

- 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.
- 12) 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.
2. 学会発表
- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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

- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得

発明の名称：「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

出願人：厚生労働省、株式会社セルフ
リーサイエンス

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

(共同研究者；梁明秀、澤崎達也)

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

研究分担者 梁 明秀 国立感染症研究所エイズセンターグループ長

研究要旨：細胞極性は多細胞生物における細胞運動、形態形成、細胞間相互作用などの高次の細胞機能発現の基盤である。細胞極性の構築には Atypical protein kinase C (aPKC) およびその結合タンパク質による制御が必須であることが知られているが、これらの因子が HIV-1 複製や粒子形成にどのように関与するかについて報告はない。我々は無細胞タンパク質合成系を活用した包括的ヒトキナーゼライブラリーを用いたリン酸化スクリーニングにより、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を明らかにした。この発見は極性細胞におけるウイルス粒子の出芽方向に細胞極性関連因子が関与することを最初に示したものであり、宿主因子を標的とした新しい HIV-1/AIDS の治療法の開発につながる可能性がある。

A. 研究目的

HIV 感染症の成立には宿主タンパク質と HIV タンパク質間の機能的相互作用が必須であり、そのものが感染個体のウイルス感染感受性や AIDS やその他関連疾患の発症を決定する。HIV-1 感染にともなう宿主個体の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機能修飾が重要であると考えられる。特に HIV-1 粒子の出芽は細胞側の multivesicular bodies (MVB) 経路を介して細胞表面から出芽するが、これには HIV-1 Gag 蛋白質の C 末端 p6 領域に存在する PTAP モチーフと YPXL モチ

ーフが、ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) 因子である TSG101/ESCRT-I と ALIX に直接作用を受けることにより制御されている。しかし、これらの相互作用には p6 領域の翻訳後修飾、すなわちリン酸化やユビキチン化が重要であることが知られており、これに関わる宿主側（キナーゼやユビキチン関連因子）の同定や詳細な分子レベルでの制御機構の解明が望まれる。

我々は本研究課題において、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およびペプ

チジルプロリルイソメラーゼ Pin1 を分子プローブとして利用したリン酸化部位同定法により、HIV-1Gag を機能的にリン酸化する宿主キナーゼの同定を試みている。この方法は細胞側のキナーゼを無細胞で合成し、in vitro における HIV-1 Gag タンパク質との相互作用やリン酸化について考察するものである。今回我々はこの方法を用いて、aPKC (atypical protein kinase C: PKC ν) が HIV-1 Gag と直接相互作用し、Gag の p6 領域をリン酸化することを新たに明らかにした。aPKC は細胞極性の形成に必須の因子であり、Par ファミリータンパク質と複合体を形成して、細胞—細胞間のタイトジャンクションの形成や、apical/lateral/basal といった細胞の空間的事象を決定づける際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形成や物質輸送を制御する。我々は 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を明らかにした。

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鑄型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, Parkin 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°C 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。

(倫理面への配慮)

研究にはヒト末梢血を使用するため、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りうるが、これは通常の診療行為を越えるものではない。

2. 個人情報やプライバシー の保護・管理に留意し、患者やクライアントの人権や利益の尊重等に細心の配慮を行う。

C. 研究結果

1. aPKC は HIV-1 Gag タンパク質と結合する。

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胚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 ; PKC ζ)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。

2. aPKC は Gag p6 の Ser487 をリン酸化する

次に、aPKC が HIV-1Gag タンパク質をリン酸化するか否かについて³²P-ATP を用いた *in vitro* リン酸化アッセイを行った。同時に複数の Gag ドメイン変異体を作製し、aPKC によるリン酸化の有無を同時に検討した。その結果、aPKC は Gag 全長および NC と p6 領域を顕著にリン酸化することが分かった。

次に aPKC が p6 のどの部位をリン酸化するかを確認するため、p6 のセリン残基をアラニンに置換した変異体を複数作製し、*in vitro* kinase assay を行ったところ、Ser487 を Ala に置換した変異体(S487A)では aPKC によるリン酸化が認められなかったが、他の変異体および野生型においてはリン酸化が認められた。この結果より、*in vitro* において活性化 aPKC は Gag の p6 領域である Ser487 をリン酸化することが明らかになった。

次に細胞内 (*in vivo*) における Gag のリン酸化の有無およびリン酸化部位を同定するため、TAP 法 (tandem affinity purification: タンデム アフィニティー精製) を用いた細胞内 Gag の高度精製を行い、SDS-PAGE で展開後、ゲル内消化を行い質量分析 (TOF-MS/MS) を施行しリン酸化部位を確認した。その結果、HIV-1Gag は Ser9, Ser54 などの複数の Ser 残基がリン酸化されていたが、同時に *in vitro*

における aPKC のリン酸化部位である Ser487 のリン酸化も認められた。

3. HIV-1 Gag は aPKC と極性細胞の sub-apical 領域で共局在する

aPKC は極性を有する細胞において特異的に活性化しているため、我々は極性細胞である MDCK 上皮細胞の単層培養を行い、細胞極性下における HIV-1Gag と aPKC の動態を観察した。まず、Gag-GFP を stable に発現する MDCK 細胞株を、レトロウイルスベクターを用いて樹立し、樹立細胞における Gag の分泌方向をトランスウェル培養法およびウエスタンブロット法により確認した。その結果、Gag タンパク質は極性 MDCK 細胞の Apical 方向に主に出芽しており、Basal 側の出芽はきわめて少量であった。

4. HIV-1 Gag-Ser487Ala 変異体は分泌極性が失われる

われわれは上記の分泌極性を有する極性 MDCK 細胞・HIV-1Gag 出芽モデルを用いて、aPKC による Ser487 のリン酸化の生理学的意義について考察した。まず、aPKC による Gag のリン酸化部位である Ser487 を Ala (非リン酸化型) に置換した S487A 変異体および Ser487Glu (リン酸化型) に置換した変異体 (S487E) を作製し、上記と同様の MDCK 細胞 Stable clone を作製した後に、VLP の分泌方向および出芽効率を解析した。その結果、Gag-S487E 変異体は野生型 Gag と同程度の分泌効率と Apical 側への放出を示したの

に対し、Gag-S487A 変異体は Apical 側での分泌が認められず、出芽効率の顕著な低下が認められた。また3次元免疫染色法により Gag の局在を観察したところ、Gag-S487A タンパク質は Apical 側からの出芽効率が顕著に低下しており、放出できないタンパク質が細胞内の sub-apical 領域に蓄積していた。これらの結果は、極性細胞におけるウイルス粒子出芽に aPKC による Ser487 のリン酸化が必要であり、aPKC は極性細胞における Gag タンパク質の出芽に対するゲートキーパーとして機能している可能性が示唆された。

D, E. 考察および結論

哺乳類細胞は高次の細胞機能を有し、その機能発現のために統合的な制御を受ける。特に多細胞生物においては細胞の集合体としての組織・器官の形成や、細胞-細胞間の情報伝達ネットワーク、さらには細胞群の空間的配列/配置が構築されるが、そのためには形態や活性の非対称性、すなわち細胞極性が必須である。例えば、上皮細胞やニューロンなどは厳密な極性を持っており、これは細胞が方向性を持って動いたり、物質を輸送したり、また有る特定方向に物質を放出したりするために重要である。また、球状のリンパ球や、不規則な形態に見えるマクロファージにおいて、移動や活性化の際には細胞中のオルガネラや細胞骨格の再配置が生じる。ウイルス感染という事象からこれらの高次の細胞

機能を考慮した場合、極性を有する細胞において、HIV-1 はどのように特異的に振る舞い、制御されているのであろうか。また細胞の極性の有無に従ってウイルスの複製や病原性に何か変化が生じるのであろうか。

細胞極性形成には、アクチンや微小管 (microtubule) などの細胞骨格の再編成や再構成が繰り返し行われる。昨年我々は宿主因子である SOCS1 が HIV-1Gag タンパク質のユビキチン化を亢進し、それにより Gag タンパク質の微小管への結合や微小管を介した Gag タンパク質の細胞内輸送を促進することを示した。この結果は、極性を有する細胞においては、Gag タンパク質がある特定の方向に運ばれ、粒子形成が行われることを示している。実際に、遊走マクロファージにおいては、細胞の先端端からのみウイルスの出芽が起こることが電子顕微鏡による解析で明らかになっている。この現象は細胞の高次機能の発現にともなって、ウイルス感染や粒子産生の制御機構も大きく変化することを示しており、この制御機構を理解し解明することで、新たな感染コントロール機構や治療標的因子を同定することが可能であると考えられる。しかしながら、極性細胞におけるウイルス粒子の出芽方向を決定する宿主因子については未だ報告がなかった。我々は本研究において、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.

- 2) 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.
- 3) Ryo A, Wulf G, Lee TH, Lu KP. Pinning down HER2-ER cross-talk in SMRT regulation. *Trends Biochem Sci.*, in press.
- 4) 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.

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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.
- 8) 正岡崇志、梁明秀、巽正志、杉浦瓦、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
- 9) 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
- 10) 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

11) 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

□発明者：梁 明秀、澤崎達也、山本直樹

□出願日：2008年8月8日

□出願人：厚生労働省、株式会社セルフリーサイエンス

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：「A Method for Screening anti-HIV Drugs and a Diagnostic Method of AIDS」

□米国特許：12/188,242

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

(共同研究者；山本直樹、澤崎達也)

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

分担研究者 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

研究要旨：HIV-1タンパク質が細胞内で宿主プロテインカイネースによりリン酸化されていることがわかってきた。タンパク質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-1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。本研究では、昨年度開発した技術を用いて、HIV-1のアクセサリー蛋白質であるVif, Vpr, Vpuと相互作用する宿主プロテインカイネースの網羅的な探索を行った。その結果、少なくとも、Vif, Vpu, Vprにそれぞれ36種類、19種類、114種類の宿主のプロテインカイネースが結合することがわかった。

A. 研究目的

近年の報告から、HIV-1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いる。その中で、最近、HIV-1タンパク質が細胞内で宿主プロテインカイネ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-1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-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の網羅的な探索は、細胞内HIV-1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ネースがコードされており、細胞内からHIV-1タンパク質をリン酸化するプロテインカイネ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。

B. 研究方法

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。

(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し、本研究はタンパクレベルの研究でありヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針(文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成13年告示)の対象外であるが、それに準じて連結可能匿名化を行い、本研究に関与しない個人情報管理者が個人情報を管理するようにする。

C. 研究結果

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作成した410種類の完全長ビ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アクセサリー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。

D. 考察

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アクセサリータンパク質と、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アクセサリータンパク質へのリン酸化の有無や、細胞内での相互作用を調べる。

E. 結論

本年度の研究により、世界に先駆けて3種類のHIV-1アクセサリータンパク質と相互作用する160種類以上の宿主プロテインカイネースを網羅的に同定することに成功した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.

- 3) 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.
- 4) Bardóczy V, Géczi 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.

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) 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.
- 3) 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

- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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シスの網羅的探索, 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
- 7) 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

最適な抗ウイルス剤の選択方法 (出願済み)

2. 実用新案登録

3. その他

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山本直樹							
Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, <u>Yamamoto N.</u>	Humanized mice for human retrovirus infection.	Eds. Nomura, Watanabe, and Habu	Curr Top Microbiol Immunol 324, vol.34	Springer-Verlag		2008	138-148
澤崎達也							
Takai K, <u>Sawasaki T.</u> , Endo Y.	Development of key technologies for high-throughput cell-free protein production with the extract from wheat embryos.	Andrzej Joachimiak	Advances in Protein Chemistry and Structural biology, Volume 75 Structural Genomics Part A	Academic Press	CA, USA	2008	53 - 84

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
山本直樹					
Dewan MZ, Takamatsu N, Hidaka T, Hatakeyama K, Nakahata S, Fujisawa J, Katano H, <u>Yamamoto N.</u> , Morishita K.	Critical role of TSLC1 expression in the growth and organ-infiltration of adult T-cell leukemia cells in vivo.	J Virol	82(23)	11958-11963	2008
Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, <u>Yamamoto N.</u> , Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S.	Loss of Atg16L1, an autophagy regulator, enhances endotoxin-induced IL-1 β production	Nature	456 (7219)	264-268	2008
Nomura W, Tanabe Y, Tsutsumi H, Tanaka T, Ohba K, <u>Yamamoto N.</u> , Tamamura H.	Fluorophore Labeling Enables Imaging and Evaluation of Specific CXCR4-Ligand Interaction at the Cell Membrane for Fluorescence-Based Screening.	Bioconjug Chem	19	1917-1920	2008
Ueoka R, Komizu Y, Matsumoto Y, Zhong Y, Tanaka R, <u>Yamamoto N.</u>	Selective inhibitory effects of hybrid liposomes on the growth of HIV type 1-infected cells in vitro.	Bioorg Med Chem Lett	18(16)	4578-4580	2008
Yajima M, Imadome KI, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, <u>Yamamoto N.</u> , 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	198(5)	673-682	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyake A, Dewan MZ, Ishida T, Watanabe M, Honda M, Sata T, <u>Yamamoto N</u> , Umezawa K, Watanabe T, Horie R.	Induction of apoptosis in Epstein-Barr virus-infected B-lymphocytes by the NF-kappaB inhibitor DHMEQ.	Microbes Infect	10(7)	748-756	2008
Amet T, Nonaka M, Dewan MZ, Saitoh Y, Qi X, Ichinose S, <u>Yamamoto N</u> , 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)	471-480	2008
Takahashi Y, Tanaka R, <u>Yamamoto N</u> , 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	24(3)	423-435	2008
Urano E, Shimizu S, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Takahashi N, Fukazawa H, <u>Yamamoto N</u> , Komano J.	Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/positive transcription elongation factor b-dependent long terminal repeat transcription.	AIDS	22(9)	1081-1083	2008
Dewan MZ, Tomita M, Katano H, Yamamoto N, Ahmed S, Yamamoto M, Sata T, Mori N, <u>Yamamoto N</u> .	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	124(3)	622-629	2009
Jeong SJ, Ryo A, <u>Yamamoto N</u> .	The prolyl isomerase Pin1 stabilizes the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax oncoprotein and promotes malignant transformation.	Biochem Biophys Res Commun	Available online 11 February		2009
梁 明秀					
Takeuchi R, <u>Ryo A</u> , 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.	10(4)	R77	2008
Masaoka T, Nishi M, <u>Ryo A</u> , Endo Y, Sawasaki T.	The wheat germ cell-free based screening of protein substrates of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta.	FEBS Lett	582 (13)	1795-1801	2008
<u>Ryo A</u> , Wulf G, Lee TH, Lu KP	Pinning down HER2-ER cross-talk in SMRT regulation.	Trends Biochem Sci	In press		2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Jeong SJ, <u>Ryo A</u> , Yamamoto N.	The prolyl isomerase Pin1 stabilizes the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax oncoprotein and promotes malignant transformation.	Biochem Biophys Res Commun	Available online 11 February		2009
澤崎達也					
Kobayashi T, Kodani Y, Nozawa A, Endo Y, <u>Sawasaki T</u> .	DNA-binding profiling of human hormone nuclear receptors via fluorescence correlation spectroscopy in a cell-free system.	FEBS Lett	582 (18)	2737- 2744	2008
Masaoka T, Nishi M, Ryo A, Endo Y, <u>Sawasaki T</u> .	The wheat germ cell-free based screening of protein substrates of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta.	FEBS Lett	582 (13)	1795- 1801	2008
<u>Sawasaki T</u> , 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	370(4)	561- 565	2008
Bardóczy V, Géczi V <u>Sawasaki T</u> , Endo Y, Mészáros T.	A set of ligation-independent in vitro translation vectors for eukaryotic protein production.	BMC Biotechnol	8	32	2008

IV. 研究成果の刊行物・別刷（抜粋）

NOTES

Critical Role for TSLC1 Expression in the Growth and Organ Infiltration of Adult T-Cell Leukemia Cells In Vivo[▽]

M. Zahidunnabi Dewan,^{1,2†} Naofumi Takamatsu,³ Tomonori Hidaka,⁴ Kinta Hatakeyama,⁵ Shingo Nakahata,³ Jun-ichi Fujisawa,⁶ Harutaka Katano,⁷ Naoki Yamamoto,^{1,2,*} and Kazuhiro Morishita^{3**}

Department of Molecular Virology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan¹; AIDS Research Center, National Institute of Infectious Disease, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan²; Department of Medical Sciences,³ Department of Internal Medicine,⁴ and Department of Pathology,⁵ Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Kiyotake, Miyazaki, Japan; Department of Microbiology, Kansai Medical University, Moriguchi, Osaka, Japan⁶; and Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan⁷

Received 2 June 2008/Accepted 15 September 2008

Adult T-cell leukemia (ATL) is associated with human T-cell leukemia virus type 1 infection. The tumor suppressor lung cancer 1 (TSLC1) gene was previously identified as a novel cell surface marker for ATL, and this study demonstrated the involvement of TSLC1 expression in tumor growth and organ infiltration of ATL cells. In experiments using NOD/SCID/ γ c^{null} mice, both leukemia cell lines and primary ATL cells with high TSLC1 expression caused more tumor formation and aggressive infiltration of various organs of mice. Our results suggest that TSLC1 expression in ATL cells plays an important role in the growth and organ infiltration of ATL cells.

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is the causative agent of an aggressive form of CD4⁺ T-cell leukemia termed adult T-cell leukemia (ATL) (7, 14, 18). Carriers of HTLV-1 have been identified in a number of locations throughout the world, including parts of Africa; Papua New Guinea; specific regions in Europe including Romania; parts of South America including northern Brazil, Peru, northern Argentina, and Colombia; and the southern part of Kyushu in Japan (17). Common findings in patients with ATL include enlargement of peripheral lymph nodes, hepatomegaly, splenomegaly, skin infiltration, and hypercalcemia. The Tax gene is a unique viral gene thought to play a central role in HTLV-1-induced transformation. It is responsible for transactivation of the HTLV-1 long terminal repeat (5, 16) and numerous cellular genes involved in T-cell activation and growth, including those encoding interleukin-2 (IL-2) (11) and the α chain of IL-2 receptor (IL-2R α) (CD25, Tac) (1, 2). The long latency of ATL development suggests that multiple genetic events accumulate in HTLV-1-infected cells; however, the pre-

cise molecular mechanisms of ATL leukemogenesis following HTLV-1 infection have not been fully elucidated.

The tumor suppressor lung cancer 1 gene (TSLC1) at chromosome 11q23 has been identified as a tumor suppressor gene in non-small-cell lung cancer (9, 13). In contrast, it was recently found to be highly and ectopically expressed in acute-type ATL cells, most ATL cell lines, and HTLV-1-infected T-cell lines (15). Enforced expression of TSLC1 in ATL-derived ED-40515(-) cells resulted in higher aggregations and binding abilities in a human umbilical vein endothelial cell line (HUVEC). These results suggest that TSLC1 might contribute to tumor growth by enhancing aggregation after infiltration and migration outside blood vessels. Since the role of TSLC1 overexpression in the course of tumor growth and organ infiltration of ATL cells remains to be fully elucidated, we investigated the direct involvement of TSLC1 in the growth and infiltration of leukemia cells using C57BL/6J and NOD-SCID/ γ c^{null} (NOG) mice (4, 8).

In order to analyze the tumorigenicity of TSLC1 expression in leukemia cells, a murine IL-2-independent T-lymphoma cell line (EL4) injected into the intraperitoneum of syngeneic C57BL/6J mice was used as a model for ATL. EL4 cells were transfected with a pcDNA3 expression plasmid containing TSLC1, and transformant cells were selected by a limiting-dilution method in the presence of G-418. We also used EL4 cells expressing a green fluorescent protein-Tax fusion protein (EL4/GAX) (6) and parental EL4 (EL4/p) as a control. Expression of Tax protein in EL4 cells, a 38-kDa band of Tax protein in HUT102 cells, and a 64-kDa band of green fluorescent protein-Tax fusion protein in EL4/GAX cells were all

* Corresponding author. Mailing address for Naoki Yamamoto: AIDS Research Center, National Institute of Infectious Disease, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan. Phone: 81-3-5285-1111. Fax: 81-3-5285-1165. E-mail: nyama@nih.go.jp. Mailing address for Kazuhiro Morishita: Division of Tumor and Cellular Biochemistry, Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Kiyotake, Miyazaki, Japan. Phone: 81-9-8585-0985. Fax: 81-9-8585-2401. E-mail: kmorishi@med.miyazaki-u.ac.jp.

† Present address: Department of Pathology, New York University School of Medicine, 550 First Avenue, New York, NY 10016.

‡ Published ahead of print on 15 October 2008.

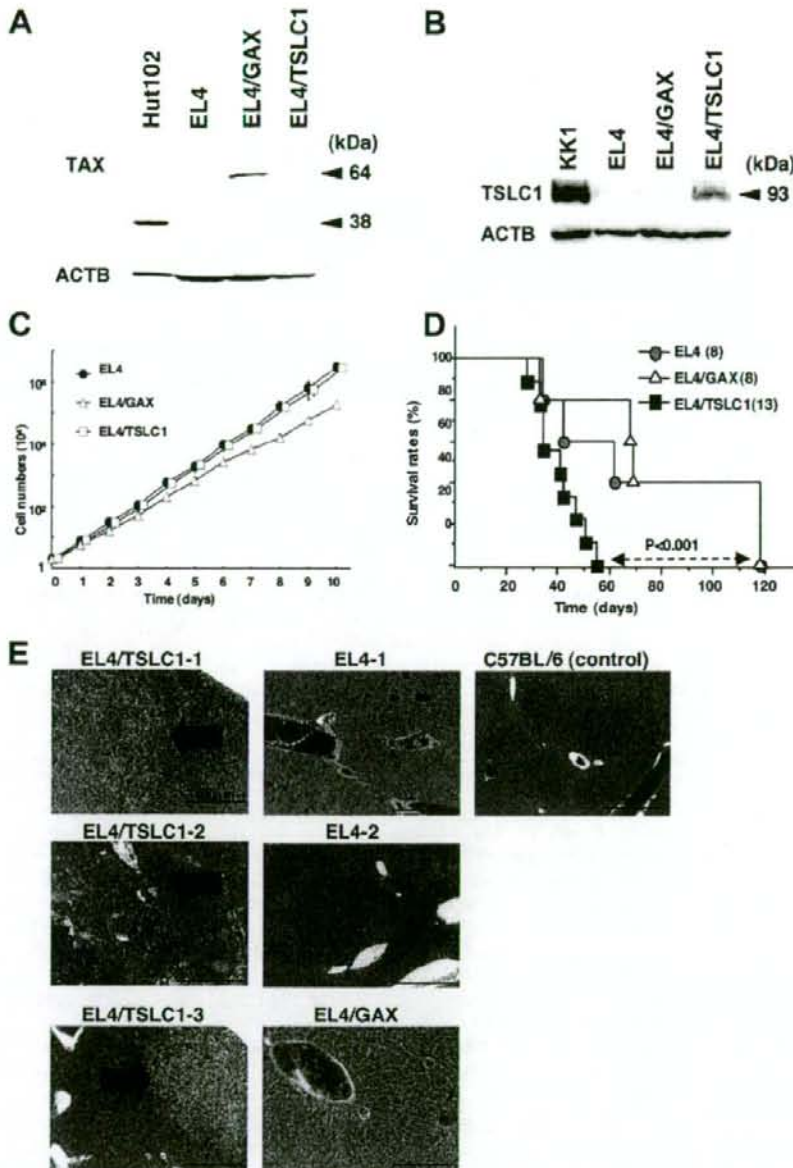


FIG. 1. Transplantation of EL4 T-cell lymphoma cells expressing TSLC1 shortened the life span of syngeneic mice. (A) Expression of Tax protein in HUT102, EL4, EL4/GAX, and EL4/TSLC1 cells was detected by Western blot analysis. Expression of β -actin protein (ACTB) was used as a loading control. (B) Expression of TSLC1 protein in KK1, EL4, EL4/GAX, and EL4/TSLC1 cells was detected by Western blot analysis. Expression of β -actin protein (ACTB) was used as a loading control. (C) Cell numbers in a growth curve are shown for an average of three independent counts, and standard deviations are indicated as error bars. (D) Survival curves of C57BL/6 mice inoculated in the abdominal cavity with EL4, EL4/GAX, or EL4/TSLC1 cells. Cumulative survival rates were calculated by the Kaplan-Meier method and compared using a log-rank test. (E) Liver sections from all mice were stained with hematoxylin-eosin. The regions of liver metastasis (arrow) were seen in liver sections from mice inoculated with EL4/TSLC1 cells but not shown in the liver sections from the mice inoculated with EL4 or EL4/GAX cells. Magnification, $\times 100$; bars, 400 μ m.