

201124019A

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
(H21-エイズ-若手-020)

HIV-1ゲノム産物の翻訳後修飾とその機能に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 高宗暢暁

平成24(2012)年 3月

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
(H21-エイズ-若手-020)

HIV-1ゲノム産物の翻訳後修飾とその機能に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 高宗 暢 暁

平成24(2012)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

HIV-1ゲノム産物の翻訳後修飾とその機能に関する研究----- 1

高宗 暢暁

II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----13

III. 研究成果の刊行物・別刷-----17

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究事業）

総括研究報告書

HIV-1 ゲノム産物の翻訳後修飾とその機能に関する研究

研究代表者 高宗暢暁 熊本大学生命科学研究部 助教

研究要旨 本研究では、翻訳後修飾という観点で HIV ゲノム産物に着目し、HIV-1 複製に必須となる翻訳後修飾に関わる宿主因子を標的とした、薬剤耐性出現を回避しうる新しい治療戦略を開拓することを目的とする。平成 23 年度においては、主としてアクセサリタンパク質 Nef に関して、以下に記す知見を得た。リン酸化解析を行った結果、Nef はプロテインキナーゼ C (PKC) を介してリン酸化され、JR-CSF 株由来の Nef (Nef_{JRCSF}) では少なくとも 3 カ所、NL4-3 株由来 Nef (Nef_{NL4-3}) では少なくとも 1 カ所のリン酸化サイトの存在が示唆された。これらリン酸化は Nef のミリスチル化依存的であった。質量分析による解析を利用して Nef タンパク質におけるリン酸化部位の探索を行った結果、リン酸化と関連するアミノ酸残基の候補を 2 カ所特定した。この 2 カ所の部位のうち特に HIV 間で保存されている部位についてリン酸化を受けない変異を導入した HIV-1 の複製能を評価した。その結果、野生型 HIV-1 と比較して変異 HIV-1 の感染性の有意な低下が観察された。以上の結果から Nef のリン酸化の抑制は HIV-1 複製制御に繋がると考えられた。

A. 研究目的

抗 HIV 薬に対する薬剤耐性ウイルスの出現は、HIV 感染症治療の長期療養が与える最大の課題の一つであり、この主要な原因は HIV-1 の易変異原性の形質である。薬剤耐性ウイルス出現を出来るだけ回避しうる新しい作用機序に基づく HIV-1 制御法開発は急務である。本研究では、翻訳後修飾という観点で HIV ゲノム産物に着目し、HIV-1 複製に必須の翻訳後修飾に関わる宿主因子を標的とした、薬剤耐性出現を回避しうる新しい治療戦略を開拓することを目的とする。

本年度では主に HIV-1 ゲノム産物の中のアクセサリタンパク質 Nef のリン酸化に着目した翻訳後修飾解析に関して、翻訳後修飾とその HIV 複製への関与の観点から各種検討を行った。

B. 研究方法

本研究の対象とする HIV-1 遺伝子として、ウイルス複製に必須の遺伝子や病原性と密接に関連する *gag* 及び *nef* 遺伝子産物に重点を置いた。また複製に重要な翻訳後修飾である Gag 及び Nef の N-ミリス

チル化を担う宿主因子 N-ミリスチルトランスフェラーゼ (NMT) に着目した。研究方法の概要は以下の通りである。主として HIV-1_{NL4-3} 株のウイルスゲノムを用いたが、研究の展開上、適宜、HIV-1_{NL4-3} 株以外の HIV-1 株や近縁のレンチウイルスも利用する。

ウイルス性タンパク質の翻訳後修飾の解析方法の主な流れとして、HIV 研究で一般的に用いられるヒト胚腎由来細胞 HEK293 細胞等に発現ベクターを導入し HIV-1 ウイルスタンパク質安定高発現細胞株を樹立し、本細胞からウイルス性タンパク質を分離して翻訳後修飾解析等を行う。また HIV-1 持続産生細胞から産生される感染性 HIV-1 を回収してウイルス性タンパク質の翻訳後修飾解析等を行う。

同定した翻訳後修飾の HIV-1 複製における意義を明らかにするために、翻訳後修飾部位に各種変異を導入した HIV-1_{NL4-3} 発現ベクターを構築し、野生株と変異株間の表現系の比較を行う。表現系の内容としては、第一にウイルス複製能力の差異を解析する。次に注目するウイルス遺伝子産物の各種機能・注目する特徴の評価を適宜おこなう。各種翻訳後修飾に

関わる宿主性酵素の同定を siRNA、阻害剤、ドミナントネガティブ変異体等を利用し行う。

(倫理面への配慮)

本研究で行った実験については、倫理面への配慮を必要としないものであった。

C. 研究結果

Nef は HIV-1 アクセサリータンパク質のひとつであり、HIV-1 の病原性因子の一つとして知られている。Nef 欠損ウイルスは低病原性であることやウイルス複製能力が野生型と比較して低いことが明らかになっており、Nef の機能阻害はそのウイルス病原性低下を来すことが予想され、HIV/AIDS 制御につながると考えられる。

本研究では、タンパク質の機能調節に関わる普遍的な翻訳後修飾であるリン酸化に着目し、Nef のリン酸化の解析を行った。T 細胞が活性化する際に protein kinase C (PKC) が活性化することから、構築した JR-CSF 株由来 Nef (Nef_{JR-CSF}) 安定高発現 HEK293 細胞を PKC 活性化剤であるホルボールエステル (PMA) で処理した。細胞より得たタンパク質可溶化サンプルを 2 次元電気泳動に供し、ウェスタンブロット法にて Nef を検出した (Fig. 1)。

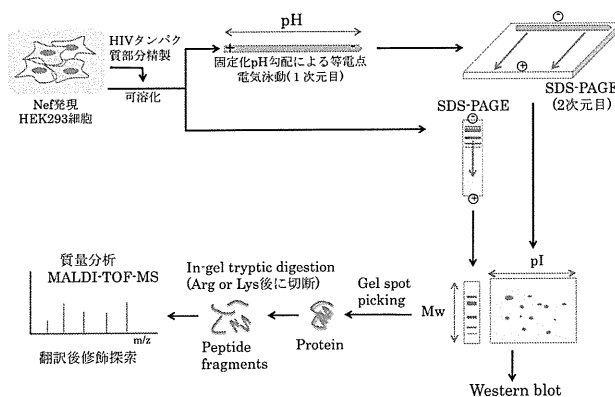


Fig. 1. Nef の翻訳後修飾解析方法の流れ

その結果、PMA 未処理のコントロールにおいて等電点 (pI)6.0 及び 5.9 の 2 つのスポットとして

Nef_{JR-CSF} が検出された (Fig. 2 左上段)。PMA 処理により Nef_{JR-CSF} は、pI6.0 及び pI5.9 に加え新たに pI5.8 及び pI 5.7 の 2 つのスポットが新たに出現し、あわせ 4 つの主要なスポットで検出された (Fig. 2 左中斷)。これらスポットは PMA 未処理時に観察された等電点の Nef_{JR-CSF} 由来スポットに加え更に酸性側に位置するスポットとして検出された。この複数の等電点で存在する Nef_{JR-CSF} をフォスファターゼによる脱リン酸化処理すると、おもに最も塩基性側の 1 つのスポットに収れんした (Fig. 2 左下段)。以上の結果から Nef_{JR-CSF} は、少なくとも 3 カ所のリン酸化サイトを有していることが示唆された。

次に、NL4-3 株由来 Nef (Nef_{NL4-3}) についても同様の検討を行った。Nef_{NL4-3} を一過性に発現させた HEK293 細胞を用いた。その結果、コントロールをみるとサイズの異なる 2 つのスポットが観察されたが、サイズから高分子側のスポット (pI 6.1) が全長の Nef であると判断された (Fig. 3 左上段)。PMA 処理により等電点の異なる 2 つの主要な Nef_{NL4-3} 由来スポット (pI6.1 および pI6.0) が観察され (Fig. 3 左中斷)、さらにフォスファターゼによる脱リン酸化処理により塩基性側の 1 つのスポット (pI6.1) に収れんした (Fig. 3 左下段)。以上の結果から、Nef_{NL4-3} は PKC によってリン酸化されるサイトが少なくとも 1 カ所存在することが示唆された。

Nef はアミノ末端が N-ミリストイル化され、この翻訳後修飾は Nef のもつ全ての機能に必須であることが知られている。ここで N-ミリストイル化を受けない Nef_{JR-CSF} 変異体 (Nef_{JR-CSF}G2A 変異体) および Nef_{NL4-3} 変異体 (Nef_{NL4-3}G2A 変異体) のリン酸化の解析を行った。Nef_{JR-CSF}G2A 変異体の解析は、Nef_{JR-CSF}G2A 安定高発現 HEK293 細胞を、Nef_{NL4-3}G2A 変異体の解析は、Nef_{NL4-3}G2A 一過性発現 HEK293 細胞を用いた。その結果、

Nef_{JR-CSF}G2A 変異体および Nef_{NL4-3}G2A 変異体は、PMA 刺激の有無にかかわらず最も塩基性側の 1 つのスポット (pI 6.0 および pI 6.1) として検出された (Fig. 2 右および Fig. 3 右)。以上の結果から、Nef_{JR-CSF} 及び Nef_{NL4-3} の PKC によるリン酸化は、Nef の N-ミリスチル化依存的であることが示された。

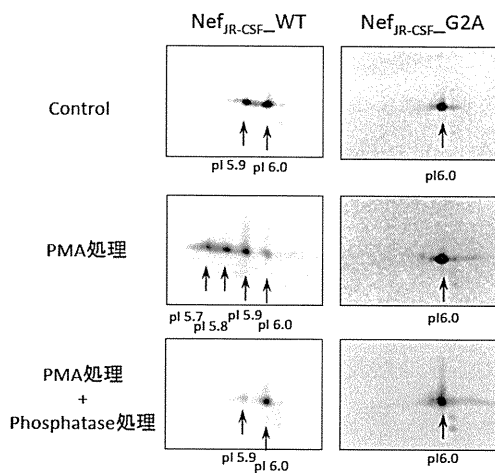


Fig. 2. 2D-PAGE後ウエスタンブロットによるNef_{JR-CSF}の検出

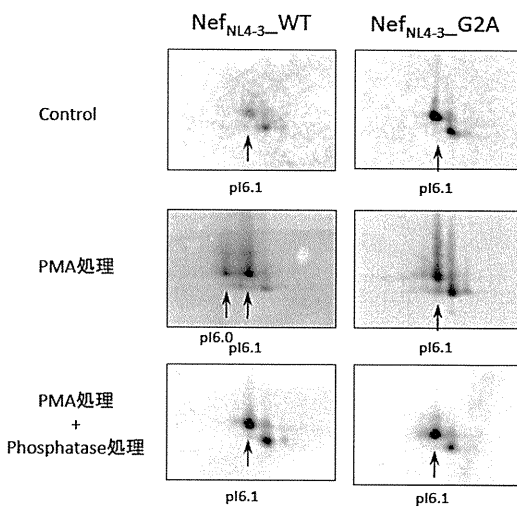


Fig.3. 2D-PAGE後ウエスタンブロットによるNef_{NL4-3}の検出

次に、質量分析法を利用し Nef のリン酸化サイトの同定を試みた。野生型 Nef_{JR-CSF}、PMA 処理細胞由来の野生型 Nef_{JR-CSF}、及び Nef_{JR-CSF}G2A 変異体を免疫沈降により回収し、SDS-PAGE 後、Nef タンパク質を含むゲルの領域を切り出した。そしてトリ

プシンによる限定分解を in-gel digestion 法で行い得られた消化産物であるペプチドフラグメントを質量分析に供しサンプル間で比較検討した (Fig. 4)。質量分析装置はマトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOF MS) を用いた。その結果、PMA 処理細胞由来の野生型 Nef_{JR-CSF} において特異的に消失するピークが観察された (Fig. 5)。このピークが帰属する Nef_{JR-CSF} 由来のペプチドフラグメント (A ペプチド) は PMA 依存的に翻訳後修飾されることが予想され、リン酸化部位を含む可能性が考えられた。

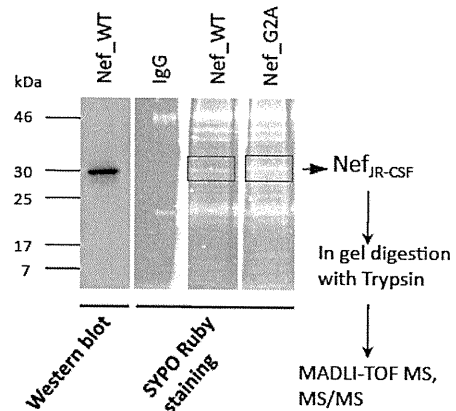


Fig.4. Nefタンパク質のMS解析の流れ

また、PMA 未処理および処理細胞由来の野生型 Nef_{JR-CSF} において検出されないが、Nef_{JR-CSF}G2A 変異体において検出されるピークが観察された (Fig. 6)。このピークが帰属する Nef_{JR-CSF} 由来のペプチドフラグメント (B ペプチド) は野生型 Nef_{JR-CSF} 依存的に翻訳後修飾されることが予想され、リン酸化部位を含む可能性が考えられた。以上 2 つの A ペプチドおよび B ペプチドのアミノ酸配列に PKC によってリン酸化されるセリン残基およびスレオニン残基が存在するかどうか確認したところ、A ペプチドにはセリン残基及びスレオニン残基が、B ペプチドにはセリン残基が存在した。

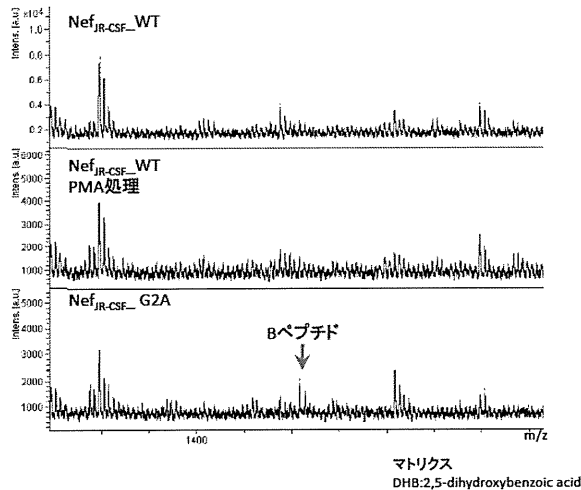


Fig. 6 Nef_{JR-CSF}のトリプシン消化産物のMALDI-TOF MSによる検出2

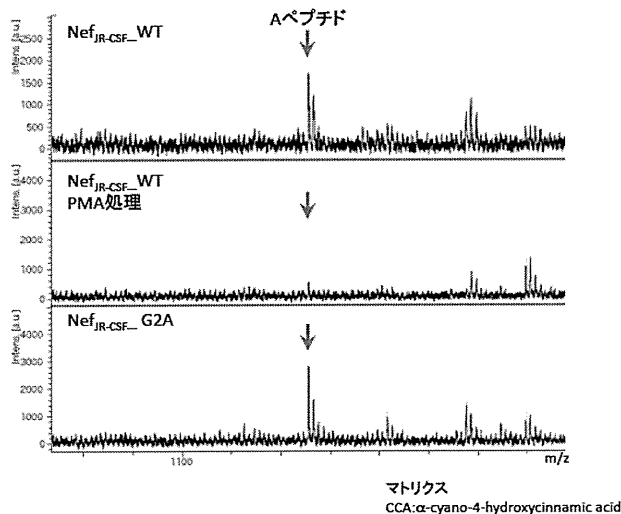


Fig. 5 Nef_{JR-CSF}のトリプシン消化産物のMALDI-TOF MSによる検出1

次に、Nef_{JR-CSF} 中の A ペプチド及び B ペプチドに含まれるセリンおよびスレオニン残基が、PMA 依存的なリン酸化と関連するかどうかを検討した。A ペプチド内のセリンまたはスレオニン残基をアラニン残基に変異した Nef_{JR-CSF} を、それぞれ Nef_{JR-CSF} mutant A1 および Nef_{JR-CSF} mutant A2 とし、また B ペプチド内のセリン残基をアラニン残基に変異した Nef_{JR-CSF} を Nef_{JR-CSF} mutant B とし、これら発現プラスミドを作製した。また、Nef_{JR-CSF} の配列中の任意のスレオニン残基をアラニンへ置換した Nef_{JR-CSF} mutant C 発現プラスミドを作製した。こ

れらに加えさらに、Nef のリン酸化サイトとして過去に報告があるセリン6またはセリン9のアラニン変異体である Nef_{JR-CSF} S6A 変異体と Nef_{JR-CSF} S9A 変異体の発現プラスミドを作製した。Nef_{JR-CSF} の野生型と G2A 変異型に加え、上記の各種変異体間 (Table I) の PMA 処理によるリン酸化レベルの相違を、先述した 2 次元電気泳動法とウェスタンブロット法により調べた。本解析には各種 Nef_{JR-CSF} の一過性発現 HEK293 細胞を用いた。PMA 未処理細胞由来野生型 Nef_{JR-CSF} は、主として等電点(pI)6.0 の 1 つのスポットとして検出され、PMA 処理により pI6.0 のスポットに加え、pI5.9 のスポットが検出された (Fig. 7A 左)。PMA 処理による pI5.9 のスポットの存在比の増加に着目して、各種 Nef 間の PMA 処理によるリン酸化レベルを比較することにした。Nef_{JR-CSF} G2A 変異体においては、先の実験結果 (Fig.2) と一致して、PMA 未処理および PMA 処理の両条件で主として pI6.0 の 1 つのスポットとして観察され、PMA 処理による pI5.9 のスポットの存在比の変化は観察されず著しく低レベルのままであった (Fig.7A 右)。Nef_{JR-CSF} S6A 変異体と Nef_{JR-CSF} S9A 変異体を検討した結果、野生型 Nef_{JR-CSF} と同様に、PMA 処理により pI5.9 のスポットの存在比が増加した。Nef_{JR-CSF} mutant A1 および Nef_{JR-CSF} mutant A2 を検討した結果、Nef_{JR-CSF} mutant A1 においては、PMA 処理による pI5.9 のスポットの存在比の増加がほとんど観察されず、Nef_{JR-CSF} G2A 変異体の結果と類似した。一方、Nef_{JR-CSF} mutant A2 においては、PMA 処理による pI5.9 のスポットの存在比の増加が観察され、野生型 Nef_{JR-CSF} の結果と類似した。Nef_{JR-CSF} mutant B について検討した結果、PMA 処理による pI5.9 のスポットの存在比の増加がほとんど観察されず、Nef_{JR-CSF} G2A 変異体の結果と類似した。最後に、Nef_{JR-CSF} mutant C について検討

した結果、PMA 処理による pI5.9 のスポットの存在比の増加が観察され、野生型 Nef_{JR-CSF} の結果と類似した。Fig. 8 で、pI5.9 のスポットの PMA 未処理および処理条件による変化を pI6.0 のスポットの割合で示した。以上の結果をまとめると、Nef_{JR-CSF} 中の A ペプチド配列内のセリン残基 (A1 サイト) と B ペプチド配列内のセリン残基 (B サイト) が、PMA 依存的なリン酸化と関連するアミノ酸残基であることが示唆された。

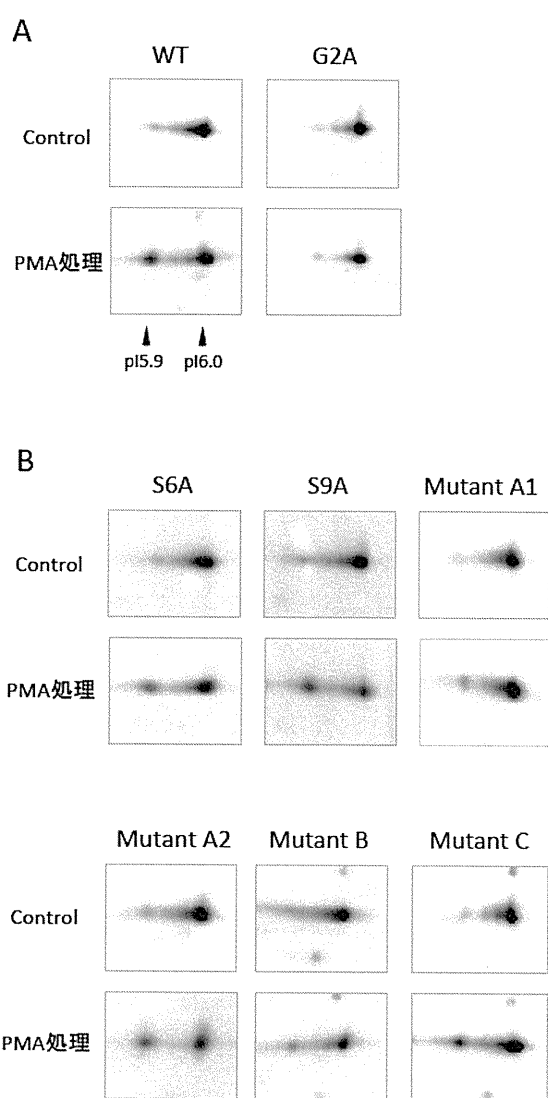


Fig. 7 Nef_{JR-CSF} の各種変異体間の PMA 処理による等電点の変化の比較

Nef_{JR-CSF} の A1 サイトと B サイトのセリン残基が PMA 依存的なリン酸化と関連することが示唆され

た。これらセリン残基が Nef において保存されているかどうかを HIV database を利用して調べた。その結果 (Fig. 9)、A1 サイトは主にプロリン残基であった。一方 B サイトはセリン残基が高度に保存されていた。このことから、B サイトのセリン残基は Nef における PMA 依存的なリン酸化、あるいは PKC によるリン酸化と関連するアミノ酸残基であると考えられた。

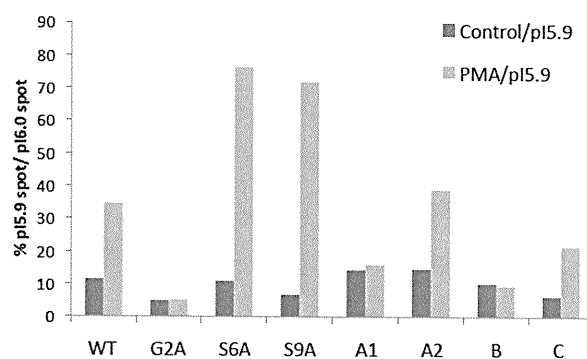


Fig. 8 PMA 未処理および処理条件における pI5.9 スポットの存在比の比較

このリン酸化と関連する B サイトのセリン残基の Nef の機能における重要性を検討するために、Nef による HIV 複製増強作用における B サイトのセリン残基の重要性を検討した。HIV-1_{JR-CSF} 株のゲノム内の Nef コード領域内の B サイトのセリン残基をアラニンに置換した変異を有する HIV-1_{JR-CSF} (HIV-1_{JR-CSF}_NefB) を作製し、この変異ウイルスと野生型 HIV-1_{JR-CSF} 及び Nef 欠損変異を有する HIV-1_{JR-CSF} (HIV-1_{JR-CSF}_ΔNef) 間におけるウイルス複製能力を比較検討した。それぞれのウイルスを産生するプラスミドを HEK293 細胞に導入し、産生されるウイルス量を、培養上清中の p24 抗原量を定量することで比較した (Fig. 10 A)。その結果、野生型 HIV-1_{JR-CSF} と比較して HIV-1_{JR-CSF}_ΔNef の産生レベルは有意な差は観察されなかったが、低い傾向が観察された。HIV-1_{JR-CSF}_NefB の産生レベルは

HIV-1_{JR-CSF_ΔNef} と同様に野生型と有意な差は観察されなかったが、低い傾向が観察された。このとき、産生されたウイルスの感染性を評価した。感染性は HIV-1 感染のインジケータ細胞である Tzmb1 細胞への感染で評価した。Tzmb1 細胞は HIV-1 感染により HIV-1 の転写因子である Tat 依存的にルシフェラーゼを発現する細胞であり、ルシフェラーゼ活性を測定することで感染レベルを評価できる(Fig. 10 B)。その結果、HIV-1_{JR-CSF_NefB} の感染性は野生型 HIV-1_{JR-CSF} より有意に低レベルであった。HIV-1_{JR-CSF_ΔNef} は野生型 HIV-1_{JR-CSF} と比較して感染性に有意差は認められなかったが、低い傾向は観察された。以上の結果から、HIV-1_{JR-CSF} における Nef の B サイトセリン残基の Nef によるウイルス複製増強作用（特に感染性増強作用）における重要性が示唆された。

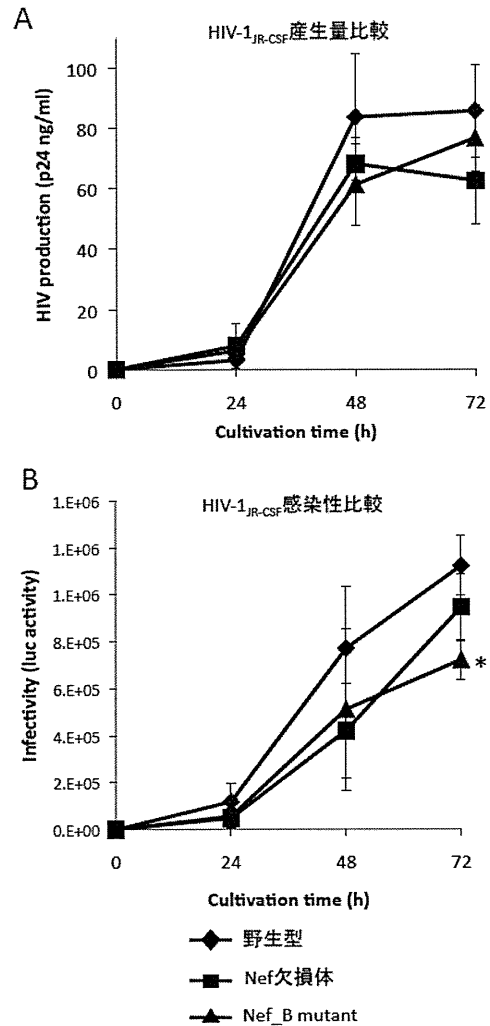


Fig. 10 HIV-1_{JR-CSF} 野生型と変異体間の複製能力の比較

	主にPro保存 A1 site ↓	高度にSer保存 B site ↓
CONSENSUS_A	P	S
CONSENSUS_A1	P	S
CONSENSUS_A2	P	S
CONSENSUS_B	P	S
CONSENSUS_02_AG	P	S
CONSENSUS_C	P	S
CONSENSUS_D	P	S
CONSENSUS_F1	P	S
CONSENSUS_F2	P	S
CONSENSUS_G	P	S
CONSENSUS_H	P	S
CONSENSUS_01_AE	P	S
CONSENSUS_03_AB	P	S
CONSENSUS_04_CPX	P	S
CONSENSUS_06_CPX	P	S
CONSENSUS_08_BC	P	S
CONSENSUS_10_CD	P	S
CONSENSUS_11_CPX	P	S
CONSENSUS_12_BF	P	S
CONSENSUS_14_BG	P	S

HIV databasesより

Fig. 9 PMA依存的なリン酸化と関連するアミノ酸残基の遺伝的多様性について

D. 考察

Nef は PMA 処理依存的にその等電点が酸性側へシフトスポット間はおおよそ pI 0.1 であった (Fig 2 及び 3)。リン酸化によってタンパク質の等電点は理論的におおよそ pI 0.1 減少 (酸性側へシフト) する。また PMA 処理で酸性側へ等電点がシフトした Nef は、フォスファターゼ処理によって最も塩基性側のスポットに収れんした (Fig 2 及び 3)。以上の結果より、PMA によって活性化されたプロテインキナーゼ C (PKC) によって Nef がリン酸化されたと考えられた。PMA 処理で Nef_{JR-CSF} では 4 つのスポットが観察され、Nef_{NL4-3} では 2 つのスポットが観察されたことから、それぞれ少なくとも 3 カ所および 1 カ

所の PKC によるリン酸化サイトが存在すると考えられる。このことから、HIV 株によって Nef のリン酸化サイト数が異なっていることが示唆された。Nef_{JR-CSF} では安定高発現細胞において PMA 処理で 4 つのスポットが明瞭に観察されたが (Fig. 2)、一方、Nef_{JR-CSF} を一過性に発現させた場合、PMA 処理で比較的薄い 3 つのスポットが観察された (Fig. 7)。これは一過性発現の場合、相対的に低発現であったことが、スポット数が異なって検出された原因であると考えられた。

PMA 処理に伴うリン酸化による等電点のシフトが、ミリストイル化を受けない Nef 変異体では観察されなかったことから、PKC による Nef のリン酸化が、Nef のミリストイル化依存的であることが示された (Fig. 2 及び 3)。ミリストイル化は Nef を膜局在化させる働きがある。このことから、Nef の膜局在が PKC によるリン酸化に必須であると考えられる。また Nef のミリストイル化は、Nef の全ての機能発現に必須の修飾であることが知られている。このことから、Nef の機能発現にリン酸化が関与する可能性が考えられた。

Nef_{JR-CSF} のトリプシン消化産物を質量分析し、リン酸化ペプチド断片の検出を試みたが、これまでの実験では検出することができなかった。しかしながら、PMA 処理依存的に消失したピークや NefG2A 変異体のみで検出されるピークが存在したことから (Fig. 5 及び 6)、リン酸化部位の推定ができた。今後、消化酵素を変更したり、リン酸化ペプチドを積極的に濃縮したりすることで、質量分析によるペプチド断片の検出を可能にすることで直接的なリン酸化部位の同定を行う必要があると考えられる。

Nef のセリン 6 は PKC によってリン酸化を受けることが過去に報告されていたことから、Nef_{JR-CSF} S6A 変異体において PMA 処理による pI5.9 のスポ

ットの増加率が野生型より低下することが予想されたが、本実験においては野生型と同様かそれ以上の pI5.9 スポットのアバンダンスの増加が観察された。この原因は不明であるが、用いた細胞種の違いなど実験条件の違いが原因となったと考えられた。また Nef のセリン 9 は PKA によってリン酸化を受けることが過去に報告されている。従って、セリン 9 は PKA によってはリン酸化を受けるが、PKC によってはリン酸化を受けないことが考えられる。

Nef リン酸化と関連するアミノ酸残基として同定した B サイトのセリンをアラニン置換した HIV-1_{JR-CSF}Nef B 変異体の複製能力を検討したところ、ウイルス産生能力で野生型より低い傾向が、感染性で野生型よりも有意に低い結果が得られた。このことから、リン酸化と関連する B サイトは Nef の機能発現に重要なアミノ酸残基であることが示唆された。今回、Nef 欠損 HIV-1_{JR-CSF} において、ウイルス産生能力および感染性で野生型と比較して低い傾向は認められたものの有意に低い結果が観察されなかった。このことから HIV-1_{JR-CSF} を用いた系における Nef のウイルス複製増強作用の寄与率が低いことが考えられた。今後、より明確に Nef の機能が評価できる系でリン酸化と関わる B サイトの意義について検討する必要がある。Nef はウイルス複製増強作用だけでなく、CD4 や MHC class I のダウンレギュレーションなどマルチな機能を有することから、これら機能におけるリン酸化と関わる B サイトの重要性を検討する必要がある。

E. 結論

Nef において、これまでに知られていなかった新規の N-ミリストイル化依存的な PKC によるリン酸化サイトが存在することが示唆された。このリン酸化サイトは Nef_{JR-CSF} では少なくとも 3 カ所、Nef_{NL4-3} では

少なくとも1カ所存在することが示された。またこのリン酸化に関して、ウイルス株によってリン酸化サイトの数が異なってくることを示唆された。本研究で Nef_{JR-CSF} において PKC 依存的なリン酸化部位もしくはリン酸化と密接に関連すると考えられるアミノ酸残基を2カ所明らかにした。これら2カ所の部位について、特にウイルス株間で高度に保存されているセリン残基をアラニンに置換した変異を有するウイルス (HIV-1_{JR-CSF}) は、野生型と比較して感染性が有意に低い結果となった。このことから、この Nef のリン酸化が Nef によるウイルス複製増強作用の機能に重要になってくると考えられた。

F. 健康危惧情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takamune N, Irisaka Y, Yamamoto M, Harada K, Shoji S, and Misumi S. Induction of extremely low protein expression level by fusion of C-terminal region of Nef. *Biotechnol. Appl. Biochem* in press
- 2) Takamune N, Kuroe T, Tanada N, Shoji S, and Misumi S. Suppression of human immunodeficiency virus type-1 production by coexpression of catalytic-region-deleted N-myristoyltransferase mutants. *Biol. Pharm. Bull*, 33: 2018-2023, 2010.
- 3) Misumi S, Inoue M, Dochi T, Kishimoto N, Hasegawa N, Takamune N, Shoji S. Uncoating of human immunodeficiency virus type 1 requires prolyl isomerase PIN1. *J Biol Chem*. 285: 25185-25195, 2010.
- 4) Anraku K, Fukuda R, Takamune N, Misumi S, Okamoto Y, Otsuka M, Fujita M. Highly sensitive analysis of the interaction between HIV-1 Gag and phosphoinositide

derivatives based on surface plasmon resonance. *Biochemistry* 49: 5109-5115, 2010.

- 5) Endo M, Gejima S, Endo A, Takamune N, Shoji S, and Misumi S. Treatment of breast cancer cells with proteasome inhibitor lactacystin increases the level of sensitivity to cell death induced by Human immunodeficiency virus type 1, *Biol. Pharm. Bull*, 33:1903-1906, 2010.

2. 学会発表

- 1) 高宗暢暁、原田圭輔、山本充奈美、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV-1 Nef の低発現性の特徴とその機能との関連、平成 23 年度日本生化学会九州支部例会、2011、福岡
- 2) 三隅将吾、井上睦美、堂地起生、岸本直樹、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、HIV-1 脱殻プロセスに関する研究、平成 23 年度日本生化学会九州支部例会、2011、福岡
- 3) 高宗暢暁、黒江徹也、棚田訓彰、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、N-myristoyltransferase 触媒領域欠損変異体による HIV 産生の抑制、第 84 回日本生化学会大会、2011、京都
- 4) 三隅将吾、井上睦美、堂地起生、岸本直樹、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、宿主因子による HIV-1 脱殻過程の制御、第 84 回日本生化学会大会、2011、京都
- 5) 岸本直樹、鬼塚彩乃、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV 粒子プロテオーム解析に基づいた感染初期過程を制御する宿主因子の探索と Integrase の翻訳後修飾、第 25 回日本エイズ学会学術集会、2011、東京
- 6) 堂地起生、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV キャプシドの Ser16 リン酸化によ

る脱殻制御機構に関する解析、第25回日本エイズ学会学術集会、2011、東京

- 7) 原田圭輔、高宗暢暁、山本充奈美、入坂由香梨、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV-1 及び SIV Nef の発現量がウイルス感染性増強作用に与える影響、原田圭輔、高宗暢暁、山本充奈美、入坂由香梨、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、2011、第25回日本エイズ学会学術集会、2011、東京
- 8) 山本充奈美、原田圭輔、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV-1 アクセサリータンパク質 Nef の発現特性、平成23年度日本薬学会九州支部大会、2011、福岡
- 9) 八城勢造、三隅将吾、高橋義博、大坪靖治、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三、HIV 感染抵抗者から学ぶ HIV ワクチン創製、平成23年度日本薬学会九州支部大会、2011、福岡
- 10) 堂地尅生、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV 脱殻制御機構に関する解析、平成23年度日本薬学会九州支部大会、2011、福岡
- 11) 岸本直樹、鬼塚彩乃、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV 粒子プロテオーム解析に基づいた感染初期過程を制御する因子の探索、平成23年度日本薬学会九州支部大会、2011、福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 高宗暢暁、三隅将吾、入坂由香梨；「タンパク質低発現化ペプチドをコードする遺伝子およびその使用方法」；出願人：国立大学法人 熊本大学；特願2009-239220；平成21年10月16日出願、平成22年10月15日優先権主張出願。

II. 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

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
Takamune N, Irisaka Y, Yamamoto M, Harada K, Shoji S, and Misumi S.	Takamune N, Irisaka Y, Yamamoto M, Harada K, Shoji S, and Misumi S. Induction of extremely low protein expression level by fusion of C-terminal region of Nef	<i>Biotechnol. Appl. Biochem</i>	in press	in press	2012

III. 研究成果の刊行物・別刷

Title

Induction of extremely low protein expression level by fusion of C-terminal region of Nef

Authors

Nobutoki Takamune^{*1}, Yukari Irisaka^{*}, Minami Yamamoto^{*}, Keisuke Harada^{*}, Shozo Shoji^{*†}, and Shogo Misumi^{*}

Affiliations

^{*}Department of Pharmaceutical Biochemistry, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-Honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan.

[†]Kumamoto Health Science University, Kumamoto, 325 Izumimachi, Kumamoto 861-5598, Japan.

Running title

Induction of extremely low protein expression level

Address correspondence to: Nobutoki Takamune, PhD, 5-1 Oe-Honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan.

Phone: +81-96-371-4367

Fax: +81-96-362-7800

E-mail: tkmnbt@kumamoto-u.ac.jp

Synopsis

Nef is one of the accessory proteins of human immunodeficiency viruses. Here, we noted that the relative expression level of Nef_{NL4-3} is much lower than that of Nef_{JR-CSF} in HEK293 cells. By evaluating the expression level using a Nef mutant, it was indicated that amino acids 129-206 of Nef_{NL4-3}, i.e., the C-terminal region named NLAA129-206, could contain the region responsible for the induction of the low protein expression level. Additionally, the expression levels of the enhanced green fluorescent protein (EGFP) and *Renilla* luciferase (Rluc) became extremely low with the fusion of NLAA129-206. Interestingly, the NLAA129-206-corresponding sequences of other Nef variants with relatively high expression levels also induced the extremely low protein expression level by fusion. These results suggest that the C-terminal region of Nef can generally induce an extremely low protein expression level. Here, we propose that the C-terminal region of Nef could become an excellent tool for the induction of an extremely low expression level of arbitrary proteins by attachment as fusion proteins.

Footnotes

Key words: enhanced green fluorescent protein (EGFP), human immunodeficiency virus (HIV), Nef, protein degradation sequence, *Renilla* luciferase (Rluc).

Abbreviations used: HIV, human immunodeficiency virus; SIV, simian immunodeficiency virus; HEK293, human embryonic kidney 293; EGFP, enhanced green fluorescent protein; Rluc, *Renilla* luciferase; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; UPS, ubiquitin proteasome system

[†]To whom correspondence should be address (email: tkmnbt@kumamoto-u.ac.jp)

Introduction

Nef, a 27-35-kDa protein, is one of the accessory proteins of human and simian immunodeficiency viruses (HIV and SIV, respectively) that enhance viral replication and is associated with the pathogenicity of these viruses. It has many functional motifs for contact to host proteins [1], by which it can serve as a molecular adaptor and exert multiple functions like CD4 downregulation and MHC class I downregulation [2]. Moreover, Nef can enhance viral infectivity, although the mechanism underlying such enhancement remains unclear [3]. *N*-myristoylation occurs at the *N*-terminus of Nef [4], and the posttranslational modification is essential for multiple functions [2].

Genetic diversity is one of the major characteristics of HIV and SIV [5]. We can find highly frequent mutations of amino acid substitution, insertion, and deletion among viral strains in the Los Alamos HIV database (<http://hiv-web.lanl.gov>). Such a genetic diversity can generate many viral phenotypes, resulting in, for example, CCR5 or CXCR4 usage [6], escape from the immune attack of the host [7], and the emergence of drug-resistant viruses [7].

The abundance of each protein is closely associated with the efficacy of its function, because protein activity is basically exerted in a dose-dependent manner. Protein expression level depends not only on mRNA level but also on translation rate and degradation rate [8, 9]. Protein degradation comprises two major systems: ubiquitin-mediated proteolysis and lysosomal degradation [10].

Some degradation signals conferring instability on proteins have been found, which include N-degrons [11], a murine ornithine decarboxylase (MODC) PEST region [12], and CL peptides [13]. These signals induce a rapid protein degradation mediated by a proteasome, in which the N-degron and CL peptides

require ubiquitination prior to degradation, while the PEST sequence is independent of ubiquitination [14]. The PEST sequence and CL peptides could convert stable proteins into unstable proteins by attachment as fusion proteins [13, 15, 16], of which the apparent expression levels could be much lower than those of the original proteins [15-17]. The feature of the instability induction of the PEST sequence and CL peptides has been applied to the development of a highly responsive reporter system [18-20] and to the improvement of the recombinant protein productivity of CHO cells [21]. In addition to protein degradation signals, mRNA-destabilizing elements [22-24] are utilized for such a system [18].

Here, we clarified that the C-terminal region (amino acids 129-206) of Nef_{NL4-3} with an extremely low expression level is necessary and sufficient for the induction of the low expression level of reporter proteins by attachment as fusion proteins. Additionally, it was indicated that the C-terminal regions of not only Nef_{NL4-3} but also other Nef variants, which even show relatively higher expression levels, have an ability to induce low protein expression levels by attachment. The mechanism of this induction has not been fully resolved yet. We propose that the C-terminal region of Nef is applicable to the development of a highly responsive reporter system and to the improvement of recombinant protein productivity.

Materials and Methods

Nef expression vectors

DNAs coding Nef proteins were amplified by PCR using the corresponding proviral DNA template and subcloned into pcDNATM3.1D/V5-His TOPO according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA).

DNA coding Nef_{JR-CSF}-V5 or Nef_{NL4-3}-V5 was amplified by PCR using pcDNA3.1/Nef_{JR-CSF}-V5 and pcDNA3.1/Nef_{NL4-3}-V5, respectively, and subcloned into the pcDNA4/HisMax vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) without polyhistidine and the XpressTM epitope-coding region. The expression vector for the Nef chimera was generated by standard overlapping PCR techniques [25].

The expression vector for each Nef Gly 2-to-Ala 2 (G2A) mutant was constructed by site-directed mutagenesis, as previously described [26].

Expression vectors of enhanced green fluorescent protein (EGFP) or *Renilla* luciferase (Rluc) fusion protein

Each expression vector for EGFP appended with each amino acid sequence to the N-terminal end was constructed using pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA), in which a triple repeat of the linker Gly-Gly-Gly-Gly-Ser [(GGGGS)₃] [27] and Xpress-epitope-tag-coding DNAs were respectively inserted at the *Sall*-*Apa*I and *Hind*III-*Pst*I sites. Each expression vector for Rluc was constructed by replacing the EGFP-coding DNA with the Rluc-coding DNA of the multiple cloning site (MCS) of each EGFP expression vector. Each expression vector for EGFP appended with each amino acid sequence to the C-terminal end was constructed using a pcDNA4/HisMax vector, in which EGFP, the (GGGGS)₃ linker, and DNAs coding each amino acid sequence were respectively inserted in the *Kpn*I-*Bam*HI, *Bam*HI-*Eco*RI, and *Eco*RI-*Pst*I sites of the MCS of the vector.

Cell culture and transfection

Human embryonic kidney 293 (HEK293) cells were cultured and transfected using Lipofectamine LTX reagent, as previously described [26].

HEK293/CD4/Nef_{JR-CSF}, HEK293/CD4/Nef_{NL4-3}, HEK293/CD4/Nef_{JR-CSF} G2A, and HEK293/CD4/Nef_{NL4-3} G2A cells

HEK293/CD4 cells were transfected with the pcDNA4/HisMax vector for Nef_{JR-CSF}, Nef_{NL4-3}, Nef_{JR-CSF} G2A, and Nef_{NL4-3} G2A. 2 days after transfection, stable clones were selected in the presence of 500 µg/ml zeocin in the conditioned medium. Each clonal HEK293/CD4/Nef cell line was obtained by the limiting-dilution method.

Immunostaining analysis

The cells were rinsed and fixed with 1% fresh paraformaldehyde in PBS(-). After permeabilization with methanol, Nef was visualized using an anti-V5 antibody, followed by an anti-mouse-FITC secondary antibody. The nucleus was stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). The cells were observed using a Biozero digital microscope (Keyence, Osaka, Japan).

Cell lysis and western blot analysis

The cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, protease inhibitors [1 mM 4-aminidophenylmethanesulfonyl fluoride hydrochloride (APMSF), 50 µg/ml aprotinin, 50 µg/ml leupeptin, 50 µg/ml pepstatin A, 50 µg/ml antipain]) and subjected to 5-20% polyacrylamide gradient sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Then, separated proteins on the gel were transferred to the polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. The membranes blocked by 5% skim-milk were incubated with an anti-V5 antibody or anti-Xpress antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA) diluted 1:5000 in immunoenhancer reagent A (Wako, Osaka, Japan) for 4 h, and then with peroxidase (POD) conjugated anti-mouse IgG in immunoenhancer reagent B (Wako, Osaka, Japan) for 1

h. Then, the specific signals were observed using chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific inc., Waltham, MA) and LAS4000 (GE Healthcare, Buckingham, England), as previously described [28]. The intensities of the bands were quantified with Fujifilm Image Gauge Software.

Rluc assay

HEK293 cells were transiently transfected with each Rluc-fusion-protein expression vector and cultured for 48 h. The harvested cells (1×10^5 cells) were lysed with the cell culture lysis reagent (Promega, Madison, WI). To measure Rluc activity, each lysate was transferred to a 96-well white microplate and coelenterazine h [29] was added at a final concentration of 5 μ M. Then, luminescence was measured simultaneously using a Wallac ARVOTM SX 1420 luminometer (Perkin-Elmer, Waltman, MA).

Flow cytometry

HEK293/CD4/Nef_{JR-CSF}, HEK293/CD4/Nef_{NL4-3}, HEK293/CD4/Nef_{JR-CSF} G2A, and HEK293/CD4/Nef_{NL4-3} G2A cells were washed with PBS and then suspended in a cold washing buffer (PBS containing 2% FCS and 0.02% NaN₃) containing a phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD4 antibody. After 30 min of incubation at 4°C, the cells were washed three times and then analyzed using an EPICS XL flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA).

Quantification of mRNA levels by RT-qPCR analysis

HEK293 cells were transfected with the Nef_{NL4-3}, Nef_{JR-CSF}, AA129-206-EGFP, CP-EGFP, or EGFP expression plasmid. Total RNA was extracted from these HEK293 cells using ISOGEN (Nippon Gene Co., Ltd., Tokyo, Japan) in accordance with to the manufacturer's instruction. First-strand cDNA synthesis was performed using the SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instruction. DyNAmoTM HS SYBR[®]Green qPCR kit (FINNZYMES, Espoo, Finland) reagents were used as quantitative real-time PCR reagents according to the manufacturer's instruction. Thermocycling was carried out using the DNA Engine OPTICON[®]2 system (MJ Research, Inc, Waltham, MA). mRNA level was normalized to the transcript of the neomycin resistance gene, which is coded in the expression vector used. The oligonucleotide primers used for the PCR were as follows: a V5 tag sense primer, TCCTCGGTCTCGATTCTACG; a V5 tag antisense primer, TGGATCCTGGTACTCAATGGT; an EGFP sense primer, ACGTAAACGGCCACAAGTTC; an EGFP antisense primer, AAGTCGTGCTGCTTCATGTG; a NeoR sense primer, AGACAATCGGCTGCTCTGAT; and a NeoR antisense primer, AGTGACAACGTCGAGCACAG.

Results and Discussion

Detection of expression diversity of Nef proteins from small subset of HIV-1 and SIV

In the beginning of this study, we constructed expression vectors of Nef from HIV-1_{NL4-3}, HIV-1_{JR-CSF}, HIV-1_{YU-2}, HIV-1_{89.6}, and SIV_{mac239} for mammalian cells, which were appended to a V5 epitope tag at the C-terminal end for detection. The expression pattern of each Nef was examined at the same time. HEK293 cells transiently expressing each Nef were lysed and subjected to SDS-PAGE, followed by western blot analysis using an anti-V5 antibody, as described in Materials and Methods. As shown in Fig. 1A, the expressions of each Nef variant from HIV-1_{NL4-3}, HIV-1_{JR-CSF}, HIV-1_{YU-2}, HIV-1_{89.6}, and SIV_{mac239} were observed, in which the molecular weights of the variants were expectedly detected as 27, 29, 28, 27, and 34 kDa, respectively. Then, in spite of the fact that the same conditions in terms of the type of cell, the amount of DNA for transfection, the expression vector with the CMV promoter, and the V5 epitope for detection were used, the diversity of the expression level among the five Nef's was observed (Figure 1A). We paid attention to the heterogeneity of the expression level. We again examined the expression properties of Nef_{NL4-3} and Nef_{JR-CSF}, respectively showing the lowest and highest expression levels, using clones of HEK293/CD4 cells stably expressing each Nef. For the expression of these proteins, the pcDNA4/HisMax vector was used, which codes for a strong translational enhancer element [30] upstream of the ATG initiation codon of Nef, and by which an increase in Nef expression level is expected. As shown in Figure 1B, the marked differences between Nef_{NL4-3} and Nef_{JR-CSF} were reproducibly observed among the clones tested by western blot analysis; the expression levels of Nef_{JR-CSF} were more than tenfold those of Nef_{NL4-3}. Relatively low expression levels of Nef_{NL4-3} were still observed, although the vector with the translational enhancer element was used.

We also examined the expression property by immunostaining HEK293/CD4 cells stably expressing Nef. Nef and the nucleus were respectively stained with an anti-V5 antibody and DAPI, simultaneously. Then, it was verified at a glance that all the cells expressed Nef in both clones (Figure 2). Nef_{NL4-3} was predominantly detected in some of the focused areas, especially in the perinuclear region (Figure 2, top panels), which is a typical pattern of the subcellular localization of Nef [31, 32]. The regions seemed to include the *trans*-Golgi network, as previously reported [31, 32], although we have not checked for the marker by double staining. On the other hand, Nef_{JR-CSF} was detected in not only the perinuclear area but also other cytosolic areas with a relatively higher fluorescence (Figure 2, bottom panels). The difference in expression level in the western blot analysis between Nef_{JR-CSF} and Nef_{NL4-3} (Figure 1B) was reflected

in the result of the immunostaining of Nef_{JR-CSF} and Nef_{NL4-3} (Figure 2).

Altogether, it was indicated that the extreme difference in expression level between Nef_{JR-CSF} and Nef_{NL4-3} is not due to experimental artifacts but due to the property of each Nef. Furthermore, the diversity of the Nef expression level is plausible, although more Nef clones should be examined to draw an unequivocal conclusion. Previously, Hartz et al. have reported that Nef from the HIV-1_{lai} strain shows a low expression level in COS-1 cells [33], although they have not evaluated relative expression levels among some Nef variants. At the least, a considerable difference in the level between Nef_{NL4-3} and Nef_{JR-CSF} in HEK293 cells was confirmed in these experiments.

To confirm whether both Nef_{NL4-3} and Nef_{JR-CSF} expressed in HEK293/CD4 cells are functional, their CD4 downregulation activity, which is the main function of Nef, was evaluated. As shown in Figure 3, the CD4 downregulation activities of Nef_{NL4-3} and Nef_{JR-CSF} were clearly observed. The activity of Nef_{NL4-3} was less than that of Nef_{JR-CSF}, in which the mean fluorescent intensities (MFIs) indicating the CD4 level in two Nef_{NL4-3}-expressing cell clones were 0.65 and 0.63, whereas those in two Nef_{JR-CSF} expressing cell clones were 0.18 and 0.12. The *N*-myristoylation at the *N*-terminus of Nef is essential for the CD4 downregulation activity [2]. To verify whether CD4 downregulation in HEK293/CD4 cells is induced by the expressed Nef's, clones of HEK293/CD4 cells expressing non-myristoylated G2A mutants of Nef_{NL4-3} or Nef_{JR-CSF} were established and the CD4 levels were evaluated. Each G2A non-myristoylated mutant of Nef_{NL4-3} or Nef_{JR-CSF} expectedly showed no CD4 downregulation. It is clear that both Nef_{NL4-3} and Nef_{JR-CSF} are functional in HEK293/CD4 cells and that a high expression level of Nef is associated with efficient CD4 downregulation.

Characterization of low expression property of Nef

To determine which region of Nef_{NL4-3} is responsible for the low expression level, a chimera Nef expression vector was constructed. The primary structure of the chimera Nef tested was as follows: the first half-sequence, amino acids (AA) 1-139, was from Nef_{JR-CSF} and the second half-sequence, AA129-206, was from Nef_{NL4-3} (Figure 4A). HEK293 cells were transfected with each Nef expression vector and subjected to western blot analysis. As shown in Figure 4B, the expression level of the chimera Nef was almost the same as that of Nef_{NL4-3}. According to the quantification of the intensities of the bands with Fujifilm Image Gauge Software, the expression level of the chimera Nef was about 10% of that of Nef_{JR-CSF}. This result suggests that AA129-206 of Nef_{NL4-3}, named NLAA129-206, is required for the low expression level.

To examine whether the NLAA129-206 is not only required but also sufficient for the induction of the low protein expression level, the region was appended to the *C*- or *N*-terminal end of the enhanced green fluorescent protein (EGFP) [34, 35]. We used the combination of two protein degradation sequences, CL1 and PEST [12, 15, 36], namely, the CP sequence as a positive control of the induction of the low protein expression level. The CP sequence can induce a strong proteasome-mediated protein degradation by fusion, resulting in a low protein expression level [17, 37]. We appended the NLAA129-206 to the *C*-terminal end of EGFP (Figure 4C). The (GGGS)₃ linker was inserted between EGFP and each appended amino acid sequence (Figures 4C). It has been reported that the linker is sufficiently long and flexible to retain the function of two proteins at both ends [27]. HEK293 cells were transiently transfected with each expression vector and cultured for 48 h. Each cellular lysate was subjected to western blot analysis as described in Materials and Methods. As shown in Figures 4D and E, the expression levels of the NLAA129-206-fused EGFPs were extremely lower than that of wild-type EGFP in the *C*- and *N*-terminal fusions. Furthermore, the expression levels of the EGFPs fused by NLAA129-206 were clearly lower than those of the EGFP fused by the CP sequence (Figures 4D). The β -actin levels were almost the same among the lines, showing that the amounts of loaded proteins were almost the same among the lines. Another very small band in addition to the main one was observed in EGFP (asterisk in Figure 4D), which is not identified but thought to be EGFP with posttranslational modifications. These results suggest that NLAA129-206 has a very high potential for inducing the low protein expression level by fusion. Additionally, the potential of NLAA129-206 seems to be brought out more effectively in the case of fusion to the *N*-terminal end of EGFP than in the case of fusion to the *C*-terminal end of EGFP.

To examine whether the induction of the low protein expression level by the fusion of the sequence occurs in not only EGFP but also other proteins, Rluc [29] was chosen for the experiment. Since the fusion of NLAA129-206 to the *N*-terminal end of EGFP was more effective than that to the *C*-terminal end for the induction of the low protein expression level (Figures 4D and E), the NLAA129-206 and CP sequences were appended to the *N*-terminal of Rluc for examination (Figure 4C). The expression level of Rluc could be evaluated by measuring bioluminescent activity [29]. Transiently, HEK293 cells expressing each Rluc were lysed and their Rluc activity was measured, as described in Materials and Methods. As shown in Figure 4F, the activity of NLAA129-206-fused Rluc was much lower than that of wild-type Rluc, whose result was identical to those of EGFP (Figures 4D and E). These results suggest that the induction of the low protein expression level by NLAA129-206 fusion universally occurs in all arbitrary proteins.