

第20回日本エイズ学会シンポジウム記録

Gag 蛋白質の輸送と機能の制御

Regulation of GAG Trafficking and Functions

村上 努¹, Heinrich G. Göttlinger², 森川 裕子³, 駒野 淳¹, 梁 明秀⁴, 佐藤 裕徳⁵¹ 国立感染症研究所・エイズ研究センター² University of Massachusetts Medical School³ 北里大学北里生命科学研究所・感染制御科学府⁴ 横浜市立大学医学部・分子病理学教室⁵ 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター

はじめに

20世紀後半に顕在化した HIV 感染症は全世界に広まり、現在も大きな社会的被害をもたらしている。この問題に対処するために、2つの開発研究が精力的に進められている。1つは、HIV 感染の予防または治療効果をもつワクチンの開発である。しかし、現在、ヒトでの有効性が確認されたワクチンは無い。他の1つは、抗 HIV 活性をもつ低分子化合物を利用した化学療法の開発である。現在、HIV-1 逆転写酵素とプロテアーゼの阻害剤を用いた多剤併用療法 (HAART) がエイズ発症阻止に効果を上げ、先進国では HIV 感染者の致死率が劇的に低下している。しかし、現行の HAART は根治治療ではなく、恒常的に抗 HIV 薬を服用する必要がある。このため、薬剤の副作用、あるいは薬剤耐性 HIV の発生と蔓延による治療効果の低減が大きな問題となっている。そこで、現在、1) 薬剤耐性ウイルスが出現しにくく、副作用の少ない抗 HIV 薬、2) 既存の抗 HIV 薬とは異なる作用点をもつ新規抗 HIV 薬、などの開発が進められている。これらの開発の基礎になるのは、ウイルスの複製機構の研究である。

ウイルスの複製機構の研究は、また、生命科学の進展に寄与する。ウイルスは、細胞の様々な代謝装置を利用して複製する。ウイルスの複製機構を知ることは、細胞の営みを分子レベルで理解することに他ならない。本シンポジウムでは、HIV 複製の後期過程の研究に焦点を当て、特に HIV Gag 蛋白質にまつわる話題を紹介する。レトロウイルスの Gag 蛋白質はウイルス粒子形成の鍵を握っており、現在、HIV 基礎研究の中心の1つになっている。最近の研究結果は、ミリスチル化した Gag がどのように細胞の中を運ばれ、細胞膜に結合し、集合して粒子を形成し、細胞外へ放出されるかを解明しつつある。シンポジウム4で

は、それら最先端の研究成果を報告する。

S4-1. Gag 蛋白質の機能と輸送に関する概説
Review on Gag functions and trafficking

Heinrich G. Göttlinger (Program in Gene Function and Expression, Program in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical School)

Göttlinger 博士には、Gag 蛋白質の機能と輸送について概説していただく予定であったが、先生のご希望により、HIV-1 粒子の放出過程に関する現在の知見とご自身のご研究 (L domain に結合する細胞蛋白質の制御機構の研究) を紹介していただいた。ここでは紙面の都合で前者のみ紹介する。後者については最近発表された論文を参照されたい (PNAS, 103, 19140, 2006)。

HIV-1 粒子の放出過程に関する現在の知見

感染細胞内で合成された HIV-1 蛋白質とゲノム RNA は、細胞膜に運ばれて組み立てられ、最終的に細胞膜から子孫ウイルス粒子として放出される。HIV-1 粒子の放出過程は、Gag 蛋白質の p6 領域中に存在する "Late (L) domain" モチーフにより制御される。L domain の配列は高度に保存されており、2種類の結合モチーフが報告されている。近年の研究により、L domain は、細胞内の特定の細胞分子群を Gag 周辺に集合させるためのプラットフォームとして働くことが明らかにされつつある (図1)。

L domain 結合モチーフの1つは PTAPモチーフと呼ばれ、TSG101 (ESCRT [endosomal sorting complex required for transport]-I complex の構成成分) との結合活性をもつ。TSG101 は、ESCRT-I complex の構成成分である Vps28 や Vps37 と相互作用することが知られており、MVB (multivesicular body) 形成に関与する蛋白質の膜小胞への取込みに関わる。PTAPモチーフに変異を導入する、あるいは細胞内の TSG101 発現をノックダウンすると、ウイルス粒子

著者連絡先: 佐藤裕徳 (〒208-0011 武蔵村山市学園4-7-1 国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター)

2007年4月23日受付

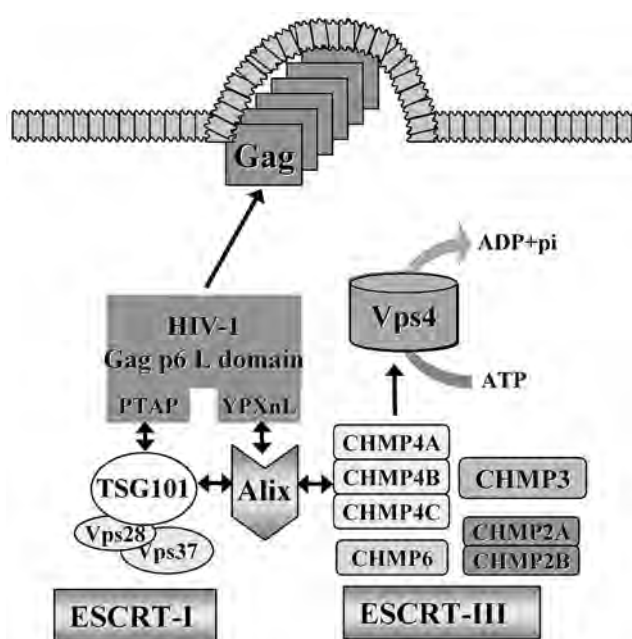


図 1 HIV-1 放出における Gag 蛋白質 L domain の役割のモデル：細胞の MVB 生合成経路関連蛋白質群を Gag 周辺に集合させ、ウイルス粒子の放出を推進するためのプラットフォームとして働く。

の放出が阻害される。これらの知見から、PTAP モチーフは、TSG101 結合を通じてウイルス粒子の放出過程に必要な膜輸送蛋白質群を Gag に引き寄せると推測されている。

L domain の他の 1 つの結合モチーフは YPXnL モチーフと呼ばれ、Alix (AIP1) との結合活性をもつ。最近酵母の Alix ホモログがやはり MVB 経路の機能発現に必要であることが示されている。Alix は TSG101, および CHMP 4 (ESCRT-III complex あるいは CHMPs [charged MVB proteins] と呼ばれる蛋白質複合体の構成成分) と相互作用することが知られている。ESCRT-III complex は、CHMP 2, CHMP3, CHMP4, CHMP6 からなり、CHMP6 は N 末端がミリスチル化され細胞膜にアンカーし、CHMP3 も細胞膜の内側と相互作用する。最後に ESCRT-III complex に ATPase Vps4 がリクルートされる。Vps4 は ESCRT-III complex を分解して、MVB 経路にリクルートされた蛋白質群の再利用を促すことが知られている。Alix, ESCRT-III complex と Vps4 のドミナントネガティブ変異体が HIV-1 放出の最終段階を顕著に阻害するので、これらの宿主蛋白質もウイルスの放出に必要な因子であると考えられている。

このように、L domain の機能解析をきっかけとして、HIV-1 粒子の放出に関与する細胞蛋白質の実体が徐々にわかってきた。HIV-1 は、細胞の MVB 生合成経路に関わる

一連の蛋白質群を利用してウイルス粒子を放出するという概念が形成され、検証が進められている。MVB は、本来は、分解される運命にある蛋白質を選別して後期エンドソーム内部へ輸送し、放出する役割を担う。HIV-1 は、感染後期に、この装置の一部を拝借して粒子放出に利用することになる。このしくみの鍵を握る因子が、L domain である。この領域と相互作用する細胞蛋白質の同定を手がかりとして、ウイルス粒子の放出に関与する細胞因子群の全容を明らかにする試みが進んでいる。今後の進展が楽しみな研究分野の 1 つと言える。

S4-2. HIV 非ミリスチル化 Gag 蛋白質によるドミナントネガティブな粒子形成阻害 Dominant negative inhibition of HIV particle production by the non-myristoylated form of Gag

森川裕子 (北里大学・北里生命科学研究所 感染制御科学府)

Yuko Morikawa (Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University)

HIV の主構造蛋白質である Gag 蛋白質は、その蛋白質合成に伴ってアミノ末端グリシンにミリスチル化を受けて細胞膜へ targeting し、assembly すなわち多量体形成によりウイルス粒子を形成して出芽する。このアミノ末端ミリスチル化は Gag 蛋白質の細胞膜 targeting ひいては粒子産生に必須であり、この修飾のない Gag 蛋白質すなわち非ミリスチル化 Gag 蛋白質では膜に結合できず粒子も産生されないことが知られている。こうした非ミリスチル化 Gag 蛋白質は機能不全なだけであると考えられてきたが、本研究ではこの非ミリスチル化 Gag 蛋白質が HIV 粒子産生をドミナントネガティブに阻害することを明らかにするとともに、その分子機構の解明を行なった。

HIV 分子クローン (pNL432 株) をベースにしたミリスチル化及び非ミリスチル化 Gag 蛋白質 (必要に応じて、カルボキシル末端に Flag あるいは HA tag を付加した) 発現 construct を作製した。この両者を 1:1 で HeLa 細胞において共発現させると、Env 蛋白質の HIV 粒子への incorporation や Gag 蛋白質の processing に影響はないものの、粒子産生量は顕著に (1/10-1/20 に) 減少した。この粒子産生の阻害効率は非ミリスチル化 Gag 蛋白質の発現量と相関し、ミリスチル化:非ミリスチル化が 1:3 の場合には粒子がほとんど産生されなくなった。こうしたドミナントネガティブな阻害機構を解明する目的で、共発現細胞における Gag 蛋白質の膜結合と多量体形成を調べた。まず Gag 蛋白質の膜及びラフトへの親和性を mem-

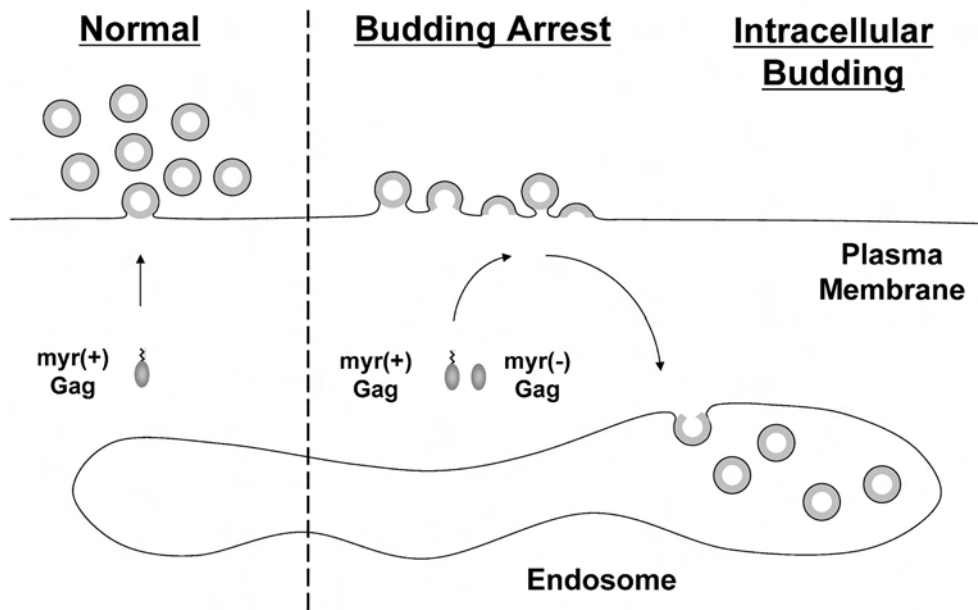


図 2 Myr (-) Gag による HIV-1 粒子放出に対するドミナントネガティブな阻害

brane floatation 法で調べた。非ミリスチル化 Gag 蛋白質はそれ単独では膜に結合できないが、共発現細胞ではミリスチル化 Gag 蛋白質と co-assembly し膜及びラフト画分に incorporate する、すなわち非ミリスチル化 Gag 蛋白質は膜 targeting の段階を阻害していないことが判明した。Gag 蛋白質には複数の assembly 領域すなわち多量体形成ドメインが存在するが、この主な領域である NC 領域を利用し、次に多量体形成の段階を調べた。非ミリスチル化 Gag 蛋白質の代わりに NC 領域を欠損させた非ミリスチル化 Gag 蛋白質を共発現させたところ、驚いたことに粒子産生量が回復した。これは観察されていたドミナントネガティブな阻害が NC 領域を介した多量体形成の段階であることを示唆する。共焦点レーザー顕微鏡及び電子顕微鏡で調べたところ、共発現細胞では細胞膜での粒子出芽阻害とエンドソームへの細胞内出芽が観察されるとともに、後者が時間経過とともに増加する現象が観察された。これらの結果は、非ミリスチル化 Gag 蛋白質は 1) ミリスチル化 Gag 蛋白質と co-assembly して膜及びラフト画分に incorporate するものの、2) NC 領域を介した高分子な多量体形成の段階でドミナントネガティブに作用し、3) 粒子出芽を停止させる。4) その後、エンドサイトーシスにより取り込まれ、その過程でエンドソーム内に出芽した可能性を示唆している (図 2)。

Gag 蛋白質ミリスチル化は粒子産生に不可欠であるものの、宿主細胞酵素による反応であることから、抗 HIV 薬の標的には難しいと考えられてきた。しかし本研究によ

り、粒子産生を阻害するためには Gag 蛋白質の完全なミリスチル化阻害が必要ではなく、(細胞毒性が出ない程度の) 部分的なミリスチル化阻害であっても粒子産生を阻害するには十分である可能性が示された。このように、Gag 蛋白質ミリスチル化は抗 HIV 薬の標的として再考する価値があると思われる。

本研究は川田茂雄博士 (東大・総合文化)・後藤俊幸博士 (京大・医)・小野陽博士 (ミシガン医科大) との共同研究である。

S4-3. ミリスチル化非依存的な HIV-1 Gag の assembly および virus-like particle 産生 Myristoylation independent assembly, transport, and VLP formation of HIV-1 Gag

駒野 淳 (国立感染症研究所・エイズ研究センター)

Jun Komano (AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases)

レトロウイルスの Gag タンパク質は単独で細胞から virus-like particle (VLP) を産生・放出することができる。そのため Gag の VLP 産生メカニズムの解析はウイルス-宿主相互作用の分子機構を理解するためのよいモデルである。HIV-1 や MLV の Gag は N 末端がミリスチル化を受ける。ミリスチル化が Gag の細胞膜 targeting それに

続く Gag の集合・細胞表面への輸送・budding に必須であると考えられてきたが、その実験的検証は間接的であった。我々はこの命題を直接的実験により検証した。

HIV-1 と MLV 由来の Gag に焦点を当てて、Gag のミリスチル化シグナルを欠失させたうえで N 末端に CD4, CD8, CXCR4, CCR5 を融合させた。これらを細胞に発現させ、細胞内局在、培養上清中への VLP 産生の有無、VLP 産生効率、VLP の物理的性質などを解析した。膜タンパク質はしばしば改変によりタンパク質発現および膜 targeting 効率が著しく低下するが、驚くべきことに膜タンパク質融合型 Gag-GFP は本来期待される topology 通りに発現し、細胞表面に集合し、VLP 産生能を有することが明らかとなった。VLP の物理的性質は、比重で比較すると Gag-GFP とほぼ同等であった。また、Gag-GFP 存在下により膜タンパク質融合型 Gag-GFP の VLP 産生増強が認められることから、膜移行ルートを経時的に vesicular sorting pathway (VPS) に改変しても、膜タンパク質融合型 Gag-GFP は機能的に Gag-GFP と相互作用する、つまり Gag が集合し出芽するルートは Gag-GFP と「交差」し同様のメカニズムで budding することが示唆された (図 3)。しかし膜タンパク質融合型 Gag-GFP の VLP 産生効率は Gag-GFP に比べ約 1/100 であった。

以上の結果から以下のことが考察された。Gag budding は lipid raft から起こること、さらに形質膜へ移行する前に multivesicular body (MVB) への一過性局在が Gag budding 効率に重要であろうとの仮説が提唱されている。膜タンパク質融合型 Gag-GFP の形質膜における compartmentalization および形質膜への targeting ルートは膜タンパク質の性質に左右されると考えられる。CD4 は lipid raft へ局在し、CXCR4 は局在しないが、両者をシグナルにもつ Gag が共に VLP を産生することから、Gag budding は必ずしも lipid raft への局在が必須ではないことが示唆された。また、膜タンパク質融合型 Gag-GFP は形質膜へ移動する前に MVB へ移行できないと考えられるので、Gag は形質膜へ移動する前に一過性に MVB へ「寄り道」することが必ずしも budding に必須ではないことも示唆された。ほぼすべてのレトロウイルス Gag がミリスチル化されることは進化的にミリスチル化が有利であったであろうことを推測させる。本研究結果はこの仮説のよりどころとなる実験データを与える。例えば限られた容量しかないゲノムに効率よく複製に必要な遺伝子をもたねばならないことを考えると、gag-pol, env という遺伝子構成ではなく、env-gag-pol のほうが遺伝子構成は単純であったはずである。にも関わらずあえてミリスチル化が選択されてきたのは、少なくともウイルス産生効率を維持するためであったと考えられる。もちろん病原性や宿主免疫からの逃避と

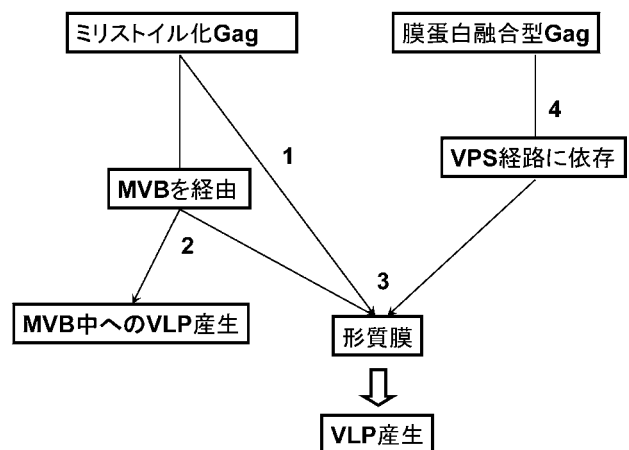


図 3 ミリスチル化 Gag と膜結合型 Gag の細胞内輸送経路と VLP 産生

機能ドメインを類似するものと置換することで Gag の機能を新たな視点でとらえることができる。(1) Gag 輸送経路は未解明な点が多い。Gag 合成後「直接」細胞膜に輸送されるルートと (2) MVB を経由するルートの存在が示唆されている。マクロファージを含む一部の細胞種では MVB 中への VLP 産出が示唆されている。(3) VLP 産生に至る前にミリスチル化 Gag と膜タンパク質融合型 Gag は相互作用するため、Gag の集合や出芽を支える分子機構は同等と推測される。(4) Gag 輸送経路を強制的に VPS 経路に改変させることにより、VLP 産生はミリスチル化および輸送経路非依存的であることが証明された。

いう点からも env-gag は不利であった可能性もある。本研究結果により、レトロウイルスの進化および複製に関する興味深い知見が得られた。今後この系を用いた基礎・応用研究への発展が期待される。

S4-4. SOCS-box 蛋白質は HIV 感染で誘導される新規宿主因子である

Role of SOCS-box proteins in HIV-1 infection and trafficking of the HIV-1 Gag

梁 明秀 (横浜市立大学医学部・分子病理学教室)

Akihide Ryo (Department of Pathology, Yokohama City University School of Medicine)

今回われわれは HIV-1 複製に関わる宿主因子を同定するため、SAGE (serial analysis of gene expression) 法を用いて、HIV-1 感染に伴って発現の変動する遺伝子の同定を

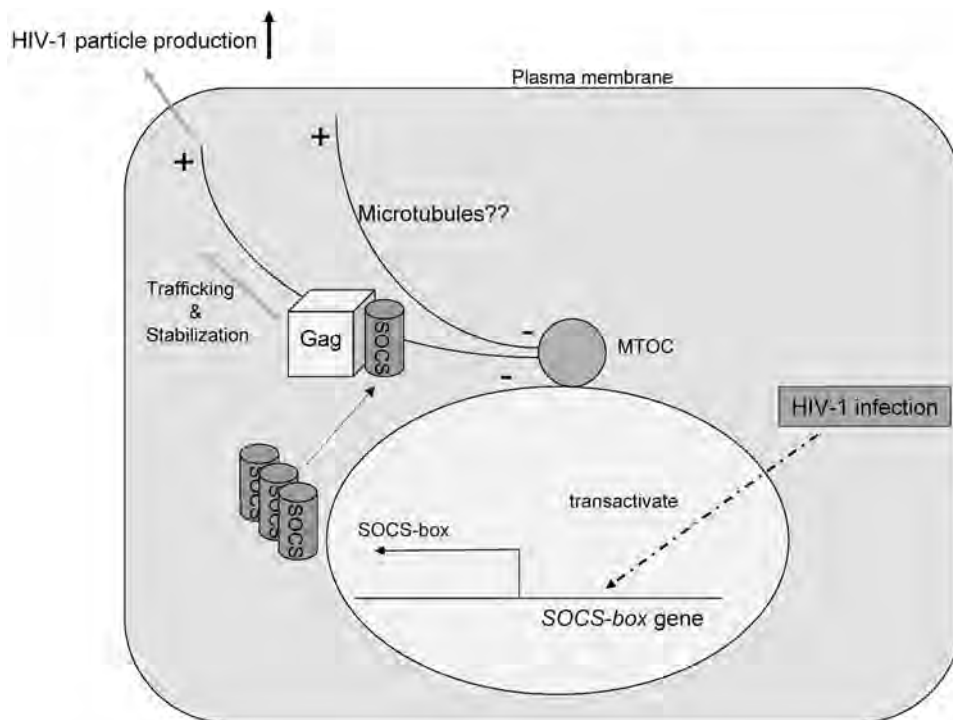


図 4 SOCS-box 蛋白質による HIV-1Gag 蛋白質の安定性と細胞膜への輸送（ウイルス産生）の促進

行なった。具体的には HIV-1 感染および非感染 MOLT-4 細胞から total RNA を抽出し、SAGE ライブラリーを作製後、シーケンスおよび SAGE タグデータ解析を行なった。その結果、全体で 142609 タグを同定し、これらは 43581 遺伝子に相当する。その後のデータベースサーチなどにより、発現の上昇した遺伝子群は主に以下の 4 つに分類された。

- (1) genes related to cell activation and signaling pathways,
- (2) transcription factors, (3) interferon-induced genes and
- (4) miscellaneous genes.

また、発現の低下した遺伝子群は主に以下の 4 つに分類された。

- (1) mitochondrial proteins and antioxidants, (2) actin-related factors, (3) translational factors and (4) miscellaneous genes.

上記については 5 倍以上の発現量の差を有意として検討を行なったが、その後の詳細な解析によりさらにいくつかの遺伝子の発現上昇が確認された。その中の 1 つに SOCS-box 蛋白質の発現が HIV 感染細胞において有意に増加することが確認された。

われわれはこの遺伝子産物が SOCS-box を有し、ユビキチンリガーゼとして機能することから、HIV 蛋白質の翻訳後修飾に関与する可能性があると考え、この遺伝子に着目してさらなる解析を行なった。

まず、SOCS-box 遺伝子が、MOLT-4 のみならず、MT-4, Jurkat といった他の T 細胞株や CD4+ ヒト末梢単核球においても、HIV 感染に伴って発現が上昇することが明らかになった。次に、293T 細胞を用いた解析により、SOCS-box 遺伝子を強制発現すると、ウイルス産生（細胞内および細胞外 p24 量）が顕著に増加した。SOCS-box の強制発現が HIV-LTR の活性に影響しなかったことより、われわれは SOCS-box 蛋白質がウイルス蛋白質に直接作用するのではないかと考えた。そこで、SOCS-box 蛋白質と Gag 蛋白質の結合を調べたところ、SOCS-box 蛋白質は Gag の MA および NC 領域に結合することが明らかになった。パルスチェース実験の結果等により、SOCS-box 蛋白質は Gag に結合し、Gag 蛋白質の安定性と細胞膜への輸送を促進することが明らかになった。これらの効果を証明するために、SOCS-box 遺伝子発現を siRNA で抑制すると、Gag の細胞内輸送が阻害され、ウイルス産生も有意に低下した。これらの結果は SOCS-box 蛋白質が HIV 感染により誘導され、Gag 蛋白質の輸送や安定性に寄与する新規の宿主因子であることを示唆するものである（図 4）。

おわりに

近年、HIV Gag 蛋白質の細胞内輸送とウイルス粒子産生に関わる可能性のある細胞蛋白質が、続々と報告されて

いる。しかし、その役割がきちんと立証されてコンセンサスを得たものはまだ少ない。現在は、数多くある細胞内の酵素、膜輸送系蛋白質群、HIV感染により発現が誘導される蛋白質群などの中から、ウイルス複製に関わる蛋白質の有力候補を選定している段階にある。本シンポジウムで、一線の研究者にその一端を紹介していただいた。一方、ゲノム科学、細胞生物学、構造生物学等の進展により、細胞蛋白質の立体構造、相互作用、生理機能等に関する情報が

急速に蓄積している。これらの研究分野が互いに連携しながら発展することで、近い将来、HIV複製の後期過程についてより鮮明な像を描ける日が来るであろう。新たに合成されたウイルス分子がどのような経路で細胞内を移動し、どのようなしくみを使って細胞膜で集合し、細胞外に放出されるのかははっきりすることで、HIVの増殖に介入する新たな方法が開発されると期待している。