管に沿って局在することがあきらかとなった。これを生化学的に証明するために、我々は、pNL4-3 とコントロールベクターまたは SOCS1 発現型で感染させた 293T 細胞の細胞からライセートを回収し、Taxol および GTP 存在下で重合させたウシ微小管と混合後、50000rpm で超遠心を行い、ペレットを SDS-PAGE 法にて展開した。その後のイムノブロットにより、SOCS1 および HIV-1Gag がともに微小管に結合すること、SOCS1 は HIV-1Gag の微小管への結合量を促進させることが明らかになった。反対に、SH2 ドメインや SOCS box を欠損させた変異型は上記の機能を欠いており、その両方のドメインが Gag の微小管結合促進のために必須であることが分かった。

6. 宿主細胞微小管安定性は SOCS1 による HIV-1Gag の細胞内輸送に必須である。

HIV-1 の分子クローンである pNL4-3 や、pcDNA-myc-SOCS1 を 293T 細胞に感染させ、各種微小管重合阻害剤（ノコダゾール、コルヒチン、ビンブラスチン）を処理後、上清中に放出されたウイルスを回収し、anti-p24 抗体を使いイムノブロットを行った。その結果、アクチン重合阻害剤やエンドソーム輸送阻害剤は特に影響しなかったが、微小管重合阻害は SOCS1 によるウイルス粒子形成を顕著に抑制した。また、微小

管重合阻害タンパク質 stathmin を pNL4-3、pcDNA-myc-SOCS1 を 293T 細胞に共発現し、ウイルス粒子形成能を検討した結果、上記微小管重合阻害剤と同様に SOCS1 による HIV-1 粒子形成促進を顕著に抑制した。

7. SOCS1 は微小管安定性を増加させる

SOCS1 強制発現細胞では、微小管の安定性の指標である、アセチル化アルファチューブリンの発現がコントロールと比較して顕著に増加していた。反対に、SOCS1-/-マウス胎児線維芽細胞では野生型細胞と比較して、ノコダゾールに抵抗性を示す微小管が有意に減少していた。

8. SOCS1 は HIV-1Gag のユビキチン化を促進する

SOCS1 は elonginB/C, Rbx1, Culin2/5 とユビキチンリガーゼ (E3) コンプレックスを形成する。我々は in vitro において、HIV-1Gag がこれらの SOCS1-E3 複合体と相互作用するかどうか考察した。小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて SOCS1、elonginB/C, Rbx1、および、ピオチン化標識 Culin2 を合成し、リコンビナント Gag タンパク質と混合した後、ストレプトアビジンビーズを用いてプルダウンを行った。

その結果、HIV-1Gag は SOCS1-ElonginB/C-Rbx-Culin2 と複合体を形成することが明らかとなった。続いて、実際に SOCS1 が HIV-1Gag のユビキチン化に関与するか否かについて、293T 細胞を用いて実験を行った。C-末端 FLAG-tagged p55 Gag (codon-optimized) と myc タグの付加した Ubiquitin、さらにはコントロールベクターまたは SOCS1 を 293T 細胞に共発現させ、

myc 抗体で免疫沈降後、FLAG 抗体で、ユビキチン化 Gag を定量した。その結果、SOCS1 は Gag のユビキチン化を顕著に促進した。

9. HIV-1 Gag のユビキチン化は Gag タンパク質の細胞内輸送やアッセムブリーに重要である

続いて、SOCS1 によって成された Gag のユビキチン化が、Gag タンパク質の細胞内輸送や、ウイルス粒子形成に必須であるかどうかを確認するため、C 末端の 2 つのグリシンを欠如させた、ユビキチン (myc-Ub ΔGG) を作製した。この変異体は基質タンパク質にコンジュゲートされないため、ユビキチン化シグナルをドミナントネガティブ的に抑制することが知られている。今回我々はこのユビキチン変異体を SOCS1/HIV-1Gag 強制発現細胞に共発現させたところ、SOCS1 による Gag の細胞内輸送や粒子形成が顕著に抑制された。また、この現象がユビキチン化特異的であることを示すため、ユビキチン結合タンパク質が結合できないユビキチン変異体 (myc-Ub ΔGG-L8A/I44A) を用いて上記と同様の実験を行ったところ、SOCS1 による Gag 輸送への抑制効果は認められなかった。

II. HIV タンパク質をリン酸化する宿主プロテインカイネースタンパク質の網羅的探索

1. 完全長プロテインカイネースライブラリーの作成

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて、410 種類の完全長プロテインカイネースライブラリーの作成に成功した。また、上記の無細胞系と AlphaScreen 系を用いること

により、基質タンパク質の特異的なリン酸化反応をハイスループットに検出することができた。特に、リン酸化結合タンパク質である Pin1 を分子プローブとすることにより、効率的に機能的リン酸化部位を複数同定することが可能となった。

2. 機能的リン酸化するキナーゼの同定

我々は、この技術を利用し、HIV-1Gag タンパク質を直接的に機能的リン酸化するキナーゼの同定を試みた。その結果、AKT1 および PKC ζ が Gag タンパク質をリン酸化することを検出することができた。293T 細胞を用いた検討により、これらのキナーゼは HIV-1 複製の後期課程に採用し、HIV-1 の粒子形成を正に制御することが明らかとなった。今後はこれらキナーゼによる Gag のリン酸化が、どのように Gag のアセンブリーやウイルス粒子の出芽に作用するかについて、さらに詳細に検討する。

D. 考察

今回、我々は、宿主細胞の微小管ネットワークの安定性および SOCS1 による Gag のユビキチン化が、Gag の細胞内輸送において重要な役割を担うことを示した。細胞内分子やオルガネラの輸送には、微小管を介した、ダイニン／キネシンモータータンパク質による細胞内輸送が知られている。種々のウイルス粒子タンパク質の細胞内輸送においても、宿主細胞骨格系、特に微小管やアクチン系との関連については過去に報告があり、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、アフリカ豚コレラウイルス (ASFV) では微小管ネットワークを介した active transport の役割が示されている。

しかし、HIV-1 粒子タンパク質の細胞内輸送における細胞骨格系の関与については、様々な相反する意見が出されており、現時点において統一する見解は得られていない。この原因としては、第一に Gag タンパク質と相互作用する細胞側因子が同定されていないこと、第2に、HIV-1 感染細胞における宿主細胞骨格輸送系に関連した、詳細な細胞生物学的解析が行われてこなかったことが上げられる。本研究において、我々は、SOCS1 の Gag 細胞内輸送に対する機能を指標とすることにより、Gag のユビキチン化修飾が trigger となり、微小管依存的輸送系によって Gag タンパク質が輸送されることを示した。今後の課題としては、実際にどのモータータンパク質が重要なのか、Gag のユビキチン化部位をどのようなエフェクター（またはアダプター）タンパク質が認識し、作用するのか？などの疑問について詳細に解析していく必要がある。これらによって、HIV-1Gag タンパク質の細胞内輸送系の詳細な分子機構が明らかになるばかりではなく、HIV-1 感染にともなう宿主細胞の物質輸送系の影響やその病態との関連についても明らかにすることができるものと考えられる。

一方我々は、SOCS1 が HIV-1 感染により誘導され、HIV-1 Gag タンパク質に直接結合することにより、HIV-1 は効率的にウイルス粒子を産生させることができることを示した。また SOCS1 特異的抑制により、効率的に Gag タンパク質の Trafficking やアセンブリーが阻害され、リソソームにおける Gag の分解が促進されることも示した。それに加え、今回の我々の研究成果は、SOCS1 を介した Gag タンパク質の細胞内輸

送の分子機構をさらに詳細に明らかにしたものであり、SOCS1 やその関連因子が AIDS/HIV 治療における有望な宿主側標的因子として新しい治療法の確立につながることを期待される。

一方我々は、HIVタンパク質をリン酸化する宿主プロテインカイネースタンパク質の網羅的探索技術の開発を目指している。網羅的なタンパク質のプロテインカイネースの解析には、1) プロテインカイネースライブラリーの整備、2) 未精製タンパク質を用いた高感度な検出系、という2つのコア技術の開発が必須である。本年度のコムギ無細胞タンパク質合成系とAlphaScreenを組み合わせることで、これらコア技術の開発に成功し、またHIV-Gagタンパク質のピオチン化の成功により、HIVタンパク質をリン酸化する宿主プロテインカイネースの網羅的探索に向けた基盤技術を開発することができた。また、PKC ϵ によるHIV-Gagのリン酸化をin vitro系で検出することに成功したことから、阻害剤スクリーニングへの道が開けた。

E. 結論

今回、私たちは、SOCS1 が HIV-1 感染を助け、IFN 非依存的に後期ウイルス増殖過程において重要な役割を担うことを示した。HIV-1 は感染により、機能性高分子を免疫細胞に送り込み、自己の複製を行う。ウイルスの増幅経路に関わる細胞因子の同定は、ウイルスが細胞に感染するメカニズムを解明する上で大きな役割を担ってきた。SOCS1 は、HIV-1 の p55 と呼ばれる Gag タンパク質のマトリックスやヌクレオキャプシドと直接結合することが出来、その結果、HIV-1

は、効率よくウイルス粒子を産生させることができる。siRNA を使い SOCS1 を抑えると、Gag タンパク質の Trafficking やアセンブリーが抑制され、核周囲で放置されることにより最終的にはリソソームの働きで消滅する。今回、HIV-1p55Gag と直接結合する SOCS1 を分子プローブとして用いることにより、HIV-1p55Gag の細胞内輸送の分子機構の解明を試みた。その結果、SOCS1 は HIV-1p55Gag のモノユビキチン化を促進させることにより、Gag タンパク質が宿主微小管ネットワークを介して効率的に形質膜へターゲットされることが明らかとなった。これらのことは、SOCS1 が細胞内で HIV-1Gag をコントロールする重要な細胞因子でありことを示唆しており、AIDS などの治療における標的因子として新しい治療法の確立につながる可能性があると期待される。

一方、本年度の澤崎らの研究により、世界に先駆けた HIV タンパク質をリン酸化する宿主プロテインカイネースの網羅的な探索技術の開発ができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

山本 直樹

- 1) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. in press.
- 2) Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J,

- Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(1):294-9, 2008.
- 3) Watanabe S, Ohta S, Yajima M, Terashima K, Ito M, Mugishima H, Fujiwara S, Shimizu K, Honda M, Shimizu N, Yamamoto N. Humanized NOD/SCID/IL2Rgamma(null) mice transplanted with hematopoietic stem cells under nonmyeloablative conditions show prolonged life spans and allow detailed analysis of human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. *J Virol*. 81(23):13259-64, 2007.
 - 4) Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y. Interleukin-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: A Model for the Screening of Antiviral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses. *J Infect Dis*. 197(1):134-41, 2008.
 - 5) Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan MZ, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N. Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2R{gamma}null mice develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood*. 109:212-8, 2007.
 - 6) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex. *AIDS*. 21:575-82, 2007.
- 梁 明秀
- 1) Ryo A, Nishi M, Tsurutani N, Ohba K, Morikawa Y, Yamamoto N. Requirement of microtubule integrity and distinct ubiquitin signaling in SOCS-1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. submitted.
 - 2) Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105(1):294-9.
 - 3) Ryo A, Hirai A, Nishi M, Liou YC, Perrem K, Lin SC, Hirano H, Lee SW, Aoki I. A suppressive role of the prolyl-isomerase pin1 in cellular apoptosis mediated by the death-associated protein daxx. *J Biol Chem*. 2007 282(50):36671-81.
 - 4) Murakami T, Gottlinger H, Morikawa Y, Komano J, Ryo A, Sato H. Regulation of Gag trafficking and functions. (Review) *The Journal of AIDS Research*. 2007 9;102-107
- 澤崎 達也
- 1) Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R,

- Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008, 105(1):294-9.
- 2) Sawasaki T, Kamura N, Matsunaga S, Saeki M, Tsuchimochi M, Morishita R, Endo Y. Arabidopsis HY5 protein functions as a DNA-binding tag for purification and functional immobilization of proteins on agarose/DNA microplate. *FEBS Lett*. 2008, 582(2):221-8.
- 3) Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Matsuda S, Han ET, Otsuki H, Kaneko O, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Torii M, Endo Y. The Wheat Germ Cell-Free Based Production of Malaria Proteins for Discovery of Novel Vaccine Candidates. *Infect Immun*. 2008, In press
- 4) Sawasaki T, Morishita R, Gouda MD, Endo Y. Methods for high-throughput materialization of genetic information based on wheat germ cell-free expression system. *Methods Mol Biol*. 2007, 375:95-106.
2. 学会発表
梁明秀、澤崎達也、山本直樹
- 1) 梁明秀、澤崎達也、山本直樹
Post-translational regulation of HIV-1 proteins revealed a new type of virus-host cell interaction for HIV-1 replication and pathogenesis. 第21回エイズ学会年会. 広島, 2007年11月28-30日.
- 2) 大庭賢二、梁明秀、寺嶋一夫、山本直樹
濾胞樹状細胞 (FDC) による HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス複製刺激機構: P-selectin/RSGL-1 と Syk pathway の関与の可能性. . 第21回エイズ学会年会. 広島, 2007年11月28-30日.
- 3) 梁明秀、澤崎達也、山本直樹
Post-translational regulation of HIV-1 proteins revealed a new type of virus-host cell interaction for HIV-1 replication and pathogenesis. 第21回エイズ学会年会. 広島, 2007年11月28-30日.
- 4) 正岡崇志、赤木達也、嘉村奈美、澤崎達也、遠藤弥重太 A new approach for protease substrate screening based on the wheat cell-free system. 第七回あわじしま感染症・免疫フォーラム 淡路島, 2007年9月1-5日
- 5) 松永智子, 松岡和弘, 竹尾暁, 澤崎達也, 坪井敬文, 遠藤弥重太, コムギ無細胞タンパク質合成により作製したタンパク質ライブラリーを用いたマラリア感染により誘導される自己抗体の解析. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会. 横浜, 2007年12月11-15日
- 6) 赤木達也、嘉村奈美、澤崎達也、遠藤弥重太 カスパーゼ3により切断されるプロテインカイネースの探索システムの構築. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会. 横浜, 2007年12月11-15日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
ウイルスタンパク質相互作用阻害剤探索

システム（出願予定）

II. 分担研究報告書

分担研究報告書

HIV 感染におけるサイトカイン制御因子 SOCS1 の果たす役割

分担研究者 山本 直樹 国立感染症研究所エイズセンター長

研究要旨：SOCS1 は、HIV-1p55Gag のマトリックス (MA) やヌクレオキャプシド (CA) タンパク質と直接結合し、効率よくウイルス産生を促進した。siRNA を使い SOCS1 発現を抑えると、Gag はその Trafficking やアセンブリーが抑制され、最終的にはリソソームで消化された。

以上の知見は、SOCS1 が細胞内で HIV-1Gag をコントロールする重要な細胞因子であり、AIDS などの治療における標的因子として新しい治療法の確立につながる可能性があることをつよく示唆している。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス タイプ 1 (HIV-1) の感染においては、ウイルスと細胞間の複雑な相互作用や因子同士のかかわりがあることが分かっている。細胞因子と HIV-1 との分子間相互作用は私たちがウイルス増殖の仕組みだけでなく、感染した細胞で起こる細胞内増殖機構を理解するために必須である。HIV-1 の感染によって抑制、又は促進される細胞遺伝子の特徴は、ウイルスと細胞間の相互作用や、ウイルス増殖に必要な標的分子を特定することに大いに貢献すると思われる。

HIV-1p55Gag タンパク質はウイルス性プロテアーゼによって切断される 4 つのドメインに分かれる。この作用によって成熟した Gag タンパク質は、マトリックス (MA/p17)、キャプシド (CA/p24)、ヌクレオキャプシド (NC/p7) と p6 から形成され、さ

らに SP1 と SP2 と呼ばれる分子量の小さなペプチドから成る。MA のミリスチル化した N-terminal の部位は、プラズマ膜への Gag 標的を促進し、一方 CA と NC は Gag の multimerization を促進する。p6 は液胞タンパクである Tsg101 と AIP1/ALIX との相互作用を促進しながら PM からの HIV-1 粒子放出の際に中心的な役割を果たす。最近では Gag の細胞内輸送を調節する因子の存在が報告されている。AP-3 δ は、粒子形成の初期段階において Gag の MA 部位に直接接合し、multivesicular body (MVB) への誘導を促進させる endosomal adaptor protein として報告された。また trans-Golgi network (TGN)-associated protein hPOSH は、PM へ輸送する前に、envelope protein (Env) と結合する場所である TGN からの Gag 小胞の放出機構を促進して Gag を運ぶ役目も果たしている。しかしながら、細胞内 Gag 輸送を

調節する細胞タンパク質が指摘されているが、このプロセスに関わる詳細な分子間関係は未だに不明な点が多い。

私たちは本研究において、suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) が、HIV-1Gag に直接接合し、細胞内輸送やこのタンパク質の安定性を促進し、HIV-1 粒子を効率よく増殖させていくことを実証した。これらの結果により、SOCS1 は効率よい HIV-1 の増殖に必要な細胞因子であり、近い未来、AIDS などの治療につながる大変興味深い標的分子であることが分かった。

B. 研究方法

定量 PCR、immunoblotting 解析、ELISA

定法により行った。

HIV-1 感染実験

培養液中のウイルスコピー数の定量を行った。HIV-RNA は QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を用いて抽出し、ABI7300 Real-Time PCR system (PE Biosystems) で定量した。

gene reporter assay

野生型 HIV-LTR (pLTR-luc) をコントロールとした luciferase expression construct、または full-length プロウイルスベクターを使用した。

GST pulldown analysis

C-末端 FLAG-tagged p55 Gag (codon-optimized) と GST-fused SOCS1 で行った。

試薬

Santa Cruz Biotechnology --- anti-CD63, anti-AP-3, anti-myc, anti-SOCS1

Zymed Laboratories --- anti-SOCS1

Sigma --- anti-FLAG

Roche Diagnostics --- anti-HA

BD Transduction laboratories --- anti-HIV-p24, anti-STAT1, anti-phospho-STAT1 など

GeneTex --- sheep polyclonal anti-TGN46
Electron Microscopy

pNL4-3 とコントロールベクターまたは SOCS1 発現型で感染させた 293T 細胞を glutaraldehyde で固定し、電子顕微鏡で観察した。形質導入した 293T 細胞は 2.5% glutaraldehyde で固定後、TEM で観察。

(倫理面への配慮)

研究にはヒト末梢血、実験動物を使用するため、下記の点を留意して実験を行った。

1. 末梢血は、医師が問診した上で健康に問題ないと判断した場合に限り、医師が採血している。採血に伴う身体への危険性はあるが、これは通常の診療行為を越えるものではない。

2. 動物実験は、「動物愛護の精神」を遵守し、極力動物の苦痛軽減を配慮して行った。放射線照射、細胞移植、採血、剖検の際は、必ず腹腔より十分量のネンブタールを注入し、動物が眠っていることを確認してから行っている。これは動物実験における実験処置に対する倫理基準のカテゴリー B (動物に対してほとんど不快感を与えないと思われる実験) レベルの実験に相当する。

C. 研究結果および D. 考察

1. SOCS1 は HIV-1 の感染によって誘導され、Posttranscriptional Mechanism により HIV-1 の増殖を促進する。

HIV-1 感染は細胞の遺伝子の発現パターンを変化させてしまい、宿主細胞のホメオ

スタシスの崩壊とウイルス増殖を許してしまう。したがって、HIV-1 増殖に関わる遺伝子と細胞内経路を解明するため、私たちは HIV-1 に感染した human T cell line (MOLT-4) と非感染コントロール細胞を使い serial analysis of gene expression (SAGE) で解析した。その結果、SOCS1 は HIV-1 の感染によって up-regulate される遺伝子であることが示された。この事実は、定量 PCR や anti-SOCS1 抗体を使った immunoblotting 解析でも同様の結果が得られた。さらに SOCS1 は、二人の患者から得られた peripheral blood mononuclear cells (PBMC) の細胞内でも up-regulate されていた。

SOCS1 が HIV-1 感染によって誘導されたことから、次にこの遺伝子産物がウイルス増殖に影響を与えるかどうかを調べた。HIV-1 の分子クローンである pNL4-3 や、pcDNA-myc-SOCS1 を 293T 細胞に感染させ、上清中に放出されたウイルス量を観察した。そして、anti-p24 抗体を使い ELISA を行った結果、野生型 SOCS1 は感染させるウイルス量に比例して上清中のウイルス増殖の促進が認められた。反対に、SH2 ドメインや SOCS box を欠損させた変異型は野生型と同レベルのウイルス増殖促進能を欠いており、その両方のドメインが促進のために必須であることが分かった。さらに、もう一つの SOCS box protein である SOCS3 は、並行して行われた実験の結果、HIV-1 増殖に関与しないという結果になり、SOCS1 こそが HIV-1 増殖に不可欠であることが示された。

次に、平行して、cell lysate とウイルス粒子を使った immunoblotting analysis を行った。ELISA の結果と同様、野生型

SOCS1 の発現型は SH2 や SOCS box の変異型と違い、明らかに量に比例して細胞中 Gag protein レベル、特に CA (p24)、や中間産物である MA-CA (p24) CA-NC (p39) の上昇を促した。この上昇傾向は上清中の HIV-1 粒子の増殖に伴って見られることが分かった。これらの結果をまとめると、SOCS1 は感染細胞中の HIV-1 粒子を増殖させ、SOCS1 は SH2 と SOCS box ドメインの 2 つの機能によって役割を果たしていることが言える。

HIV-1 粒子を実際に観察するため、transmission electron microscopy (TEM) を使った。SOCS1 を発現させた細胞中には、コントロールと比較して、きわめて大量の増殖した成熟ウイルス粒子が PM 表面上に検出された。また、粒子の放出を阻害されたことを意味する、二面体や肥大粒子のような奇形ウイルス粒子は SOCS1 過剰発現の細胞には見られなかった。この観察結果と一致するように、SOCS1 を人為的に発現させた細胞は、同じ量のコントロールウイルスを Jurkat cell に添加した場合と同じ感染性を持つことが分かった。これらの結果より、SOCS1 は、HIV-1 粒子を成熟させ、感染性を持たせる役割を担うことが示された。

SOCS1 によって促進された HIV-1 増殖の仕組みを明解にするため、野生型 HIV-LTR (pLTR-luc) をコントロールとした luciferase expression construct か、または full-length プロウイルスベクターを使用した gene reporter assay を行った。興味深いことに、SOCS1 over expression はリポーター産物の構成に影響を及ぼさない。つまり、SOCS1 はウイルスが増殖促進させる際に、posttranscriptional mechanisms を経て HIV-1 の複写を促進する

と考えられた。

2. SOCS1 と HIV-1 Gag Protein との相互作用

初期の実験結果により、SOCS 1 は posttranscriptional mechanism を経て HIV-1 増殖を促進することが示された。従って、次に SOCS1 は HIV-1Gag に直接接合し得るのか否かを検証してみた。C-末端 FLAG-tagged p55 Gag (codon-optimized) と GST-fused SOCS1 で GST pulldown analysis を行ったところ、p55 Gag は GST-SOCS1 と共に特異的に沈殿物を生成することが分かった。更なる研究により、myc-tagged SOCS1 と内因性 SOCS 1 は共に 293 T 細胞中の Gag-FLAG と結合し、免疫性沈殿物を生じることが分かった。また、様々な SOCS1 変異体を GST pull-down analysis により観察した結果、N-末端と SH2 ドメインの両方を欠損している変異型は p55 に接合せず、N-末端か SH2 ドメインのどちらか一方が正常であれば 293T 細胞の SOCS1 が Gag に結合する能力は失われないことが分かった。この事実によって、SH2 ドメインは、HIV-1Gag と SOCS1 が結合するのに重要な役割を持っていることが示された。面白いことに、SH2 ドメインの構造が変異した SOCS1 の R105E 変異体はそれでも結合可能であるが、Gag と SOCS1 の相互作用は Gag の Tyrosine phosphorylation とは独立したものであると考えられる。

Gag protein の SOCS1 が結合する部位を調べてみたところ、MA と NC ドメインであることが分かった。このことは、p55 Gag の MA と NC ドメインを欠損してしまうと完全に SOCS1 と相互関係が無くなるという実

験結果と一致した。また、in vitro の実験でも同様の結果が得られた。

Gag と SOCS1 の細胞内での所在を明らかにするため、光学顕微鏡を用いて観察したところ、内因性の SOCS1 は HIV-1 粒子の増殖中においても Gag protein と細胞質内で結合することが分かった。

3. SOCS 1 は Gag の構造を安定化させ plasma membrane への移動を促進する

anti-p24 で免疫染色を行ったところ、overexpress した SOCS1 は PM に結合する Gag の割合を増やすことが分かった。また、野生株の細胞より、SOCS1 を発現させた細胞は細胞質内の Gag のレベルははるかに低かった。したがって、SOCS1 は Gag の PM への移行を促進させることを示した。

さらに SOCS1 が Gag 生成を安定化させる役割を持つかどうかを確かめるため、Pulse-chase analysis を行った。その結果 SOCS1 は、上清中の p24 と同様に細胞中の p55 Gag polyprotein を安定化させることが示された。また、p24 は、SOCS1 を形質導入した細胞の上清中に驚くほどの速さで増えていくことがわかった。

この仮説を証明するため、SOCS1 を形質導入した HeLa 細胞を使い、chcloheximide analysis を行った。24 時間後、細胞を 3 時間ほど Gag-GFP を導入しタンパク質合成を阻止するため 5 時間 CHX で処理した。さらに、細胞は CHX 無しの新しい培地で 150 分間培養した後、光学顕微鏡で観察した。コントロール細胞では、Gag-GFP は主に核の周りに発現している一方、SOCS1 を導入した半分の細胞が PM の近くに Gag-GFP を発現していた。