

研究課題：Gag の細胞内輸送機構に関する研究～翻訳後修飾を中心に

研究分担者：梁 明秀（横浜市立大学医学部 微生物学 教授）

研究協力者：宮川 敬、工藤 あゆみ、松永 智子

研究要旨

ウイルス複製後期過程における粒子産生 (Virion genesis) に至るまでの Gag の細胞内輸送メカニズムの詳細は未解明であり、このことが Gag を標的とする抗ウイルス薬の開発を阻む要因となっている。そこで本研究では、Virion genesis に関与すると推測される宿主因子 (c-CBL, APC) について解析し、これらの因子群を介した Gag の細胞内輸送・集合メカニズムについて検討を行った。その結果、これらの因子群は、Gag のアセンブリー、プロセッシングあるいはリサイクリングなど様々な過程に関与すると考えられた。

A. 研究目的

感染細胞におけるGagの輸送、アセンブリー（集合と多量体化）そしてHIV粒子産生（Virion genesis）に至る詳細な分子機構は未解明であり、このことがGagを標的とする薬剤の開発を阻む要因となっている。そこで本研究ではこれら一連のvirion genesisに関与する宿主因子ネットワークを解明し、これらの因子群がHIV-1複製に与える影響について、ウイルス増殖や病態との関連について考察を行う。ウイルスは宿主のメンブレントラフィックや細胞骨格を利用して細胞内に侵入したり細胞から出芽したりするものが複数あることが知られている。また、このことは細胞の極性や運動方向によって、ウイルス分泌の方向性や細胞内の局在が変化することを示唆するものである。また、細胞内ウイルスタンパク質が宿主細胞の輸送系や細胞骨格系の機能を阻害することにより、ウイルス病原性を発揮する可能性が示唆される。HIV感染遊走マクロファージにおいても、ウイルス出芽方向は、細胞が動く方向に同期していることが知られている。したがって動的な細胞変化にともなうHIV Gagタンパク質の細胞内動態を理解することは、新たなウイルス-宿主相互作用の解明につながる可能性がある。Gagタンパク質の細胞内輸送方式や輸送場所を決定する制御機構が解明されれば、それらに関わる細胞側因子の同定につながり、新規の治療法の開発へと道を開くことができる。本研究課題ではHIV感染細胞のダイナミクスと連動したGagタンパク質の細胞内制御について解析する。HIV Gagタンパク質の機能的ユビキチン化に焦点を当て、Gagタンパク質の細胞内輸送方式や出芽方向、さらには細胞-細胞間感染に関与する因子群の同定を行う。本年度は特にGagとの機能的相互作用が推測されるユビキチンリガーゼc-CBLおよびAPCのHIV粒子産生への影響について解析した。

B. 研究方法

c-CBL, APCのHIV産生に対する影響を調べるため、HEK293細胞もしくはJurkat細胞にHIV分子クローン (pNL4-3) とHaloタグが付加したc-CBL発現ベクター (pHT-CBL) もしくはGFPタグが付加されたAPC (pEGEP-APC)を共発現させ、48時間後の細胞内Gagおよび培養上清中のGag量をウェスタンブロット法、ELISA法を用いて解析した。HIV感染実験は、これらの因子を発現したJurkat細胞もしくはH9細胞にHIVを感染させ、上清中のHIV量についてELISA法にて数日毎に測定した。Cell-to-cell感染への影響を調べるため、これらの因子とGag-GFPを発現させたJurkat細胞とDsRedを発現させたH9細胞とを96well plate内で共培養し、24時間後にDsRedおよびGag-GFP陽性細胞をフローサイトメーターにてカウントした。

Gagの多量体化はBiFC (二分子蛍光補完法 Bimolecular Fluorescence Complementation) 系を使用した。これは細胞内でGag同士が結合した場合にのみ緑色蛍光タンパク質Kusabira-Green (KG) の立体構造が再構築され蛍光が観察されるという原理に基づいたものであり、蛍光を獲得した細胞をフローサイトメーターにて測定し、結合の割合を数値化した。

C. 研究結果

1. HIV粒子産生におけるc-CBLの機能解析

我々と他の研究グループは、宿主防御因子Tetherinの機能制御に重要な役割を果たす因子としてBCA2 (PLoS Pathog. e1000700, 2009)、HRS (PLoS Pathog. e1001265, 2011) を同定した。興味深いことにBCA2やHRSはともにEGF受容体(EGFR)の輸送、特にエンドサイトーシスに関わる因子であるが、一方でこれらの因子がGagそのものにも機能することが近年報告された。BCA2はGagをユビキチン化することで (PLoS Pathog. e1004151, 2014)、またHRSはGagのエキソサイトーシスを阻害することで (Protein & Cell 6, 2011)、

HIV産生を制御する。これらの報告はGagのアセンブリーおよびHIV産生機構の一部にEGFRの輸送因子群が関与する可能性を示唆する。そこで、同じくEGFRの膜輸送に関与し、且つ多くの生物種で保存されているアダプタータンパク質c-CBLについてHIV産生への影響を調べた。その結果、c-CBL濃度依存的なHIV産生の増加が見られた。また、Gag-Polのみの発現で上清中に放出されるViral-like particle (VLP) に対しても、c-CBLはその産生を増加させた。しかしc-CBLの過剰発現ではVPL産生をむしろ減少させた。これは、c-CBL過剰発現によりE3複合体の形成に影響が出た可能性が考えられる。c-CBLはリン酸化されたEGFRに結合してその輸送を制御することが報告されており、現在Gagのリン酸化と絡めてその詳細な機構について検討中である。また、c-CBLはユビキチンリガーゼとしても知られており、Gagのユビキチン化に関与する可能性についても検討している。

2. HIV粒子産生におけるAPCの機能解析

我々は、過去の研究により、癌抑制遺伝子産物であるAPC蛋白質がHIV Gagの新規結合因子であることを質量分析によって見出した。昨年度までの成果として、APCは、HIV Gagと結合し、HIV複製後期過程においてGagの細胞膜までの輸送および多量体化を促進し、T細胞におけるCell-free感染およびCell-to-cell感染を促進する因子であることが判明している。今年度も引き続きその生理学的機能について検討を行った。APCがHIV Gag特異的に機能する宿主因子であるかを検討するため、HIV-1、HTLV-1、XMRVのGag発現ベクターを作製し、コントロール細胞とAPC発現細胞におけるVLP産生を比較した。その結果、APCはHIV-1 VLP産生のみを促進し、HTLV-1およびXMRV VLP産生には影響を与えなかった(図1)。次に、APCとHIV-1 Gagの複合体構造をシミュレーションすることで両者の結合に関与するアミノ酸残基や、Gag多量体化に対する影響についての構造学的推測を試みた。その結果、APCの複数の領域がGagと相互作用しうることが推定された。しかしながら現在判明しているAPCのGag結合領域が800アミノ酸程度と大きいため、APCのGag結合領域をさらに狭めるための実験を行っている。

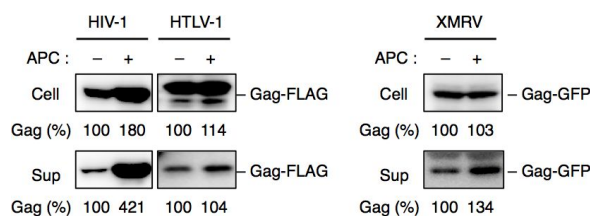


図1 APCのHIV Gag特異的なVLP産生促進。HEK293細胞にHIV-1, HTLV-1またはXMRV由来のGag発現ベクターとAPC発現ベクターを共発現し、48時間後の細胞内および細胞上清中のGag量をウェスタンブロット法で解析した。

D. 考察

今回解析したc-CBL, APCはいずれの因子もGagに直接結合し、VLP産生を変化させることから、Gagそのもの、あるいはVirion genesisに関与する細胞内マシナリーへの関与が疑われる。

T細胞においてNefはc-CBLを失活させることでシグナル伝達系を抑制することが報告されている(Immunity 23, 2005)。このことは、Nefがc-CBLを介してウイルス粒子の産生を制御する可能性があることを示唆する。今後はT細胞におけるGag-CBL系の解析をsiRNAやCRISPR/Cas9法を用いたノックダウン実験において検証予定である。またc-CBLは、リン酸化された基質タンパク質に結合し、ユビキチン化修飾を付加する機構が一般的に知られているため、Gagのリン酸化とユビキチン化という観点から本因子が関与する可能性やそのウイルス学的機能について検討中である。

APCは300kDを超える比較的大きなタンパク質であり、さらにいくつかの補助因子と複合体を形成する。GagがHIV産生する上でこのような巨大なAPC複合体を利用するメリットについては今後検討する必要がある。我々の実験では、APC結合因子の一つであるKAP3が、APCによるHIV産生促進に重要であることが明らかになっている。KAP3はAPC複合体が微小管上を滑るのに必要なアダプター因子であり、Gagが効率よく細胞膜へ輸送されるためのカーゴタンパク質として利用している可能性がある。またAPCは微小管を利用してRNAを細胞の先端部へ輸送することが知られており(Nature 453, 2008)、APC-Gag複合体がウイルスRNAの効率的な輸送に関与する可能性についても現在検討中である。

E. 結論

HIV産生に影響を与える因子群の解析により、HIV virion genesisに至る各過程の分子機構が一部解明されつつある。今後の詳細な検討により、Gagのユビキチン化、リン酸化の観点から薬剤標的となるweak pointを見いだせる可能性がある。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1)Furukawa A, Sugase K, Morishita R, Nagata T, Kodaki T, Takaori-Kondo A, Ryo A, Katahira M. Quantitative analysis of location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014;53(9):2349-52.

2. 学会発表等

(1)梁 明秀;無細胞蛋白質発現系を活用したウイルス - 宿主相互作用研究,ウイルス研究の潮流シリーズ・ウイルス研究所セミナー,京都,2014年10月.

(2)Ayumi Kudoh, Kei Miyakawa, Satoko Matsunaga, Isao Kosugi, and Ryo Akihida ; H11/HSPB8 confers HIV resistance to Human placental trophoblasts, The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara, 奈良,2014年9月.