

20090800/A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山本 直樹

平成22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	BCA2/Rabring7 は tetherin 依存的に HIV-1 粒子産生を抑制する	・・・	9
	山本 直樹（国立感染症研究所 エイズ研究センター長）		
2	がん抑制遺伝子産物 APC による HIV-1Gag タンパク質細胞内ダイナミズムへの影響	・・・	13
	梁 明秀（横浜市立大学医学部微生物学 教授）		
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	・・・	17
	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	・・・	23
IV.	研究成果の刊行物・別刷	・・・	25

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

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：ヒト細胞には、ウイルス感染に対抗するためのさまざまな自然免疫の機能が備わっている。最近、Neilらは、宿主膜タンパク質 tetherin が子孫ウイルスを細胞膜上で繫留し、ウイルス粒子の細胞からの放出を強力に阻害することを報告した。本研究では、tetherin と相互作用し、かつ協調して機能する因子として RING 型 E3 リガーゼの一種、BCA2/Rabring7 を同定した。BCA2 は tetherin によって繫留されたウイルス粒子の細胞内への取り込みと分解を促進する、抵抗性宿主因子であることが示唆された。一方、Gag タンパク質の細胞内の特異的な領域への輸送機構や、その配向性を規定する宿主因子についてはほとんど知られていない。我々は HIV-1 の Gag と結合する新規の宿主タンパク質として癌抑制遺伝子産物 APC (adenomatous polyposis coli) を見いだした。その詳細な機能解析から、APC は HIV-1 の粒子産生を正に制御する重要な宿主因子であり、APC の発現または APC と Gag の相互作用を阻害することで HIV-1 複製を抑制できる可能性が示唆された。一方、HIV-1 のアクセサリ蛋白質である Vif, Vpr および Vpu と結合する 16 種類のヒトプロテインカインースを用いて、細胞内で Vif および Vpr との相互作用解析を行い、3 種類のヒトプロテインカインースを見出した。その一部のプロテインカインースの過剰発現は HIV 感染に対して抑制的に働くことが示された。

研究分担者

梁 明秀

横浜市立大学医学部微生物学 教授

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

HIV-1 は他のウイルスと同様、偏性寄生体であり、その増殖や病原発現には、感染細胞内のウイルス-宿主細胞因子間、また宿主細胞因子同士の複雑な相互作用の役割が必須である。このため、ウイルスの増殖サイクル及びそれに関与する新たな宿主因子の同定は、ウイルス複製の分子機構を明らかにし、新規の作用機序を有する抗 HIV 薬の開発につながることを期待される。

A. 研究目的

多剤併用療法である HAART の導入は HIV/AIDS の治療に革命を起こした。結果、死亡患者数は大幅に減少し、HIV 感染症は、いまや慢性の疾患に変わりつつあるといっても過言ではない。一方、依然感染者と患者の数は今も全世界的に増え続けている。また抗レトロウイルス薬の長期服用に伴う様々な副作用や薬剤耐性ウイルスの出現、免疫再構築症候群の対処や治療費用の増大等の多くの問題が顕在化しており、HIV-1 感染症を根治できる新しい治療法や予防法の開発が必須である。

本研究課題では、tetherin と相互作用し、かつ協調して機能する宿主因子の同定、HIV-1Gag タンパク質に直接結合する宿主因子のプロテオーム解析による解明、さらにアクセサリ蛋白質である Vif, Vpr および Vpu と結合するヒトプロテインカインースの研究を通し、ウイルス粒子産生の分子機構を明らかにすることで、新規の抗 HIV 療法の開発のための基盤情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

プラスミド構築・ウイルス精製・抗体

ヒト BCA2 (GenBank #BC054049) と tetherin (GenBank #D28137) 遺伝子のクローニングのため、HeLa 細胞の全 RNA から RT-PCR 法にて該当遺伝子を増幅し、pCMV ベクター (Clontech) に挿入した。感染性ウイルスは、293T 細胞にモレキュラークローン (pNL4-3 または pNL4-3ΔVpu) を導入し、48 時間後に上清を回収して調製した。ポリクローナル抗 BCA2 抗体は、KLH キャリアーを付加した BCA2 由来のペプチドをウサギに免疫して作製した。APC の効果を見る実験で使用した抗体は GFP モノクローナル抗体 (Wako, 1:2000)、GFP rabbit 抗体 (invitrogen, 1:200)、Talin モノクローナル抗体 (SIGMA, 1:500)、APC rabbit 抗体 (Santa Cruz, 1:100) である。

タンパク質間相互作用の検出

Tetherin を発現した 293T 細胞ライゼートに、グルタチオンビーズが付加された GST-BCA2 タンパク質を添加し、ウェスタンブロット法にて結合タンパク質の検出を行った。または、HA-BCA2 と Myc-tetherin を発現させた 293T 細胞ライゼートに、抗 HA 抗体にて免疫沈降法を行った。

ウイルス複製アッセイ

HeLa または HOS 細胞に pNL4-3 または pNL4-3ΔVpu を、HA-BCA2 とともに発現させ、48 時間後に上清中のウイルス量を ELISA 法にて定量した。細胞ライゼートはウェスタンブロット法にて解析した。T 細胞でのマルチサイクルでの複製を解析するために、Jurkat 細胞に BCA2 を安定的に発現させた後、ウイルスを低 MOI にて感染させた。上清中のウイルス量を、ELISA 法にて定期的に解析した。

遺伝子導入ならびに顕微鏡解析

ガラスボトムディッシュ上の HeLa 細胞に遺伝子導入を行い、48 時間後にパラホルムアルデヒドにより固定・染色の後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。もしくは、遺伝子導入した HeLa 細胞

をグルタルアルデヒドにより固定し、ゼラチンにて包埋・再固定の後、透過型電子顕微鏡にて観察した。

パルスチェイス解析

遺伝子導入した HeLa 細胞を Met/Cys-free 培地にて前処理した後、放射線同位体元素を含む ³⁵S-Met/Cys 培地で HIV-1 Gag タンパク質をラベルした。細胞を通常の培地に戻して定期的に回収し、ライゼートを抗 Gag 抗体にて免疫沈降し、オートラジオグラフィーを用いて解析した。

siRNA・ストリッピングアッセイ

APC の siRNA 導入実験に関しては、HiPerFectTransfection Reagent (QIAGEN) を用いて定例に従って行った。導入 48 時間後に細胞をカバーガラス上に播種し、各時間経過後にホルマリン固定後蛍光免疫染色を施行した。使用した siRNA の配列は以下の通りである；

siAPC47 : 5'-AAA GGA UGG AAU CUG AAU CAG ACG A-3'

siAPC48 : 5'-UAU AGU GGG ACU GAG AUU AGG UGG G-3'

siControl : 5'-CAG UCG CGU UUG CGA CUG GTT-3'

BCA2 に対する siRNA は Invitrogen 社より購入した (Oligo #HSS120532, #HSS120534)。細胞に siRNA を導入し、24 時間後に pNL4-3 または pNL4-3ΔVpu を遺伝子導入した。さらに 48 時間後に上清を回収した。細胞膜上に保持されたウイルス粒子を定量するために、プロテアーゼ (Subtilisin) を、siRNA/DNA 導入細胞に処理し、再度上清を回収した。これらの上清を混合し、含まれるウイルス量を、ELISA 法にて解析した。

プロテオミクス解析

HIV-1 Gag タンパク質と相互作用する宿主因子探索のため TAP/MS (Tandem Affinity Purification/ mass spectrometry) を用いたプロテオミクス解析を行った。C 末端に TAP タグ (IgG-binding motif-TEV 切断配列-calmodulin binding motif) を付加させた HIV-1 Gag のを 293T

細胞にリポフェクション法により発現導入し、アフィニティカラムで2段階でGagと結合タンパク質の抽出を行った。回収されたタンパク質をTrypsinで消化し、(MALDI-TOF/MS解析とMASCOTデータベース解析により同定した。同定されたタンパク質はコムギ無細胞タンパク質合成系により合成後、Gagとそのドメイン変異体との結合活性を我々は無細胞タンパク質合成系と化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイアルファスクリーン法にて解析した。

ELISA

ルミパルス(富士レビオ)を用いて細胞上清中のp24量を定量した。

HIV-1Vif, Vpr および Vpu と結合するヒトプロテインカイネース

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420種類の完全長プロテインカイネース遺伝子を鋳型に、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アクセサリタンパク質との相互作用は、アルファスクリーン法により検出した。また、結合が確認されたプロテインカイネースの細胞を用いた実験は、HEK293TもしくはJurkat細胞を用いて行い、検出にはFlagもしくはV5タグに対する抗体を用いたイムノブロットングにより行った。

HIVタンパク質と宿主因子との複合体形成能または相互作用を基盤とした薬剤スクリーニング系の構築

小麦無細胞タンパク質合成システムとアルファスクリーン手法を用いてVif-APOBEC3GまたはGag-SOCS1の相互作用を阻害する分子・薬剤のス

クリーニングを、約2万種類の合成低分子化合物ライブラリーおよび約3千種類の天然化合物ライブラリーを用いて解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で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、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った。また臨床サンプルの解析及びデータの公表にあたっては、倫理委員会の規則にのっとり、当該患者(感染者)の同意を得た上で行う予定である。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。細胞移植、採血、剖検の際は、必ず腹腔より十分量のネブタールを注入し、動物が眠っていることを確認してから行っている。

C. 研究結果

1. tetherinと相互作用する宿主因子、BCA2の同定

膜輸送系に関与する約60種類のタンパク質ファミリーについて免疫沈降法を行い、BCA2という分子がtetherinと相互作用することが分かった。変異体解析の結果、BCA2はtetherinの細胞質ドメインと相互作用することが示唆された。BCA2はHeLa細胞などのtetherin陽性細胞では用量依存的にHIV-1粒子産生を抑制したが、HOS細胞などのtetherin陰性細胞では、その抑制は見られなかった。また、この阻害効果はVpuの共発現により打ち消されたこと、Vpu欠失型HIV-1では阻害効果が増幅されたことから、BCA2の抗HIV-1活性はtetherin依存的である事が示唆された。

BCA2を過剰発現したHeLa細胞では、HIV-1コアタンパク質Gagの発現レベルが極端に低下していた。パルスチェイス法にてGagの安定性について比較検討したところ、BCA2存在下では、Gagの分解が促進されていた。これらの結果から、BCA2はtetherinによって細胞膜に繫留されたHIV-1

粒子をリソソームでの分解に導くことが示唆された。

以上より、BCA2は、細胞膜上でウイルス粒子を繫留した tetherin と相互作用し、協調的に細胞質への取り込みおよびリソソームでの分解を促進していることが示唆された。

2. HIV-1Gag タンパク質と相互作用する APC の同定

TAP法を用いたプロテオミクス解析により293T細胞内でHIV-1Gagに結合する宿主タンパク質を複数抽出した。その中に約300KDのバンドを確認し、MALD-TOF/MS解析の結果APCタンパク質であることが確認された。次に、293T, HeLa, A549細胞にHIV-1分子クローンであるpNL4-3とAPCまたはその変異体群を共発現させ、各時間後の細胞上清中のp24量を定量したところ、すべての細胞においてAPCによるHIV粒子形成の増加が認められた。APCは極性細胞において細胞の先端端に局在することが知られているが、細胞極性を有するA549細胞または末梢血由来マクロファージにGag-GFPを発現させた後、細胞を遊走またはトランスウェル上で偽足形成させた後に免疫染色にて観察したところ、HIV-1GagはAPCとともに細胞の先端端や偽足部位に共局在していた。次にAPCの局在決定因子であるKAP-3を特異的siRNAを用いてノックダウンしたところ、APCおよびGagの細胞末端での局在は消失した。このことは極性細胞における形質膜へのGagタンパク質の輸送にAPCおよびKAP-3が重要な役割を果たすことを示唆する。

3. HIVのアクセサリ蛋白と相互作用するヒトプロテインカイネース

VifやVpr, Vpuと相互作用する、それぞれ36種類、118種類、17種類のヒトプロテインカイネースの中から、VifおよびVprと結合する16種類のヒトプロテインカイネースを選別し、細胞内での相互作用解析を行ったところ、Vifと共発現により発現量が増加する7種類のヒトプロテ

ンカイネース、およびVprとの共発現により積極的に分解誘導される3種類のヒトプロテインカイネースを見出した。さらに、その一部のプロテインカイネースの過剰発現はHIV感染に対して抑制的に働くことが示された。

D. 考察

BCA2はN末端にRab7結合ドメイン、C末端にRINGドメインをもつユニークなE3ユビキチンリガーゼである。T細胞を含む様々な細胞種で広く発現し、主な役割としてEGF受容体のユビキチン化と輸送に関する因子として知られているが、HIV-1産生に関与するという報告はこれまでになかった。今回新たに見いだしたBCA2の抗HIV-1活性は、膜タンパク質 tetherin の発現の有無に依存した。

BCA2を過剰発現した感染細胞では、新しく産生されたHIV-1粒子はCD63陽性の細胞内小胞に集積され、リソソームで細胞内分解された。この一連の輸送・分解機構の解明には、より詳細な解析が必要である。一つの仮説としては、膜輸送系で主にリソソームへの運搬に関与する低分子Gタンパク質Rab7とBCA2とが直接結合する報告があることから、tetherin-BCA2複合体が細胞内を移動するとともにRab7をリクルートすることで、ウイルスを含んだ小胞をリソソームに導く可能性が考えられる。実際、BCA2のE3リガーゼ活性を欠失した変異体でも抗HIV-1活性は維持されていた。BCA2の抗HIV-1活性には、E3リガーゼ活性よりもむしろRab7を介した膜輸送系因子としての機能のほうが重要なかもしれない。また、BCA2の抗HIV-1活性はtetherin依存的であると考えられるにもかかわらず、Vpuをもつ野生型HIV-1に対しても若干の効果を発揮した。しかし、Vpuの存在下ではBCA2の効果は約2倍程度弱まることから、両者には量的関係があることが示唆される。もしくは、VpuのTetherin中和機能を弱める何らかの機構がBCA2に存在する可能性もあり、さらなる解析が必要である。

HIV-1Gag タンパク質と機能的に相互作用する

宿主因子を同定し、ウイルス粒子形成に至る Gag タンパク質の細胞内動態とその調節機構を明らかにすることを目的とした。我々のグループは昨年度にサイトカインシグナル抑制因子である SOCS1 が、Gag タンパク質を直接ユビキニン化させることで、微小管を介した HIV-1 Gag の細胞内輸送を促進することを報告した。APC は微小管を介して細胞末端までキネシンモータータンパク質を介して細胞膜まで輸送されることが知られており、APC とキネシンを結びつけるアダプターとして KAP-3 が重要である。本研究課題において、HIV-1Gag が APC と結合すること、APC および KAP-3 阻害により細胞末端部への局在とウイルス粒子産生が顕著に阻害されることから、Gag と APC は KAP-3 の存在下で微小管に沿って細胞末端部まで輸送させることが示唆される。SOCS1 による Gag のユビキニン化は Gag と APC の結合を促進することで、粒子産生を促進する可能性がある。しかしながら、Gag タンパク質の各ドメインに結合する宿主因子は数多く、またその時間的、空間的状況により変化するものと考えられる。それらをさらに詳細に解析することで、ウイルス粒子形成を阻害する新規の HIV 治療薬の開発につながることを期待される。

さらに我々は、HIV-1 タンパク質と相互作用する宿主プロテインカインースタンパク質の網羅的探索技術の開発を目指した。プロジェクト開始から2年間、網羅的な相互作用宿主タンパク質探索に必要な、プロテインカインースライブラリーの整備、未精製タンパク質を用いた高感度な相互作用検出系、HIV-1 のアクセサリ蛋白質である Vif、Vpr、Vpu と相互作用する、それぞれ 36 種類、118 種類、17 種類のヒトプロテインカインースの同定といった、2つのコア技術の開発と、実際の相互作用タンパク質の同定に成功した。本年度は、見出した宿主ヒトプロテインカインースの中から、Vif および Vpr と結合する 16 種類のヒトプロテインカインースを選別し、共発現系で細胞内相互作用を解析し、Vif により発現誘導される 7 種類のヒトプロテインカインース、および Vpr と

の共発現により積極的に分解誘導される 3 種類のヒトプロテインカインースを見出した。本研究で見出した Vpr と相互作用し分解誘導されるプロテインカインースの中には、細胞分裂に深く関与するプロテインカインースが含まれており、実際に、そのプロテインカインースを過剰発現した細胞では、HIV-1 の増殖が抑制された。現在、その抑制機構について解析している。

E. 結論

Tetherin・BCA2 による一連の阻害機構は、ウイルスを宿主細胞内で分解に導くという、これまで報告のない新しいタイプのものであり、今後の抗エイズ薬の治療標的となる可能性がある。

また我々は、HIV-1 粒子産生に関与する宿主因子としてがん抑制遺伝子産物 APC タンパク質を同定した。APC タンパク質は HIV-1Gag タンパク質と直接結合し、極性細胞における Gag タンパク質の形質膜への局在と Gag の多重化化に関与することを見いだした。

本年度の研究により、世界に先駆けて 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ンースの中から、細胞内での安定性や分解誘導を起こす宿主タンパク質を同定し、その中には、HIV-1 増殖に関与する宿主タンパク質を同定することに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyakawa K, Ryo A, Murakami T, Ohba K, Yamaoka S, Fukuda M, Guatelli J, Yamamoto N: BCA2/Rabring7 promotes tetherin-dependent HIV-1 restriction. **PLoS Pathog.** 5(12):e1000700, 2009.
- 2) Ohba K, Ryo A, Dewan MZ, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Nagashima Y, Tanaka Y, Okamoto T, Terashima K, Yamamoto N:

- Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand 1. **J Immunol.** 183(1):524-32, 2009.
- 3) 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. **Biochem Biophys Res Commun.** 381(2):294-9, 2009.
 - 4) Nishi M, Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Sawasaki T, Morishita R, Perrem K, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N: Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. **FEBS Lett.** 583(8):1243-50, 2009.
 - 5) Zhou W, Yang Q, Low CB, Karthik BC, Wang Y, Ryo A, Yao SQ, Yang D, Liou YC: Pin1 catalyzes conformational changes of Thr-187 in p27Kip1 and mediates its stability through a polyubiquitination process. **J Biol Chem.** 284(36):23980-8, 2009.
 - 6) Ryo A, Wulf G, Lee TH, Lu KP: Pinning down HER2-ER crosstalk in SMRT regulation. **Trends Biochem Sci.** 34(4):162-5, 2009.
 - 7) Shimada H, Hirai K, Simamura E, Hatta T, Iwakiri H, Mizuki K, Hatta T, Sawasaki T, Matsunaga S, Endo Y, Shimizu S. Paraquat toxicity induced by voltage-dependent anion channel 1 acting as an NADH- dependent oxidoreductase. **J Biol Chem.** 284(42): 28642-9, 2009.
 - 8) Nozawa A, Matsubara Y, Tanaka Y, Takahashi H, Akagi T, Seki M, Shinozaki K, Endo Y, Sawasaki T. Construction of a protein library of arabidopsis transcription factors using a wheat cell-free protein production system and its application for DNA binding analysis. **Biosci Biotechnol Biochem.** 73(7):1661-4, 2009.
 - 9) Igawa T, Fujiwara M, Takahashi H, Sawasaki T, Endo Y, Seki M, Shinozaki K, Fukao Y, Yanagawa Y. Isolation and identification of ubiquitin-related proteins from Arabidopsis seedlings. **J Exp Bot.** 60(11):3067- 73, 2009.
 - 10) Takahashi H, Nozawa A, Seki M, Shinozaki K, Endo Y, Sawasaki T. A simple and high-sensitivity method for analysis of ubiquitination and polyubiquitination based on wheat cell-free protein synthesis. **BMC Plant Biology** 9: 39,2009.
 - 11) Matsuura I, Chiang KN, Lai CY, He D, Wang G, Ramkumar R, Uchida T, Ryo A, Lu K, Liu F: Pin1 promotes transforming growth factor-beta-induced migration and invasion. **J Biol Chem.** 285(3):1754-64, 2010.
 - 12) Takai K, Sawasaki T, Endo Y. Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. **Nature Protocols** 5(2):227-38, 2010.
 - 13) Pulikkan JA, Dengler V, Peer Zada AA, Kawasaki A, Geletu M, Bohlander SK, Ryo A, Tenen DG, Behre G. Elevated PIN1 expression by C/EBP α -p30 blocks C/EBP α induced granulocytic differentiation via c-Jun in AML. **Leukemia**, In press.
2. 学会発表
- 1) 梁明秀、山本直樹 : HIV-1産生を制御する tetherin相互作用蛋白の同定. 特定領域研究「感染現象のマトリックス」縦糸研究会, 平成21年5月20~21日, 名古屋大学, 名古屋.
 - 2) 梁明秀 : HIV-1 Gag タンパク質の細胞内ダイナミクス関連因子の同定とその制御機構の解明. 第9回日本蛋白質科学会年会, 平成21年5月20~22日, 熊本全日空ニュースカイ, 熊本.
 - 3) 宮川 敬, 梁明秀, 山本直樹 : 宿主蛋白質 BCA2/Rabring7 は tetherin と協調して HIV-1 粒子産生を抑制する. 第19回抗ウイルス

療法研究会, 平成 21 年 6 月 4~5 日, ゆうぽうと, 東京.

- 4) 梁明秀: The peptidyl-prolyl isomerase Pin1: A novel post-phosphorylation modifier indevelopment and diseases. 先端融合領域イノベーション創出拠点の形成翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成 第 1 回公開シンポジウム, 平成 21 年 6 月 19 日, 港南区民文化センター, 横浜
- 5) 梁明秀: ペプチジルプロリルイソメラーゼ Pin1: 疾患や分化を司る新しいリン酸化後修飾因子. 日本ヒトプロテオーム機構(JHUPO) 第 7 回大会, 平成 21 年 7 月 27~28 日, 北里大学薬学部, 東京.
- 6) Miyakawa K, Ryo A, Yamamoto N: Identification of a tetherin-interacting protein that restricts HIV-1 particle production. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Sep. 8-11, 2009, Hyogo.
- 7) Matsuoka K, Komori H, Nose M, Endo Y, Sawasaki T. New Screening Method for Autoantigen Protein Based on Biotinylated Protein Library. HUPO2009. September 26-30, 2009, The Westin HarbourCastle, Toronto.
- 8) Takahama S, Sawasaki T, Okayama A, Akagi T, Endo Y, Yamamoto N, Ryo A: Atypical protein kinase C positively regulates the Vpr incorporation into HIV-1 particles by phosphorylating Gag p6. The 10th Kumamoto AIDS Seminar, 平成 21 年 9 月 28~29 日, ホテル日航熊本, 熊本.
- 9) 高濱正吉、澤崎達也、遠藤弥重太. Atypical protein kinase C positively regulates the Vpr incorporation into HIV-1 particles by phosphorylating Gag p6. 第 10 回熊本エイズセミナー・エイズグローバル COE 合同国際シンポジウム. 平成 21 年 9 月 28-29 日, 熊本.
- 10) 田所大典、高濱正吉、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ゼの網羅的探索、及び新規基質の細胞生物学的解析. 第 4 回無細胞生命科学研究会. 平成 21 年 11 月 16~17 日, 岐阜.
- 11) 清水康平、田所大典、高濱正吉、澤崎達也、遠藤弥重太. Caspase-3 による TRB3 切断の細胞生物学的解析. 第 4 回無細胞生命科学研究会. 平成 21 年 11 月 16~17 日, 岐阜.
- 12) 正岡崇志、梁明秀、巽正志、杉浦互、松永智子、森下了、澤崎達也、山本直樹. 酵素活性を指標とした新規の HIV プロテアーゼ阻害剤耐性検査法の基盤技術の開発. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会, 平成 21 年 11 月 26~28 日, 名古屋国際会議場, 名古屋.
- 13) 高濱正吉、澤崎達也、岡山明子、赤木達也、遠藤弥重太、山本直樹、梁明秀: 細胞極性制御キナーゼ aPKC による HIV-1 Gag のリン酸化及びその生理的意義. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会, 平成 21 年 11 月 26~28 日, 名古屋国際会議場, 名古屋.
- 14) 熱田翠薫、吉田篤司、吉崎慎二、八島さやか、松永智子、澤崎達也、梁明秀: 免疫抑制受容体 PD-1 を阻害する新規抗体の作製. 第 32 回分子生物学会年会, 平成 21 年 12 月 9~12 日, パシフィコ横浜, 横浜.
- 15) 小島良績、後藤さやか、近藤麻美、木下茂美、梁明秀: 滑膜細胞における C/EBP- β に対する Pin1 の効果. 第 32 回分子生物学会年会, 平成 21 年 12 月 9~12 日, パシフィコ横浜, 横浜.
- 16) 船橋一世、澤崎達也、遠藤弥重太. Screening of human protein kinases binding to SOCS1 protein 第 32 回日本分子生物学会年会. 平成 21 年 12 月 9~12 日, パシフィコ横浜, 横浜.
- 17) 清水康平、田所大典、高濱正吉、遠藤弥重太、澤崎達也. Cell biological analysis of TRB3 cleaved by caspase-3. 第 32 回日本分子生物学会年会. 平成 21 年 12 月 9~12 日, パシフィコ横浜, 横浜.
- 18) 橋本季明、吉田茂生、澤崎達也、遠藤弥重太、吉川潮、鎌田真司. Screening of novel caspase substrates functioning at mitotic phase. 第 32 回

- 日本分子生物学会年会. 平成 21 年 12 月 9～12 日, パシフィコ横浜, 横浜.
- 19) 田所大典、高濱正吉、澤崎達也、遠藤弥重太. Complementary screening of Caspase-3-cleaved kinome and the cell biological analysis of the new substances. 第 32 回日本分子生物学会年会. 平成 21 年 12 月 9～12 日, パシフィコ横浜, 横浜.
- 20) Sawasaki T, Endo Y, Morishita R, Takai K, Membrane protein production and purification without affinity tag based on wheat germ cell-free system. Keystone Symposia Structural Genomics: Expanding the Horizons of Structural Biology (J2). January 8-13, 2010, Colorado, USA.
- 21) Takeo S, Sawasaki T, Torii M, Sattabongkot J, Endo Y, Tsuboi T, Functional production of malarial parasites' proteins with wheat germ cell-free system. Keystone Symposia Structural Genomics: Expanding the Horizons of Structural Biology (J2). January 8-13, 2010, Colorado, USA.
- 22) Miyakawa K, Ryo A, Murakami T, Guatelli J, Yamamoto N: BCA2/Rabring7 promotes tetherin-dependent HIV-1 restriction. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Feb.16-19, 2010, San Francisco, CA, USA.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

II. 分担研究報告書

BCA2/Rabring7 は tetherin 依存的に HIV-1 粒子産生を抑制する

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

研究協力者 宮川 敬 国立感染症研究所エイズ研究センター

研究要旨：ヒト細胞は、ウイルス感染に対抗するためのさまざまな手段を持っている。1型ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）が感染したヒト宿主細胞では、子孫ウイルス粒子が細胞膜から次々に産生されるが、近年、宿主膜タンパク質 tetherin/CD317/BST-2 が子孫ウイルスを細胞膜上で繫留し、ウイルス粒子の細胞からの放出を強力に阻害する因子として報告された（Neil et al, Nature, 2008）。Tetherin を介して膜上に繫留されたウイルス粒子は、細胞内に取り込まれて消化されるが、その詳細な分子機構は未だ不明である。本研究では、tetherin と相互作用し、かつ協調して機能する因子として RING 型 E3 リガーゼの一種、BCA2/Rabring7 を同定した。BCA2 の過剰発現下では、tetherin により膜上に繫留されたウイルス粒子は細胞内に効率的に取り込まれ、リソソームで分解された。反対に、BCA2 をノックダウンすると、細胞内に取り込まれるウイルス粒子が減少し、細胞膜で繫留された状態のウイルス粒子が増加した。これらの結果から、BCA2 は tetherin によって繫留されたウイルス粒子の細胞内への取り込みと分解を促進する、抵抗性宿主因子であることが示唆された。

A. 研究目的

感染細胞内のウイルス-宿主細胞因子間の複雑な相互作用は、子孫ウイルスの効率的な産生には必須である。一方で、ウイルス産生を負に制御する内在性抑制因子の存在も明らかになりつつある。これまで、1型インターフェロンを処理した細胞では、HIV-1 の産生が抑制されることが知られていた。このとき、電子顕微鏡による観察では、多数のウイルス粒子が感染細胞膜上に繫留（tethering）されていたことから、ウイルス抵抗性の膜タンパク質「Tetherin」の存在が考えられていた。興味深い事に、HIV-1 がもつウイルスタンパク質 Vpu を欠損させると tetherin の効果が顕著に増加することから、tetherin はインターフェロン誘導性で、かつ Vpu によりアンタゴナイズされる性質をもつことが示唆された。近年 Neil らは、マイクロアレイを用いたスクリーニングにより、tetherin の正体が CD317/BST-2 と呼ばれる膜タンパク質であることを解明した。その後、tetherin は Vpu 存在下では急速に分解されること、HIV-1 Vpu 以外のエンベロープウイルスにも同様の産生阻

害効果を示すことなどが解明された。しかしながら、tetherin によって膜上で繫留されたウイルス粒子がその後どのような処理をされるのかという、いわゆる「post-tethering」の分子機構については不明であった。本研究では、RING 型 E3 リガーゼで、EGF 受容体の輸送に関与するタンパク質である BCA2/Rabring7 が新規の tetherin 結合因子であることを見だし、post-tethering の過程で協調的に働くことを明らかにした。

B. 研究方法

プラスミド構築・ウイルス精製・抗体

ヒト BCA2 (GenBank #BC054049) と tetherin (GenBank #D28137) 遺伝子のクローニングのため、HeLa 細胞の全 RNA から RT-PCR 法にて該当遺伝子を増幅し、pCMV ベクター (Clontech) に挿入した。感染性ウイルスは、293T 細胞にモレキュラークローン (pNL4-3 または pNL4-3ΔVpu) を導入し、48 時間後に上清を回収して調製した。ポリクローナル抗 BCA2 抗体は、KLH キャリアーを付加した BCA2 由来のペプチドをウサギに免疫して作製し

た。

タンパク質間相互作用の検出

Tetherin を発現した 293T 細胞ライゼートに、グルタチオンビーズが付加された GST-BCA2 タンパク質を添加し、ウェスタンブロット法にて結合タンパク質の検出を行った。または、HA-BCA2 と Myc-tetherin を発現させた 293T 細胞ライゼートに、抗 HA 抗体にて免疫沈降法を行った。

ウイルス複製アッセイ

HeLa または HOS 細胞に pNL4-3 または pNL4-3ΔVpu を、HA-BCA2 とともに発現させ、48 時間後に上清中のウイルス量を ELISA 法にて定量した。細胞ライゼートはウェスタンブロット法にて解析した。T 細胞でのマルチサイクルでの複製を解析するために、Jurkat 細胞に BCA2 を安定的に発現させた後、ウイルスを低 MOI にて感染させた。上清中のウイルス量を、ELISA 法にて定期的に解析した。

顕微鏡解析

ガラスボトムディッシュ上の HeLa 細胞に遺伝子導入を行い、48 時間後にパラホルムアルデヒドにより固定・染色の後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。もしくは、遺伝子導入した HeLa 細胞をグルタルアルデヒドにより固定し、ゼラチンにて包埋・再固定の後、透過型電子顕微鏡にて観察した。

パルスチェイス解析

遺伝子導入した HeLa 細胞を Met/Cys-free 培地にて前処理した後、放射線同位体元素を含む ³⁵S-Met/Cys 培地で HIV-1 Gag タンパク質をラベルした。細胞を通常の培地に戻して定期的に回収し、ライゼートを抗 Gag 抗体にて免疫沈降し、オートラジオグラフィーを用いて解析した。

siRNA・ストリッピングアッセイ

BCA2 に対する siRNA は Invitrogen 社より購入し

た (Oligo #HSS120532, #HSS120534)。細胞に siRNA を導入し、24 時間後に pNL4-3 または pNL4-3ΔVpu を遺伝子導入した。さらに 48 時間後に上清を回収した。細胞膜上に保持されたウイルス粒子を定量するために、プロテアーゼ (Subtilisin) を、siRNA/DNA 導入細胞に処理し、再度上清を回収した。これらの上清を混合し、含まれるウイルス量を、ELISA 法にて解析した

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所研究および横浜市立大学の倫理規程を遵守し、倫理委員会の承認の下に研究を実施する。本研究はタンパクレベルの研究であるが、ヒトゲノム解析を行う場合は、ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針 (文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成 13 年告示) 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

膜輸送系に関与する約 60 種類のタンパク質ファミリーについて免疫沈降法を行ったところ、BCA2 が tetherin と相互作用することが分かった。Tetherin は N 末端に細胞質ドメイン、C 末端に GPI アンカーをもつ膜タンパク質で、このうち細胞質ドメインを欠失させた tetherin は、BCA2 との結合能を失ったことから、BCA2 は tetherin の細胞質ドメイン (cytoplasmic tail) と相互作用することが示唆された。一方、BCA2 は N 末端に Rab7 結合ドメイン、C 末端に RING ドメインをもつ RING 型 E3 リガーゼであるが、tetherin が結合するのはこのどちらのドメインでもなく、その中間領域であることが分かった。共焦点レーザー顕微鏡にて両者の細胞内局在を観察した結果、細胞質と細胞膜の両方で共局在が認められた。

次に、BCA2 が HIV-1 産生に与える影響について、ELISA 法を用いて調べた。BCA2 は HeLa 細胞などの tetherin 陽性細胞では用量依存的に HIV-1 粒子産生を抑制したが、HOS 細胞などの

tetherin 陰性細胞では、その抑制は見られなかった。しかし、HOS 細胞に tetherin を一過的に発現させると、BCA2 の抗 HIV-1 活性が認められた。また、この阻害効果は Vpu の共発現により打ち消されたこと、Vpu 欠失型 HIV-1 では阻害効果が増幅されたことから、BCA2 の抗 HIV-1 活性は tetherin 依存的である事が示唆された。

ウェスタンブロット法を用いた解析の結果、興味深い事に、BCA2 を過剰発現した HeLa 細胞では、HIV-1 コアタンパク質 Gag の発現レベルが極端に低下していた。放射性同位体を用いたパルスチェイス法にて Gag の安定性について比較検討したところ、BCA2 存在下では、Gag の分解が促進されていた。また、この分解はリソソーム阻害剤の添加によって中和された。透過型電子顕微鏡による観察の結果、BCA2 を過剰発現させた HeLa 細胞では、細胞上清中の HIV-1 粒子量の減少にとともに、細胞内小胞中に多数のウイルス粒子が取り込まれていた。これらの結果から、BCA2 は tetherin によって細胞膜に繫留された HIV-1 粒子をリソソームでの分解に導くことが示唆された。

最後に、HIV-1 産生における内在性 BCA2 の機能を調べるため、siRNA にて BCA2 をノックダウンした HeLa 細胞を用いて解析した。この細胞から産生されるウイルス粒子量は若干増加したが、その多くは細胞膜上で留まっていることが ELISA 法と免疫染色法によって明らかになった。この細胞をプロテアーゼ処理すると、上清ウイルス量が顕著に増加したことから、細胞膜上で留まるウイルス粒子は tetherin によって繫留された状態である可能性が示唆された。

これらの結果から、BCA2 は、細胞膜上でウイルス粒子を繫留した tetherin と相互作用し、協調的に細胞質への取り込みおよびリソソームでの分解を促進していることが示唆された。

D. 考察

BCA2 は N 末端に Rab7 結合ドメイン、C 末端に RING ドメインをもつユニークな E3 ユビキチンリガーゼである。T 細胞を含む様々な細胞種で

広く発現し、主な役割として EGF 受容体のユビキチン化と輸送に関与する因子として知られているが、HIV-1 産生に関与するという報告はこれまでになかった。今回新たに見いだした BCA2 の抗 HIV-1 活性は、膜タンパク質 tetherin の発現の有無に依存した。

BCA2 を過剰発現した感染細胞では、新しく産生された HIV-1 粒子は CD63 陽性の細胞内小胞に集積され、リソソームで細胞内分解された。この一連の輸送・分解機構の解明には、より詳細な解析が必要である。一つの仮説としては、膜輸送系で主にリソソームへの運搬に関与する低分子 G タンパク質 Rab7 と BCA2 とが直接結合する報告があることから、tetherin-BCA2 複合体が細胞内を移動するとともに Rab7 をリクルートすることで、ウイルスを含んだ小胞をリソソームに導く可能性が考えられる。実際、BCA2 の E3 リガーゼ活性を欠失した変異体でも抗 HIV-1 活性は維持されていた。BCA2 の抗 HIV-1 活性には、E3 リガーゼ活性よりもむしろ Rab7 を介した膜輸送系因子としての機能のほうが重要なのもかもしれない。また、BCA2 の抗 HIV-1 活性は tetherin 依存的であると考えられるにもかかわらず、Vpu をもつ野生型 HIV-1 に対しても若干の効果を発揮した。しかし、Vpu の存在下では BCA2 の効果は約 2 倍程度弱まることから、両者には量的関係があることが示唆される。もしくは、Vpu の Tetherin 中和機能を弱める何らかの機構が BCA2 に存在する可能性もあり、さらなる解析が必要である。

E. 結論

Tetherin・BCA2 による一連の阻害機構は、ウイルスを宿主細胞内で分解に導くという、これまで報告のない新しいタイプのものであり、今後の抗エイズ薬の治療標的となる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyakawa K, Ryo A, Murakami T, Ohba K, Yamaoka S, Fukuda M, Guatelli J, Yamamoto N:

- BCA2/Rabring7 promotes tetherin-dependent HIV-1 restriction. **PLoS Pathog** 5(12): e1000700, 2009.
- 2) Ohba K, Ryo A, Dewan MZ, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Nagashima Y, Tanaka Y, Okamoto T, Terashima K, Yamamoto N: Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand 1. **J Immunol** 183(1): 524-532, 2009.
 - 3) 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. **Biochem Biophys Res Commun.** 381(2): 294-299, 2009.
 - 4) Nishi M, Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Sawasaki T, Morishita R, Perrem K, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N: Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. **FEBS Lett** 583(8): 1243-50, 2009.
- into HIV-1 particles by phosphorylating Gag p6. The 10th Kumamoto AIDS Seminar, 平成 21 年 9 月 28~29 日, ホテル日航熊本, 熊本.
- 5) 高濱正吉, 澤崎達也, 岡山明子, 赤木達也, 遠藤弥重太, 山本直樹, 梁明秀: 細胞極性制御キナーゼ aPKC による HIV-1 Gag のリン酸化及びその生理的意義. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会, 平成 21 年 11 月 26~28 日, 名古屋国際会議場, 名古屋.
 - 6) Miyakawa K, Ryo A, Murakami T, Guatelli J, Yamamoto N: BCA2/Rabring7 promotes tetherin-dependent HIV-1 restriction. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Feb.16-19, 2010, San Francisco, CA, USA.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

2. 学会発表

- 1) 梁明秀, 山本直樹: HIV-1 産生を制御する tetherin 相互作用蛋白の同定. 特定領域研究「感染現象のマトリックス」縦糸研究会, 平成 21 年 5 月 20~21 日, 名古屋大学, 名古屋.
- 2) 宮川 敬, 梁 明秀, 山本直樹: 宿主蛋白質 BCA2/Rabring7 は tetherin と協調して HIV-1 粒子産生を抑制する. 第 19 回抗ウイルス療法研究会, 平成 21 年 6 月 4~5 日, ゆうぼうと, 東京.
- 3) Miyakawa K, Ryo A, Yamamoto N: Identification of a tetherin-interacting protein that restricts HIV-1 particle production. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Sep. 8-11, 2009, Hyogo.
- 4) Takahama S, Sawasaki T, Okayama A, Akagi T, Endo Y, Yamamoto N, Ryo A: Atypical protein kinase C positively regulates the Vpr incorporation

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

がん抑制遺伝子産物APCによるHIV-1Gagタンパク質細胞内ダイナミズムへの影響

研究分担者 梁 明秀 横浜市立大学医学部微生物学教授

研究要旨： HIV-1の粒子形成のもっとも重要なステップの1つは、構造タンパク質である前駆体Gagタンパク質 (Pr55) が細胞質で合成後、細胞の形質膜まで輸送されるプロセスである。マクロファージなどの極性を有する細胞におけるHIV-1の粒子産生は細胞の先端 (leading edge: 先端端) のみにおいて起こることが知られているが、Gagタンパク質の細胞内の特異的な領域への輸送機構や、その配向性を規定する宿主因子についてはほとんど知られていない。我々はHIV-1のGagと結合する新規の宿主タンパク質として癌抑制遺伝子産物APC (adenomatous polyposis coli) を見いだした。APCは自身のC末端領域でHIV-1 Gagと直接相互作用し、感染細胞におけるGagタンパク質の先端端の局在とGagタンパク質のアッセムブリーを促進する。これらの結果により、APCはHIV-1の粒子産生を正に制御する重要な宿主因子であり、APCの発現またはAPCとGagの相互作用を阻害することでHIV-1複製を抑制できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

多剤併用療法の導入によりHIV/AIDSによる死亡患者数は減少傾向にあるものの、依然患者数は全世界的に増え続けている。また抗レトロウイルス薬の長期服用に伴う様々な副作用や薬剤耐性ウイルスの出現、免疫再構築症候群の対処や治療費用の増大等の多くの問題が顕在化しており、HIV-1感染症を根治できる新しい治療法や予防法の開発が必須である。HIV-1の増殖や病原発現には宿主-寄生体相互作用の役割は必須である。ウイルスの増殖サイクル及びそれに関与する宿主因子の同定はウイルス複製の分子機構を明らかにし、新たな作用機序を有する抗HIV薬の開発につながる。本研究課題では、HIV-1Gagタンパク質に直接結合する宿主因子をプロテオーム解析により明らかにし、ウイルス粒子産生の分子機構を明らかにすることで、新規の抗HIV療法の開発のための基盤情報を得ることを目的とする。

B. 研究方法

プロテオミクス解析

HIV-1 Gagタンパク質と相互作用する宿主因子探索のためTAP/MS (Tandem Affinity Purification/ mass spectrometry) を用いたプロテオミクス解析を行った。C末端にTAPタグ (IgG-binding motif-TEV切断配列-cal

modulin binding motif) を付加させたHIV-1 Gagを293T細胞にリポフェクション法により発現導入し、アフィニティカラムで2段階、Gagと結合タンパク質の抽出を行った。回収されたタンパク質をTrypsinで消化し、(MALDI-TOF/MS解析とMASCOTデータベース解析により同定した。同定されたタンパク質はコムギ無細胞タンパク質合成系により合成後、Gagとそのドメイン変異体との結合活性をアルファスクリーン法にて解析した。

siRNA導入

HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN) を用いて定例に従って行った。導入48時間後に細胞をカバーガラス上に播種し、各時間経過後にホルマリン固定後蛍光免疫染色を施行した。

使用したsiRNAの配列は以下に示す。

siAPC47 : 5' -AAA GGA UGG AAU CUG AAU CAG ACG A-3'

siAPC48 : 5' -UAU AGU GGG ACU GAG AUU AGG UGG G-3'

siControl : 5' -CAG UCG CGU UUG CGA CUG GTT-3'

免疫染色

カバーガラス上に播種した細胞をホルマリン3%PBSで固定後、0.1%TritonX及び10%G

oatSerumで15分ブロッキングを行い、一次抗体反応させた。PBSで洗浄後、60分PBS中に静置し、二次抗体(室温、60分)反応させた。同様に洗浄した後、DAPIを用いて核の染色を行い共焦点レーザースキャン顕微鏡(Zeiss LSM510)で観察した。使用した抗体はGFPモノクローナル抗体(Wako, 1:2000)、GFP rabbit抗体(invitrogen, 1:200)、Talinモノクローナル抗体(SIGMA, 1:500)、APC rabbit抗体(Santa Cruz, 1:100)である。

ELISA

ルミパルス(富士レビオ)を用いて細胞上清中のp24量を定量した。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所研究および横浜市立大学の倫理規程を遵守し、倫理委員会の承認の下に研究を実施する。本研究はタンパクレベルの研究であるが、ヒトゲノム解析を行う場合は、ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針(文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成13年告示)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

1. APCはHIV-1Gagタンパク質と相互作用する。

TAP法を用いたプロテオミクス解析により293T細胞内でHIV-1Gagに結合する宿主タンパク質を複数抽出した。その中に約300KDのバンドを確認し、MALD-TOF/MS解析の結果Adenomatous Polyposis Coli(APC)タンパク質であることが確認された。次にコムギ無細胞タンパク質合成系を用いた結合解析にて、APCのC末端がGagのMAおよびNCに結合することが明らかとなった。これらの現象は免疫沈降法およびGSTプルダウン法においても確認された。

2. APCはHIV-1の粒子産生を促進する。

293T, HeLa, A549細胞にHIV-1分子クローンであるpNL4-3とAPCまたはその変異体群を共発現させ、各時間後の細胞上清中のp24量を定量したところ、すべての細胞においてAPCによるHIV粒子形成の増加が認められた。また、2種類のAPC特異的siRNAを細胞に

予め導入後pNL4-3を導入した場合は、コントロールと比較して、顕著にウイルス粒子形成を阻害した。また、APCのGag結合領域であるC末端部のみを感染細胞に発現させると、ドミナントネガティブ効果としてウイルス粒子形成を顕著に減少させた。

3. APCはHIV-1Gagと先導端で共局在する。

APCは極性細胞において細胞の末端部(先導端)に局在することが知られている。細胞極性を有するA549細胞または末梢血由来マクロファージにGag-GFPを発現させた後、細胞を遊走またはトランスウェル上で偽足形成させた後に免疫染色にて観察したところ、HIV-1GagはAPCとともに細胞の先導端や偽足部位に共局在していた。次にAPCの局在決定因子であるKAP-3を特異的siRNAを用いてノックダウンしたところ、APCおよびGagの細胞末端での局在は消失した。このことは極性細胞における形質膜へのGagタンパク質の輸送にAPCおよびKAP-3が重要な役割を果たすことを示唆する。

D. 考察

本研究は、HIV-1Gagタンパク質と機能的に相互作用する宿主因子を同定し、ウイルス粒子形成に至るGagタンパク質の細胞内動態とその調節機構を明らかにすることを目的とした。我々のグループは昨年度にサイトカインシグナル抑制因子であるSOCS1が、Gagタンパク質を直接ユビキニン化させることで、微小管を介したHIV-1Gagの細胞内輸送を促進することを報告した。APCは微小管を介して細胞末端までキネシンモータータンパク質を介して細胞膜まで輸送されることが知られており、APCとキネシンを結びつけるアダプターとしてKAP-3が重要である。本研究課題において、HIV-1GagがAPCと結合すること、APCおよびKAP-3阻害により細胞末端部への局在とウイルス粒子産生が顕著に阻害されることから、GagとAPCはKAP-3の存在下で微小管に沿って細胞末端部まで輸送させることが示唆される。SOCS1によるGagのユビキニン化はGagとAPCの結合を促進することで、粒子産生を促進する可能性がある。しかしながら、Gagタンパク質の各ドメインに結合する宿主因子は数多く、またその時間的、空間的状況により変化する

ものと考えられる。それらをさらに詳細に解析することで、ウイルス粒子形成を阻害する新規のHIV治療薬の開発につながることを期待される。

尚、本研究成果は日米エイズセミナーにおいて一部発表された。

E. 結論

今回我々はHIV-1粒子産生に関与する宿主因子としてがん抑制遺伝子産物APCタンパク質を同定した。APCタンパク質はHIV-1Gagタンパク質と直接結合し、極性細胞におけるGagタンパク質の形質膜への局在とGagの多重化化に関与することを見いだした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyakawa K, Ryo A, Murakami T, Ohba K, Yamaoka S, Fukuda M, Guatelli J, Yamamoto N: BCA2/Rabring7 promotes tetherin-dependent HIV-1 restriction. **PLoS Pathog.** 2009 Dec;5(12):e1000700.
2. Pulikkan JA, Dengler V, Peer Zada AA, Kawasaki A, Geletu M, Bohlander SK, Ryo A, Tenen DG, Behre G. Elevated PIN1 expression by C/EBP α -p30 blocks C/EBP α induced granulocytic differentiation via c-Jun in AML. **Leukemia**, In press.
3. Matsuura I, Chiang KN, Lai CY, He D, Wang G, Ramkumar R, Uchida T, Ryo A, Lu K, Liu F: Pin1 promotes transforming growth factor-beta-induced migration and invasion. **J Biol Chem.** 2010 Jan 15;285(3):1754-64.
4. Zhou W, Yang Q, Low CB, Karthik BC, Wang Y, Ryo A, Yao SQ, Yang D, Liou YC: Pin1 catalyzes conformational changes of Thr-187 in p27Kip1 and mediates its stability through a polyubiquitination process. **J Biol Chem.** 2009 Sep 4;284(36):23980-8.
5. Ohba K, Ryo A, Dewan MZ, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Nagashima Y, Tanaka Y, Okamoto T, Terashima K, Yamamoto N: Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand 1. **J Immunol.** 2009 Jul 1;183(1):524-32.
6. 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. **Biochem Biophys Res Commun.** 2009 Apr 3;381(2):294-9.
7. Nishi M, Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Sawasaki T, Morishita R, Perrem K, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N: Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. **FEBS Lett.** 2009 Apr 17;583(8):1243-50.
8. Ryo A, Wulf G, Lee TH, Lu KP: Pinning down HER2-ER crosstalk in SMRT regulation. **Trends Biochem Sci.** 2009 Apr;34(4):162-5.

2. 学会発表

1. 梁明秀、山本直樹：HIV-1産生を制御するtetherin相互作用蛋白の同定。特定領域研究「感染現象のマトリックス」縦糸研究会，平成21年5月20～21日，名古屋大学，名古屋。
2. 梁明秀：HIV-1 Gag タンパク質の細胞内ダイナミクス関連因子の同定とその制御機構の解明。第9回日本蛋白質科学会年会，平成21年5月20～22日，熊本全日空ニュースカイ，熊本。
3. 宮川 敬，梁明秀，山本直樹：宿主蛋白質 BCA2/Rabring7 は tetherin と協調して HIV-1 粒子産生を抑制する。第19回抗ウイルス療法研究会，平成21年6月4～5日，ゆうぼうと，東京。
4. 梁明秀：The peptidyl-prolyl isomerase Pin1: A novel post-phosphorylation modifier indevelopment and diseases. 先端融合領域イノベーション創出拠点の形成翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成 第1回公開シンポジウム「，平成21年6月19日，港南区民文化センター、横浜
5. 梁明秀：ペプチジルプロリルイソメラーゼ Pin1:疾患や分化を司る新しいリン酸化後修飾因子。日本ヒトプロテオーム機構(JHUPO)第7回大会，平成21年7月27～28日，北里大学薬学部，東京。
6. Miyakawa K, Ryo A, Yamamoto N: Identification of a tetherin-interacting

protein that restricts HIV-1 particle production. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Sep. 8-11, 2009, Hyogo.

7. Takahama S, Sawasaki T, Okayama A, Akagi T, Endo Y, Yamamoto N, Ryo A: Atypical protein kinase C positively regulates the Vpr incorporation into HIV-1 particles by phosphorylating Gag p6. The 10th Kumamoto AIDS Seminar, 平成 21 年 9 月 28～29 日, ホテル日航熊本, 熊本.
8. 高濱正吉、澤崎達也、岡山明子、赤木達也、遠藤弥重太、山本直樹、梁明秀: 細胞極性制御キナーゼ aPKC による HIV-1 Gag のリン酸化及びその生理的意義. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会, 平成 21 年 11 月 26～28 日, 名古屋国際会議場, 名古屋.
9. 熱田翠薫、吉田篤司、吉崎慎二、八島さやか、松永智子、澤崎達也、梁明秀: 免疫抑制受容体 PD-1 を阻害する新規抗体の作製. 第 32 回分子生物学会年会, 平成 21 年 12 月 9～12 日, パシフィコ横浜, 横浜.
10. 小島良績、後藤さやか、近藤麻美、木下茂美、梁明秀: 滑膜細胞における C/EBP- β に対する Pin1 の効果. 第 32 回分子生物学会年会, 平成 21 年 12 月 9～12 日, パシフィコ横浜, 横浜.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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、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