

第21回日本エイズ学会シンポジウム記録

HIV 増殖とその制御分子

HIV and Host Factors in HIV Infection

座長：小柳 義夫¹，森川 裕子²発表者：塩田 達雄³，高折 晃史⁴，増田 貴夫⁵，Paul Spearman⁶Chairman : *Yoshio KOYANAGI*¹, *Yuko MORIKAWA*²Speakers : *Tatsuo SHIODA*³, *Akifumi TAKAORI-KONDO*⁴,
*Takao MASUDA*⁵ and *Paul SPEARMAN*⁶¹ 京都大学ウイルス研究所・〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53 ykoyanag@virus.kyoto-u.ac.jp, ² 北里大学北里生命科学研究所・〒108-8641 東京都港区白金 5-9-1 morikawa@lisci.kitasato-u.ac.jp³ 大阪大学微生物病研究所・〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-1 shioda@biken.osaka-u.ac.jp, ⁴ 京都大学医学研究科・〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54 atakaori@kuhp.kyoto-u.ac.jp, ⁵ 東京医科歯科大学歯学総合研究科・〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45 tmasu.impt@tmd.ac.jp,⁶ Emory University School of Medicine・Atlanta, GA 30322, USA paul.spearman@emory.eduキーワード：HIV, TRIM5 α , APOBEC3G, Integrase, Gag

1. はじめに

第21回エイズ学会において企画されたシンポジウム13「HIV増殖とその制御分子」の概要について報告する。

本シンポジウムは、HIV感染における増殖過程を分子から理解し、新たな抗HIV戦略を見出す研究の現状を紹介することを目的とした。近年、HIV増殖を抑制する宿主細胞因子としてTRIM5 α ならびにAPOBEC3Gが同定され、その分子機序の解明が急速に進んでいる。前者はウイルスUncoatingの段階を抑制する。TRIM分子群は標的分子のユビキチン化に関与するものが多いが、TRIM5 α の抗HIV作用の機序はいまだ不明の点が多い。後者はウイルスRNAがDNAに逆転写する段階に働き、cytidine deaminaseをつかさどる酵素である。これらの分子機序の解説をTRIM5 α について塩田博士が、APOBEC3Gについて高折博士が紹介した。これら抑制因子はウイルスと宿主の進化過程において、それぞれ生じてきた分子群であり、生物の進化にどのように関わってきたのか今後の研究成果が期待される。一方、HIVはきわめて巧妙に宿主細胞内の分子を利用して、ウイルスの複製を行う。後半の講演では、その細胞内ウイルス複製の分子機序の理解を目的とした。ウイルスDNAの染色体組み込みに働くインテグラーゼについて増田博士が、そして、ウイルス構造蛋白であるGag蛋白の細胞内移動と集合過程についてアメリカEmory大学のSpear-

man博士が最近の成果を紹介した。細胞内コンパートメントを合目的に移動するウイルス蛋白の研究は、細胞科学的にもきわめて重要なテーマである。これら4人のシンポジウムの講演により、エイズ研究におけるウイルス分子生物学研究の最新知見を理解した。きわめて基礎的なテーマを取り上げたが、HIV研究はその成果が抗ウイルス薬の開発などの理論的基幹をなすので、応用研究へもインパクトは大きいと考えた。

2. 各シンポジストの発表内容

① レトロウイルス増殖阻害因子TRIM5 α

塩田 達雄

近年、細胞内に存在するウイルス増殖阻害因子が注目を集めている。2002年のAPOBEC3Gの発見に引き続き2004年にはTRIM5 α が新たなレトロウイルス抵抗性因子として同定された¹⁾。本稿ではTRIM5 α についてウイルス側のTRIM5 α 感受性決定基の同定を行った我々の最近の知見を紹介する。

HIV-1は宿主域が狭く、ヒト以外に感染する動物はチンパンジーのみであり、アカゲザル、カニクイザル、アフリカミドリザル等の旧世界ザルには感染しない。HIV-1はサル細胞に侵入はするものの、それ以降の過程が効率よく進行しないために、遺伝子発現には至らない。2004年2月26日号のNature誌に、アカゲザルのcDNAライブラリーの中からHIV-1の感染を抑制するTRIM5 α が同定されたと論文が掲載された。この論文の中で、アカゲザルのTRIM5 α はサル免疫不全ウイルスであるSIVmac239の感染を全

著者連絡先：小柳義夫（〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53 京都大学ウイルス研究所）

2008年4月17日受付

く阻害できないが HIV-1 の感染を阻害し、その効果は、siRNA によって TRIM5 α の発現をノックダウンすると失われることが示された。ところで、HIV-1 と SIVmac のキメラウイルス SHIV の研究からカプシド蛋白が SIVmac 由来でなければサルには感染できないことが以前から知られていた。ではカプシド蛋白の中のどの領域だろうかという疑問に至った。

我々は HIV2 型 (HIV-2) に着目した。HIV-2 は HIV-1 とは異なり分離株によってはサルに感染することが知られていたからである²⁾。UCSF の Levy 教授から分与された UC1, UC2, UC7, UC12, UC14, 9421, 12741 の 7 株と徳島大の足立教授が樹立した GH123 分子クローン由来のウイルス、合計 8 株に対するカニクイザル TRIM5 α の感染抑制効果を調べた。GH123 と UC12 の 2 株がカニクイザル TRIM5 α に対して感受性 (TRIM5 α により感染が抑制される)、それ以外の 6 株はカニクイザルの TRIM5 α に耐性 (TRIM5 α の存在下でも感染は抑制されない) であった。各 HIV-2 株のカプシド蛋白をコードするウイルスゲノムの塩基配列を決定したところ、様々な変異が見られたが、感受性株 2 株だけが他の 6 株と異なる場所を 1 カ所だけに特定することができた。感受性株は 120 番目 (株によっては 119 番目) のアミノ酸がプロリン、耐性の株ではグルタミンあるいはアラニンであった。そこでカニクイザル TRIM5 α に感受性の GH123 株の分子クローンのカプシド蛋白の 120 番目のプロリンをアラニン (GH123-P123A) あるいはグルタミン (GH123-P123Q) に置換したところ、どちらの変異体もカニクイザル TRIM5 α 耐性に変化した (図 1)。逆にカニクイザル TRIM5 α 耐性の SIVmac のカプシド蛋白の対応する部位のグルタミンをプロリンに置換し

たところ、感受性に変化した。また、各ウイルス株のヒト TRIM5 α に対する感受性を検討したところ、やや程度が低下するもののカニクイザル TRIM5 α に耐性の株はヒト TRIM5 α に対しても耐性、カニクイザル TRIM5 α に感受性の株はヒト TRIM5 α に対しても感受性を示した³⁾。

次に HIV-2 カプシド蛋白の 120 番目のアミノ酸の変異がカプシド蛋白の三次元構造に及ぼす影響を検討するため、X 線による結晶構造が明らかになっている HIV-1 カプシド蛋白の三次元構造を基にして、HIV-2 カプシド蛋白の三次元構造をコンピュータで予測した。その結果、120 番目のアミノ酸はカプシド蛋白の 6 番目と 7 番目の α ヘリックスの間のループの中にあり、120 番目のアミノ酸がプロリンからグルタミンやアラニンに置換すると、120 番目のアミノ酸を含むループの構造が大きく変化することが明らかになった。これらの結果から、HIV-2 のカプシド蛋白の 120 番目のアミノ酸を含むループが TRIM5 α と直接結合するものと考えられた。

HIV-2 の祖先と考えられる SIV が持つグルタミン (TRIM5 α 耐性) のコドンは CAA または CAG、HIV-2 に見られるプロリンのコドンは CCN、アラニンは GCN であることから、まずプロリン (TRIM5 α 感受性) への変化が生じた上で TRIM5 α 耐性へ戻る変化が生じた結果アラニンになったと考えられる。ヒトの TRIM5 α の抗 HIV-2 活性は、サルの TRIM5 α に比較すると遥かに弱い。そのため SIV としては許容されなかったプロリン (TRIM5 α 感受性) を持つ株が HIV-2 としてヒトの間では存在可能となったのだろうが、おそらく最初の変化は細胞傷害性 T 細胞等からの逃避により生じたのではないかと筆者らは想像している。

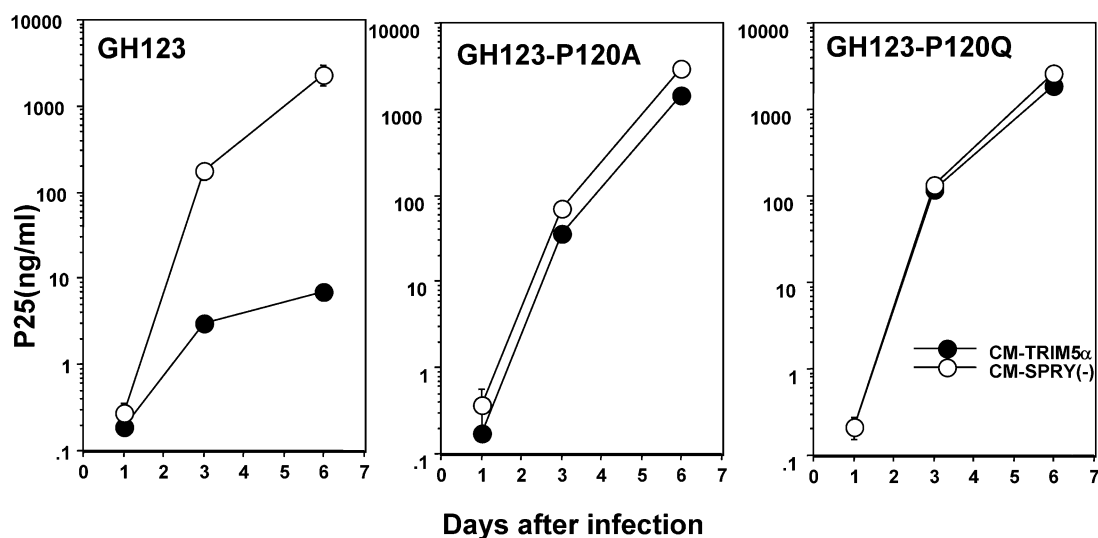


図 1 HIV-2 変異株のカニクイザル TRIM5 α 感受性

② 「抗 HIV-1 宿主因子 APOBEC3G と HIV-1 Vif」

高折 晃史

APOBEC3G は、逆転写の際に、ウイルス 1 本鎖 DNA に dC から dU への変異を導入することにより HIV-1 の複製を阻害する (図 2 の 1)⁴⁾。一方、Vif 蛋白は、本分子と結合しユビキチン-プロテアソーム系を介してこれを分解することでその抗ウイルス活性を抑え、ウイルス複製を助けている (図 2 の b)⁵⁾。言い換えると HIV-1 の複製は、これら分子間の相互作用によって制御されている。本シンポジウムでは、これら 2 つの分子の翻訳後修飾による活性調節に関して述べた。

まず、Vif 蛋白に関しては、Vif 自身がユビキチン化を受け、感染細胞内での半減期が非常に短いことを見出した。そこでこの原因と意義を明らかにするため、その E3 リガーゼの同定を試みた。我々が見出したのは、p53 の E3 リガーゼでもある MDM2 が、Vif 蛋白の E3 であるということである。具体的には、MDM2 の共発現は、細胞内での Vif 蛋白発現量を減らすことが、これは、プロテアソーム依存性に Vif 蛋白の安定性を低下させることによる。また、Vif は、MDM2 の中央部のドメインに特異的に結合する。さらに、*in vitro* および *in vivo* ユビキチンアッセイを用いて、それぞれにおいて MDM2 が Vif を確かにユビキチン化することを示した。これらのデータは、MDM2 が Vif の E3 リガーゼであることを示している。さらに、MDM2 は Vif の分解を介して、HIV-1 の複製を負に制御していることを、one cycle 感染系、およびマクロファージを用いた siRNA による MDM2 ノックダウンの系を用いて証明した。

次に、APOBEC3G に関しては、APOBEC3 ファミリー蛋白のひとつである AID は、最近 Protein kinase A (PKA) によるリン酸化によりクラススイッチレコンビネーション (CSR) 活性が調節されていることが報告された。APOBEC3G も本 PKA リン酸化部位を 2 箇所所有していることから、PKA によるリン酸化が APOBEC3G の機能調節を行っている可能性に関して検討した。まず、免疫沈降法により、APOBEC3G と PKA との結合を示した。次に、*in vitro* および *in vivo* リン酸化アッセイにより、PKA が、それぞれにおいて APOBEC3G のリン酸化を引き起こすこと、そのリン酸化部位が N 端側の T32 であることを示した。さらに、PKA によるリン酸化が APOBEC3G の抗ウイルス活性に与える影響を検討したところ、PKA による APOBEC3G のリン酸化は、Vif による APOBEC3G の中和に対する抵抗性を付与していることが示唆された。

以上の結果より、Vif および APOBEC3G は、翻訳後の修飾作用によりその機能が制御されていることを示しており、これらの修飾変換により新たな抗 HIV-1 薬の開発が可能であることを示唆するものである。非常に重要な知見で

あると考える。

③ インテグラーゼと相互作用する宿主因子と HIV 複製制御

増田 貴夫

我々は、これまで HIV-1 インテグラーゼがウイルスゲノムの組み込み過程に加え、脱殻、逆転写、核内輸送へ機能的にも関与することを明らかにしてきた⁶⁾。また、このインテグラーゼに保存されているアミノ酸残基のなかでウイルスの複製に必須とされる部位を特定し、インテグラーゼの構造と機能相関解析研究から新たな抗ウイルス戦略の確立を探っている。一方、HIV 感染初期過程における一連のウイルスゲノムの動的変化には、逆転写酵素およびインテグラーゼのウイルス由来蛋白のみでは不十分であり、宿主因子のサポートも必要とされる。こうした背景からインテグラーゼと相互作用する新規宿主因子の同定を試み、酵母 two-hybrid 法により新規インテグラーゼ相互作用宿主因子、Gemin2 を同定した⁷⁾。この因子はスプライシングに関与する small nuclear ribonucleoproteins (snRNP) 複合体の細胞質内アッセムブリおよび核内輸送に関与する survival motor neuron (SMN) 複合体の構成因子のひとつとして同定されていたが具体的な役割は未だ不明である。本研究は、ウイルス複製における Gemin2 の具体的な関与を明確にすることを目的とした。

まず、RNA 干渉および免疫沈降法による実験結果から、Gemin2 は HIV-1 感染後すみやかにインテグラーゼおよびプレインテグレーション複合体と相互作用し (図 3A)、ウイルスゲノムの逆転写過程への関与が示唆された (図 3B)。次に、Gemin2 の宿主因子とインテグラーゼの細胞内相互作用とそれらの機能を調べるために HIV-1 インテグラーゼの細胞内発現系を確立し、ウイルス複製における機能不全が確認されている種々のインテグラーゼ変異体もあわせて比較解析を行った。その結果、細胞内で発現させた HIV-1IN は非常に強く核内に局在した。Gemin2 をノックダウンさせた細胞においては、IN の核局在は保たれていたものの、安定性が低下することを見出した (図 3B)。さらに、インテグラーゼ点変異体解析実験から、逆転写過程に影響が及ぶそれでは Gemin2 との相互作用も失われることが確認された (図 3C)。これら逆転写活性低下変異体は Gemin2 結合モチーフの変異体とは異なることから、インテグラーゼの高次構造もしくは多量体形成が Gemin2 との相互作用に重要であることが強く示唆された。

これらの結果から Gemin2 は HIV-1 インテグラーゼのプロテアソーム依存的分解を抑制し、この分子を保護することで細胞内安定性に寄与することがわかった。このことは、インテグラーゼの安定性とは、ウイルス複製における

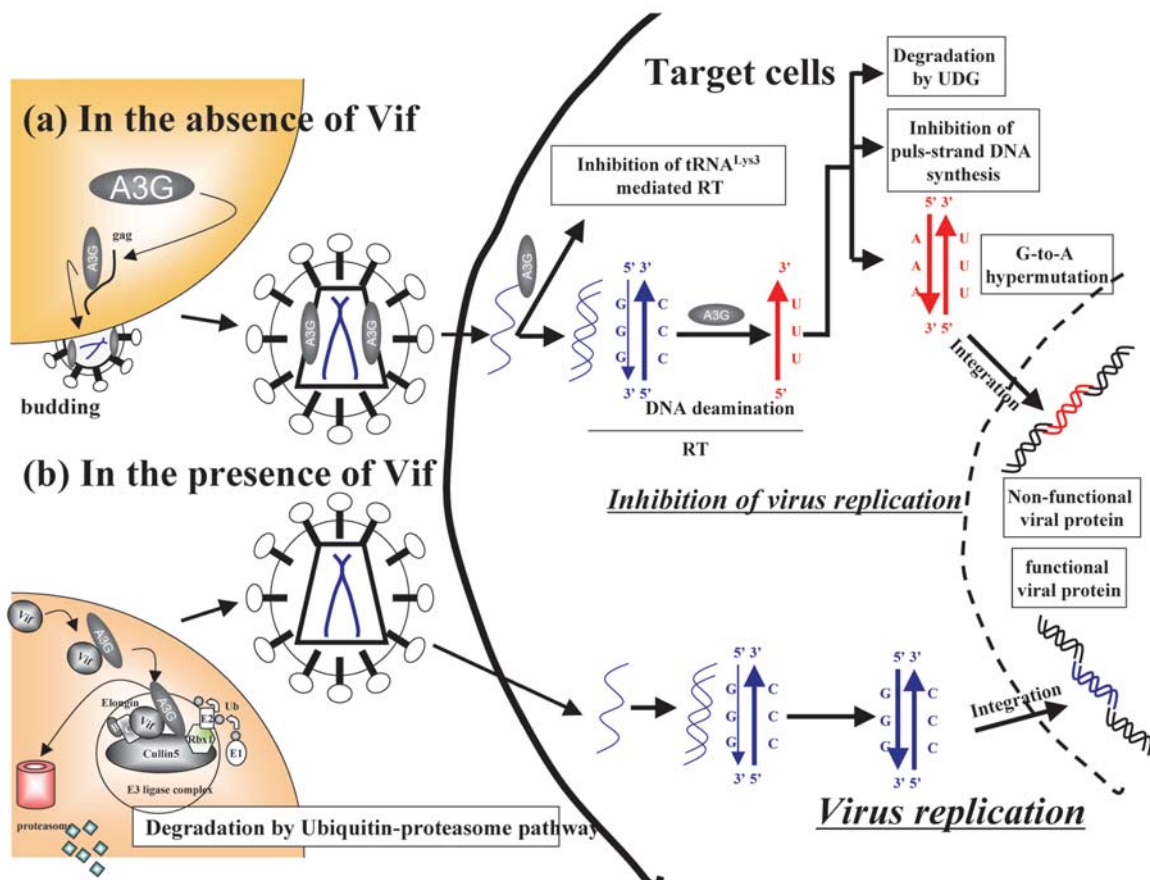


図 2 APOBEC3G/Vif の相互作用

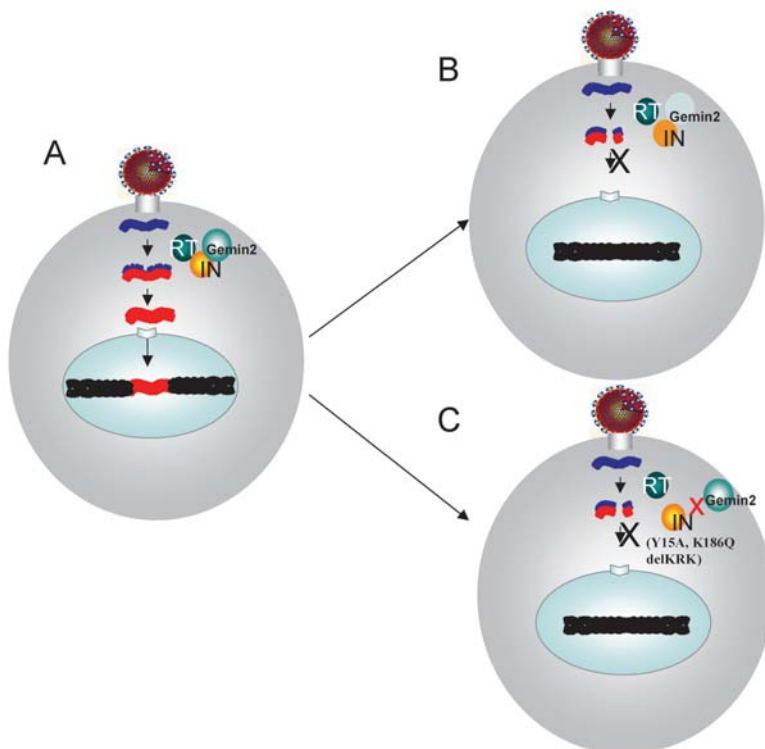


図 3 Gemin2 の HIV への作用

A) Gemin2 は HIV-1 感染後すみやかにインテグラーゼと相互作用する。
 B) Gemin2 をロックダウンさせた細胞では、HIV-1 感染は逆転写過程で停止してしまう。また、インテグラーゼ (IN) の細胞内安定性も低下する。
 C) 逆転写過程に影響を及ぼす IN 変異体 (Y15A, K186Q, delKRR) は Gemin2 との細胞内相互作用が低下する。

逆転写過程に重要な要因であることを示唆するものである。インテグラーゼの安定性に関与する宿主因子の解析は、今後の新規抗ウイルス開発戦略においても重要な知見であると考えられる。

④ Multimerization and intracellular trafficking of HIV-1 Gag in living cells

GFPを用いた蛍光イメージング技術はもはや不動のものとなった。解析したい分子への GFP 付加により、その分子の細胞内動態を緑色蛍光イメージとしてリアルタイムで追跡できるようになったかである。また GFP 変異体であるシアン(青緑)色の CFP と黄色の YFP が作製され、この CFP-YFP ペアを用いた蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) 技術が開発された。FRET とは、CFP (エネルギー供与体) を励起して放出されるエネルギーが近接の YFP (エネルギー受容体) へ移動し、その YFP から蛍光を発する現象であり、CFP と YFP の相対的距離によってエネルギー移動量が変化するため、生体分子間相互作用や生体分子構造変化を生きた細胞内でリアルタイムに観察することができる手法である。Spearman 博士の講演では、前半部でこの FRET 技術を用いて証明される Gag-Gag 相互作用について、後半部では Gag-GFP を用いて生細胞での Gag 輸送についての研究内容が発表された。

【Gag 蛋白の膜結合と多量体形成】

Gag 蛋白は N 末端にミリスチン酸 (長鎖脂肪酸の 1 つ) が付加されたポリプロテイン (myr-MA(p17)-CA(p24)-NC(p7)-p6) であり、このミリスチル化が Gag 蛋白の膜

結合に必須である。これら 4 つのドメインの結晶構造は個々には決定されているが、ポリプロテインの構造は決定されていない。HIV 粒子形成における各ドメインの役割は、① MA (p17) は Gag 蛋白の膜結合に、② CA (p24) は、N 末端半分が 6 量体形成を、C 末端半分が 2 量体形成を、③ NC (p7) は RNA 結合とそれに伴う Gag 多量体形成を、④ p6 は TSG101 (エンドソームの ESCRT-I 複合体の 1 つ) が結合し、粒子出芽に関与している。

Gag 蛋白の膜結合と多量体形成過程を解析する目的で、Gag-CFP と Gag-YFP (いずれも Gag 蛋白は野生型のもの) を HeLa 細胞で共発現させ、Gag-Gag 相互作用を FRET で、膜結合を membrane floatation 法で、細胞内局在を共焦点顕微鏡で調べた。その結果を表 1 にまとめた。野生型 Gag 蛋白では膜結合画分でのみ FRET が観察された。これを共焦点顕微鏡で観察すると細胞質膜にのみ局在していたことから、Gag 蛋白は細胞質膜で多量体を形成すると考えられた。これに対し、膜に結合できない myr (-) 変異体では、Gag-Gag 相互作用ドメインはすべて intact であるのに FRET は観察されなかった。従って、ミリスチル化は Gag-Gag 相互作用に必要であり、Gag 蛋白は膜結合の後に多量体を形成すると考えられた。次に、Gag 蛋白の各ドメインについて調べた。ミリスチル化シグナルと CA (p24)-NC (p7) ドメインがあれば、Gag 蛋白は細胞質膜にターゲティングし FRET が観察された。CA (p24) の多量体形成ドメインを変異させると FRET 効率が低下し、さらに NC (p7) の塩基性アミノ酸を変異させると FRET が消失した。従って、これらの CA (p24)-NC (p7) ドメインが Gag 蛋白の多量体形成の責任領域であることが確認され

表 1 Gag 蛋白の膜結合と多量体形成

Gag-CFP/YFP constructs	FRET	膜結合	細胞内局在
myr- [MA] - [CA] - [NC] - [p6] - [CFP/YFP]	+++	+	細胞質膜
[MA] - [CA] - [NC] - [p6] - [CFP/YFP]	-	-	細胞質
myr- [CA] - [NC] - [CFP/YFP]	+++	+	細胞質膜
myr- [CA*] - [NC] - [CFP/YFP]	++		
myr- [CA*] - [NC*] - [CFP/YFP]	-	+	細胞質
[CA] - [LZ] - [CFP/YFP]	+++	-	細胞質

膜結合は membrane floatation 法で、細胞内局在は共焦点顕微鏡で調べた。

CA* : CA の多量体形成に関与するアミノ酸を置換 (M39A, W184A, M185A)

NC* : NC の塩基性アミノ酸 15 個をアラニンに置換

LZ : ロイシンジッパーの配列に置換

た。不思議なことに、この FRET が消失した単量体しかできない Gag 蛋白は、細胞質内の膜に結合するものの細胞質膜に達していない。近年、膜結合が（膜上での Gag 蛋白濃度を上昇させるため）多量体形成を促進するという説と、逆に、多量体形成がミリスチル基を露出させ膜結合を促進するという説が提唱されている。Spearman 博士の講演は、全体的に見れば、後者を否定するものではないが前者を支持する内容と思われる。

【生細胞における Gag 蛋白輸送の可視化】

近年、Gag 蛋白の細胞内輸送経路としてエンドソーム経路や細胞骨格系が示唆されている。Spearman 博士の講演後半では、生細胞における Gag 蛋白輸送のタイムラプス解析を紹介されるとともに、微小管の関与の可能性を示唆した。Gag-GFP の HeLa 細胞内における局在を時系列で解析すると、あまり局在変化がないもの、ゆっくり動くもの、躍動的な動きを示すそれぞれが観察された。特定の場に向かって収束する傾向は認めにくいだが、この躍動的な動きは微小管に沿っており、その速度 (6-10 $\mu\text{m}/\text{sec}$) から微小管モーター蛋白であるダイニンやキネシンの関与が考えられた。ノコダゾールで微小管構造を破壊するとこの躍動的な動きはなくなるが、粒子産生量は半分くらいにしか低下しないことから、別の輸送経路も存在する可能性があるらしい。近年、Gag 蛋白の細胞質膜輸送にエンドソーム経路が関与する、あるいは逆に、細胞質膜に達した Gag 蛋白がエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれるとの報告がなされている。そこで、タイムラプス解析で細胞質膜に局在する Gag 蛋白について観察したところ、その Gag 蛋白は 30 分後でもエンドサイトーシスされなかった。しかし、エンドサイトーシスあるいはエンドソーム経路の発達がよく知られている MelJuSo 細胞やヒトマクロファージの初代細胞では、その細胞質内に局在変化が少ない Gag 蛋白の蓄積が観察され、その腔状構造からエンドソームと

思われた。近年、エンドソームなどの細胞内小器官自体が微小管に沿って細胞質膜近傍に輸送されることが明らかとなった。Gag 蛋白が微小管に直接結合して輸送されているのか、あるいは、Gag 蛋白がエンドソームなどを介して微小管輸送されているのかとの質問に対し、博士の意見は後者であった。

文 献

- 1) Stremlau M, *et al.* : The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 6977 : 848, 2004.
- 2) Castro BA, *et al.* : Persistent infection of baboons and rhesus monkeys with different strains of HIV-2. *Virology* 1 : 219, 1991.
- 3) Song H, *et al.* : A single amino acid of the human immunodeficiency virus type 2 capsid affects its replication in the presence of cynomolgus monkey and human TRIM 5alphas. *J Virol* 13 : 7280, 2007.
- 4) Takaori-Kondo A : APOBEC family proteins : novel antiviral innate immunity. *Int J Hematol* 83 : 213, 2006.
- 5) Kobayashi M, Takaori-Kondo A, Miyauchi Y, Iwai K, Uchiyama T : Ubiquitination of APOBEC3G by an HIV-1 Vif-Cullin5-Elongin B-Elongin C complex is essential for Vif function. *J Biol Chem* 280 : 18573, 2005.
- 6) Masuda T : Functional aspects of HIV-1 integrase : from uncoating to integration of viral genome. *Uirusu* 52 : 177, 2002.
- 7) Hamamoto S, Nishitsuji H, Amagasa T, Kannagi M, Masuda T : Identification of a novel human immunodeficiency virus type 1 integrase interactor, Gemin2, that facilitates efficient viral cDNA synthesis in vivo. *J Virol* : 5670, 2006.