

201124035A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV-1 複製におけるサイクロフィリン A の機能の解明

-異性化酵素活性欠失変異体を用いた機能解析 (H23-エイズ-若手-001)

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 竹村 太地郎

平成24(2012)年 5月

目次

I 総括研究報告

HIV-1 複製におけるサイクロフィリン A の機能の解明

-異性化酵素活性欠失変異体を用いた機能解析-----2

竹村 太地郎

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 複製におけるサイクロフィリン A の機能の解明  
-異性化酵素活性欠失変異体を用いた機能解析

研究代表者 竹村 太地郎

国立感染症研究所エイズ研究センター任期付研究員

研究要旨

本研究では HIV-1 複製における CypA の機能解明を目的として、異性化酵素活性欠失変異 CypA を発現させた 293T 細胞における HIV-1 複製前期過程の評価と CypA 阻害条件下における継代培養により得られた CypA 非依存的に増殖可能な変異 HIV-1 の分離と塩基配列の解析を行った。異性化酵素活性欠失 CypA では HIV-1 感染能が復帰しなかったことから、CypA の異性化酵素活性とそれに伴う Gag 蛋白質の構造変化が HIV-1 複製前期過程においては必要と考えられた。また、HIV-1 複製の CypA 依存性が CypA 結合ループとは異なるループ 7 領域による可能性が示され、さらにループ 7 領域に直接 CypA が結合することが示唆された。

A. 研究目的

多剤併用療法の導入以降、感染者の予後、生活の質は大きく改善したが、現在も長期服薬に伴う副作用や多剤耐性ウイルス出現と感染拡大が大きな課題となっている。現行よりも強力な HIV-1 複製を抑制する方法の開発は服薬量、を減らすこと、耐性ウイルス出現の可能性を減らすことが期待でき、上記の課題の改善に総合的に貢献しうる。自然界には「種間の壁」とも呼べるキャプシド蛋白質 (CA) といくつかの宿主因子が関与した強力な HIV-1 複製抑制機構が存在する。サイクロフィリン A (CypA) も CA と相互作用し

HIV-1 複製に関与すると考えられている宿主因子の 1 つであるが、その作用機序は明らかでない。本研究では HIV-1 複製における CypA の作用機序を解明することを目的とする。特に CypA の異性化酵素活性が HIV-1 複製前期過程に寄与するかという問題に解答を出す。以上より細胞への侵入直後のウイルスと宿主因子の相互作用を明らかにし、新たな機序による HIV-1 感染、増殖を抑制する方法の開発に貢献することを長期目標とする。

B. 研究方法

### < 1 > 点変異導入 CypA を用いた解析

PCR 法を用いて異性化酵素活性部位に変異を導入した HA 標識 CypA 発現プラスミドを 3 種類 (R55A、H126A、S99T) 作製した。293T 細胞にこれらの変異 CypA 発現プラスミドと野生型 CypA 発現プラスミドをトランスフェクションし、1 日後細胞数を計測しリプレートした後 HIV-1 分子クローン pNL4-3 をトランスフェクションした。2 日後に培養上清から超遠心法によりウイルス粒子を回収し、ウエスタンブロッティング法によりウイルス粒子中に取り込まれた CypA を検出し変異 CypA と CA の結合効率を評価した。また、293T 細胞に恒常発現 shRNA を導入し内在 CypA 発現抑制細胞株 (293T. CypAsh) と対照として 293T. nonTsh を作製した。これらの細胞株に変異 CypA 発現プラスミドをトランスフェクションし、1 日後に細胞数を計測しリプレートした後、翌日 VSV-G でシュードタイプした Luciferase 発現 HIV-1 ベクターを約 4 時間感染させた。2 日後に細胞中の Luciferase 活性を計測し、それぞれの変異 CypA 発現細胞における HIV-1 感染効率を評価した。

### < 2 > CypA 阻害条件下においても複製可能な変異 HIV-1 の分離と塩基配列の解析

これまでに CypA が HIV-1 CA 中の CypA 結合ループを介して結合し、CypA 結合ループへの変異導入や CypA の競合阻害剤サイクロスポリン A (CsA) の添加により CypA と CA の結合が低下し、HIV-1 の複製効率が低下することが知られている。しかし、

CypA 結合ループに変異を導入した NL4-3 (P90A. A92E) 株は CsA の存在化で複製能がさらに低下することが見出され、CypA 結合ループ以外に CypA と相互作用する領域が存在する可能性が考えられた。本研究では野生型 NL4-3 株と CypA 結合ループに変異を導入した NL4-3 (P90A. A92E) 株とを (1) NL4-3 のみ、(2) NL4-3 + 1 $\mu$ M CsA、(3) NL4-3 (P90A. A92) のみ、(4) NL4-3 (P90A. A92) + 1 $\mu$ M CsA の各条件で継代培養し、CypA と CA の結合を阻害した条件下においても複製可能な変異 HIV-1 の分離を試みた。細胞は Jurkat 細胞を用い、初期感染は p24 量で 20ng/2 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞にて行った。ウイルス増殖を p24 ELISA にて評価し、ウイルス増殖の確認後、Gag 領域に注目して塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究は個人情報を取り扱う研究は含まず、HIV-1 を用いた実験は P3 レベルの実験施設において行った。

## C. 研究結果

### < 1 > 点変異導入 CypA を用いた解析

これまでに他グループの生化学的解析と構造解析より、本研究で用いた CypA 変異体の基質への結合能と酵素活性は R55A; 基質との結合能が無く酵素活性も無い、H126A; 基質との結合能は変化がないが酵素活性は野生型の 0.5% 程度に低下する、S99T; 基質と結合するが、異性化酵素活性は失う、という報告がなされている (DA Bosco et al. Journal of

Molecular Biology. 2010. 403, 723-738)。しかしこれらの解析は短いペプチドを用いた解析であり、HIV-1 CA との結合は明らかでない。そこでまず、各変異 CypA 発現細胞を用いて HIV-1 を作製し、ウイルス粒子中に取り込まれた HA. CypA をウエスタンブロット法にて定量し、変異 CypA と HIV-1 CA の結合効率の評価を行った。その結果、H126A は野生型と同程度以上の結合が確認されたが、R55A と S99T においては結合が見られず、S99T では既報の結果とは相違が見られた。

次に内在 CypA 発現抑制 293T 細胞に各変異 CypA を発現させ、HIV-1 ベクターを用いて複製前期過程における変異 CypA の機能の評価を行った。その結果、対照として用いた野生型 CypA 発現細胞では HIV ベクターの感染効率が復帰したが、H126A を含むすべての変異 CypA において HIV-1 ベクターの感染効率は復帰しなかった。この結果は変異 CypA が HIV-1 複製前期過程をサポートしておらず、CypA の異性化酵素活性が必要である可能性を示唆する。  
< 2 > CypA 阻害条件下においても複製可能な変異 HIV-1 の分離と塩基配列の解析

前述の (1) から (4) 全ての培養条件において、4 7 代の継代後ウイルスの増殖が確認された。そこで感染細胞から DNA を抽出し、Gag 領域全域を PCR にて増幅しサブクローニングした後、各条件 4 クローンずつ Gag 領域の塩基配列を決定した。培養条件 (1) ではマトリクスの V35I (MA V35I)、(2) では MA E40K と CA

H120N、(3) では CA N121K、(4) では CA G89R と CA R132K の各変異が確認された。もし CypA 結合ループへの CypA の結合が必須なのであれば(3)の条件で CypA 結合ループに変異が生じ CypA との結合能が復帰することが予想されたが、両方の条件において P90A. A92E の変異は保持されていた。一方で、CA H120N、CA N121K、CA R132K の各変異は helix\_6 と\_7 の間の領域(便宜的に以後ループ7領域とする)とその近傍に位置し、HIV-1 複製における CypA 依存性がこの領域に起因することが示唆された。ループ7領域には CypA 結合ループに類似する高プロリンモチーフ (<sup>120</sup>PPIP<sup>123</sup>モチーフ)が存在する。そこでループ7領域をアラニンに置換した変異体を作製し、CypA との結合効率を < 1 > と同様の方法により評価した。その結果、ループ7領域変異体ではウイルス産生が大きく低下したが、特に 120 番目のプロリンをアラニンに置換した場合に CypA との結合が低下することが確認された。従って、CA のループ7領域が別の CypA 結合領域として機能している可能性が考えられた

#### D. 考察

本研究では HIV-1 複製における CypA の機能解明を目的として、異性化酵素活性欠失変異 CypA を発現させた 293T 細胞における HIV-1 複製前期過程の評価と CypA 阻害条件下における継代培養により得られた CypA 非依存的に増殖可能な変異

HIV-1 の分離と塩基配列の解析を行った。異性化酵素活性欠失 CypA では HIV-1 感染能が復帰しなかったことから、CypA の異性化酵素活性とそれに伴う Gag 蛋白質の構造変化が HIV-1 複製前期過程においては必要と考えられた。また、HIV-1 複製の CypA 依存性が CypA 結合ループとは異なるループ 7 領域による可能性が示され、さらにループ 7 領域に直接 CypA が結合することが示唆された。一方で、他のグループによる MLV、HIV-2 の解析から、ループ 7 相当領域がウイルス複製抑制に働く宿主因子に対する感受性に関与することが今年度報告されており、CypA がそれらのウイルス複製抑制に働く宿主因子からの逃避に関与する可能性も考えられる。CA ループ 7 領域に着目して CypA との結合と構造の変化、さらに他の宿主因子との相互作用を明らかにする必要があると考えている。

## E. 結論

本研究は HIV-1 複製における CypA の機能解明を目的とした。CypA の異性化酵素活性が HIV-1 複製前期過程においては必要と考えられること、HIV-1 複製の CypA 依存性が CypA 結合ループとは異なる領域（ループ 7 領域）により、さらにループ 7 領域に直接 CypA が結合する可能性が示された。

## F. 研究発表

竹村 太地郎

学会発表(ポスター含む)

海外

1) Taichiro Takemura, Miyako Kawamata, and Tsutomu Murakami. Selection and characterization of the mutant HIV-1 that can replicate without CypA in the CypA-dependent Jurkat cell. Cold Spring Harbor Meeting Retroviruses. May 23-28, 2011, Cold Spring Harbor, USA.

2) Tsutomu Murakami, Honggui Wu, Miyako Kawamata, Joe Chiba, and Taichiro Takemura. Role of Rab11A in HIV-1 Assembly. Cold Spring Harbor Meeting Retroviruses. May 23-28, 2011, Cold Spring Harbor, USA.

国内

1) Taichiro Takemura, Miyako Kawamata and Tsutomu Murakami. Selection and sequencing analysis of the mutant HIV-1 that can replicate without CypA in Jurkat cell. International Union of Microbiological Societies Congresses. Sep11-16, 2011, Sapporo, Japan.

2) Tsutomu Murakami, Honggui Wu, Miyako Kawamata, Joe Chiba, and Taichiro Takemura. Role of Rab11 in Virus Assembly of HIV-1. International Union of Microbiological Societies Congresses. Sep11-16, 2011, Sapporo,

Japan.

3) 竹村 太地郎、川又 美弥子、村上 努. サイクロフィリン A 非依存的に増殖可能な新規 HIV-1 変異株の解析. 日本エイズ学会、2011 年、東京

4) 呉 鴻規、竹村 太地郎、川又 美弥子、千葉 丈、村上 努. HIV-1 粒子形成過程における Rab11a 蛋白質の機能解析. 日本エイズ学会、2011 年、東京

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

