

2008080/0A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山本 直樹

平成21年3月

目 次

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	・・・ 1
	山本 直樹（国立感染症研究所 エイズ研究センター長）	
II.	分担研究報告書	
1	HIV-1 の翻訳後修飾と細胞内免疫機構の解析	・・・ 13
	山本 直樹（国立感染症研究所 エイズ研究センター長）	
2	Atypical protein kinase C (aPKC) は極性細胞における HIV-1 粒子出芽 方向を制御する	・・・ 21
	梁 明秀（国立感染症研究所エイズセンター グループ長）	
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	・・・ 29
	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）	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	・・・ 33
IV.	研究成果の刊行物・別刷（抜粋）	・・・ 37

1. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
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

研究代表者 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

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複雑に関わっており、その理解は重要である。我々はとくに、宿主因子によるウイルスタンパク質の直接的な翻訳後修飾に焦点を置いた研究を行い、以下の重要な結果を得た；Pin1 が Gag の NC 領域に indirect に結合し、Gag の重合化と HIV-1 の粒子形成を抑制すること、aPKC が HIV-1p55Gag の p6 領域をリン酸化し、極性細胞におけるウイルス粒子の出芽とその方向を制御すること、RING フィンガー蛋白質 BCA2 が HIV-1 粒子産生を阻害すること、少なくとも、Vif, Vpr, Vpu にそれぞれ 3 6 種類、1 9 種類、1 1 4 種類の宿主のプロテインキナーゼが結合すること、ヒト幹細胞（iPS 細胞）を確立し、これを用いたヒト型感染モデルマウスの作成を行っていること、さらに酵素活性を指標としたあたらしい HIV プロテアーゼ薬剤耐性検査法の開発に成功した。

研究分担者

梁 明秀

国立感染症研究所エイズ研究センター
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

A. 研究目的

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、宿主因子によるウイルスタンパク質の直接的な翻訳後修飾が重要であることが知られている。最近我々はこの手法を用いて、HIV 感染細胞において成熟 HIV 粒子の形成に必要な細胞側因子として SOCS1 を新たに同定している。SOCS1 は HIV Gag タンパク質

と直接複合体を形成し、Gag タンパク質の形質膜への輸送や細胞内の安定化に重要な役割を果たす (Ryo et al., PNAS, 2008 105:294-9)。同様のアプローチで HIV の粒子形成を促進する宿主因子についてもいくつかの興味深い蛋白を同定した(梁, 山本, 日本エイズ学会にて発表)。また、メンブレントラフィック関連ユビキチンリガーゼである宿主因子が Tetherin(CD317)と協調して、HIV 粒子の細胞内への取り込みと分解を促進する (宮川, 山本, 日本エイズ学会にて発表)。

本提案プロジェクトでは、リン酸化部位結合酵素 Pin1 を分子プローブとして用いることにより、HIV 感染細胞内で機能的リン酸化を受ける宿主およびウイルスタンパク質を網羅的に同定し、これらをもとに HIV-1

感染にともなって活性化する細胞内免疫機構の詳細を明らかにすることを目的とする。近年、HIV-1 複製後期過程で作用する抵抗性宿主因子が相次いで報告され、新規のウイルス粒子産生阻害機構の一端が明らかになりつつある。ペプチジルプロリルイソメラーゼ Pin1 はリン酸化された Ser-Pro または Thr-Pro モチーフに結合し、基質タンパク質の構造変化を引き起こすことでその機能を調節する。我々は Pin1 が HIV-1 複製の後期過程において HIV-1Gag タンパク質に相互作用することで HIV-1 粒子形成を制御することを見いだした。さらに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ネースライブラリーの構築を行い、*in vitro* で HIV-1 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。そのアプローチとして、まず HIV-1 タンパク質の結合するプロテインカイネースの探索を行い、その中からリン酸化するカイネースの同定を試みることにした。

このように本プロジェクトの遂行により、すでに重要な宿主因子を複数同定済みである。本研究では、これらの因子のより詳細な分子細胞レベルでの解析や同定した宿主遺伝子の導入による HIV 抵抗性 iPS 細胞の樹立、我々の開発したユニークなモデル動物、NOG マウス、を用いた個体レベルでの検証を行うことにより、当該因子群の HIV 複製や病原性発現への役割や影響について解析する。また、我々の得意とする無細胞タンパク質合成系の技術を用いて、上記因子に対する阻害剤のスクリーニングも併せておこなうことにより、宿主因子を標的とした新規の治療法や発症予防法の開発を目

指す。

B. 研究方法

無細胞タンパク質合成および宿主キナーゼと HIV-1Gag の相互作用スクリーニング

無細胞タンパク質合成系は下記の 3 つのステップから成る。a) キャップ構造非依存型の翻訳エンハンサーおよびポリ A 非依存型 3' 非翻訳配列の探索結果による高誘発型 mRNA 合成、b) PCR 法を利用した FLAG または GST 合タンパク質融合転写型製の作製および無細胞系に至適化した転写・翻訳、c) 合成タンパク質のビオチン化。次に無細胞系タンパク質合成システムにて合成された HIV-1Gag タンパク質と、同じ手法で合成された約 320 種類のヒトキナーゼライブラリーを用いて、HIV-1Gag タンパク質との機能的相互作用についてアルファスクリーンを用いて解析した。具体的には、基質タンパク質である HIV-1Gag p55 にドナービーズを、宿主キナーゼにアクセプタービーズを付加した後に混合し、キナーゼ-Gag の特異的相互作用を蛍光プレートリーダー (Envision, Perkin Elmer 社) にて検出した。タンパク質のリン酸化については、96 穴プレート上で、HIV-1 Gag タンパク質を ATP の存在下でキナーゼと混合し 25℃ で 30 分反させた後、Pin1-FLAG アクセプタービーズを添加し、アルファスクリーンを用いて解析した。

Tandem Affinity Purification (TAP 法)

HIV-1 Gag 遺伝子を N 末端へ組み込み込んだ発現ベクターに *in frame* に TAP タグ配列を付加した。次にこのプラスミドベクターを 293T 細胞にリポフェクション法により導入し、48 時間後に細胞を回収した。細

胞を遠心後 1%SDS-Tris バッファーを用いて溶解、熱変性、ソニケーションを行った後、SDS 不含 RIPA バッファーにて 10 倍に希釈しプルダウン標品とした。細胞ライセートは IgG セファロースビーズ、カルモジュリンアガロースビーズを用いた 2 段階の精製を行った後、TEV プロテアーゼによる切断し回収した。

タンパク質質量分析

TAP 法で得られた HIV-Gag 精製物をトリプシンによりプロテアーゼ消化を行い、陽イオン交換カラムと逆相カラムの 2 つのカラムで高分離しながら質量分析した。具体的にはナノ 2DLC を ESI-IT MS に付属した装置で分析し、MASCOT によりリン酸化部位の解析を行った。

免疫染色

Gag-GFP を発現させた各種細胞株ガラスボトム上で培養した後、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った。次に抗 ZO-1 マウスモノクローナル抗体、抗 aPKC 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。

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、ピ

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プロテインカイネースタンパク質を得た。FLAG 配列を N 末端に付加した HIV-1 アクセサリータンパク質との相互作用は、AlphaScreen 法により検出した。

新規 HIV プロテアーゼ薬剤耐性検査法の開発

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムおよび化学増幅型ルミネッセンス プロキシミティー ホモジニアスアッセイ (アルファスクリーン) を用いて、プロテアーゼタンパク質の酵素活性を指標とした、あたらしい薬剤耐性検査の基盤技術の開発を行った。本手法は、薬剤耐性患者血清中 HIV-1 プロテアーゼ遺伝子を PCR 法で増幅し、2nd PCR 時に転写開始領域、翻訳エンハンサー領域、および 3' UTR 領域を付加するだけで、鋳型遺伝子の準備が可能となり、発現ベクターへのサブクローニング操作をまったく必要としない。これらの鋳型をもとに全自動タンパク質合成ロボットを用いて 384 種類のタンパク質を一晩で合成し、未精製のままアルファスクリーンにより酵素活性をハイスループットで測定することが可能である。

不死化羊膜細胞の iPS 細胞化の検討

他施設を含めヒト細胞の iPS 細胞の作製についての報告がなされているが樹立の際、マウス胎児細胞を支持細胞として使用している。今回、研究の基礎として、支持細胞を使わないマトリゲルを固定化して不死化した羊膜細胞の iPS 細胞化を検討した。ヒト胎盤由来の羊膜細胞の不死化は HPV16E6E7 及び hTERT 遺伝子を導入す

ることで不死化した。さらに iPS 細胞への遺伝子導入法の検討、iPS 細胞の免疫不全マウスへの移入実験も計画している。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所研究等倫理規程を遵守し、倫理委員会の承認の下に患者様に適切な説明の上、同意を得た臨床検体のみを研究に使用する。特に、患者様個人情報の管理には万全を期す。また本研究は遺伝子組換え実験、病原体の使用、動物実験を用いることから「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守する。実験計画は研究者が所属する機関の組換え DNA 実験安全委員会、バイオセーフティ委員会、動物実験委員会、医学研究倫理委員会等の承認・認可を得て実験を行なう。

C. 研究結果

Pin1 による HIV-1 粒子形成の抑制

293T 細胞および HeLa 細胞を用いて、pNL4-3 と Pin1 を co-transfection を行ったところ、Pin1 は量依存的に粒子産生を抑制した。また、Pin1 特異的 siRNA や Pin1 阻害剤の Juglone を処理した細胞では、逆に HIV-1 粒子産生が増加した。細胞ライセートのウエスタンブロット法により、Pin1 は Gag の重合化とプロテアーゼによる切断を顕著に抑制することから、Gag タンパク質のアッセムブリーと成熟化に関与する可能性が示唆された。また BRET 法を用いた Gag-Gag 相互作用実験では、Pin1 は Gag タンパク質間の結合を顕著に阻害した。次に Pin1 と Gag の相互作用を、GST プルダウン法を用いて解析したところ、Pin1 は Gag の NC 領

域に結合することが明らかとなった。NC 領域に Pin1 結合配列である Ser/Thr-Pro がいないこと、またヌクレアーゼ存在下でその結合活性が低下することにより、Pin1 は NC に結合する他の宿主因子に結合し、NC と複合体を構成している可能性が示唆された。

aPKC と HIV-1 Gag タンパク質の相互作用

HIV-1Gag と直接相互作用する宿主キナーゼの同定を行うため、我々は完全長ヒトキナーゼ cDNA ライブラリーを鋳型にして小麦無細胞タンパク質合成を行い、HIV-1 Gag タンパク質と直接相互作用するキナーゼをアルファスクリーンによって同定を試みた。約 320 種類のキナーゼをスクリーニングした結果、9 種類の宿主キナーゼが統計的に有意な範囲で Gag と相互作用が認められ、そのうち 4 種類が 99% 有意のラインを越えたスコアを得た。その 4 種類のうち 3 種類は膜型のチロシンキナーゼであったが、1 つはセリンスレオニンキナーゼである Atypical protein kinase C (aPKC) であった。このキナーゼは極性細胞特異的に活性化し、細胞-細胞間のジャンクション形成や細胞の運動に重要な役割を果たすことが知られていた。それ故、我々は aPKC と HIV-1 Gag の物理的および機能的相互作用についてさらに解析を進めた。まずは、Gag の各ドメイン変異体と aPKC の相互作用をアルファスクリーン法で確認したところ、aPKC は Gag の MA および NC 領域に結合することが明らかになった。これらの相互作用は免疫沈降法においても確認された。さらに aPKC が Gag p6 の Ser487 をリン酸化すること、Gag が aPKC と極性細胞の sub-apical 領域で共局在すること、さらに HIV-1 Gag-Ser487Ala 変異体では分泌極性が失わ

れるなど、を見出した。

BCA2によるHIV-1粒子産生の阻害

BCA2は容量依存的に細胞内Gag発現量とウイルス粒子産生を減少させた。この効果はVpuの強制発現により打ち消された。一方、BCA2特異的なsiRNAを導入したHeLa細胞にpNL4-3を導入したところ、細胞内Gag発現量とウイルス粒子産生の亢進が認められた。また、Gagのエンドサイトーシスが通常認められないHOS細胞およびCos-7細胞ではBCA2によるウイルス粒子産生阻害効果は観察されなかった。

HIV-1アクセサリタンパク質と相互作用するプロテインカイネース

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作成した410種類の完全長バイオチン化プロテインカイネースライブラリーから、少なくとも、Vif, Vpu, Vprにそれぞれ36種類、19種類、114種類のプロテインカイネースが結合することがわかった。また3種類のHIV-1アクセサリタンパク質と共通で結合するプロテインカイネースは、4種類であった。

あたらしいHIVプロテアーゼ薬剤耐性検査法の開発

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムおよびアルファスクリーンを用いて、を用いて、21例のHIV患者血清より得られたHIVプロテアーゼに対する阻害剤の効果を測定し、遺伝子型検査法による薬剤耐性予測結果 (<http://hivdb.stanford.edu/>) と比較検討を行ったところ、おおよそ80%以上のサンプルにおいて遺伝子型検査との相関が認められた。また、6例の分子クローン化した薬剤耐性プロテアーゼを用いた解析では、

表現型検査法による結果と有意な相関が認められた。

フィーダーフリーによる不死化したヒト羊膜細胞からiPS細胞作製

他施設を含めヒト細胞のiPS細胞の作製についての報告がなされているが樹立の際、マウス胎児細胞を支持細胞として使用している。今回、研究の基礎として、支持細胞を使わないマトリゲルを固定化して不死化した羊膜細胞のiPS細胞化を検討した。ヒト胎盤由来の羊膜細胞の不死化はHPV16E6E7及びhTERT遺伝子を導入することで不死化した。細胞2株は男性の正常核型と異常の核型のモザイク状態をしめし、ピメンチン陽性で倍加時間が約30時間であった。VSV-Gで包んだ4因子の組み換えレトロウイルスを作製して、不死化したヒト羊膜細胞に1回感染後、6-7日間培養して20%マトリゲルを固定化したシャーレ上に播種して出現したiPS様のコロニーをクローニングを行い増殖させ、継代もマトリゲルを使用した。樹立できた細胞株のin vitro及びin vivoにおける未分化能や分化能などの生物学的な検討を行った。

D, E. 考察および結論

Pin1はHIV-1Gagタンパク質のNC領域に間接的に結合することで、Gagの重合化やそれに引き続く粒子産生を顕著に抑制することが分かった。Pin1はHIV-1感染で誘導されるrestriction factorの1つである可能性が示唆された。今後はPin1がどのような機序でGagタンパク質に相互作用し、粒子産生を抑制するかについて詳細な分子メカニズムの解明を行う予定である。

小麦無細胞タンパク質合成系を用いたハ

イスループット全長ヒトキナーゼライブラリースクリーニングにより、HIV-1 Gag p6をリン酸化する宿主キナーゼとして新たにaPKCを同定した。aPKCは細胞の極性形成に必須の因子であり、極性細胞における非対称性マイクロドメインを形成する。aPKCによるGagタンパク質のリン酸化が極性細胞におけるHIV-1粒子の方向性を持った出芽の制御に必須の因子であることが示唆された。今後は実際の感染CD4⁺T細胞やマクロファージにおいてaPKCが直接ウイルスの出芽を制御しているか、また細胞極性が関与する感染事象の1つとして、virological synapseを介した細胞—細胞間のウイルス伝播におけるaPKCの役割等について詳細な解析を行う必要がある。しかしながら、我々の本研究成果は、aPKCとその関連因子がHIV-1出芽や粒子形成を制御する新しい宿主因子の1つであることを初めて示したものであり、aPKC/Parシステムが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。またBCA2によるHIV-1粒子産生の阻害に関しては、BCA2がVpu依存的なHIV-1粒子の取り込みと分解に関与することが示唆された。現在、BCA2のHIV-1粒子産生阻害メカニズムを詳細に検討中である。

本研究は、HIV-1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。昨年度、網羅的なタンパク質のプロテインカイネースの解析に必要な、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相互作用検出系、という2つのコア技術の開発に成功

した。本年度は、それらの技術を用いて、Vif, Vpu, Vprの3種類のHIV-1アクセサリタンパク質と、それぞれ36種類、19種類、114種類の宿主プロテインカイネースが結合することを見出した。これらの中には、これまでのHIV-1感染において、指摘されていた細胞生物学的現象を説明できるプロテインカイネースが含まれていた。例えば、Vprの過剰発現は、ヒトやサルなどの細胞で、細胞分裂期のG2アレストを引き起こすことが知られているが、本研究で見出したVprと結合するタンパク質の中には、細胞分裂に深く関与するプロテインカイネースが含まれており、本研究を進めることにより、Vpr誘導G2アレスト機構解明に寄与することが期待される。今後は、これらのプロテインカイネースのHIV-1アクセサリタンパク質へのリン酸化能の有無や、細胞内での相互作用を調べる。

あたらしいHIVプロテアーゼ薬剤耐性検査法の開発に関して、我々は、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムおよびアルファスクリーンを用いて作成された、プロテアーゼタンパク質の酵素活性を指標とした、あたらしい薬剤耐性検査の基盤技術の開発に成功した。本法はGenotype法とPhenotype法を結ぶタンパク質レベルの薬剤耐性検査法として位置づけられ、短期間で安価に適切な薬剤情報を提供できるため、患者本位のテーラーメイド医療の実現に貢献するものと期待される。

最後に、iPS細胞の確立とこれを用いたヒト型感染モデルマウスの作成であるが、今回、マウス胎児細胞などの支持細胞を使用せずにヒトiPS細胞が樹立できたことは臨床的応用において安全面で意義ぶかいと

思われる。iPS 細胞を蛍光ラベルした後、NOG マウスに移入することにより、in vivo における iPS 細胞の分化や組織分布や、HIV-1 プロモータレポーター遺伝子 (LTR-GFP など) を予め導入した iPS 細胞を NOG マウスへ移入し、HIV-1 遺伝子の発現可能な組織や細胞について考察する予定であるが、その部分の研究は少し遅れており、反省を要する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Md. Zahidunnabi Dewan, Naofumi Takamatsu, Tomonori Hidaka, Kinta Hatakeyama, Shingo Nakahata, Jun-ichi Fujisawa, Harutaka Katano, Naoki Yamamoto, and Kazuhiro Morishita. Critical role of TSLC1 expression in the growth and organ-infiltration of adult T-cell leukemia cells in vivo. **J. Virol.**, 2008 Dec;82(23):11958-63.
- 2) Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T and Akira S. Loss of Atg16L1, an autophagy regulator, enhances endotoxin-induced IL-1 β production. **Nature**, 2008 Nov 13;456(7219):264-8.
- 3) Nomura W, Tanabe Y, Tsutsumi H, Tanaka T, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H. Fluorophore Labeling Enables Imaging and Evaluation of Specific CXCR4-Ligand Interaction at the Cell Membrane for Fluorescence-Based Screening. **Bioconjug Chem.** 2008, 19, 1917-1920
- 4) Ueoka R, Komizu Y, Matsumoto Y, Zhong Y, Tanaka R, Yamamoto N. Selective inhibitory effects of hybrid liposomes on the growth of HIV type 1-infected cells in vitro. **Bioorg Med Chem Lett.** 2008 Aug 15;18(16):4578-80.
- 5) Yajima M, Imadome KI, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S. A New Humanized Mouse Model of Epstein-Barr Virus Infection That Reproduces Persistent Infection, Lymphoproliferative Disorder, and Cell-Mediated and Humoral Immune Responses. **J Infect Dis.** 2008 Sep 1;198(5):673-682.
- 6) Miyake A, Dewan MZ, Ishida T, Watanabe M, Honda M, Sata T, Yamamoto N, Umezawa K, Watanabe T, Horie R. Induction of apoptosis in Epstein-Barr virus-infected B-lymphocytes by the NF-kappaB inhibitor DHMEQ. **Microbes Infect.** 2008 Jun;10(7):748-56.
- 7) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, and Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 324, vol.34, pp138-148, 2008, Springer-Verlag (Eds. Nomura, Watanabe, and Habu),

- 8) Amet T, Nonaka M, Dewan MZ, Saitoh Y, Qi X, Ichinose S, Yamamoto N, Yamaoka S. Statin-induced inhibition of HIV-1 release from latently infected U1 cells reveals a critical role for protein prenylation in HIV-1 replication. **Microbes Infect.** 10(5):471-80, 2008
- 9) Takahashi Y, Tanaka R, Yamamoto N, Tanaka Y. Enhancement of OX40-Induced Apoptosis by TNF Coactivation in OX40-Expressing T Cell Lines in Vitro Leading to Decreased Targets for HIV Type 1 Production. **AIDS Res Hum Retroviruses.** 2000 Mar;24(3):423-35.
- 10) Urano E, Shimizu S, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Takahashi N, Fukazawa H, Yamamoto N, Komano J. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/positive transcription elongation factor b-dependent long terminal repeat transcription. **AIDS.** 2008 May 31;22(9):1081-3.
- 11) Takeuchi R, Ryo A, Komitsu N, Mikuni-Takagaki Y, Fukui A, Takagi Y, Shiraishi T, Morishita S, Yamazaki Y, Kumagai K, Aoki I, Saito T. Low-intensity pulsed ultrasound activates the PI3K/Akt pathway and stimulates the growth of chondrocytes in 3D-cultures: a basic science study. **Arthritis Res Ther.** 2008, 10(4):R77.
- 12) Kobayashi T, Kodani Y, Nozawa A, Endo Y, Sawasaki T. DNA-binding profiling of human hormone nuclear receptors via fluorescence correlation spectroscopy in a cell-free system. **FEBS Lett.** 2008, 582(18):2737-44.
- 13) Masaoka T, Nishi M, Ryo A, Endo Y, Sawasaki T. The wheat germ cell-free based screening of protein substrates of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta. **FEBS Lett.** 2008, 582(13):1795-801.
- 14) Sawasaki T, Nishihara M, Endo Y. RIP and RALyase cleave the sarcin/ricin domain, a critical domain for ribosome function, during senescence of wheat coleoptiles. **Biochem Biophys Res Commun.** 2008, 370(4):561-5.
- 15) Bardóczy V, Géczy V, Sawasaki T, Endo Y, Mészáros T. A set of ligation-independent in vitro translation vectors for eukaryotic protein production. **BMC Biotechnol.** 2008, 8:32.
- 16) Dewan MZ, Tomita M, Katano H, Yamamoto N, Ahmed S, Yamamoto M, Sata T, Mori N, Yamamoto N. An HIV protease inhibitor, ritonavir targets the nuclear factor-kappaB and inhibits the tumor growth and infiltration of EBV-positive lymphoblastoid B cells. **Int. J. Cancer,** 2009 Feb 1;124(3):622-9.
- 17) Jeong SJ, Ryo A, Yamamoto N. The prolyl isomerase Pin1 stabilizes the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax oncoprotein and promotes malignant transformation. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** In Press, Available online 11 February 2009.

- 18) Ryo A, Wulf G, Lee TH, Lu KP. Pinning down HER2-ER cross-talk in SMRT regulation. *Trends Biochem Sci.*, in press.
2. 学会発表
- 1) Takahashi H, Seki M, Shinozaki K, Sawasaki T, Endo Y, High-throughput detection of ubiquitination and poly-ubiquitination based on wheat cell-free protein production system. 19th international Conference on Arabidopsis Research. July 23-27, 2008, Motreal, Canada.
- 2) 西真由子, 山本直樹, 青木一郎, 梁明秀: SOCS1 は HIV-1 Gag タンパク質の細胞内輸送を促進する 第 27 回分子病理学研究会 平成 20 年 8 月 2-3 日、湘南国際村センター
- 3) Ohba K, Ryo A, Terashima K, Yamamoto N: Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. 第 8 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、平成 20 年 9 月 7 日-11 日、兵庫県立淡路夢舞台国際会議場
- 4) Ryo A, Yamamoto N: Identification of host factors required for HIV-1 Gag trafficking. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Sep.18-19, 2008, Aso Resort Grand Vrio Hotel. (第 9 回熊本エイズセミナー、平成 20 年 9 月 18-19 日、阿蘇リゾート グランヴィリオホテル)
- 5) Ohba K, Ryo A, Terashima K, Yamamoto N: Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Sep.18-19, 2008, Aso Resort Grand Vrio Hotel. (第 9 回熊本エイズセミナー、平成 20 年 9 月 18-19 日、阿蘇リゾート グランヴィリオホテル)
- 6) Takahama S, Ryo A: Atypical protein kinase C (aPKC), a cell polarity regulating kinase, phosphorylates HIV-1 Gag. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Sep.18-19, 2008, Aso Resort Grand Vrio Hotel. (第 9 回熊本エイズセミナー、平成 20 年 9 月 18-19 日、阿蘇リゾート グランヴィリオホテル)
- 7) Ryo A: Use of Cell-Free Protein Synthesis System in HIV/AIDS Research. PIM(Protein Island Matsuyama) International Symposium 2008, Sep. 25-27, 2008, Matsuyama. Sep. 26 The 6th Matsuyama International Symposium on Cell-free Sciences (第 6 回無細胞化学松山国際シンポジウム、松山全日空ホテル本館 4 階ダイヤモンドホールルーム)
- 8) Ryo A: Detection and Identification of HIV-1 resistance and crucial host factors by cell-free protein production system. 4th International Infection Control Conference of Theodore Bilharz Research Institute (TBRI), Nov. 10-13, 2008, TBRI, Giza, Egypt.
- 9) Takahashi H, Seki M, Shinozaki K, Endo

- Y, Sawasaki T, High-throughput analysis of ubiquitination and polyubiquitination based on wheat cell-free protein production system and luminescent detection. The Fifth International Symposium on the COP9 signalosome, Proteasome and eIF3. November 11-14, 2008, RIKEN, Yokohama Institute, Japan.
- 10) 正岡崇志, 梁明秀, 巽正志, 杉浦互, 森下了, 澤崎達也, 山本直樹: 酵素活性を指標とした新規HIVプロテアーゼ薬剤耐性検査法の開発 第22回日本エイズ学会学術集会・総会 平成20年11月26-28日、大阪国際交流センター
- 11) 梁明秀, 山本直樹: 無細胞タンパク質合成系を用いたHIV/AIDS研究の新たな展開 第22回日本エイズ学会学術集会・総会シンポジウム7「実験室からの発信」 平成20年11月26-28日、大阪国際交流センター
- 12) 宮川敬, 梁明秀, 大庭賢二, 村上努, 山本直樹: RINGフィンガー蛋白質BCA2はHIV-1粒子産生を阻害する 第22回日本エイズ学会学術集会・総会 平成20年11月26-28日、大阪国際交流センター
- 13) 仲宗根正, 網康至, 梁明秀, 山本直樹: ウイルス曝露非感染サルモデル開発の試み 第22回日本エイズ学会学術集会・総会 平成20年11月26-28日、大阪国際交流センター
- 14) 高橋宏隆, 関原明, 篠崎一雄, 遠藤弥重太, 澤崎達也. コムギ無細胞系を用いたシロイヌナズナ植物の HECT 型 E3 タンパク質の発現と解析. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同学会. 神戸、2008年12月9-12日
- 15) 関藤利枝, 松岡和弘, 野澤彰, 澤崎達也, 遠藤弥重太, コムギ無細胞蛋白質合成系を基盤したヒト蛋白質ライブラリーの作成. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会. 神戸, 2008年12月9-12日
- 16) 関藤利枝, 松岡和弘, 野澤彰, 澤崎達也, 遠藤弥重太, コムギ無細胞蛋白質合成系を基盤したヒト蛋白質ライブラリーの作成. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会. 神戸, 2008年12月9-12日
- 17) 田所大典, 高濱正吉, 野澤彰, 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網羅的探索, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008年12月9-12日
- 18) 赤木達也, 澤崎達也, 遠藤弥重太, カスパーゼ8により切断される膜貫通タンパク質の探索システムの構築, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008年12月9-12日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 「A Method for Screening anti-HIV Drugs and a Diagnostic Method of AIDS」
- 米国特許: 12/188,242
- 発明者: 梁明秀, 澤崎達也, 山本直樹

出願日：2008年8月8日	2. 実用新案登録
出願人：厚生労働省、株式会社セルフ リーサイエンス	なし
「最適な抗ウイルス剤の選択方法」	3. その他
出願済み	なし

11. 分担研究報告書

HIV-1 の翻訳後修飾と細胞内免疫機構の解析

研究代表者 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： 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複雑に関わっており、その理解は重要である。我々はとくに、宿主因子によるウイルスタンパク質の直接的な翻訳後修飾に焦点を置いた研究を行い、以下の重要な結果を得た； Pin1 が Gag の NC 領域に indirect に結合し、Gag の重合化と HIV-1 の粒子形成を抑制すること、RING フィンガー蛋白質 BCA2 が HIV-1 粒子産生を阻害すること、ヒト幹細胞（iPS 細胞）を確立し、これを用いたヒト型感染モデルマウスの作成を行っていること、さらに酵素活性を指標としたあたらしい HIV プロテアーゼ薬剤耐性検査法の開発に成功した。

A. 研究目的

近年、HIV-1 複製後期過程で作用する抵抗性宿主因子が相次いで報告され、新規のウイルス粒子産生阻害機構の一端が明らかになりつつある。ペプチジルプロリルイソメラーゼ Pin1 はリン酸化された Ser-Pro または Thr-Pro モチーフに結合し、基質タンパク質の構造変化を引き起こすことでその機能を調節する。我々は Pin1 が HIV-1 複製の後期過程において HIV-1 Gag タンパク質に相互作用することで HIV-1 粒子形成を制御することを見いだした。

さらに、ウイルス複製後期過程において HIV-1 粒子産生を負に制御し、Gag と相互作用する宿主因子 BCA2 (Breast Cancer Associated gene 2) を見いだした。主として乳癌細胞で高発現が認められる BCA2 は、C 末端に RING ドメインをもつ E3 ユビキチンリガーゼの一種であり、EGFR の取り込みと分解の制御に関与する。また N

末端ジンクフィンガー領域において低分子 G 蛋白質 Rab7 と結合することにより、小胞内蛋白質のライソゾームへのターゲティングや分解を制御することが知られている。本研究において我々は、BCA2 のウイルス抵抗性宿主因子としての新しい機能について検証を行った。

薬剤耐性 HIV 検査は、新規感染者および長期療養患者に対する適切な治療を行う上で欠かせない検査と位置づけられている。薬剤耐性検査としては、現在「遺伝子型検査」と「表現型検査」が行われているが、それぞれに長短所があり、また実際の酵素活性を指標としていないため正確に薬剤耐性を反映しない事例も生じている。

2007 年に京都大学の山中からはヒト皮膚線維芽細胞から、4 つの遺伝子 (c-Myc, Klf4, Oct3/4, Sox2) の組み換えレトロウイルスを感染させ、iPS 細胞作製について発表した。我々は HIV 抵

抗性の遺伝子を有する iPS 細胞を作製し、免疫不全マウス (NOG マウス) に移入することで、HIV 抵抗性マウスモデルを作製することを目指している。そして将来的には iPS 細胞を用いた HIV-1/AIDS に対する新規治療法や予防法の確立を目指す。

B. 研究方法

1. Pin1 による HIV-1 複製の制御

後期過程において HIV-1Gag タンパク質に相互作用することで HIV-1 粒子形成コドン修飾した HIV-1Gag タンパク質を 293 細胞および T 細胞株で発現させ、細胞のライセートを GST-Pin1 リコンビナントタンパク質と混合し、グルタチオンセファロースビーズでプルダウンを行った。また VLP および HIV-1 粒子産生については細胞上清中の P24 量をルミパルス(富士レビオ)を用いて定量した。

2. BCA2 による HIV-1 粒子産生の阻害

BCA2 の HIV-1 粒子産生に対する効果を調べるため、我々は BCA2 を過剰発現した HeLa 細胞に pNL4-3 を導入し、ウイルス粒子産生および細胞内 Gag 発現量を解析した。

3. あたらしい HIV プロテアーゼ薬剤耐性検査法の開発

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムおよび化学増幅型ルミネッセンス プロキシミティー ホモジニアスアッセイ (アルファスクリーン) を用いて、プロテアーゼタンパク質の酵素活性を指標とした、あたらしい薬剤耐性検査の基盤技術の開発を行った。本手法は、薬剤耐性患者血清中 HIV-1 プロテアーゼ遺伝子を PCR 法で増幅し、2nd PCR 時に転写開始領域、翻訳エンハンサー領域、および 3' UTR

領域を付加するだけで、鋳型遺伝子の準備が可能となり、発現ベクターへのサブクローニング操作をまったく必要としない。これらの鋳型をもとに全自動タンパク質合成ロボットを用いて 384 種類のタンパク質を一晩で合成し、未精製のままアルファスクリーンにより酵素活性をハイスループットで測定することが可能である。

4. 不死化羊膜細胞の iPS 細胞化の検討

他施設を含めヒト細胞の iPS 細胞の作製についての報告がなされているが樹立の際、マウス胎児細胞を支持細胞として使用している。今回、研究の基礎として、支持細胞を使わないマトリゲルを固定化して不死化した羊膜細胞の iPS 細胞化を検討した。ヒト胎盤由来の羊膜細胞の不死化は HPV16E6E7 及び hTERT 遺伝子を導入することで不死化した。さらに iPS 細胞への遺伝子導入法の検討、iPS 細胞の免疫不全マウスへの移入実験も計画している。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所研究等倫理規程を遵守し、倫理委員会の承認の下に患者様に適切な説明の上、同意を得た臨床検体のみを研究に使用する。特に、患者様個人情報管理には万全を期す。また本研究は遺伝子組換え実験、病原体の使用、動物実験を用いることから「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守する。実験計画は研究者が所属する機関の組換え DNA 実験安全委員会、バイオセーフティ委員会、動物実験委員会、医学研究倫理委員会等の承認・認可を得て実験を行な

う。

C. 研究結果

Pin1 による HIV-1 粒子形成の抑制

我々の過去の研究結果により、Pin1 は HIV-1 感染に伴って、その発現が亢進することが知られている。今回我々は、Pin1 が HIV-1 複製後期過程における Gag のアッセンブリーや粒子形成に及ぼす影響について考察した。

まずは、293T 細胞および HeLa 細胞を用いて、pNL4-3 と Pin1 を co-transfection を行ったところ、Pin1 は量依存的に粒子産生を抑制した。また、Pin1 特異的 siRNA や Pin1 阻害剤の Juglone を処理した細胞では、逆に HIV-1 粒子産生が増加した。細胞ライセートのウエスタンブロット法により、Pin1 は Gag の重合化とプロテアーゼによる切断を顕著に抑制することから、Gag タンパク質のアッセンブリーと成熟化に関与する可能性が示唆された。また BRET 法を用いた Gag-Gag 相互作用実験では、Pin1 は Gag タンパク質間の結合を顕著に阻害した。

次に Pin1 と Gag の相互作用を、GST プルダウン法を用いて解析したところ、Pin1 は Gag の NC 領域に結合することが明らかとなった。NC 領域に Pin1 結合配列である Ser/Thr-Pro が無いこと、またヌクレアーゼ存在下でその結合活性が低下することにより、Pin1 は NC に結合する他の宿主因子に結合し、NC と複合体を構成している可能性が示唆された。

BCA2 による HIV-1 粒子産生の阻害

BCA2 は容量依存的に細胞内 Gag 発現量とウイルス粒子産生を減少させた。この効果は Vpu の強制発現により

打ち消された。一方、BCA2 特異的な siRNA を導入した HeLa 細胞に pNL4-3 を導入したところ、細胞内 Gag 発現量とウイルス粒子産生の亢進が認められた。また、Gag のエンドサイトーシスが通常認められない HOS 細胞および Cos-7 細胞では BCA2 によるウイルス粒子産生阻害効果は観察されなかった。

あたらしい HIV プロテアーゼ薬剤耐性検査法の開発

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムおよびアルファスクリーンを用いて、を用いて、21例のHIV患者血清より得られたHIVプロテアーゼに対する阻害剤の効果を測定し、遺伝子型検査法による薬剤耐性予測結果 (<http://hivdb.stanford.edu/>) と比較検討を行ったところ、おおよそ80%以上のサンプルにおいて遺伝子型検査との相関が認められた。また、6例の分子クローン化した薬剤耐性プロテアーゼを用いた解析では、表現型検査法による結果と有意な相関が認められた。フィーダーフリーによる不死化したヒト羊膜細胞から iPS 細胞作製

他施設を含めヒト細胞の iPS 細胞の作製についての報告がなされているが樹立の際、マウス胎児細胞を支持細胞として使用している。今回、研究の基礎として、支持細胞を使わないマトリゲルを固定化して不死化した羊膜細胞の iPS 細胞化を検討した。ヒト胎盤由来の羊膜細胞の不死化は HPV16E6E7 及び hTERT 遺伝子を導入することで不死化した。細胞 2 株は男性の正常核型と異常の核型のモザイク状態をしめし、ピメンチン陽性で倍加時間が約 30 時間であった。VSV-G で包んだ 4 因子の組み換えレトロウイ

ルスを作製して、不死化したヒト羊膜細胞に1回感染後、6-7日間培養して20%マトリゲルを固定化したシャーレ上に播種して出現したiPS様のコロニーをクローニングを行い増殖させ、継代もマトリゲルを使用した。樹立できた細胞株のin vitro及びin vivoにおける未分化能や分化能などの生物学的な検討を行った。

D, E. 考察および結論

Pin1によるHIV-1粒子形成の抑制

Pin1はHIV-1Gagタンパク質のNC領域に間接的に結合することで、Gagの重合化やそれに引き続く粒子産生を顕著に抑制することが分かった。Pin1はHIV-1感染で誘導されるrestriction factorの1つである可能性が示唆された。今後はPin1がどのような機序でGagタンパク質に相互作用し、粒子産生を抑制するかについて詳細な分子メカニズムの解明を行う予定である。

BCA2によるHIV-1粒子産生の阻害

BCA2がVpu依存的なHIV-1粒子の取り込みと分解に関与することが示唆された。現在、BCA2のHIV-1粒子産生阻害メカニズムを詳細に検討中である。

あたらしいHIVプロテアーゼ薬剤耐性検査法の開発

我々は、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムおよび化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティーホモジニアスアッセイ(アルファスクリーン)を用いて作成された、プロテアーゼタンパク質の酵素活性を指標とした、あたらしい薬剤耐性検査の基盤技術の開発に成功した。本法はGenotype法とPhenotype法を結ぶタン

パク質レベルの薬剤耐性検査法として位置づけられ、短期間で安価に適切な薬剤情報を提供できるため、患者本位のテーラーメイド医療の実現に貢献するものと期待される。

iPS細胞の確立とこれを用いたヒト型感染モデルマウスの作成

今回、マウス胎児細胞などの支持細胞を使用せずにヒトiPS細胞が樹立できたことは臨床的応用において安全面で意義ぶかいと思われる。iPS細胞を蛍光ラベルした後、NOGマウスに移入することにより、in vivoにおけるiPS細胞の分化や組織分布や、HIV-1プロモーターレポーター遺伝子(LTR-GFPなど)を予め導入したiPS細胞をNOGマウスへ移入し、HIV-1遺伝子の発現可能な組織や細胞について考察する予定であるが、その部分の研究は少し遅れており、反省を要すると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Md. Zahidunnabi Dewan, Naofumi Takamatsu, Tomonori Hidaka, Kinta Hatakeyama, Shingo Nakahata, Jun-ichi Fujisawa, Harutaka Katano, Naoki Yamamoto, and Kazuhiro Morishita Critical role of TSLC1 expression in the growth and organ-infiltration of adult T-cell leukemia cells in vivo. *J. Virol.*, 2008 Dec;82(23):11958-63.
- 2) Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori

- T and Akira S. Loss of Atg16L1, an autophagy regulator, enhances endotoxin-induced IL-1 β production. **Nature**, 2008 Nov 13;456(7219):264-8.
- 3) Nomura W, Tanabe Y, Tsutsumi H, Tanaka T, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H. Fluorophore Labeling Enables Imaging and Evaluation of Specific CXCR4-Ligand Interaction at the Cell Membrane for Fluorescence-Based Screening. **Bioconjug Chem**. 2008, 19, 1917-1920
 - 4) Ueoka R, Komizu Y, Matsumoto Y, Zhong Y, Tanaka R, Yamamoto N. Selective inhibitory effects of hybrid liposomes on the growth of HIV type 1-infected cells in vitro. **Bioorg Med Chem Lett**. 2008 Aug 15;18(16):4578-80.
 - 5) Yajima M, Imadome KI, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S. A New Humanized Mouse Model of Epstein-Barr Virus Infection That Reproduces Persistent Infection, Lymphoproliferative Disorder, and Cell-Mediated and Humoral Immune Responses. **J Infect Dis**. 2008 Sep 1;198(5):673-682.
 - 6) Miyake A, Dewan MZ, Ishida T, Watanabe M, Honda M, Sata T, Yamamoto N, Umezawa K, Watanabe T, Horie R. Induction of apoptosis in Epstein-Barr virus-infected B-lymphocytes by the NF-kappaB inhibitor DHMEQ. **Microbes Infect**. 2008 Jun;10(7):748-56.
 - 7) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, and Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**324, vol.34,pp138-148, 2008, Springer-Verlag (Eds. Nomura, Watanabe, and Habu),
 - 8) Amet T, Nonaka M, Dewan MZ, Saitoh Y, Qi X, Ichinose S, Yamamoto N, Yamaoka S. Statin-induced inhibition of HIV-1 release from latently infected U1 cells reveals a critical role for protein prenylation in HIV-1 replication. **Microbes Infect**. 10(5):471-80, 2008
 - 9) Takahashi Y, Tanaka R, Yamamoto N, Tanaka Y. Enhancement of OX40-Induced Apoptosis by TNF Coactivation in OX40-Expressing T Cell Lines in Vitro Leading to Decreased Targets for HIV Type 1 Production. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 2000 Mar;24(3):423-35.
 - 10) Urano E, Shimizu S, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Takahashi N, Fukazawa H, Yamamoto N, Komano J. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/positive transcription elongation factor b-dependent long terminal repeat transcription. **AIDS**. 2008 May 31;22(9):1081-3.
 - 11) Dewan MZ, Tomita M, Katano H, Yamamoto N, Ahmed S, Yamamoto M, Sata T, Mori N, Yamamoto N. An HIV protease inhibitor, ritonavir