

第16回日本エイズ学会シンポジウム記録

SIV Gp120 コアの機能領域に付加する糖鎖の役割

富田 康浩¹⁾, 横山 勝¹⁾, 仲宗根 正²⁾, 永井 美之³⁾, 佐藤 裕徳¹⁾¹⁾ 国立感染症研究所遺伝子解析室²⁾ 国立感染症研究所エイズ研究センター³⁾ 富山衛生研究所

要旨 : SIVmac239 株 Env Gp120 の C2V3 領域に付加する N 結合型糖鎖は、ウイルス感染性の発現に必須である。一連の糖鎖変異体を用いた生化学解析、および Gp120 分子モデルを用いた立体構造解析により、C2V3 領域の糖鎖は Env 前駆体の高次構造形成と成熟には必要ないこと、完成した Gp120 分子もしくは Gp120-Gp41 複合体の機能発現に関与する可能性があること、の 2 点が判明した。これらの知見は、レンチウイルス Gp120 に多数付加する糖鎖について、免疫逃避以外の役割を調べる基盤となる。

キーワード : Env Gp120, 立体構造形成, 糖鎖

日本エイズ学会誌 5 : 89-91, 2003

緒言

新規合成ペプチドに付加する糖鎖は、細胞内における蛋白質の折り畳み、品質管理、選別と輸送において重要な役割を果たす。また、完成した蛋白質において分子間相互作用に重要な役割を果たす。霊長類レンチウイルスの Env Gp120 では 20 箇所以上で N 結合型糖鎖が付加し、一般にはウイルスの免疫逃避に関与するとされる。しかし、Gp120 の糖鎖が蛋白質前駆体の立体構造形成と機能発現に果たす役割はほとんど不明である。

SIVmac239 株 Gp120 の C2V3 領域に付加する N 結合型糖鎖 (N278, N284, N295, N316) はウイルス感染性の発現に必須である¹⁾。本報告では、これらの糖鎖が Env 前駆体の立体構造形成と成熟に果たす役割、および完成した Gp120 における糖鎖の 3 次元情報について解析した。

方法

抗体, 細胞. 小胞体分子シャペロン抗体²⁾ は平秀晴博士 (岩手大学), 感染サル血漿は森一泰博士 (国立感染症研究所), MAGIC-5A 細胞³⁾ は, 巽正志博士 (国立感染症研究所) より分与された。

Env 前駆体成熟過程の解析. SIV DNA¹⁾ を HeLa 細胞に導入し, ① Env 前駆体の小胞体分子シャペロン結合能, ② Env 前駆体開裂感受性, ③ Gp120 の細胞表面発現, ④ 膜表面 Env の融合能, ⑤ Gp120 のウイルス粒子への取込みに

ついて, パルスチェイス免疫沈降法, 間接蛍光抗体法, MAGIC-5A 融合アッセイ, ウイルス粒子のウエスタンブロットにより解析した。

SIV Gp120 の立体構造モデル作製. カナダ CCG 社の統合計算化学システム MOE⁴⁾ を用い, HIV-1 Gp120 結晶構造 (PDB 番号 1G9M)⁵⁾ を鋳型としてホモロジーモデリング法により SIV Gp120 モデルを作製した。次いで, モレキュラービルダーを用いて糖鎖分子を結合させ, エネルギー最小化により熱力学的に最も安定な糖鎖の位置を決定した。

結果

1. 全ての糖鎖欠失変異体は ① 小胞体分子シャペロン (カルネキシンおよびカルレティキュリン) との結合能を有し, 解離速度 ($t_{1/2} = 25 \text{ min}$) に有為差は無かった, ② 開裂感受性であった, ③ 細胞表面に輸送されて発現した, ④ 細胞膜上で膜融合能を有した, ⑤ ウイルス粒子に取り込まれた (表 1)。
2. 一次配列上近接する C2V3 領域の糖鎖は, Gp120 の異なる表面に分散していた。N295 は CD4 結合溝, N284 は Gp41 との推定結合領域, N278, N316 は CCR5 推定結合部位, とそれぞれ Env の機能発現上重要な領域の近傍に付加することが判明した (図 1)。

考察

本研究の結果は, レンチウイルス Gp120 糖鎖の役割について免疫逃避以外の新たな役割を示唆する。すなわち, 糖鎖の一部は, 完成した Gp120 分子もしくは Gp120-Gp41 複合体の機能発現に必須の役割を果たしている可能性がある。また, 新たな課題も提出する。細胞内には糖鎖を介す

著者連絡先: 佐藤裕徳 (〒208-0111 東京都武蔵村山市学園 4-7-1 国立感染症研究所遺伝子解析室)

Fax : 042-567-5632, E-mail : hirosato@nih.go.jp

2003 年 4 月 2 日受付

表 1 糖鎖変異体 Env 前駆体の成熟過程

Gp120 ID ^a	小胞体		ゴルジ体	膜局在	
	結合活性 calnexin	calreticulin	Gp160 開裂	細胞膜	ウイルス粒子
wt	+	+	+	+	+
N278Q	+	+	+	+	+
N284Q	+	+	+ ^b	+ ^c	+ ^d
N295Q	+	+	+	+ ^c	+
N316Q	+	+	+	+	+ ^d
N460Q	+	+	+	+	ND
N479Q	+	+	+	+ ^c	ND

^a wt ; 野生株, N278Q, N284Q, N295Q, N316Q, C2V3 糖鎖欠損株 (感染性消失株), N460Q, N479Q ; C 末端糖鎖欠損株 (感染性昂進株)

^b 開裂効率は野生株の 1/5 に低下。

^c Gp120 単抗体を用い, 立体構造変化が検出された。

^d Gp120 量は野生株の 1/5~1/3 に低下。

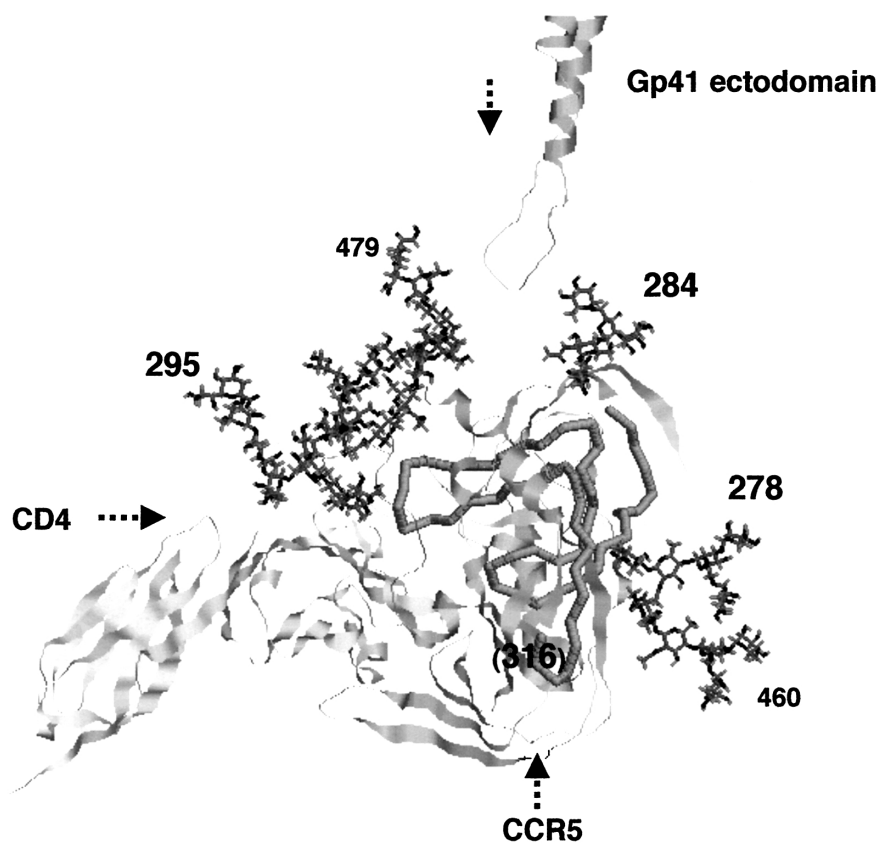


図 1 SIV Gp120 C2V3 領域に付加する糖鎖の位置

方法に従い SIVmac239 Gp120 の N278, N284, N295, N460, N479 に糖鎖を結合させた分子モデルを作製した。(N316) ; モデルは V3 ループの大半を欠いているため, 糖鎖付加するアミノ酸残基のおよその位置を示してある。蛋白質の主鎖はリボンモデル, 糖鎖はワイヤーフレームモデルで表示。C2V3 領域は, スティックモデルで表示。Gp120 に対するヒト CD4⁵⁾, SIV Gp41⁶⁾, CCR5 のおよその相対的配置を示してある。

る蛋白質品質管理機構が存在し、糖鎖の欠失はしばしば蛋白質の成熟に致死的影响をもたらす。しかし、Gp120の成熟は例外的に糖鎖欠失に寛容であった。多数の糖鎖をもつGp120では、少数の糖鎖しか付加されない一般的な膜糖蛋白質に比べ、糖鎖を介する未成熟状態の提示と適切な折り畳みがより効率的におきている可能性がある。これら2つの可能性は、今後の重要な検討課題と考えている。

謝辞：本研究は平成14年度厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）による「HIV及びその関連ウイルスの増殖機構及び増殖制御に関する研究」の一環として実施された。

文 献

- 1) Ohgimoto S, Shioda T, Mori K, Nakayama EE, Hu H, Nagai Y : Location-specific, unequal contribution of the N glycans in simian immunodeficiency virus gp120 to viral infectivity and removal of multiple glycans without disturbing infectivity. *J Virol* 72 : 8365-8370, 1998.
- 2) Tomita Y, Yamashita T, Sato H, Taira H : Kinetics of interactions of sendai virus envelope glycoproteins, F and HN, with endoplasmic reticulum-resident molecular chaperones, BiP, calnexin, and calreticulin. *J Biochem* 126, 1090-1100, 1999.
- 3) Hachiya A, Aizawa S, Tanaka M, Takahashi Y, Ida S, Gatanaga H, Hirabayashi Y, Kojima A, Tatsumi M, Oka S : Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 by using CCR5-expressing HeLa/CD4⁺ cell clone 1-10 (MAGIC-5). *Antimicrob Agents Chemother* 45 : 495-501, 2001.
- 4) MOE 2002.03 ; Chemical Computing Group Inc., Montreal, QC, Canada. [http : //www.chemcomp.com/](http://www.chemcomp.com/)
- 5) Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA : Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393 : 648-659, 1998.
- 6) Caffrey M, Cai M, Kaufman J, Stahl SJ, Wingfield PT, Covell DG, Gronenborn AM, Clore GM : Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41. *EMBO J* 17 : 4572-4584, 1998.