

**研究課題：** HIV-1 アクセサリー蛋白質のパッケージングにおける Gag の機能の研究  
**研究分担者：** 間 陽子 ( 理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット ユニットリーダー )  
**研究協力者：** Chutiwitoonchai Nopporn ( 理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット  
訪問研究員・エイズ予防財団 リサーチレジデント )

## 研究要旨

HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr は Gag 蛋白質 p6 ドメインとの結合を介してウイルス粒子にパッケージングされること、p6 の Vpr との結合サイトは、HIV-1 粒子の放出に必須な Endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) である Tsg101 および Alix と p6 との結合サイトの近接に位置していることが知られているが、Vpr が Gag と ESCRT 分子群との相互作用にどのような影響を及ぼすのか不明なままである。これまでに我々は、GST pull down 法により、Vpr が Gag と TSG101 および Alix との結合を濃度依存的に競合阻害する事を初めて示した。さらに、Gag は細胞質に、Tsg101 は細胞質および核膜に局在するが、両蛋白質を同時に強発現させると、Gag は核膜上で Tsg101 と共同在して凝集し、その共同在は Vpr により減少することを見出した。今年度は、fluorescence resonance energy transfer (FRET) 法により、生細胞内において Gag と Tsg101 は核膜上で共同して凝集すること、この凝集は Vpr の発現により阻害されることが立証した。さらに、細胞内で TSG101 を過剰発現させると Gag の発現量とウイルス様粒子 (VLP) の産生量が減少することを見出した。これらの低下は TSG101 による Gag のリソソーム経路を介した分解の可能性が示された。この低下は Vpr の存在によって回復した。最後に、Vpr と Gag p6 の相互作用を標的とする新規阻害剤候補を探索するための ELISA binding 法を構築し、構造多様性を考慮した 9600 個の化合物から、Tsg101 と Gag p6 の結合を阻害する低分子化合物を取得した。これらの幾つかはマクロファージにおけるウイルス複製をも阻害した。

## A. 研究目的

HIV-1 粒子の放出課程は、Gag 蛋白質の p6 領域内に存在する "Late (L) domain" モチーフと後期エンドソーム分子群 Endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) との結合を通じて制御される。L domain モチーフの一つが PTAP モチーフと呼ばれ、ESCRT 蛋白質の一つである Tsg101 との結合することでウイルス構成タンパク質の細胞膜移行に重要な作用を示す。事実、PTAP モチーフに変異を導入する、あるいは Tsg101 発現をノックダウンするとウイルス粒子の放出は阻害される。L domain の他の結合モチーフが YPXnL モチーフと呼ばれ ESCRT タンパク質の Alix (AIP1) との結合活性を有する。Alix は Tsg101 および ESCRT III complex と結合することが知られている。

HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr は p6 と結合することでウイルス粒子にパッケージングされることが知られているが、Vpr が Gag 蛋白質の輸送や粒子出芽に及ぼす影響は未だ不明なままである。また、Vpr の p6 との結合サイトは P6 と Tsg101 および Alix 結合サイトに近接しているが、その詳細な相互作用様式および Vpr が p6-ESCRT 相互作用にどのような効果を有するのかは明らかになっていない。従って、p6 と ESCRT 分子群との相互作用、Gag 蛋白質の輸送および粒子出芽に果たす Vpr の役割を解析することは、Gag 出芽機構の解明と Gag の新規治療標的部位の探索に重要となる。

本研究の目的は、Gag p6 と TSG101 などの ESCRT 分子群との相互作用および Gag 蛋白質の輸送および粒子出芽に及ぼす Vpr の効果を解析する事、Vpr のウイルス粒子パッケージング機構を解明する事である。更に、p6 と ESCRT 分子群との相互作用を阻害する低分子化合物をスクリーニングすることを目的とする。本研究により Gag の新規治療標的部位および構造の提供および Gag 出芽の分子メカニズムの解明が期待できる。

## B. 研究方法

1) Fluorescence resonance energy transfer (FRET) 法 : eCFP-TSG101/pCAGGS, Gag-Venus/pCAGGS および mRFP-Vpr/pCAGGS 発現ベクターを作製し、HeLa 細胞へ導入後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて FRET 法を行った。

2) ウイルス様粒子 (VLP) の産生 : Gag/pCAGGS ベクターを 293T 細胞に導入して Gag を発現させ、48 時間後に培養上清を回収して 20% ショ糖密度勾配超遠心法により VLP を精製し、Western blot 法を行った。この時、Flag-TSG101/pCAGGS あるいは Vpr/pCAGGS 発現ベクターを共導入した。

3) Gag と Tsg101 の結合阻害を標的とした低分子化合物のスクリーニング : GST-Vpr と His-Tsg101 を大腸菌で大量合成し、ELISA binding assay を構築した。合成した PTAP ペプチドを添加することで Gag と Tsg101 蛋白質の結合阻害を確認した。9600 個の小分子化合物を含む Core Library 用いて

スクリーニングを実施した。小分子化合物のウイルス阻害効果と細胞毒性評価はマクロファージを用いた感染実験とWST法により調べた。マクロファージの準備は健常人由来の血液から末梢血単核球 (PBMCs) を分画し、抗-CD14抗体ビーズを用いてCD14陽性細胞である単球を分離し、Macrophage colony stimulation factor (M-CSF)を加えて1週間培養し最終分化マクロファージとした。

(倫理面への配慮) 特になし

### C. 研究結果

CFP-TSG101/pCAGGS, Gag-Venus/pCAGGS およびmRFP-Vpr/pCAGGS発現ベクターを作製し、FRET法を構築した。CFP-TSG101/pCAGGSおよびGag-Venus/pCAGGSをHeLa細胞に共導入すると、Tsg101発現ベクターを過剰に発現させた時(0.75 µg以上)に始めて凝集が確認された(図1)。この凝集は発現ベクターの導入量依存的であった。FRET法によりこの凝集においてTsg101とGagが共局在していることが明らかとなった(図2A)。次に、CFP-TSG101/pCAGGS およびGag-Venus/pCAGGSに加えて、mRFP-Vpr/pCAGGSも同時に導入すると、凝集はVprの存在により低下した(図2B)。

哺乳類細胞に Gag 蛋白質を発現させると VLP が形成・放出されることが報告されている。そこで、Tsg101 が核膜上で Gag と凝集することが、VLP の産生に及ぼす影響を調べた。Gag/pCAGGS、Flag-TSG101/pCAGGS あるいは Vpr/pCAGGS を 293T 細胞に共導入して、48 時間後に培養上清を回収して 20% ショ糖密度勾配超遠心法により VLP を精製し、Western blot 法を行った(図3)。TSG101を強発現させるとGagの発現量とVLPの産生量が減少することが示された。このVLPの産生量の減少はTsg101の量依存的であった。興味深い事に、この減少はVprの存在によって回復した。(data not shown)。

続いて、VLPの産生量の低下がGag蛋白質の分解によるものか否かを調べるために、Gag/pCAGGSおよびGag/pCAGGS発現ベクターを293T細胞に共同導入して24時間培養後にプロテアーゼインヒビターであるLactacystin (LC)およびリソソームインヒビターであるBafilomycin A1(BFA1)で6時間処理した後に、cell lysateを用いてWestern blot法を行った。その結果、TSG101によるGagの分解は、LC処理ではなく、BFA1処理で阻害されたことから、リソソーム経路を介した分解の可能性が示された(図4)。

Tsg101とGag p6の結合を標的とする新規阻害剤候補を探索するためのELISA binding法を構

築し、構造多様性を考慮した9600個の化合物を含むCore Libraryを用いて、Tsg101とGag p6の結合を阻害する低分子化合物を取得した。さらにこれらの化合物の幾つかはマクロファージにおけるウイルス複製をも阻害した。

### D. 考察

本研究において初めて、細胞内で過剰発現したTsg101がGagの凝集と分解を誘導することが示された。さらに、Tsg101の過剰発現が、Gagの細胞内での発現とVLPの産生を低下させることも明らかとなった。これらの成果は、TSG101の強発現はGag trafficking と viral budding を阻害するというこれまでの報告(J Virol 2003. 77(17);9173; J Virol 2003. 77(11);6507; PNAS 2011. 108(37);E689)を裏付けている。この現象が実際のHIV-1感染細胞において認められる否かを解析することが必要である。

これまでに、GAG-TSG101の阻害薬については、2報の論文が発表されている。一つ目はTSG101に結合するインヒビター(Oxime based peptide)、二つ目はGAG-TSG101の結合阻害を標的としたインヒビター(Selected Cyclin Peptide (IC50:7は7マイクロM, peptidに環状になるように化合物を付加))である。しかし、両者ともペプチドインヒビターであるため、細胞に取り込まれやすくする改変が必要であった。そこで、本研究において我々は、細胞に取り込まれるような改変を必要としない小分子化合物を選択し、標的としてGAG-TSG101の結合阻害を選択した。その結果、Gag p6とTsg101との相互作用が新規抗ウイルス阻害薬の標的となる可能性を突き止めた意義は大きい。今後は、Gag p6とTsg101との相互作用を阻害する小分子化合物の作用機構を詳細に解明することが重要である。

### E. 結論

- 1) Tsg101とGag p6が新しい抗ウイルス阻害剤の標的になることが立証された。
- 2) FRET法により、生細胞内においてGagとTsg101は核膜上で共局在して凝集すること、この凝集はVprの発現により阻害されることが確認された。
- 3) 細胞内でTSG101を過剰発現させるとGagの発現量とVLPの産生量が減少した。これらの低下はTSG101によるGagのリソソーム経路を介して分解される可能性が示された。この低下はVprの存在によって回復した。

F. 知的所有権の取得状況 無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Murakami T, Aida Y. Visualizing 1 Vpr-induced G2 arrest and apoptosis. *PLoS One*, 9(1):e86840, 2014

2) Zahoor M. A, Xue G, Sato H, Murakami T, Takeshima S-n, Aida Y. HIV-1 Vpr induces interferon-stimulated genes in human monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, 9(8):e106418, 2014.

3) Miyatake H, Sanjoh A, Unzai S, Matsuda G, Tatsumi Y, Miyamoto Y, Dohmae N, Aida Y. Crystal structure of human importin- $\alpha$ 1 (Rch1), revealing a novel autoinhibition mechanism involving homodimerization. *PLoS One*, 10(2): e0115995, 2015

4) Hagiwara K, Ishii H, Murakami T, Takeshima S-n, Chutiwitoonchai N, Kondoh Y, Honda K., Osada H, Tsunetsugu-Yokota Y, Suzuki M, and Aida Y. Synthesis of a Vpr-binding derivative for use as a novel HIV-1 inhibitor. *Antivirus Res.*, revised.

### 2. 学会発表等

(1) Kamori D, Murakami T, Hasan Z, Carlson J, Siarot L, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Gatanaga H, Oka S, Aida Y, Ueno T. : Effects of naturally arising mutations in HLA-A\*02-restricted immunodominant region on the functions of HIV-1 Vpr, 第 16 回白馬シンポジウム, 2014.6.14、熊本

(2) Zahoor A. M, 薛光愛, 佐藤洋隆, 村上知行, 竹嶋伸之輔, 間陽子 : HIV Vpr 発現マクロファージにおけるマイクロアレイによる遺伝子発現解析, 第 157 回日本獣医学会学術集会, 2014.9.9-12、札幌

(3) Siarot L, 佐藤洋隆, Chutiwitoonchai N, 間陽子 : Screening of small molecules Interfering the specific interaction between human immunodeficiency virus-type I(HIV-1) Gag and ESCRT Tsg 101, 第 157 回日本獣医学会学術集会, 2014.9.9-12、札幌

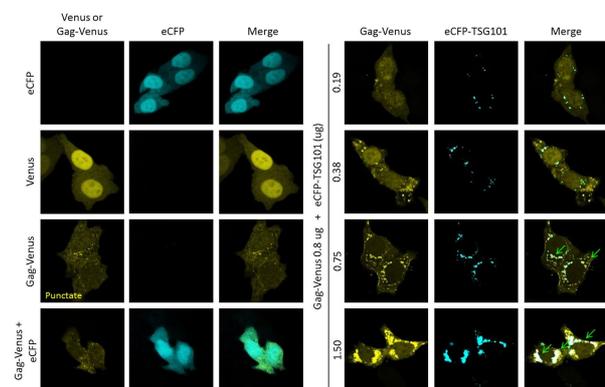
(4) 村上知行, 間陽子 : Vpr は新規 Vpr 結合因子 HIP1 のリン酸化の制御を介して G2 期停止を調節する, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014.11.10-12、横浜

(5) Chutiwitoonchai N, 間陽子 : TSG101 overexpression induces Gag aggregation at perinuclear region and this aberrance is rescued by Vpr : 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014.11.10-12、横浜

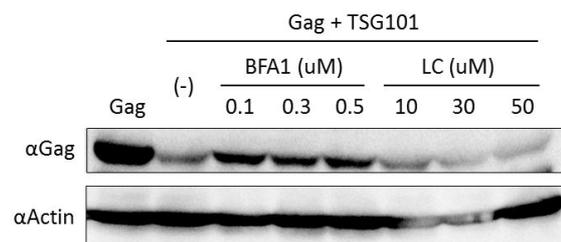
(6) Siarot L, 佐藤洋隆, Chutiwitoonchai N, 間陽子 : Gag-Tsg 101 targeting anti-human immunodeficiency virus-type I (HIV-I) therapy, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014.11.10-12、横浜

(7) 佐藤洋隆, 阿部昌子, 大貫哲男, 黒田和道, 長澤洋介, 武井正美, 山本樹生, 吉田稔, 間陽子 : HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr を標的とした新規

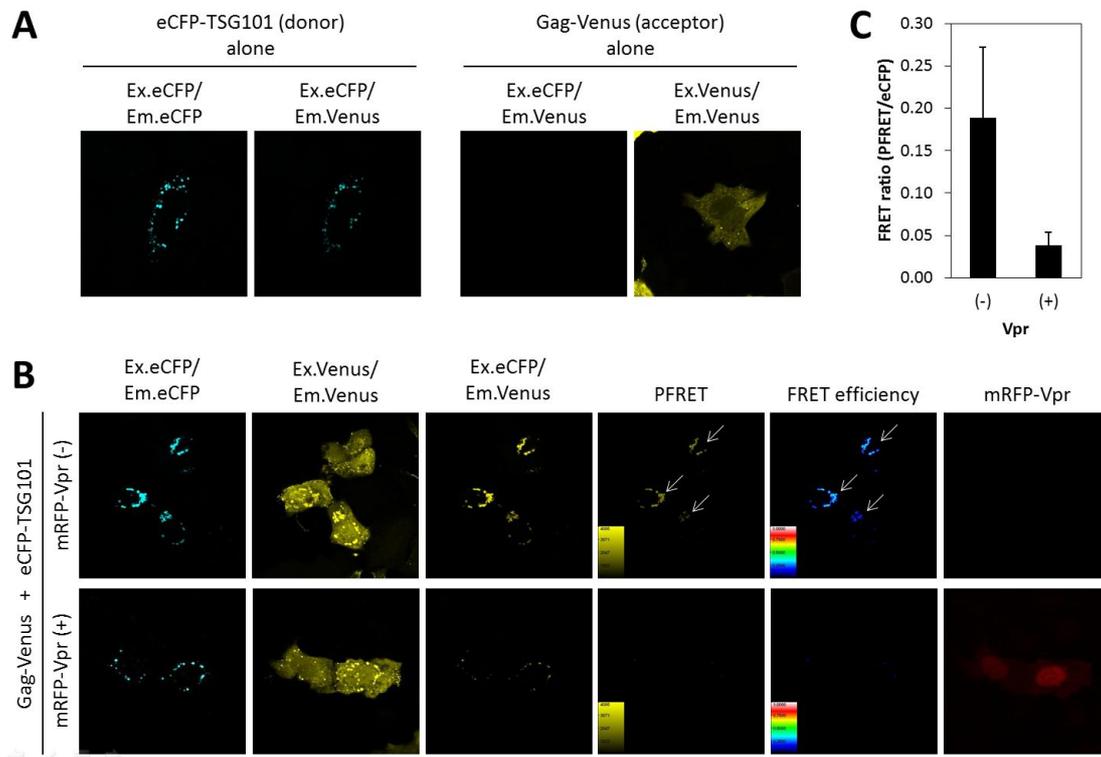
抗 HIV 治療薬スクリーニング系の構築、第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014.11.10-12、横浜 (8) 萩原恭二, 村上知行, 石井英樹, 竹嶋伸之輔, 近藤恭光, 本田香織, 長田裕之, 横田(恒次)恭子, 鈴木正昭, 間陽子 : アクセサリータンパク質 Vpr の核移行を標的にしたマクロファージに対する新規 HIV-1 阻害剤の最適化研究、第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014.11.10-12、横浜 (9) Kamori D., 村上知行, Hasan Z, Meribe S, Carlson J., Siarot L, 三浦聡之, 立川(川名)愛, 岩本愛吉, 瀧永博之, 岡慎一, 間陽子, 上野貴将 : Effect of natural variability of an immunodominant Vpr region on immunological footprints, clinical outcome and protein functions, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014.11.10-12、横浜 (10) L.L. Siarot, H. Sato, N Chutiwitoonchai, T. Aono, Y. Aida : Screening of small molecule inhibitors for human immunodeficiency virus-type I(HIV-1) by targeting Gag-Tsg101 interaction. 2015. 3.5-7, 2015 Palm Spring Symposium, CA, USA



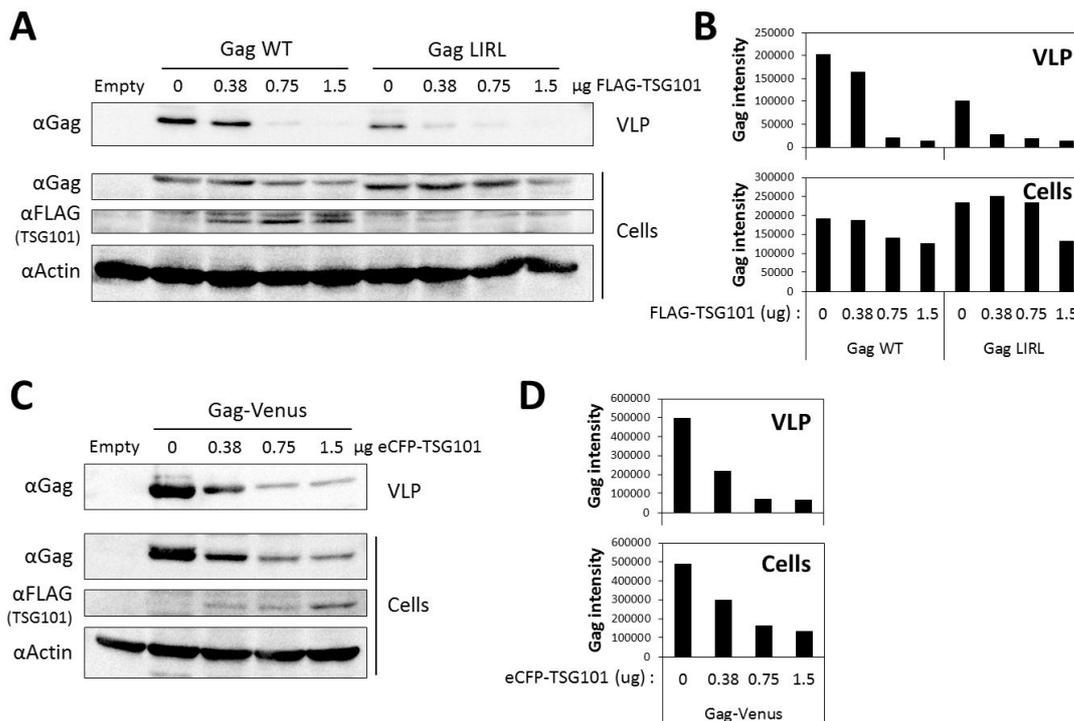
**Figure 1 TSG101 induced Gag aggregation.** HeLa cells were transfected with Gag-Venus plasmid alone or co-transfected with the indicated amount of eCFP-TSG101 plasmid for 48 hr. The green arrows indicate co-localization of Gag/TSG101.



**Figure 4 TSG101 down-regulated Gag through lysosomal pathway.** 293T cells were co-transfected with Gag + FLAG-TSG101 plasmids for 24 h. The inhibitors, BFA1 (Bafilomycin A1) or LC (Lactacystin) at indicated concentrations were added and the cells were cultured for 6 h before collecting total cells for Western blot analysis.



**Figure 2 FRET analysis of Vpr rescued TSG101 induced Gag aggregation.** HeLa cells were transfected with eCFP-TSG101 or Gag-Venus plasmid alone (A), or co-transfected with eCFP-TSG101 + Gag-Venus plasmids (B, upper row), or eCFP-TSG101 + Gag-Venus + mRFP-Vpr plasmids (B, lower row) for 48 hr. The precision FRET (PFRET) and FRET efficiency were analyzed by sensitized emission method. (C) FRET ratio (PFRET/eCFP-TSG101) calculated from B. The white arrow heads indicated co-localization of Gag/TSG101.



**Figure 3 TSG101 induced Gag down-regulation and decreased VLP production.** 293T cells were co-transfected with Gag (WT or LIRL, ΔPTAP) + FLAG-TSG101 plasmids (A) or Gag-Venus + eCFP-TSG101 plasmids (C). After 48 hr, the VLP was collected by 20% sucrose cushion/ultracentrifugation method and the total cell lysates were prepared for Western blot analysis. The Gag intensity of VLP and cell lysate in A and C were compared in B and D, respectively.