

## 第23回日本エイズ学会シンポジウム記録

## HIV 細胞進入とその防御機序

## HIV Entry : New Insights of the Molecular Mechanism

松下 修三<sup>1</sup>, 横山 勝<sup>2</sup>, 宮内 浩典<sup>3,4</sup>, 松田 善衛<sup>5,6</sup>, 俣野 哲朗<sup>7</sup>, 岩谷 靖雅<sup>8</sup>

*Shuzo MATSUSHITA<sup>1</sup>, Masaru YOKOYAMA<sup>2</sup>, Kosuke MIYAUCHI<sup>3,4</sup>,  
Zene MATSUDA<sup>5,6</sup>, Tetsuro MATANO<sup>7</sup> and Yasumasa IWATANI<sup>8</sup>*

<sup>1</sup> 熊本大学エイズ学研究センター

<sup>2</sup> 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター

<sup>3</sup> 国立感染症研究所エイズ研究センター

<sup>4</sup> エイズ予防財団

<sup>5</sup> 東京大学医科学研究所アジア感染症研究拠点

<sup>6</sup> 中国科学院生物物理研究所

<sup>7</sup> 東京大学医科学研究所感染症国際研究センター

<sup>8</sup> 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター

## はじめに

AIDSの主因であるHIV感染症は、ウイルスがリンパ球を中心としたCD4陽性細胞に慢性感染することに起因する。さらに、ウイルスの細胞指向性の変容が病態進行と深く関連していると考えられている。これらHIV感染症の特徴を決定するものがHIVエンベロープタンパク(Env)である。一方で、細胞外に露出しているEnvは個体におけるウイルス感染防御の格好な標的でもありうる。そのため、Envは、ウイルス感染において特異的な細胞へ吸着し進入する機能が維持されつつ、免疫(特に中和抗体)による防御から逃れるためにその抗原性が変化し続けている。Envの複雑な機能と多様性を解明するには、Env多量体構造を踏まえた構造学的解析が必要不可欠になっており、HIV研究の中でも非常に複雑な研究分野になっている。1996年のケモカインレセプター(Fusin)の発見以来、構造学研究者を取り込んで、今再び、Env研究が脚光を浴びはじめている。本稿では、HIVのEnvとその機能について、第23回日本エイズ学会学術集会シンポジウムにおいて発表された内容を中心に、研究の最前線で活躍している研究者の成果を概説する。

## SY4-1. エンベロープの進化と中和抗体

松下 修三(熊本大学・エイズ学研究センター 病態制御分野)

Shuzo Matsushita (Center for AIDS Research, Kumamoto University)

HIV-1のエンベロープ蛋白は標的細胞のCD4分子及びCCR5やCXCR4などのケモカインレセプターと相互作用するgp120(SU)と、gp120とともに3量体を形成し、膜融合から侵入の過程において重要な役割を果たすgp41(TM)からなる。関連する霊長類ウイルスの系統樹解析から、HIV-1はgroup M、O及びNに分けられているが、世界各地での流行株には特徴があり、group Mは13以上のsubtype(またはclades)に分類されている。また、これらのsubtype間のキメラウイルスの流行が認められ、疫学的解析を複雑なものにしている。一方、HIV-1は感染個体内では互いに似ているが遺伝子配列の異なるクアシスピーシスを形成し、細胞性・液性の免疫選択圧の下に、刻々と変化(進化)すると考えられる。我々は中和単クローン抗体を用いて、ウイルスの中和エスケープ変異を研究し、標的エピトープの変化ばかりでなく、V2領域による強固な3量体構造の形成や、糖鎖による遮蔽、さらにこれらの変異によって起こる増殖性の低下を補う変異がほぼ同時に起こってこることを見出した。これは、*in vivo*で感染初期に起こる現象を説明するとともに、エンベロープ進化のプロセスの一部を明らかにするものと考えられる。また、図1と2に示すように、CCR5と相互作用するV3やCD4 induced (CD4i) epitopesはCD4-gp120の結合後に露出し、中和抗体の標的となるが、遮蔽が強力であればある程感染力は弱くなるこ

著者連絡先: 岩谷靖雅 (〒460-0001 愛知県名古屋市中区三の丸  
4-1-1 国立病院機構名古屋医療センター臨床研究  
センター)

2010年4月8日受付

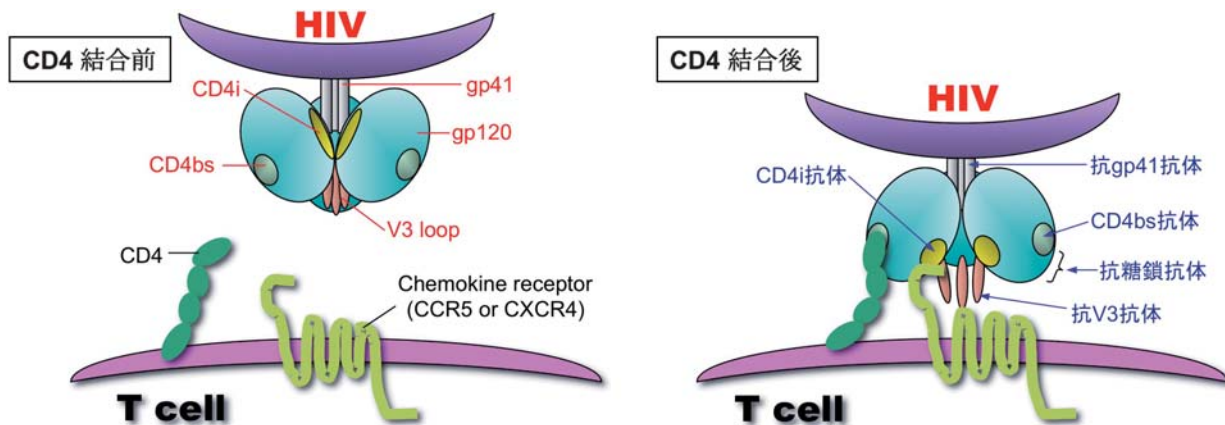


図 1 HIV エンベロープ蛋白と中和抗体反応部位

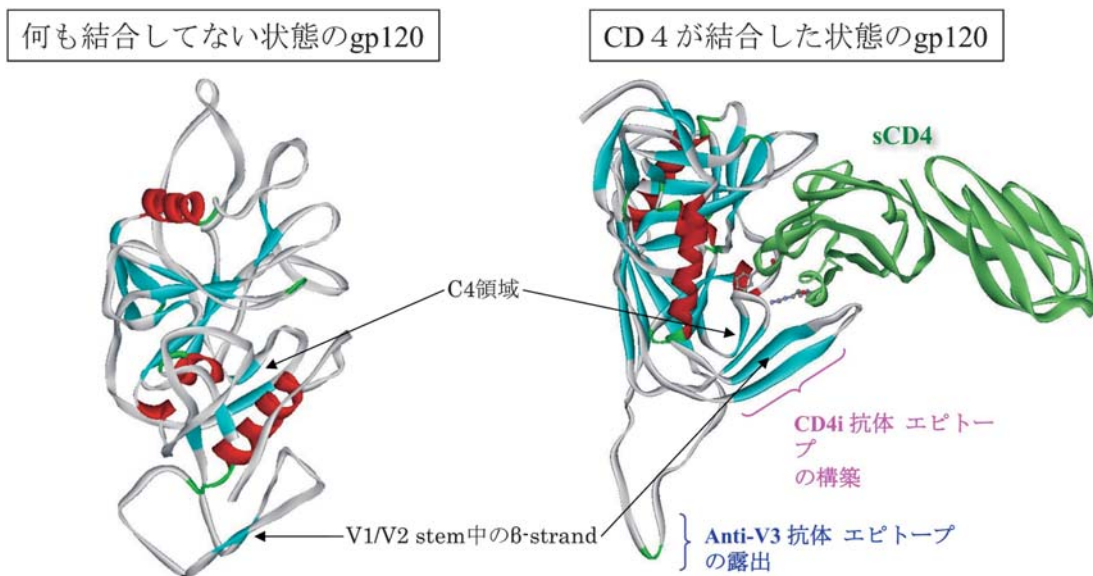


図 2 結晶構造解析による CD4 結合前後の gp120 の立体構造変化と中和抗体反応エピトープの構築および露出の模式図

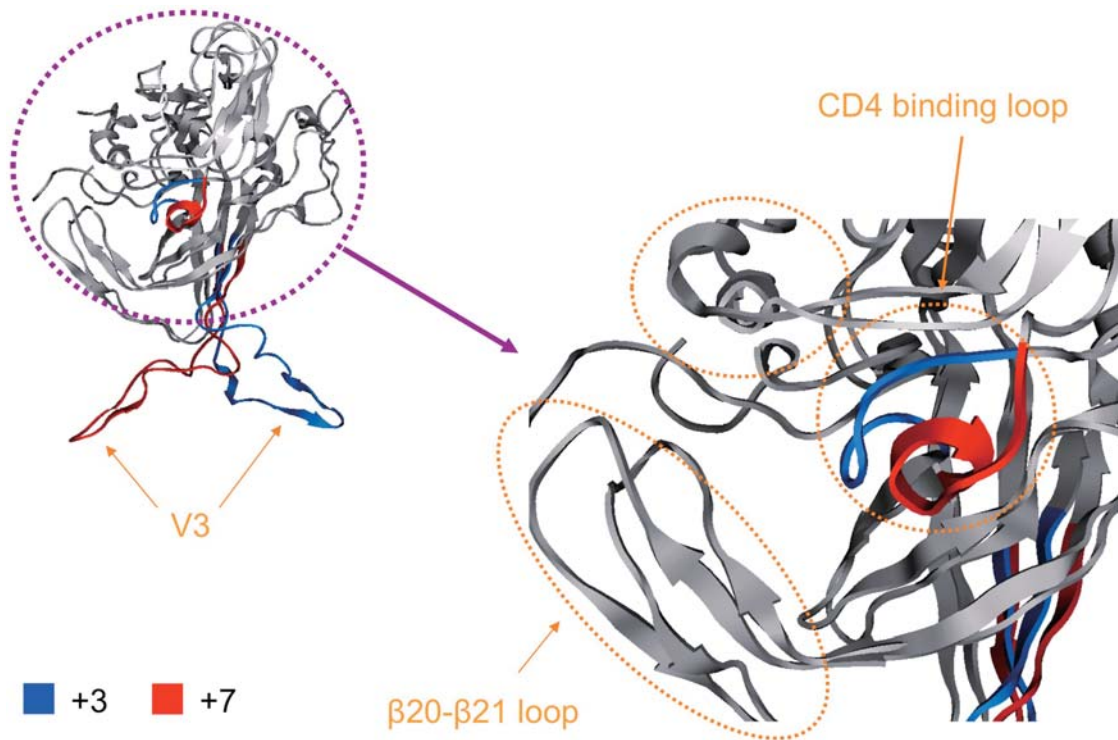


図 3 HIV-1 gp120 の V3 と CD4 結合ループの配置。  
 ホモロジーモデリング法および分子動力学計算により構築した HIV-1 gp120 分子モデル。V3 配列の荷電量が+3, 荷電量が+7の構造を重ね合わせている。リボン表示は gp120 を表し, V3 と CD4 結合ループのみ青または赤で表している。青は V3 配列の荷電量が+3, 赤は荷電量が+7である。

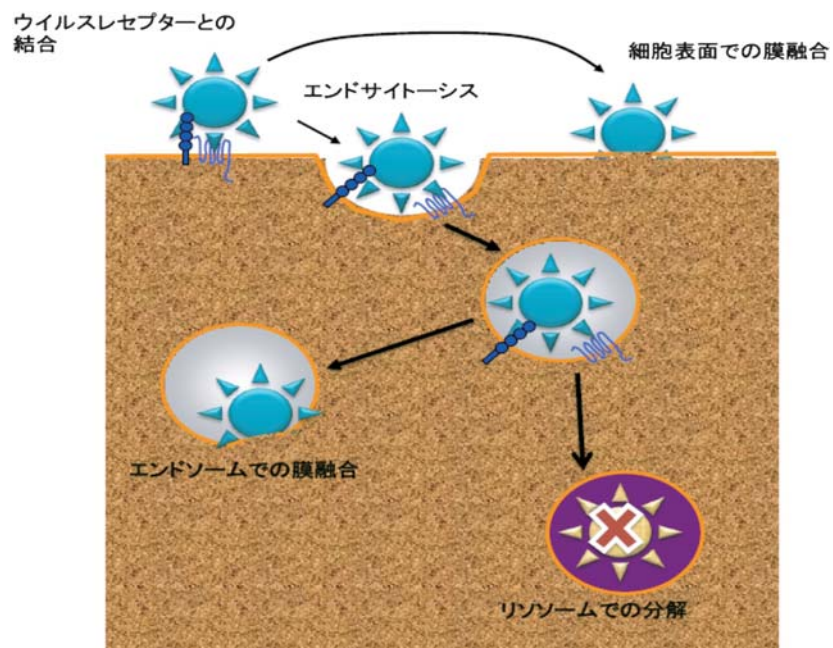


図 4 HIV はどこで膜融合するのか？



とから、初感染時には、むしろ感染性がよく、中和感受性も保たれているウイルスが増殖するという説がある。我々は、中和抗体に対する感受性の検討のため、最近の感染症例からウイルスを分離し、エンベロープ配列を調べているが、古典的な subtype B ではなく、重感染によって起こるキメラ化によってエンベロープに進化が見られるウイルスが増えている可能性が観察された。これらのデータは、HIV-1 エンベロープの進化は、CTL や中和抗体からのエスケープによるエピトープ変化の蓄積ばかりでなく、重感染によるキメラ化が重要な因子であることを示す。

## SY4-2. 計算科学による HIV-1 Gp120 の構造解析

横山 勝 (国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター)

Masaru Yokoyama (Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases)

HIV-1 gp120 の V3 は感染受容体との相互作用に中心的役割を担う。そのため本来は機能的制約が強く作用し、アミノ酸変異は抑制されるはずである。ところが V3 は高変異領域として知られる。これは、V3 は免疫原性が高く、持続感染には抗原変異を必要とするため、とされる。本研究では、計算科学による HIV-1 gp120 の構造解析を行い、HIV の液性免疫逃避能を制御する gp120 の構造要因を特定した。

これまである種の受容体結合特異性 (CCR5 指向性) を規定する V3 配列は、感染者体内で比較的均一な集団として維持されることが知られており、他の細胞指向性 V3 に比べて塩基性アミノ酸が少ない。HIV sequence database (<http://www.hiv.lanl.gov/>) より得たアミノ酸配列を用いてエントロピー解析を行うと、自然界で多く見られる V3 配列は荷電量が +3 かつ糖鎖付加部位を持ち、荷電量の大きい V3 配列に比べアミノ酸が保存されていた。この結果より、荷電量の低下によって V3 配列の多様性が低下すると考えられる。次に、荷電量の抗 V3 抗体中和感受性への影響を知るために中和アッセイを行った。V3 配列の荷電量が +2, +3, +4 かつ糖鎖付加部位を持つとき、ウイルスは抗 V3 抗体に低感受性であった。また、同じ荷電量でも CCR5 指向性であるとき中和抵抗性であった。

ウイルスが抗 V3 抗体中和を逃避するメカニズムを知るため、HIV-1 gp120 の分子モデルを構築し V3 配列の荷電量の gp120 構造への影響を調べた。分子モデルは V3 配列の荷電量の影響を検討するため、V3 配列のみが異なる 2 つの分子モデル (V3 配列の荷電量が +3 と +7) を、ホモロジーモデリング法および分子動力学計算により構築した。荷電量が +3 の gp120 分子モデルと +7 の gp120 分子モデルを比較した (図 3)。荷電量が +3 では V3 先端部が  $\beta$ 20-

$\beta$ 21 ループとは反対方向に向き、荷電量が +7 では V3 先端部は  $\beta$ 20- $\beta$ 21 ループの方向に向いた。したがって、gp120 コアが同じアミノ酸配列であっても、V3 配列の荷電量により V3 の立体配置が変化する。クライオ電子顕微鏡の像をもとに gp120 三量体における V3 の配置を検討すると、V3 配列の荷電量の低下により中和エピトープの露出度が低下する可能性が示唆された。

次に、V3 配列の荷電量が CD4 結合ループの配置に及ぼす影響を調べた。V3 配列の荷電量が +7 である gp120 の CD4 結合ループは、+3 である gp120 よりも V4 ループの方向にシフトしていた。そのため、V3 配列の荷電量が +7 の gp120 は +3 の gp120 よりも CD4 結合部位が広い。この結果より、V3 配列の荷電量が大きいと CD4 結合部位を認識する中和抗体による感受性が大きいと考えられる。そこで、gp120 の多様性を Shannon の式を用いたエントロピー解析により調べると、V3 配列の荷電量が +7 では、荷電量が +3 と比べて CD4 結合ループ周辺のアミノ酸がより多様である。これは CD4 結合部位近傍が抗体の選択圧を受けていることを示唆し、構造解析の結果を支持する。荷電量が +7 では +3 よりも中和感受性であることを確かめるために中和アッセイを行うと、+7 のウイルスの CD4 結合部位を認識する中和抗体の感受性は、+3 のウイルスよりも大きいことが分かった。

以上より、V3 の荷電量によって gp120 コアのアミノ酸配列が同じでも、V3 配列の荷電量によって V3 の配置が変わることが示された。また、V3 配列の荷電量は V3 の配置だけではなく、gp120 コアの構造にも影響を与えた。したがって、HIV-1 gp120 V3 は荷電量に基づきウイルスの中和感受性と細胞指向性を司る機能領域と考えられる。

## SY4-3. エンドサイトーシスを介した HIV-1 の細胞侵入

宮内 浩典 (国立感染症研究所・エイズ研究センター/エイズ予防財団)

Kosuke Miyauchi (AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases)

エンベロープウイルスは脂質二重層からなるウイルス膜を有し、宿主細胞の細胞質内に侵入するためにウイルス膜と細胞膜との膜融合の過程を必要とする。この膜融合はウイルス粒子の表面に存在するフュージョンタンパク質の構造変化によって誘導される。ウイルスフュージョンタンパク質の構造変化はウイルスによって異なった刺激により誘導され、この構造変化は一般的に不可逆的であることから、ウイルスにとってどのタイミングでこの構造変化をスタートさせるのかは感染を成立させるために重要なポイントとなる (図 4)。インフルエンザウイルスのような低 pH

依存性ウイルスは pH の低下をフュージョンタンパク質の構造変化のきっかけとしている。一方、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) のような低 pH 非依存性ウイルスはウイルスレセプターとの結合を構造変化のきっかけとする。低 pH 依存性ウイルスはエンドソームの低 pH 環境を利用して膜融合するため、エンドサイトーシスはウイルス感染において必須である。HIV は低 pH 非依存性ウイルスであり、その感染成立にエンドソームの低 pH 環境を必要とせず、HIV のウイルスレセプターは細胞表面に存在するため HIV は細胞表面で膜融合を行うものと一般には考えられてきた。

我々は HIV の宿主細胞への侵入経路を明らかにするために、HIV の膜融合過程をベータラクタマーゼを用いたウイルス-細胞間膜融合アッセイと蛍光標識した単一ウイルスのトラッキングアッセイの二つの方法によって解析した。ベータラクタマーゼを用いたウイルス-細胞間膜融合アッセイでは、細胞膜不透過性の膜融合阻害ペプチドで得られた膜融合キネティクスと温度を低下させる方法で測定した膜融合キネティクスは大きく異なっており、HIV はエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれた後、エンドソームで膜融合を完了することが示唆された。また蛍光標識した単一ウイルスのトラッキングアッセイにおいても、ほとんどの HIV がエンドソームで膜融合を起こしている事を示す結果が得られた。さらに、各種のエンドサイトーシス阻害剤を用いたところ、HIV の膜融合は著しく阻害され、HIV が膜融合の完了にエンドサイトーシスを必要とする事が明らかとなった。ペプチド型の膜融合阻害剤や一部の中和抗体は HIV のフュージョンタンパク質の構造中間体を認識するため、HIV がエンドソーム内で膜融合を完了することにより、これらの分子による HIV 阻害効果を減弱させる可能性が考えられる。

#### SY4-4. HIV-1 エンベロープタンパク質 gp41 サブユニットの機能

松田 善衛 (東京大学医科学研究所アジア感染症研究拠点/中国科学院生物物理研究所日中連携構造ウイルス学・免疫学研究室)

Zene Matsuda (Research Center for Asian Infectious Diseases, Institute of Medical Science, The University of Tokyo/China-Japan Joint Laboratory of Structural Virology and Immunology, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences)

HIV-1 エンベロープタンパク質は前駆体 gp160 として生成され、宿主域を決定する gp120 と膜融合を司る gp41 のサブユニットに切断される。gp41 はクラス 1 型の融合タンパク質に属し、N 末に融合ペプチド (FP), その下流にコイルドコイル形成領域 (N- 及び C-HR) と広域中和抗体エピトープが存在する membrane-proximal external region (MPER) を有する細胞外ドメインと、脂質二重膜を通過する膜貫通部分 (MSD), それ以降の細胞内部分 (CT) から構成され C 末端に至る (図 5)。近年膜融合機構の概略が明らかにされてきたが、関連分子の必要分子数、時間的、空間的変化の詳細はまだ明らかではない。

膜融合に際してはもともと脂質二重膜で隔てられた二つの画分 (A, B) が、融合によってひとつの画分 (A+B) となる。したがって融合に際して生じる二つの画分間の交通を測定することによって膜融合のモニタリングを行うことができる (図 6)。最近われわれは膜融合の経時的解析を簡易に行える細胞ベースのアッセイ系を確立した。本法は膜融合のレポーターとしてウミシイタケルシフェラーゼ (RL) を分割酵素 (split enzyme) として用いるものである。すなわち、それぞれ単独では活性を有しない RL の 2 分割体を作成し、それらを 2 種類の細胞 (エンベロープ発現細胞 (Env+) 及び、受容体発現細胞 (Receptor+)) それぞれに別個に発現させておき、分割酵素の活性の復元をもって膜融合を測定するものである (図 6)。RL には膜透過性の基質が存在するので、膜融合の過程を生きた細胞のままモニターすることができる。膜融合の際の移動分子の差異による既存の方法との比較を表 1 に示す。転写因子の移動によ



FP: Fusion Peptide  
 HR: Heptad Repeat  
 MPER: Membrane-Proximal External Region  
 MSD: Membrane-Spanning Domain  
 CT: Cytoplasmic Tail

図 5 gp41 のドメイン構造

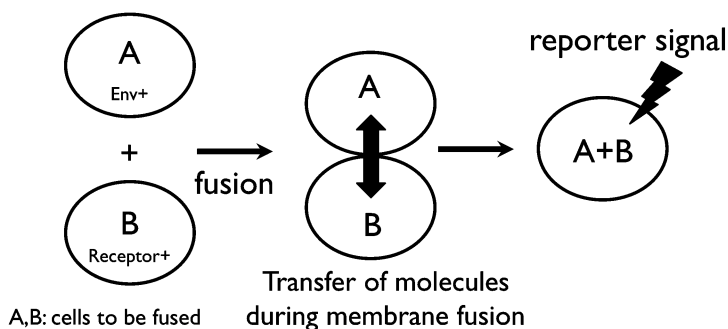


図 6 アッセイの概要 膜融合に際して AB 間で起こる分子の移動をマーカーとする

表 1 Comparison of different assays

Transferred molecules	Generation of signals	Detection Time	Quantification	Real-time assay
Transcription factor	only when fusion(+)	Slow	Easy	No
Dye	throughout	Quick	Hard	Yes
Split enzyme	only when fusion(+)	Quick	Easy	Yes

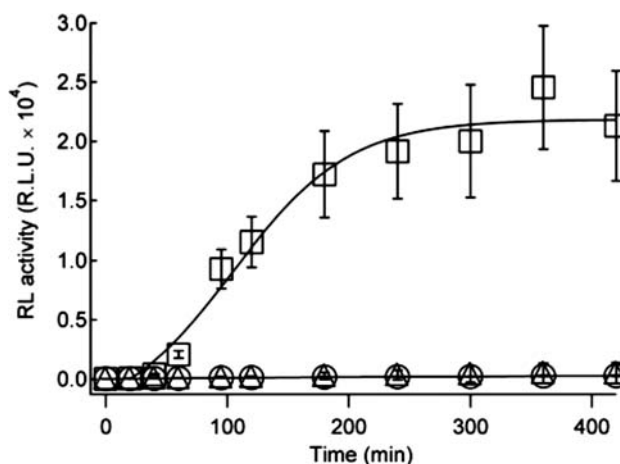


図 7 分割 RL による膜融合のモニタリング。(□は野生型, ○と△はコントロール)

るレポーター遺伝子の活性化による方法は定量的である一方、検出までの時間が長くリアルタイムアッセイには適さない。また色素の移動による方法は感度もよくリアルタイム測定も可能であるが、色シグナルの出現ではなく光学機

器によるその位置変化を振り所とするためアッセイの簡便さの面では劣っている。われわれの方法ではルシフェラーゼシグナルは融合後のみに発生し、迅速、簡便かつ定量的に測定可能である。野生型 HIV-1 エンベロープ蛋白質を用

いた実際の測定例を図7に示す。これは分割 **RL** の一方とエンベロップ蛋白質とを発現する **293FT** 細胞と、もう一方の分割 **RL** を発現させた **293CD4** 細胞の共培養の系において **RL** 活性の回復を膜透過性基質を用いて測定したものである。

われわれはこの方法を用いて **gp41** 膜貫通部分変異体の解析を行った。膜貫通部分は約 20 アミノ酸残基からなり各クレード間でも非常によく保存されている。この配列の高い保存性に反して、それぞれのアミノ酸の置換変異に対する許容性は極めて高い。しかしその許容度には明らかに限界があり幾つかの膜貫通部分の異種膜貫通部分による完全置換体においては膜融合活性の著しい低下が見られる。われわれの以前の解析では **CD4** 結合過程以降に障害があ

ることが示唆されていたが、そのメカニズムは不明であった。今回これらの変異体による膜融合をこのアッセイ系で経時的に測定したところ、野生型に比べて膜融合の進行が大きく遅れていることが示唆された (Kondo *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 285 : 14681-14688, 2010)。

今回開発された膜融合アッセイ系は **HIV-1** のエンベロップ蛋白質の指向性の決定や、変異体の膜融合の解析に有用であると考えられる。膜融合の判断が簡便に且つ定量的に測定できることから、膜融合阻害剤のスクリーニングにも応用可能であると考えられる。さらにこのシステムは **HIV-1** 以外のエンベロップ蛋白質による膜融合のアッセイや、ウイルスエンベロップ以外による膜融合過程の解析にも応用可能である。