

201108024A

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業（政策創薬マッチング研究事業）  
（H22-政策創薬-一般-017）

HIV の宿主因子依存性を逆利用したエイズ発症機構の解明研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 日吉 真照

平成24(2012)年3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

HIVの宿主因子依存性を逆利用したエイズ発症機構の解明研究 ----- 1

研究代表者 日吉真照 (熊本大学エイズ学研究センター 特任助教)

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 14

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 15

## HIV の宿主因子依存性を逆利用したエイズ発症機構の解明研究

研究代表者 日吉真照 熊本大学エイズ学研究センター 特任助教

### 研究要旨

HIV は宿主細胞の様々な因子を利用し、複雑な病態を引き起こす。特に、Nef はそれ自身には酵素活性は無いが、様々な宿主因子と相互作用することでエイズ発症に関与することが知られている。そのため、エイズ発症機構の理解、発症防止薬剤の開発そして長期療養の課題の克服、全ての点で Nef の徹底的な解析は不可欠である。しかし、「何故 Nef が必須なのか、どの機能が重要か、どのような宿主因子との相互作用が必要か」などの根本的な点は未解明である。本研究では、Nef が複数の宿主因子を利用する性質を逆手に取ったユニークなアプローチで、これらの課題解決のための新たなツールと視点を提供する。Nef と最も強く結合する宿主因子は酵素 Hck であることが知られている。Hck をツールとした研究において、酵素領域を欠くドミナントネガティブ Hck 変異体は、Nef の重要な機能であるウイルス粒子感染力の増強と主要組織適合抗原 MHC I の発現低下を完全に阻害することがわかっている。この阻害効果は、ドミナントネガティブ Hck が Nef と他の宿主因子の結合を排除した結果と考えられる。そこで本研究では、ドミナントネガティブ Hck をもとにして、Nef 標的的低分子ペプチドを同定する。さらに、Nef の機能発現機構を明らかにするために、Hck ペプチドを用いて Nef と相互作用する宿主因子（群）の同定を試みる。

これまでに、ドミナントネガティブ Hck の配列から Nef の機能を阻害する Hck 由来ペプチドを得ている。また、我々は最近、Nef に直接結合して Nef 機能を阻害する化合物 2C を同定している。本年度、これら 2 つの分子について Nef 機能の阻害効果を詳細に解析した。また、これら 2 つの分子をプローブとして用いて、Nef と相互作用する宿主タンパク質の同定を試みた。その結果、化合物 2C は、ウイルス産生細胞において Nef に作用することでウイルスの感染力を低下させること、マクロファージにおけるウイルス複製を抑制することを明らかにした。さらに、化合物 2C を用いて Nef に結合した宿主タンパク質の抽出を行なったところ、3 種類の宿主タンパク質の候補を見出した。

#### A. 研究目的

コホート研究やサル感染モデルを用いた研究によって、HIV Nef はエイズ発症に重要なタンパク質であることが明らかにされている。そのため、エイズ発症機構の理解、発症防止薬剤の開発そして長期療養の課題の克服、全ての点で Nef

の徹底的な解析は重要である。しかし、「Nef のどの機能が重要か、それら機能にどんな宿主因子が必要か」など根本的な点は未解明である。本研究では、Nef がその機能を発揮するために複数の宿主因子を利用する性質を逆手に取ったユニークなアプローチで、HIV 研究の新たな

ツールと視点 (Nef 機能阻害ペプチドと関連宿主因子) を提供する。

Nef と最も強く結合する宿主因子は酵素 Hck である。興味深いことに、酵素領域を欠損するドミナントネガティブ Hck 変異体は、ウイルス粒子感染力の増強と主要組織適合抗原 MHC I の発現低下という 2 つの重要な Nef の機能を阻害する。この 2 つの Nef 機能は、生体内高ウイルス量の維持、感染細胞の免疫監視からの逃避に重要である。この Nef 機能阻害は、ドミナントネガティブ Hck と Nef の強い結合によって、Nef と本来結合する他の宿主因子との結合が阻害された結果と考えられる。

以上の知見を逆手に取れば 2 つの点に応用できる。まずドミナントネガティブ Hck の配列をもとにして、上記 2 つの Nef の機能を阻害するペプチドの同定が可能である。さらに、ドミナントネガティブ Hck をプローブとして用い、プローブの存在下では Nef との結合が阻害されるタンパク質を調べることによって、上記 2 つの Nef 機能を担う宿主因子を同定できる。いずれも、エイズ発症過程、その中で果たす Nef の役割を解明する上で有用なツールと視点を提供する。これらの検討は未だなされていない。本研究では、ドミナントネガティブ Hck の配列をもとに、細胞透過性のある最も効果的な Nef 機能阻害ペプチドを同定する。また、近年我々のグループが独自に同定した Nef 結合化合物 2C の Nef 機能阻害効果についても解析する。これらの研究によって、Nef をターゲットとした新たな抗 HIV 剤の候補となる分子の同定を試みる。さらに、ドミナントネガティブ Hck や化合物 2C をプローブとして Nef に結合する宿主因子 (群) を同定し、Nef によるエイズ発症機構の解明を試みる。

## B. 研究方法

最近我々が独自に同定した化合物 2C と

Nef の結合様式を予測するために、Molecular operating environment ver. 2007.09. を用いて化合物 2C-Nef ドッキングモデルを作製した。次に、化合物 2C の Nef 機能の抑制効果を詳細に解析した。まず、Nef のウイルス感染力増強機能に対する化合物 2C の抑制効果について詳細な解析を行なった。具体的には、化合物 2C 存在下と非存在下において、293 細胞に HIV molecular clone もしくは HIV Nef 欠損変異体をトランスフェクションによって導入し、組み替え HIV ウイルスを作製した。それぞれの培養上清中の p24 Gag タンパク質量を ELISA 法で測定した後、p24 量が一定となるようにインディケータ細胞 TZM-bl に感染させ、ウイルス粒子の感染性を LTR プロモーター制御下で発現する b-gal を指標に評価した。

さらに、化合物 2C がどのように HIV ウイルスの感染力を抑制するかを検討した。まず、HIV の標的細胞への感染過程における化合物 2C の効果を調べるために、293 細胞を用いて作製した組み替え HIV ウイルスと化合物 2C を同時にインディケータ細胞 TZM-bl に加え、ウイルス粒子の感染を評価した。また、感染細胞内におけるウイルス産生過程に対する化合物 2C の効果を調べるために、293 細胞に HIV molecular clone をトランスフェクションで導入して 24 時間後に化合物 2C を加えた。その後、産生されたウイルス粒子の感染性をインディケータ細胞 TZM-bl を用いて解析した。一方、エンベロープを欠損した HIV 変異体と vesicular stomatitis virus (VSV-G) のエンベロープをコードした DNA を 293 細胞を導入し、同時に化合物 2C を加えて VSV-G シュードタイプ HIV ウイルスを含んだ培養上清を得た。このウイルスについても TZM-bl を用いてウイルスの感染力を解析した。

次に、ウイルス複製に対する化合物 2C

の効果を調べた。293 細胞で作製した組み替え HIV ウイルスを Jurkat 細胞もしくはマクロファージに加え、化合物 2C 存在下と非存在下で培養した。その後、それぞれの培養上清中の p24 Gag タンパク質量を LISA 法で測定して比較した。

さらにウイルスの感染力と複製の増強以外の Nef 機能に対する化合物 2C の抑制効果を調べた。我々は近年、Nef が Hck の酵素活性を異常に活性化することで HIV 感染マクロファージのゴルジ体機能を阻害することを見出している。そこで、化合物 2C は Nef によるゴルジ体機能異常を抑制できるか検討した。具体的には、Nef と Hck をトランスフェクション法で導入した 293 細胞を化合物 2C の存在下と非存在下で培養した後、それらの細胞から調整した細胞質抽出液を用いて western blot 行い、リン酸化 GRASP65 タンパク質を検出した。このリン酸化 GRASP65 の量を指標にして、化合物 2C の Nef によるゴルジ体機能異常の抑制効果を検討した。

今回、Nef の機能を担う新規の宿主因子の同定も試みた。そのために、Nef と結合する宿主タンパク質の中で化合物 2C もしくは Hck 由来ペプチドの存在下で結合が阻害される宿主タンパク質の抽出を行なった。具体的には、Nef と Flag tag そして Strep tag の融合タンパク質 (Nef-Flag-Strep 融合タンパク質) をコードした発現ベクターを作製し、トランスフェクション法によって 293 細胞に導入した。2 日間培養後、細胞から調整した細胞質抽出液を Strep-Tactin アフィニティゲルに加え、Nef-Flag-Strep 融合タンパク質をゲルに結合させた。ビオチン溶液を用いてゲルから抽出した Nef-Flag-Strep 融合タンパク質溶液は次に Flag 抗体アフィニティゲルを加えてインキュベートし、Nef-Flag-Strep 融合タンパク質をゲルに結合させた。その後、化合物 2C、Hck 由来ペプチドもしくは

DMSO 溶液を用いて Flag 抗体アフィニティゲルからタンパク質を抽出した。それぞれのサンプルを用いて SDS-PAGE を行い、銀染色によって各サンプルで検出されるタンパク質を比較した。

(倫理面への配慮)

ヒト末梢血液細胞は必要な委員会 (熊本大学大学院医学薬学研究部等倫理委員会) の承認を得た上で規則に従って実施する。医師により本研究の趣旨を説明し、同意を得られた場合のみ採血し、匿名化の後に実験に用いる。組換え DNA 実験および HIV ウイルスを用いた実験は、学内の必要な委員会の承認を得た上で規則に従って実施する。所属研究室内の P3 実験室で行い、実験終了後のウイルス不活化など安全面には特に留意する。

本研究ではマウス等の実験動物を用いず、ヒトゲノム解析・遺伝子解析研究、疫学研究、遺伝子治療臨床研究、臨床研究、ヒト幹細胞を用いる臨床研究には該当しない。

### C. 研究結果

Nef と化合物 2C の結合様式の詳細を調べるために結合モデルを作製したところ、これまでに我々が示した結果と一致して、化合物 2C は Nef に直接結合することが強く示唆された。特に、Nef のアルギニン (R) 77、リシン (K) 82、アラニン (A) 83、アスパラギン酸 (D) 86、イソロイシン (I) 87、フェニルアラニン (F) 90、グルタミン (Q) 118 そしてチロシン (Y) 120 (アミノ酸の番号は HIV NL43 株の Nef における位置を示す) は、化合物 2C との結合に関与することが示唆された (図 1)。

化合物 2C の Nef 機能抑制効果を詳細に解析するために、まず、化合物 2C によるウイルスの感染力への影響を調べた。その結果、化合物 2C の存在下で作製した組み替え HIV ウイルスでは、感染力が化合

物2Cの濃度依存的に低下することが明らかになった(図2 A)。一方、Nefを欠損した組み替えHIVウイルスでは、化合物2Cの存在下においても感染力の減少は見られなかった(図2 B)。これらの結果から、化合物2CはNefの機能を特異的に阻害することでウイルス感染力を低下させることが明らかになった。次に、化合物2Cがウイルス感染力を低下させるメカニズムについて解析を行なった。標的細胞に組み替えHIVウイルスと化合物2Cを同時に加えた後、細胞の感染率を調べたところ、感染阻害は見られなかった(図3 A)。それに対して、HIV molecular clone導入後に化合物2C存在下で培養した細胞では、産生されたHIVウイルスの感染力が低下していた(図3 B)。これらの結果から、化合物2Cは細胞内でウイルスが産生されるときに作用して、その感染力を低下させることが示唆された。一方、VSV-GシュードタイプHIVウイルスの産生細胞に化合物2Cを加えたところ、化合物2Cによる感染力低下は見られなかった(図3 C)。

次に、化合物2CのHIVウイルス複製に対する効果を解析した。まず、Jurkat細胞を標的細胞として用いた。HIV-1 NL4-3を感染させたJurkat細胞を化合物2C存在下と非存在下で培養した後、それぞれの培養上清に含まれるウイルス量を測定したところ、それらのウイルス量に違いは無かった(図4 A、B)。次に、マクロファージを用いて同様の実験を行なったところ、化合物2C存在下ではウイルス量が減少していた(図5 A、B左図)。一方、Nefを欠損したHIV-1 NL4-3を感染させたマクロファージを用いて同様の実験を行なったところ、化合物2C存在下においてもウイルス量は減少しなかった(図5 A、B右図)。これらの結果から、化合物2CはNefの機能を阻害することでウイルス産生を抑制することが明らかになった。

さらに、ウイルス粒子感染力増強と主要組織適合抗原(MHC I)発現抑制の2つの機能以外のNef機能に対して、化合物2Cは抑制効果を持つか解析を試みた。近年、我々のグループは、HIV感染マクロファージにおいてNefはGRASPタンパク質のリン酸化を誘導することでゴルジ体の機能異常を引き起こすことを明らかにしている。そこで、化合物2Cは感染細胞内のゴルジ体機能異常を抑制するか調べた。NefとHckを導入した293細胞を化合物2C存在下と非存在下で培養した後、それぞれの細胞質抽出液を用いたwestern blotでリン酸化GRASPタンパク質を検出したところ、化合物2C存在下ではGRASPタンパク質のリン酸化が抑制されていることがわかった(図6)。このことから、化合物2CはHIV感染マクロファージにおけるゴルジ体機能異常を抑制することが示唆された。

Nefが結合する新規の宿主因子(群)を同定するために、Nefと結合する宿主因子の中で化合物2C存在下では結合が阻害される宿主タンパク質の同定を試みた。Nefを発現させた293細胞から調整した細胞質抽出液中のNefをビーズに結合させ、化合物2Cを加えた時にゲルから流出する宿主タンパク質を調べたところ、3種類のタンパク質が検出された。

#### D. 考察

我々はこれまでの研究で、化合物2CはNefと直接結合することを示唆する結果を得ている。今回、Nefと化合物2Cの結合様式モデルを作製したところ、化合物2CはNefのR77、K82、A83、D86、I87、F90、Q118そしてY120を介して結合することがわかった。興味深いことに、これらのアミノ酸の中で、R77はNefの機能に重要なPxxPモチーフ(-PVTPQVPLR<sup>77</sup>P-)を構成する。また、R77、A83、F90そしてY120は宿主因子Hckとの結合に重要であることがこれまでの研究で明らかにな

っている。このモデルによって明らかになった化合物 2C の結合様式は、化合物 2C が Hck と Nef PxxP モチーフの結合を阻害するという以前の我々の結果と一致している。さらに、化合物 2C は Nef を持つ野生型ウイルスの感染力は低下させるが、Nef を欠損したウイルスの感染力には影響しない。この結果は、化合物 2C は特異的に Nef の機能を抑制することを示している。これらのことから、化合物 2C は特異的に Nef PxxP モチーフに直接結合し、Nef と何らかの宿主タンパク質との結合を阻害することで HIV ウイルスの感染力を低下させると考えられる。

化合物 2C による HIV ウイルス感染力低下のメカニズムを調べたところ、化合物 2C は感染細胞内でウイルスが産生される時に作用することがわかった。さらに化合物 2C はシュードタイプ HIV ウイルスの感染力には全く影響がないことがわかった。シュードタイプの HIV ウイルスは感染初期のステップが野生型ウイルスと異なることが知られている。また、他のグループはシュードタイプウイルスの感染力には Nef は関与しないという結果を報告している。これらのことから、化合物 2C は産生細胞内で Nef 機能を特異的に阻害することで、感染初期に関与するウイルスの構造や何らかの機能タンパク質に作用して感染力を低下させると考えられる。

さらに今回、化合物 2C によるウイルス複製への影響を調べた。HIV を感染させた Jurkat 細胞では化合物 2C はのウイルス複製を抑制しなかった。これまでの研究によって Jurkat 細胞では Nef 非依存的にウイルスが産生されることが示されている。そのため、Jurkat 細胞では化合物 2C による抑制効果が見られなかったと考えられる。一方、化合物 2C は HIV 感染マクロファージにおけるウイルス複製を抑制することがわかった。これらの結果から、化合物 2C は Nef の機能を特異

的に抑制することで、ウイルス複製を抑制すると考えられる。

また、ウイルス感染力増強と MHC-I 発現抑制以外の Nef 機能に対する化合物 2C の効果を調べた。最近、我々は Nef が感染マクロファージにおいてゴルジ体の機能を阻害することを見出している。今回、化合物 2C は Nef によるゴルジ体機能阻害を回復することがわかった。このことは化合物 2C が多くの Nef 機能を抑制する可能性を示唆している。今後、化合物 2C の効果をさらに調べる必要がある。

これまでに世界中で報告された Nef 機能阻害分子は、化合物 2C と他に 1 例だけである。今回の詳細な検討の結果、化合物 2C は HIV ウイルスの感染力と複製を抑制することがわかった。さらに、Nef の他の機能を阻害する可能性も示唆された。既存の抗 HIV 剤とは異なり、化合物 2C は Nef 機能を阻害するという新たな作用機序を持つ分子であるため、この化合物をさらに改良することは全く新しい抗 HIV 剤の開発につながると考えられる。

今回の研究で化合物 2C は Nef の機能に重要な PxxP モチーフと直接結合することがわかった。この PxxP モチーフは、Nef が機能を発揮する際に宿主因子との結合に重要な領域であることが知られている。そのため、化合物 2C を作用させたときに Nef との結合が阻害される宿主タンパク質は、Nef 機能を発揮する上で必要とされる因子であると考えられる。今回、化合物 2C 非存在下で Nef と結合する宿主因子の中で、化合物 2C 存在下では Nef と結合できない宿主タンパク質を調べたところ、3 種類のタンパク質を見出すことができた。これらのタンパク質を同定することによって、Nef 機能発現機構のさらなる解明に貢献できると考えられる。

## E. 結論

化合物 2C は Nef PxxP モチーフに直接結合することがわかった。詳細な機能解

析により、化合物 2C は Nef の機能を阻害することで、ウイルス粒子感染力増強を抑制すること、ウイルス粒子産生を抑制すること、そして、感染マクロファージのゴルジ体機能異常を回復させることが明らかになった。化合物 2C は Nef をターゲットとしたこれまででない作用機序を持つ薬剤である。これらのことから、化合物 2C は新たな抗 HIV 剤の候補となり得る。また、化合物 2C が Nef PxxP モチーフに直接結合する特徴を持つことから、化合物 2C は Nef と結合する宿主因子の探索に有用なツールとなり得る。今回、化合物 2C を用いて Nef に結合する可能性がある 3 種類の宿主タンパク質を見出すことができた。これらのタンパク質を同定することで、Nef の機能発現メカニズムについて新たな知見を得ることが期待される。

F. 健康危機情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

**Hiyoshi M**, Takahashi-Makise N, Yoshidomi Y, Chutiwitoonchai N, Chihara T, Okada M, Nakamura N, Okada S and Suzu S.

HIV-1 Nef perturbs the function, structure, and signaling of the golgi through the Src kinase Hck.

*J Cell Physiol.*, 227, 1090-1097, 2012.

Chutiwitoonchai N, **Hiyoshi M**, Mwimanzi P, Ueno T, Adachi A, Ode H, Sato H, Fackler OT, Okada S and Suzu S. The identification of a small molecule compound that reduces HIV-1 Nef-mediated viral infectivity enhancement.

*PLoS One.* 6, e27696, 2011.

2. 学会発表

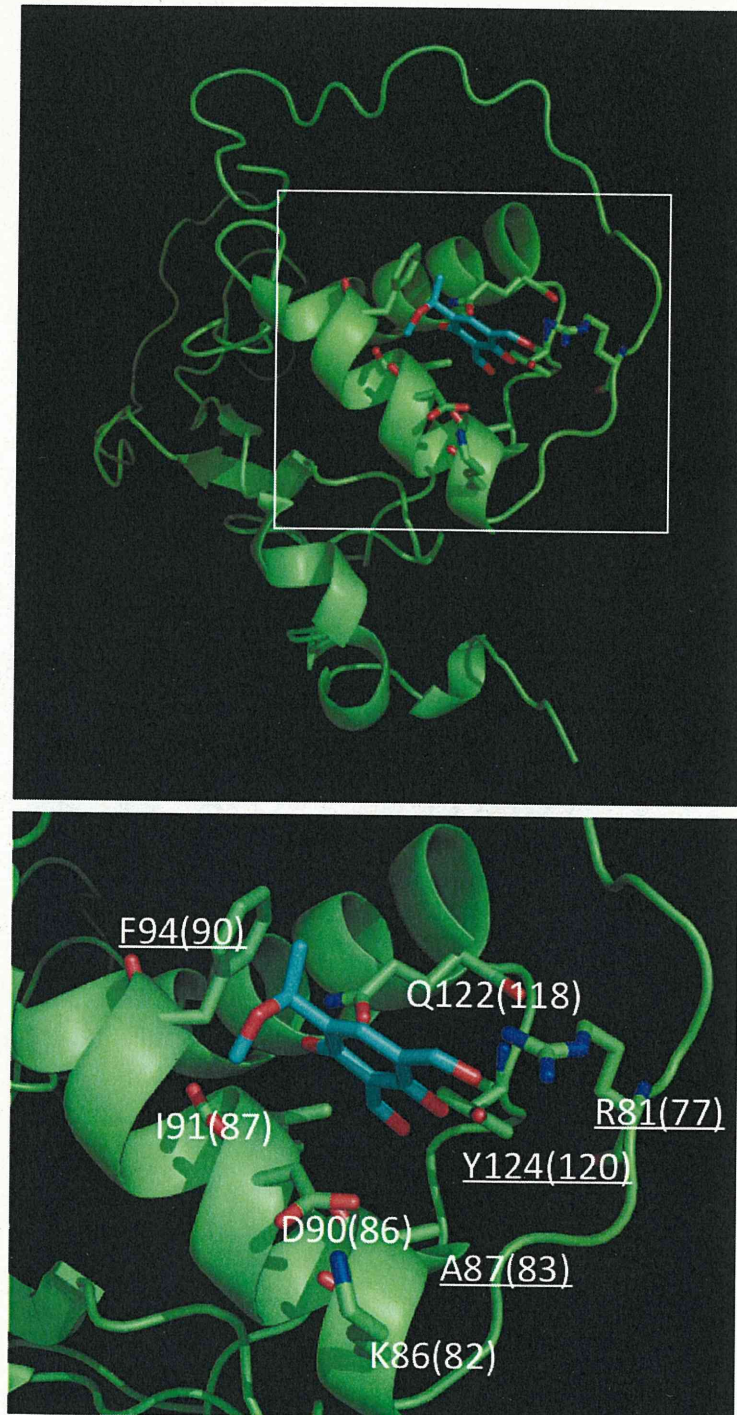
該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし。

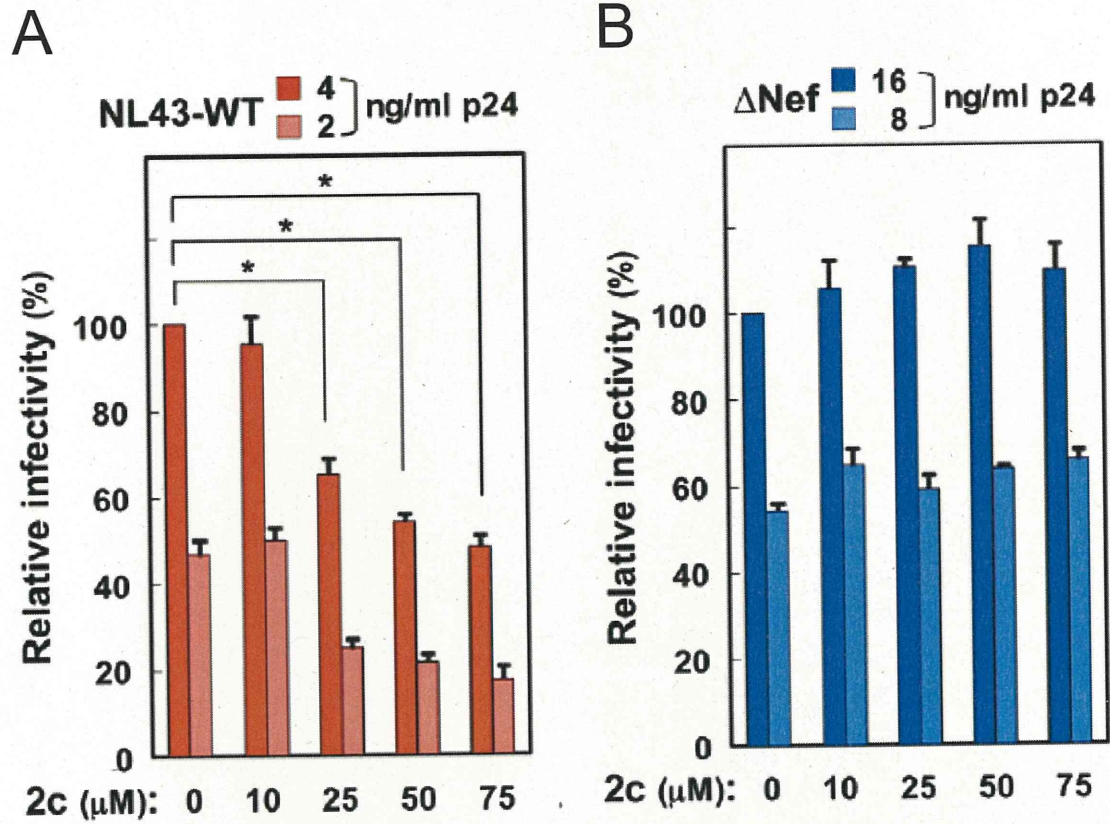


図1 化合物2CとNefタンパク質の結合モデル



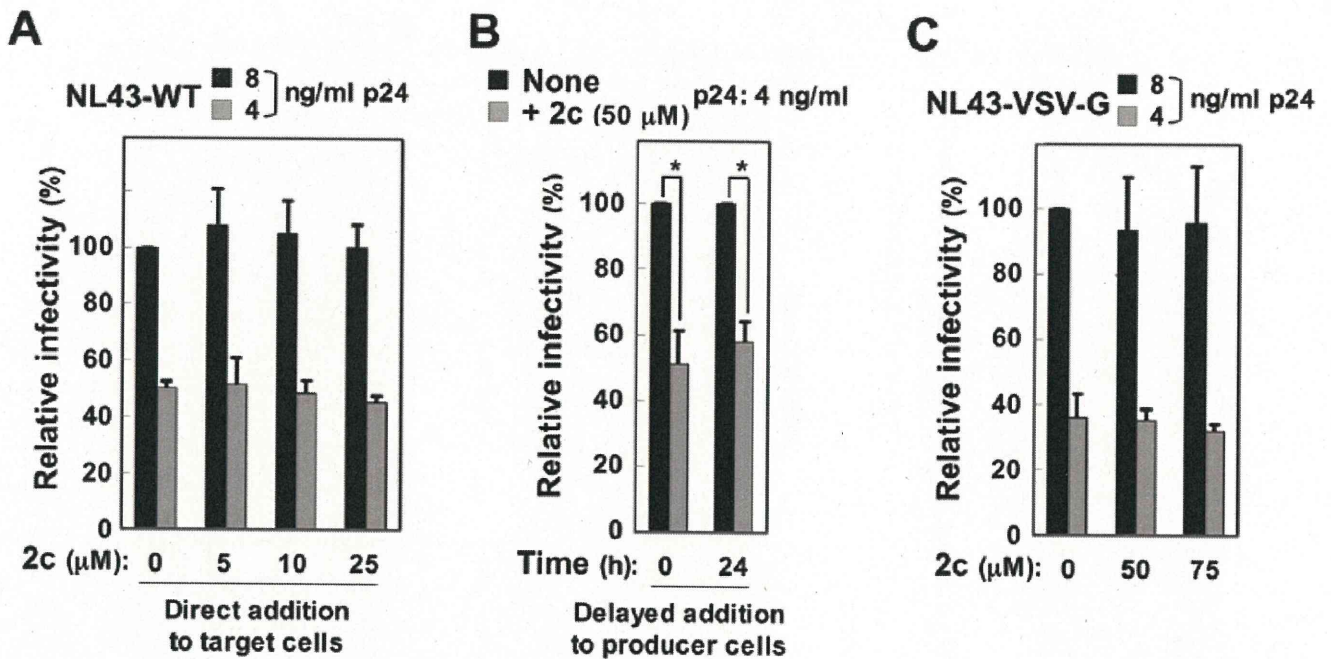
化合物2CはNefのPxxPモチーフと直接結合することが明らかになった。

図2 化合物2CによるHIVウイルス感染力抑制効果(1)



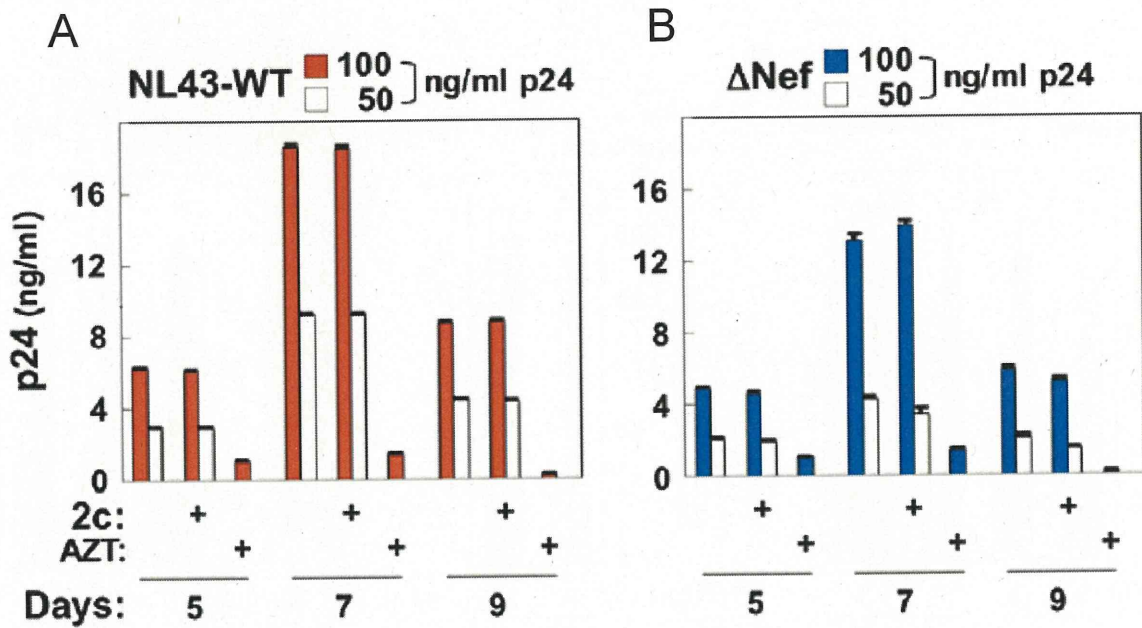
化合物2Cは野生型HIVウイルスの感染力を抑制するが(A)、Nefを欠損したHIVウイルスの感染力は抑制しないことが明らかになった(B)。

図3 化合物2CによるHIVウイルス感染力抑制効果(2)



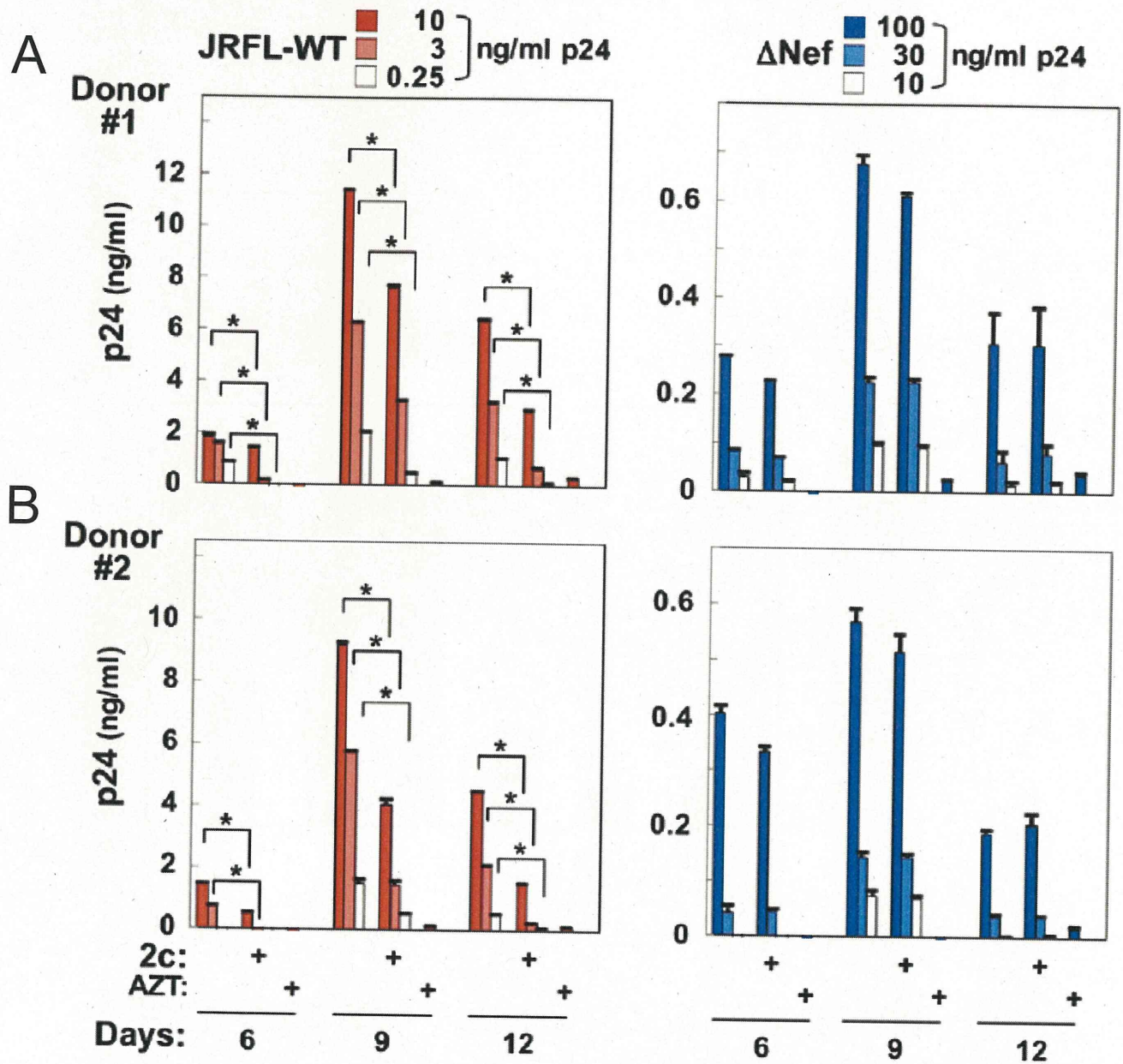
化合物2C存在下で標的細胞に感染させたウイルスの感染力は低下しないことが明らかになった(A)。一方で、化合物2C存在下で培養した細胞から産生されたウイルスの感染力は低下することが明らかになった(B)。また、化合物2CはVSV-GシュードタイプHIVの感染力には影響しないことがわかった(C)。

図4 化合物2CのHIVウイルス複製に対する影響解析(1)



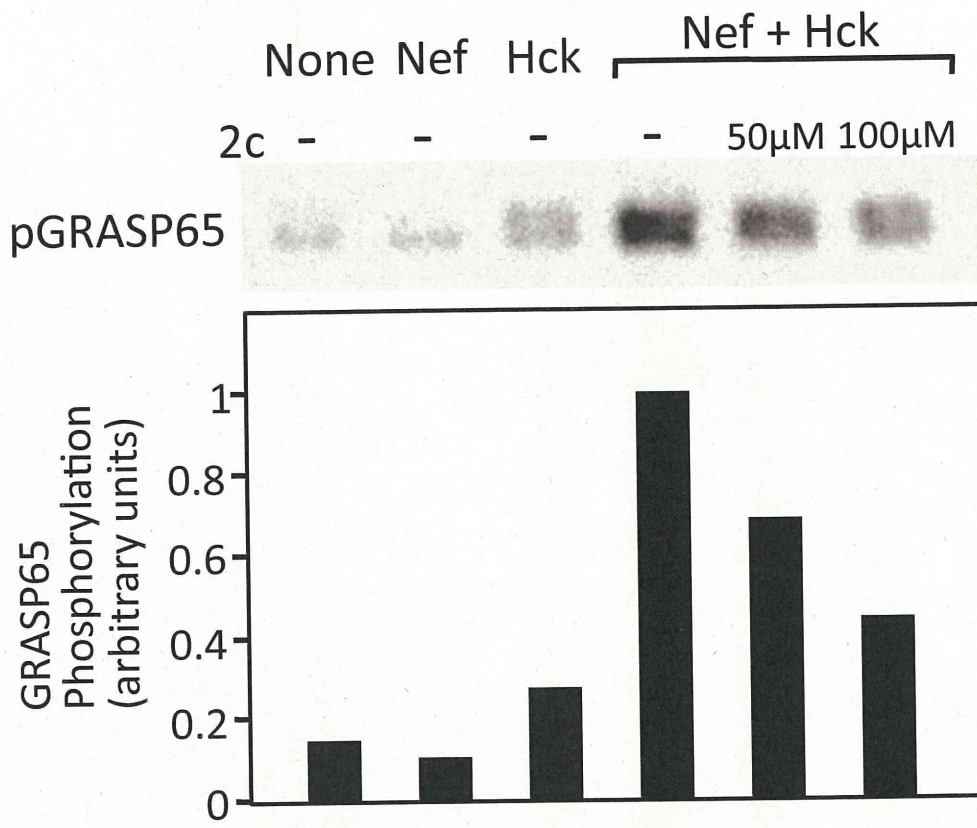
Jurkat細胞では、化合物2Cは野生型HIV(A)およびNef欠損HIV(B)のウイルス複製を抑制しないことが明らかになった。

図5 化合物2CのHIVウイルス複製に対する影響解析(2)



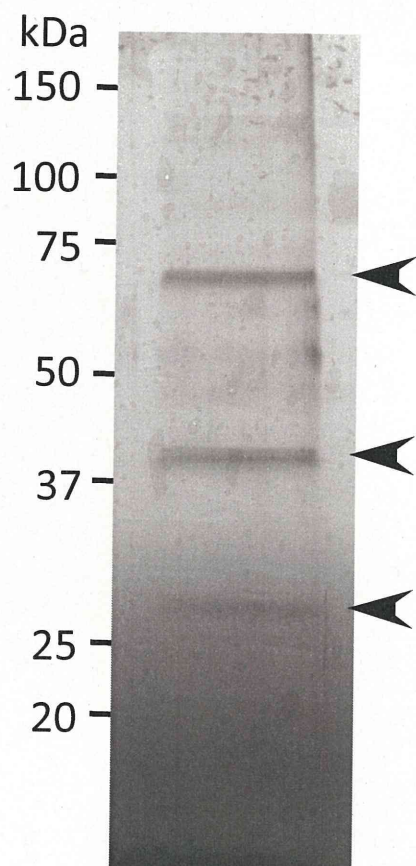
感染したマクロファージにおいて、化合物2Cは野生型HIVの複製を抑制することが明らかになった。

図6 化合物2CによるHIV感染細胞のゴルジ体機能異常の回復



化合物2CはNefによるGRASPタンパク質のリン酸化を抑制することが明らかになった。

図7 化合物2Cを用いたNef結合宿主タンパク質の解析



化合物2Cを用いてNefと結合する宿主タンパク質を調べたところ、3種類のタンパク質が検出された。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

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  |
|---|--|-----------------------|-----|-----------|------|
| Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Yoshidomi Y, Chutiwitoonchai N, Chihara T, Okada M, Nakamura N, Okada S, Suzu S. | HIV-1 Nef perturbs the function, structure, and signaling of the golgi through the Src kinase Hck.             | <b>J Cell Physiol</b> | 227 | 1090-1097 | 2012 |
| Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Mwimanzi P, Ueno T, Ode H, Sato H, Fackler OT, Okada S, Suzu S.                   | The identification of a small molecule compound that reduces HIV-1 Nef-mediated viral infectivity enhancement. | PLoS One              | 6   | e27696    | 2011 |



# HIV-1 Nef Perturbs the Function, Structure, and Signaling of the Golgi Through the Src Kinase Hck

MASATERU HIYOSHI,<sup>1</sup> NAOKO TAKAHASHI-MAKISE,<sup>1</sup> YUKA YOSHIDOMI,<sup>1</sup> NOPPORN CHUTIWITOONCHAI,<sup>1</sup> TAKASHI CHIHARA,<sup>1</sup> MASATO OKADA,<sup>2</sup> NOBUHIRO NAKAMURA,<sup>3</sup> SEIJI OKADA,<sup>1</sup> AND SHINYA SUZU<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Japan

<sup>2</sup>Department of Oncogene Research, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan

<sup>3</sup>Cell Biology, Division of Life Science, Graduate School of Natural Science and Technologies, School of Pharmacy, College of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University, Kanazawa, Japan

The interaction between HIV-1 Nef and the Src kinase Hck in macrophages has been shown to accelerate the progression to AIDS. We previously showed that Nef disturbed the *N*-glycosylation/trafficking of Fms, a cytokine receptor essential for maintaining macrophages in an anti-inflammatory state, in an Hck-dependent manner. Here, we show the underlying molecular mechanism of this effect. Using various Hck isoforms and their mutants and Golgi-targeting Hck mutants, we confirmed that Hck activation at the Golgi causes the Nef-induced Fms *N*-glycosylation defect. Importantly, we found that both the co-expression of Nef and Hck and the expression of a Golgi-targeted active Hck mutant caused alterations in the distribution of GM130, a Golgi protein that was shown to be required for efficient protein glycosylation. Moreover, the activation of Hck at the Golgi caused strong serine phosphorylation of the GM130-interacting Golgi structural protein GRASP65, which is known to induce Golgi cisternal unstacking. Using pharmacological inhibitors, we also found that the activation of Hck at the Golgi followed by the activation of the MAP kinase ERK-GRASP65 cascade is involved in the Fms *N*-glycosylation defect. These results suggest that Nef perturbs the structure and signaling of the Golgi by activating Hck at the Golgi, and thereby, induces the *N*-glycosylation/trafficking defect of Fms, which is in line with the idea that Src family kinases are crucial Golgi regulators. *J. Cell. Physiol.* 227: 1090–1097, 2012. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

HIV-1 Nef protein is a well-characterized critical determinant of the development of AIDS (Kestler et al., 1991; Deacon, 1995; Kirchoff et al., 1995). As Nef has no catalytic activity, its pathogenic function is mediated through cellular machinery (Geyer et al., 2001; Malim and Emerman, 2008). The cellular protein with the highest affinity for Nef is Hck, a Src kinase expressed in macrophages (Saksela et al., 1995; Karkkainen et al., 2006; Tribble et al., 2006). Nef induces Hck to adopt a unique active conformation, which allows the constitutive activation of its kinase activity (Moarefi et al., 1997; Lerner and Smithgall, 2002). The pathological importance of the Nef–Hck interaction has been clearly proven by studies with HIV-1 transgenic mice. Mutations in the Hck-binding sites of Nef abolished the development of AIDS-like disease in the HIV-1 transgenic mice (Hanna et al., 1998), and the development of the disease was significantly delayed in the absence of Hck; that is, in *hck*<sup>-/-</sup> HIV-1 transgenic mice (Hanna et al., 2001). These findings indicate that the Nef–Hck interaction in macrophages is at least in part responsible for the development of AIDS. This idea was supported by the identification of an unusual Nef variant that failed to activate Hck in a long-term HIV-1-positive non-progressor (Tribble et al., 2007). However, it is unclear how this molecular interaction in macrophages affects the progression of the disease.

We previously showed that Nef inhibited M-CSF signaling, the primary cytokine of macrophages (Suzu et al., 2005), by reducing the cell surface expression of the M-CSF receptor Fms (Hiyoshi et al., 2008). The inhibition of the M-CSF–Fms axis may trigger worsening of uncontrolled immune states in HIV-1-infected patients, as M-CSF is essential for maintaining macrophages in an anti-inflammatory state (Hamilton, 2008). We also showed that the reduced surface expression of Fms

was due to the accumulation of immature hypo-*N*-glycosylated Fms at the Golgi, which was dependent on the activation of Hck (Hiyoshi et al., 2008). On the other hand, it has been shown that a substantial fraction of Hck is detected at the Golgi and the plasma membrane (Guiet et al., 2008). Nef mainly localizes at the Golgi (Foster and Garcia, 2008), and therefore, the activation of Hck by Nef preferentially occurs at the Golgi (Hung, 2007). Indeed, using various Nef alleles/mutants, we found that the degree of Hck activation at the Golgi was correlated with the degree of impaired intracellular trafficking and *N*-glycosylation of Fms (Hassan, 2009). However, the underlying molecular mechanism responsible for these effects remains to be determined.

The Fms *N*-glycosylation defect induced at the Golgi by the Nef–Hck axis appears to be linked to the idea that Src family kinases play crucial regulatory roles at the Golgi. Src kinases including Hck are involved in an array of signaling pathways involving the plasma membrane (Corey and Anderson, 1999; Lowell, 2004). However, accumulating evidence has suggested

Contract grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

\*Correspondence to: Shinya Suzu, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Honjo 2-2-1, Kumamoto-city, Kumamoto 860-0811, Japan. E-mail: ssuzu06@kumamoto-u.ac.jp

Received 19 November 2010; Accepted 21 April 2011

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com), 12 May 2011.  
DOI: 10.1002/jcp.22825

that Src kinases also contribute to the structure and function of the Golgi. Most Src kinases have been physiologically detected at the Golgi (Sallese et al., 2009), and fibroblasts lacking ubiquitous Src kinases (c-Src/Yes/Fyn) exhibited aberrant Golgi structures (Bard et al., 2003). The overexpression of a constitutive-active c-Src mutant resulted in the fragmentation and dispersal of Golgi stacks (VWeller et al., 2010). Moreover, an increase in the load of nascent proteins from the endoplasmic reticulum led to the activation of Golgi-localized Src kinases, which regulate protein trafficking activity in secretory pathways (Pulvirenti, 2008). In this study, we therefore analyzed the molecular events, including the signaling cascades, that are induced by the Nef–Hck axis at the Golgi and are involved in the Fms *N*-glycosylation defect.

## Materials and Methods

### Cells, antibodies, and inhibitors

The HEK293 cells (Invitrogen, Carlsbad, CA) were maintained as described previously (Suzu et al., 2005). The primary antibodies used were as follows: anti-Fms (C-20; Santa Cruz, Santa Cruz, CA), anti-Hck (clone 18; BD Transduction, Lexington, KY), anti-Hck phosphorylated at Tyr 411 (Hck<sup>Y411</sup>; Santa Cruz), anti-Lyn (clone 42; BD Transduction), anti-c-Src (SRC2; Santa Cruz), anti-CD8 (H-160; Santa Cruz) to detect CD8–Nef fusion proteins (Hiyoshi et al., 2008), anti-ERK1/2 (K-23; Santa Cruz), anti-ERK1/2 phosphorylated at Tyr 204 (E-4; Santa Cruz), anti-GM130 (clone 35; BD Transduction), anti-LAMP-1 (clone 25; BD Transduction), anti-EEA-1 (clone 14; BD Transduction), anti-calnexin (H-70; Santa Cruz), anti-desmoglein (clone 62; BD Transduction), anti-TGN46 (Serotec, Oxford, UK), anti-GRASP65 (CB1011; Calbiochem, Darmstadt, Germany), and anti-GRASP65 phosphorylated at Ser 277 (Yoshimura et al., 2005). PP2 (Sigma, San Diego, CA) and U0126 (Promega, Madison, WI) were used as a Src kinase inhibitor and a MEK/ERK inhibitor, respectively. These inhibitors were dissolved in DMSO (Wako, Osaka, Japan) and added to the cultures at a final concentration of 10  $\mu$ M.

### Plasmids

The human Fms plasmid (pCEF-c-fms) was prepared as described previously (Suzu et al., 2005). The SF2 strain Nef cDNA cloned into the pRc/CMV-CD8 vector was used to express the CD8–Nef fusion protein (Hassan, 2009). Rat GRASP65 cDNA cloned into pcDNA3.1 was prepared as described previously (Yoshimura et al., 2005). Using p56Hck cDNA (Hassan, 2009) as a template, p59Hck cDNA was prepared by PCR. p56Hck-G2A/C3S, p59Hck-G2A, and the constitutive-active (AxxA; Lerner and Smithgall, 2002) and kinase-dead (KE; Lerner and Smithgall, 2002) versions of Hck were prepared using the QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). p56Hck-Golgin was prepared by adding cDNA encoding the 184 C-terminal amino acids of Golgin-84, which contain Golgi-retention sequences (Bascom et al., 1999), to the C-terminal end of p56Hck. GalT-p56Hck was prepared by adding cDNA encoding the 81 N-terminal amino acids of GalT (Yamaguchi and Fukuda, 1995), which also contain Golgi-retention sequences, to the N-terminus of p56Hck. All of these cDNA were subcloned into the pcDNA3.1 vector after their nucleotide sequences had been verified. Expression plasmids for Src kinases other than Hck were also used. The murine N-Src plasmid was prepared as described previously (Kotani et al., 2007). Human Fgr in the pApuro2 vector and human Lyn in the pME-puro vector were provided by R. Goitsuka (Tokyo University of Science) and Y. Yamanashi (The University of Tokyo), respectively.

### Transfection

Transient transfection of 293 cells was performed as described previously with slight modifications (Hassan, 2009). In brief, cells

grown on a 12-well tissue culture plate were transfected with a total of 1.6  $\mu$ g plasmid using Lipofectamine2000 (Invitrogen). The total amount of plasmids was normalized with empty vectors. After 6 h, the culture medium was replaced with complete DME medium containing 10% FCS. In selected experiments, a kinase inhibitor such as PP2 or U0126 was added to the culture when the medium was changed. The transfected cells were cultured for an additional 42 h and then analyzed by Western blotting, immunofluorescence, and subcellular fractionation.

### Western blotting

Total cell lysates were prepared as described previously (Suzu et al., 2000). Cleared cell lysates were resolved by SDS–PAGE under reducing conditions, and the proteins were transferred to a nylon membrane (Hybond-P; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Detection was performed using ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) with HRP-labeled anti-immunoglobulin (GE Healthcare). The relative intensity of the bands on scanned gel images was quantified using NIH Image software, and Fms *N*-glycosylation and GRASP65 phosphorylation were also shown graphically using arbitrary units. For Fms *N*-glycosylation, the percentage of immature hypo-*N*-glycosylated Fms (gp130Fms/gp130Fms plus gp150Fms) was calculated and compared among the samples (Hassan, 2009). Data are expressed as fold differences compared with the sample containing the lowest amount of gp130Fms.

### Immunofluorescence

For the immunofluorescence, 293 cells were fixed in 2% paraformaldehyde, permeabilized with PBS containing 0.2% Triton X-100 (Hiyoshi et al., 2008), and stained with the primary antibodies (described above) followed by the following secondary antibodies (all from Molecular Probes, Eugene, OR): anti-mouse Alexa Fluor 488, anti-mouse Alexa Fluor 568, anti-rabbit Alexa Fluor 488, and anti-sheep Alexa Fluor 568. Nuclei were also stained with DAPI (Molecular Probes). Fluorescent signals were visualized with a confocal laser scanning microscope LSM 700 (Carl Zeiss, Hamburg, Germany) equipped with 63 $\times$ /1.4 Oil DIC PlanApoChromat objective lenses. Image processing was performed using an LSM software ZEN 2009 (Carl Zeiss).

### Subcellular fractionation

The subcellular fractionation on a sucrose gradient was performed exactly as reported previously (Matsuda et al., 2006; Hassan, 2009). In brief, the cells were swollen in hypotonic buffer containing PhoSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim, Germany) and then homogenized. Then, the post-nuclear supernatants were fractionated by ultracentrifugation (100,000g for 75 min) on discontinuous sucrose gradients. All steps were carried out on ice. After ultracentrifugation, the fractions (total 13 fractions) were collected from the tops of the tubes and analyzed by Western blotting with the antibodies described above.

### Statistical analysis

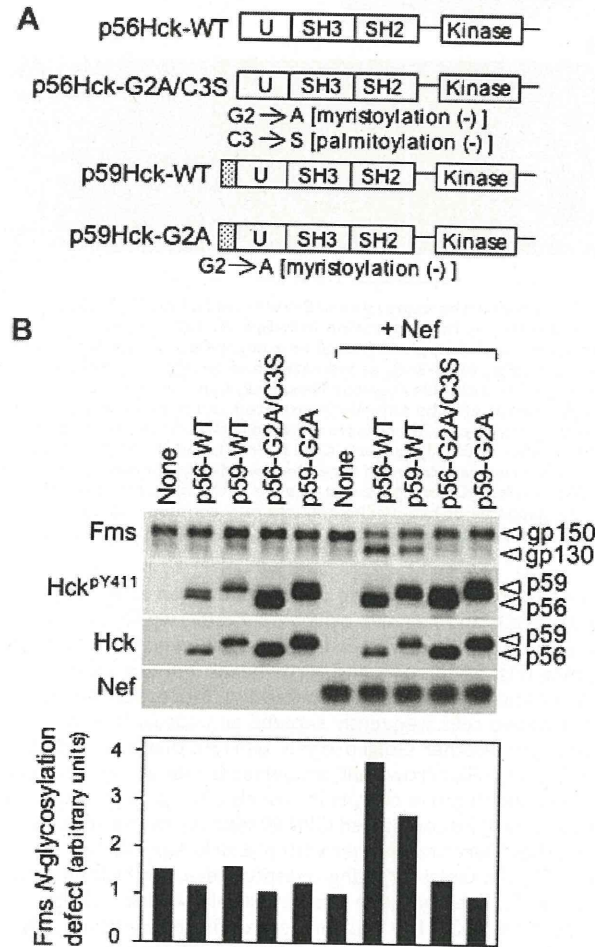
The statistical significance of differences between samples was determined using the Student's *t*-test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

## Results

### Hck activation at the Golgi causes the Fms *N*-glycosylation defect

We previously showed that the co-expression of Nef and the p56Hck isoform in 293 cells reduced the cell surface expression of Fms, which was associated with intense Fms signals at the

perinuclear Golgi region and an increase in the expression hypo-*N*-glycosylated gp130Fms (Hiyoshi et al., 2008). Initially, to examine whether the constitutive activation of Hck at the Golgi caused the Fms *N*-glycosylation defect, we tried three different approaches. As Hck is expressed as alternatively translated isoforms (p56Hck and p59Hck) with different lipid modifications (Fig. 1A), we first examined whether the

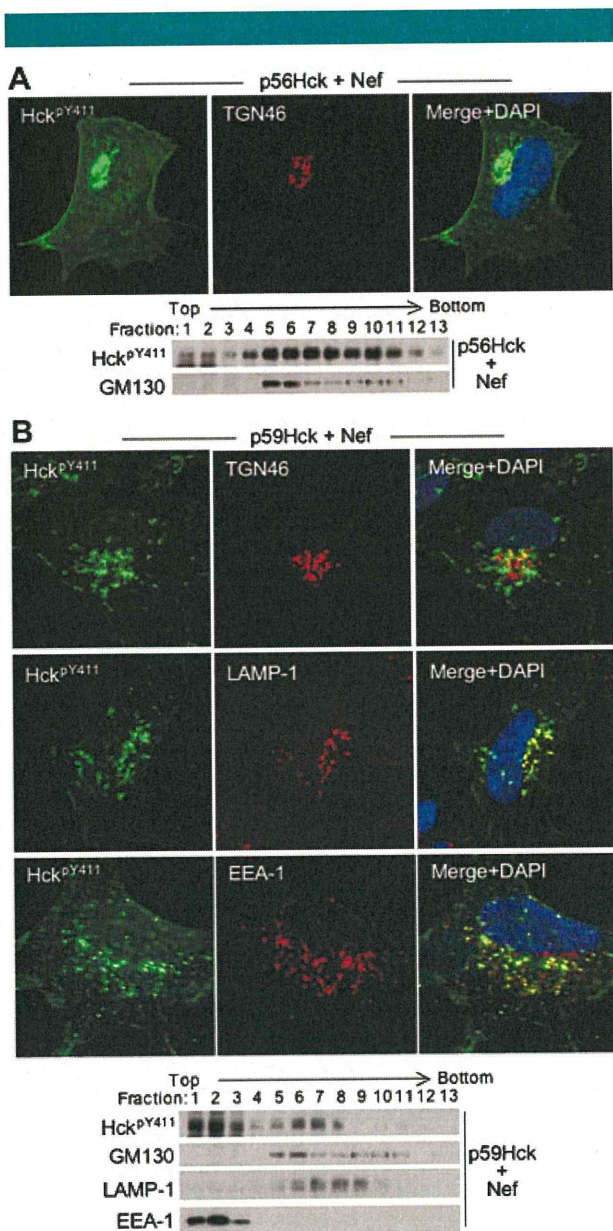


**Fig. 1.** Different abilities of p56Hck and p59Hck to cause the Fms *N*-glycosylation defect in the presence of Nef. **A:** The wild-type (WT) p56Hck, p56Hck-G2A/C3S mutant, wild-type (WT) p59Hck, and p59Hck-G2A mutant are schematically shown. p59Hck has 21 additional N-terminal amino acids (Carreno et al., 2000). Both isoforms have a myristoylation site (Gly2), but only p56Hck has a palmitoylation site (Cys3). Thus, the p56Hck-G2A/C3S mutant lacks both myristoylation and palmitoylation sites, whereas the p59Hck-G2A mutant only lacks a myristoylation site. U, unique domain; SH2, Src homology-2 domain; SH3, Src homology-3 domain; kinase, tyrosine kinase domain. **B:** 293 cells were transfected with the Fms plasmid alone (none) or in combination with the plasmids for Hck and Nef, as indicated. Total cell lysates were subjected to Western blotting with antibodies against Fms, active Hck (Hck<sup>pY411</sup>), total Hck, and Nef. p56-WT, the wild-type p56Hck; p59-WT, the wild-type p59Hck; p56-G2A/C3S, non-lipid modified p56Hck; p59-G2A, non-lipid modified p59Hck. gp150Fms and gp130Fms are the fully-*N*-glycosylated and hypo-*N*-glycosylated Fms, respectively (Hassan, 2009). Quantified Fms *N*-glycosylation defect values are also shown on the bar graph. The percentage of immature gp130Fms (gp130Fms/gp130Fms + gp150Fms) was calculated and compared among samples. Data are expressed as the fold difference compared with the sample with the lowest amount of gp130Fms. Data shown are representative of three independent experiments with similar results.

co-expression of Nef with p59Hck also caused the Fms *N*-glycosylation defect. As shown (Fig. 1B), p59Hck/Nef co-expression caused the Fms *N*-glycosylation defect (an increase in the level of gp130Fms), but its level was moderate compared to that induced by p56Hck/Nef co-expression (Fig. 1B, lanes 3 and 4 from the right). This was not due to differences in the degree of activation of these Hck isoforms by Nef, which was assessed by the auto-phosphorylation of Hck at Tyr 411 (Hck<sup>pY411</sup>; Fig. 1B). Lipid modification is required by both Hck isoforms for the induction of the Fms *N*-glycosylation defect as non-lipid modified mutants (p56Hck-G2A/C3S and p59Hck-G2A; Fig. 1A) had no effect on Fms *N*-glycosylation (Fig. 1B). Based on these findings, we next examined whether the different abilities of these Hck proteins correlated with their presence and activation at the Golgi. An intense signal for Nef-activated p56Hck (Hck<sup>pY411</sup>) was found at the Golgi region positive for the Golgi protein TGN46 (Fig. 2A, immunofluorescence), and most of the active p56Hck was recovered in fractions containing GMI130, another Golgi protein (Fig. 2A, fractionation). In contrast, the signal for Nef-activated p59Hck was detected as small vesicles (Fig. 2B, immunofluorescence), which appeared to overlap with TGN46 (a Golgi marker), LAMP-1 (a lysosome marker), and EEA-1 (an early endosome marker). Indeed, a large proportion of the active p59Hck was recovered in fractions containing EEA-1 (Fig. 2B, fractionation), suggesting its presence in early endosomes. As expected, the non-lipid modified mutants, p56Hck-G2A/C3S and p59Hck-G2A, did not show any specific Golgi-localization, even in the presence of Nef (data not shown). These results support the idea that the presence of active Hck at the Golgi resulted in the Fms *N*-glycosylation defect.

We also tested whether other Src kinases had a similar effect on Fms *N*-glycosylation when co-expressed with Nef. Myeloid lineage-specific Src kinases such as Lyn and Fgr were also shown to bind to Nef, but with lower affinity than Hck (Trible et al., 2006). In line with this finding, the degree of the Fms *N*-glycosylation defect induced by Lyn/Nef or Fgr/Nef co-expression was moderate compared with that induced by Hck/Nef expression (Fig. 3A). Interestingly, the neuron-specific Src N-Src induced a severe defect, even when expressed alone (Fig. 3A), and was abundantly detected in the Golgi-like perinuclear region (Fig. 3B). Since it is well known that the kinase activity of N-Src is higher than that of c-Src due to the insertion of six amino acids into the SH3 domain (Cartwright et al., 1987), these results further support the idea that the presence of active Src kinases at the Golgi causes the Fms *N*-glycosylation defect.

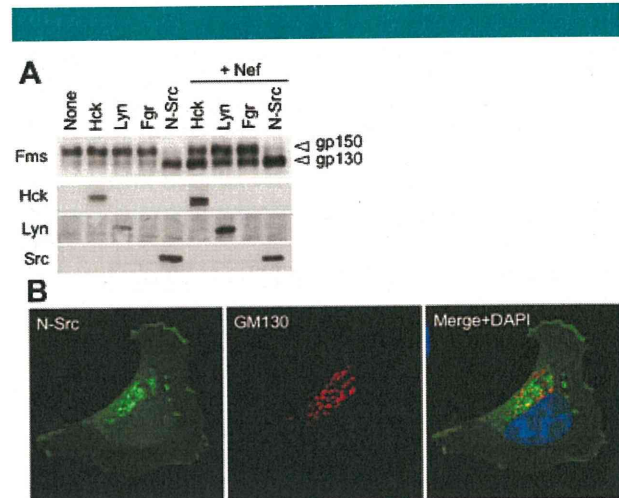
We also tested whether the expression of Golgi-targeting Hck mutants was sufficient to cause the Fms *N*-glycosylation defect. p56Hck-Golgin and GalT-p56Hck (Fig. 4A) were prepared by adding the Golgi-retention sequences of Golgin-84 (Bascom et al., 1999) and  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase (GalT; Yamaguchi and Fukuda, 1995), respectively. Given the orientation of the Golgi-retention sequences used, p56Hck-Golgin and GalT-p56Hck were expected to face the cytoplasm and the lumen of the Golgi, respectively (Fig. 4A). In addition to the active mutants (AxxA), kinase-dead mutants (KE) were prepared as a control (Fig. 4A). The targeting of these mutants to the Golgi was verified by immunofluorescence (Fig. 4B) and subcellular fractionation analyses (Fig. 4C). As shown in Figure 4D, p56Hck-AxxA-Golgin, which was constitutively active and displayed an endogenous Hck-like orientation, induced a significant Fms *N*-glycosylation defect, even in the absence of Nef. All other mutants including GalT-p56Hck-AxxA, which was also active but faced the Golgi lumen, failed to induce the defect (Fig. 4D). We therefore concluded that the constitutive activation of Src kinases at the Golgi causes the *N*-glycosylation protein defect.



**Fig. 2.** Difference in intracellular localization between Nef-activated p56Hck and p59Hck. **A:** 293 cells were transfected with the wild-type p56Hck and Nef plasmids and co-stained with anti-active Hck (Hck<sup>pY411</sup>, green), anti-TGN46 antibodies (red), and DAPI (blue). The cells were also subjected to subcellular fractionation on a sucrose density gradient followed by Western blotting with antibodies against active-Hck and GM130. A total of 13 fractions were collected from the top of the tube. **B:** 293 cells were transfected with the wild-type p59Hck and Nef, and analyzed as shown in (A). In Western blotting analysis of the fractions, anti-LAMP-1 and anti-EEA-1 were also used as antibodies for lysosomes and early endosomes, respectively. Data shown are representative of three independent experiments with similar results. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at <http://wileyonlinelibrary.com/journal/jcp>]

#### Hck activation at the Golgi appears to induce structural changes in the Golgi

We next examined whether the Fms *N*-glycosylation defect caused by Nef/Hck co-expression was associated with structural changes in the Golgi. To this end, we stained co-transfected cells with anti-TGN46 or anti-GM130 antibodies



**Fig. 3.** Effect of the expression of Src kinases on Fms *N*-glycosylation and the intracellular localization of N-Src. **A:** 293 cells were transfected with Fms alone (none) or in combination with Src kinases (Hck, Lyn, Fgr, or N-Src), as indicated, and analyzed by Western blotting with antibodies against Fms, Hck, Lyn, and Src. gp150Fms and gp130Fms are the fully-*N*-glycosylated and hypo-*N*-glycosylated Fms, respectively. **B:** 293 cells transfected with N-Src were co-stained with anti-Src antibody (green), GM130 (red), and DAPI (blue). Data shown are representative of three independent experiments with similar results. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at <http://wileyonlinelibrary.com/journal/jcp>]

and compared their staining patterns between active Hck-positive cells and negative cells. As a result, we found that the active Hck-positive cells frequently showed faint TGN46 staining (Fig. 5A, arrows and arrowheads indicate active Hck-positive and negative cells, respectively). Moreover, the active Hck-positive cells frequently showed an unusual staining pattern for another Golgi protein, GM130; that is, compacted staining (Fig. 5B, arrows and arrowheads indicate active Hck-positive and negative cells, respectively). A high percentage of cells showing the compacted GM130 staining was also observed when they were transfected with p56Hck-AxxA-Golgin (Fig. 5C), the Golgi-targeting constitutive-active Hck mutant (see Fig. 4). The change in the intracellular or intra-Golgi distribution of GM130 was further confirmed by quantitative subcellular fractionation. Most GM130 proteins were recovered from the heavy fractions (9, 10, and 11) of untransfected cells (Fig. 6, none). In contrast, the peak of GM130 shifted to lighter fractions in cells transfected with Nef or Hck alone (p56Hck-WT), which was more obvious in the cells co-transfected with Nef and Hck (p56Hck-WT + Nef) and in the cells transfected with p56Hck-AxxA-Golgin. No such change in the peak was observed for calnexin (an endoplasmic reticulum marker) or desmoglein (a plasma membrane marker) (Fig. 6A). These results suggest that Hck activation at the Golgi induces structural changes in the Golgi.

#### Nef-Hck axis induces the protein *N*-glycosylation defect via the ERK-GRASP65 cascade

As noted above (Figs. 5 and 6), we found a change in the staining pattern of GM130 in active Hck-positive cells. In addition, it has been shown that GM130 binds to and stabilizes a structural Golgi protein, GRASP65 (Barr et al., 1998; Wang et al., 2003). GRASP65 forms oligomers to hold adjacent Golgi cisternae in stacks (Sutterlin et al., 2002; Wang et al., 2003), and the phosphorylation of GRASP65, for example, at serine 277 by the MAP kinase ERK, causes the loss of its oligomerization and