

第12回日本エイズ学会 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

HIV 転写調節機構および Tat の分子作用機構に関する研究

Regulation of HIV Transcription by Tat and NF- κ B

朝光 かおり

Kaori ASAMITSU

名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学

Department of Molecular and Cellular Biology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

HIV 遺伝子の転写は、HIV 由来の転写活性化因子 Tat と宿主由来の転写活性化因子 NF κ B によって制御されている。それらの活性は主に、Tat は転写伸長因子 P-TEFb に、NF κ B は阻害タンパク I κ B によって調整を受けている。それらの活性制御形式を解明することにより、HIV 複製について理解が深まるだけでなく、新たな作用機序を持つ抗 HIV 戦略へと至ることが期待される。

日本エイズ学会誌 14: 78-82, 2012

はじめに

HIV のライフサイクルは、①ウイルスの標的細胞のレセプターへの吸着、細胞内への侵入と脱殻、②逆転写酵素による HIV-RNA から HIV-DNA の逆転写、③ウイルス遺伝子の宿主細胞 DNA への組み込み、④組み込まれた HIV プロウイルスからのウイルス RNA とウイルスタンパクの転写、⑤合成されたウイルス RNA とウイルスタンパクが組み合わさりウイルス粒子の形成と成熟、⑥ウイルスの細胞外への放出という過程からなる (図 1)。

このライフサイクルをウイルスの遺伝情報の流れで見たところ、①ウイルス RNA が DNA に転写される逆転写の段階と、②宿主遺伝子に組み込まれたプロウイルスらの転写過程の大きく 2 つに分けることができる。これらの過程は、遺伝情報量の増大の点において大きく異なる。すなわち、逆転写の段階では最初にファーストストランドの cDNA が合成された際に鋳型となったウイルス RNA は逆転写酵素の持つ RNaseH によって分解されるため、遺伝情報量の増大はここでは起こらない。これに対して、プロウイルスとなった DNA からの転写は宿主の転写因子 NF κ B と HIV 由来の転写活性化因子 Tat によって担われており、これらの分子によって、遺伝子量が数百倍から数千倍に増幅される。この結果、レトロウイルスとしては例外的にきわめて多量のウイルス産生が可能になり、さまざまな病原性、強い伝播性、および容易に宿主免疫や治療薬の耐性出現が可能となっている。したがって、この転写の過程がウ

イルス複製の律速段階と考えられる。本稿では新規阻害活性機序を持つ NF κ B 阻害剤の HIV 複製に与える効果と最近明らかした新規の Tat の制御機構について紹介する。

Tat の新規活性調節機構

1. Tat の活性調節

Tat は、HIV プロウイルスからのウイルス遺伝子活性化の最も重要な責任分子である¹⁾。HIV-LTR からの転写活性化は、本分子がウイルス RNA の 5' 末端に形成される TAR と呼ばれるステム・バルジ・ループ構造に、サイクリン T1 (CycT1) と CDK9 からなる PTEF-b とともに結合し、CDK9 が RNA ポリメラーゼ II をリン酸化することで遂行される²⁾。この転写活性化複合体 TAR/Tat/P-TEFb (CycT1/CDK9) の中で活性制御を担う分子が、Tat/TAR、そして CDK9 を認識する CycT1 である。CycT1 は Tat/TAR と CDK9 の橋渡しを制御する「glue」のような機能で制御していると考えられる。

この Tat/TAR-CycT1 の結合には、CycT1 の中央部に存在する TRM (=Tat/TAR recognition motif) が関与し、その中で特に 261 番目のシステイン残基 (CycT1 C261) が Tat の転写活性化に重要であることが明らかにされていた³⁾。しかしながら、本領域以外にも Tat の転写活性化を制御するアミノ酸が存在することは示唆されていたにもかかわらず、それ以上の解析はされていなかった。そこで、われわれは近年明らかにされた CycT1 の X 線結晶解析構造をもとに解析を進めた⁴⁾。

2. Tat 転写活性化に寄与する CycT1 新規制御機構の同定

図 2a に解析に用いた CycT1 立体構造を示した⁵⁾。TRM の近傍に CycT1 の N 末領域が存在することが観察される。そのことから、われわれは、N 末領域も TRM と同様に Tat

著者連絡先: 朝光かおり (〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1 名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学)

2012年2月14日受付

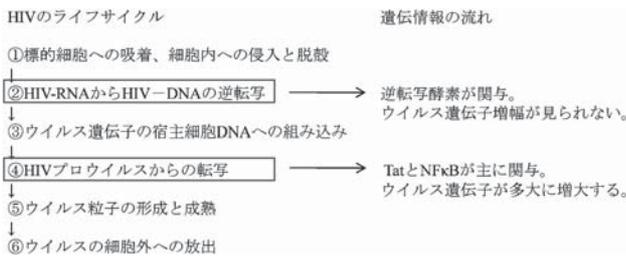


図1 ウイルスのライフサイクルと遺伝情報の流れ

の転写活性化に関与するのではないかと考え、HIV-LTRをレポーターとしたルシフェラーゼアッセイを行い検討することとした。その結果、Tatの転写活性化においてCycT1のN末領域が関与し、そのなかで特にCycT1 Q46A, CycT1 Q50A, CycT1 F176Aのアミノ酸残基が重要であることが分かった(図2b)。なお、コントロールであるTRMに変異を加えたCycT1変異体(CycT1 K251A, CycT1 C261Y, CycT1 C261A)ではTatの転写活性化が見られず、従来の報告と一致していた。

さらに、CycT1のアミノ酸残基の役割を検討するためにTatとCycT1を融合したキメラタンパクを用いて実験を行った(図2c)。その結果、CycT1-TatキメラタンパクのCycT1 Q50A, CycT1 F176A変異において活性阻害が見られたが、その効果は限局的であった。また、CycT1 Q46A変異においては活性がほぼ野生型と変わらなかった。さらに、CycT1 Q46A/Q50Aダブル変異体においては活性がさらに阻害され、CycT1 Q46A/Q50A/F176Aトリプル変異体においては活性がほぼ消失していた。これらの結果から、それぞれのアミノ酸は別の作用機序でTatの活性制御に影響を及ぼしていると考えられる。

TatとCycT1が融合したキメラタンパクの系は、融合により両者の結合状態をミミックしている。そのため、その活性状態は両者が結合した後の活性を反映していると考えられる。その系において、CycT1 Q46の変異体が転写活性に影響を示さなかったことから、CycT1 Q46はTatの結合のみに関与し、CycT1 Q50, F176はTatの結合とその後の転写活性調節に関与することが示唆された。CycT1がTatとの相互作用のみならず直接的にTatの活性調節に関与することを示している。

3. Tat/P-TEFb 複合体構造

2010年、TahirovらによりTat/P-TEFb複合体構造が解明された⁶⁾。この立体構造においてもCycT1 TRMとN末領域、そしてわれわれが明らかにしたCycT1 Q46, Q50, F176はTatの近傍に存在していた。CycT1 N末とTRMがTatと相互作用する妥当性について、立体構造解析においても改めて示された。

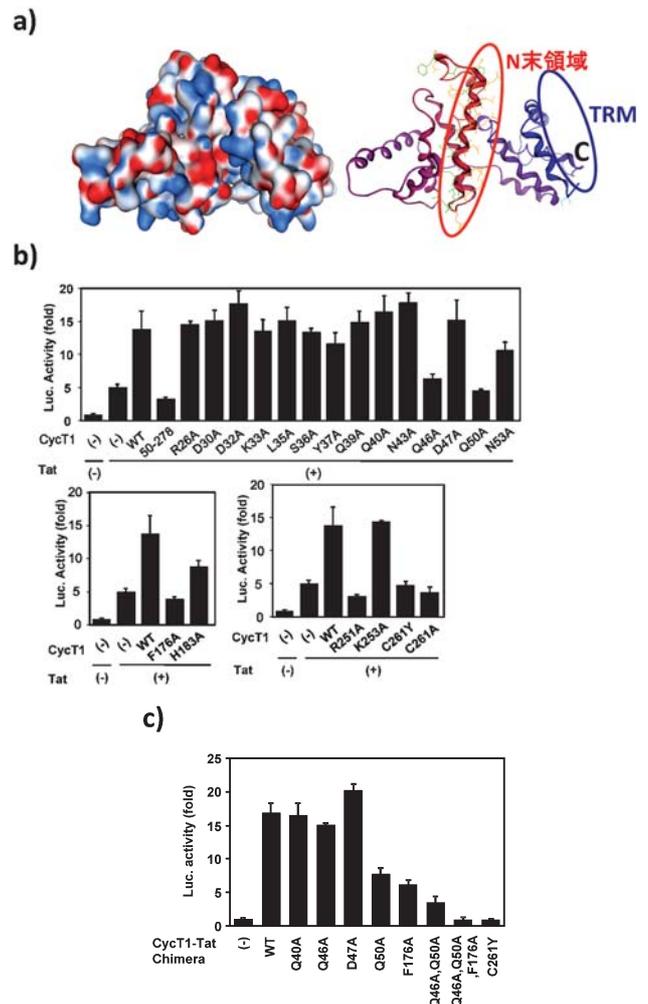


図2 CycT1立体構造(2pk2)とCycT1N末領域のTat転写活性への効果

a) CycT1立体構造(2pk2)。スペースフィーディングモデル(左側)とリボンモデル(右側)で示した。CycT1 TRM(青く囲った部分)がCycT1 N末(赤く囲った部分)に近接していた。b, c) CycT1アミノ酸残基のアラニン変異によるTat転写活性化に与える影響。TatとCycT1のco-transfection(b)とTat-CycT1キメラタンパクの効果(c)。CycT1 Q46, Q50, F176はアラニン変異により転写活性化は失われるが、その効果は、キメラタンパクでは減弱する(Asamitsu *et al.*, J Mol Biol 29: 887-895, 2011より転載)⁴⁾。

この構造において、TatはCycT1がN末とTRM領域から形成される溝のような領域に入り込む、もしくは隙間を埋めるようにCycT1と結合していることが観察された。そのため、TatとCycT1は広い面積で結合することとなり、その結果それらは強固に結合していると考えられる。また、さらにこの複合体を解析すると、多数の分子間(Tat-

CycT1 間, Tat-CDK9 間) もしくは分子内 (CycT1 分子内) 水素結合を形成していることが明らかになった。CycT1 と Tat の間で水素結合がみられることは、以前から示唆させていたが、Tat と CDK9 の間に水素結合が形成されることが示されたのは初めてである。Tat そのものが CDK9 の活性調節にも直接関与することが示唆され、その生物学的意義など今後の検討が待たれる。

4. 天然変性タンパクとしての Tat とその立体構造特性

Tat/P-TEFb 複合体構造が明らかにされる前から、Tat 単体の立体構造はいくつか解かれており、それらの構造は Protein Data Bank (PDB) に登録されている^{7,8)}。それらを比較してみると、アミノ酸レベルでは相同性が見られるものの、立体構造は個々に異なり相同性はみられない。その理由としては、Tat は特定の構造を持たない天然変性タンパクであり、Tat 単体では 2 次構造を持たない。そのため、構造解析の際のサンプルの取り扱いや結晶化の条件によって得られた結晶構造が異なると考えられる。

今回明らかにされた Tat/P-TEFb 複合体構造中の Tat 構造は、立体構造は今まで報告されている Tat 構造のどれとも相同性を持たない。今まで明らかにされていた Tat の構造は、P-TEFb との複合体を形成したときの Tat 構造を反映していないと考えられる。また、本 Tat 構造を解析するとその構造の一部に α ヘリックス構造を持つことが分かる。すなわち、Tat 単体では 2 次構造を持たないが、複合体形成をすると Tat は一部に 2 次構造をとり、複合体の特異性と安定化に寄与すると考えられる。

近年、特定の構造を持たない天然変性タンパクの標的タンパクの分子認識機構が注目を集めている。天然変性タンパクは単独では特定の構造をとらず、標的分子と相互作用することで初めて特定の立体構造を形成し機能を発揮する。Tat はその代表例であり、実際に NMR 解析からも単独では特徴的な構造を持たないことが示されている⁹⁾。P-TEFb と複合体形成することで Tat は α ヘリックス構造をとり、Tat 依存性の転写を活性化すると考えられる。

5. まとめ—Tat と CycT1 の相互作用形式

Tat と CycT1 の結合には、CycT1 の TRM と N 末の領域が関与することが明らかになった。これらの領域が協調して、Tat/P-TEFb の転写活性化複合体を形成していくと考えられる。CycT1 N 末は立体構造解析から、水素結合ネットワークにより特定の構造を形成している。しかしながら、TRM は特定の構造をとらない disorder 領域であることが推察されており、Tat との結合にはまず CycT1 の N 末領域で構成される構造が Tat を認識し、その後 CycT1 TRM と Tat の結合が形成され安定的な Tat/P-TEFb 複合体が形成されていくと考えられる。CycT1 の構造が定まっている N 末領域と disorder 領域である TRM から構成される領域と

disorder タンパクである Tat がどのように分子認識と活性複合体を形成していくか、今後の検討が待たれる。

NF κ B 活性調節機構からみた HIV 複製制御機構

1. NF κ B 活性調節機構

HIV プロウイルス DNA の LTR (long terminal repeat) (= HIV-LTR) 領域には、宿主転写因子が結合する DNA 配列が存在し、ウイルスからの転写活性制御は宿主転写因子にも担われている。転写因子の中で特に SP1 や NF κ B が活性制御に重要である^{10,11)}。それらの役割として、SP1 は HDAC とともに HIV-1 潜伏感染状態の維持や Tat による転写活性化、NF κ B は潜伏感染の破たんや誘導性の HIV の遺伝子活性化に関与すると考えられている。転写因子は、通常のウイルス複製過程のみならず、HIV の潜伏感染の維持と破たんにも関与しているのである。

NF κ B は、通常、阻害タンパクである I κ B と結合し、細胞質に不活性化型として局在している^{12,13)}。TNF やストレスなどの活性化刺激によりシグナル伝達経路が活性化されると、最終的に I κ B リン酸化キナーゼ (IKK α / β / γ 複合体) が活性化され、I κ B がリン酸化される。リン酸化型 I κ B はプロテアソームにより分解され、フリーとなった NF κ B は核内に移行後標的遺伝子の転写を活性化する。この IKK α / β 活性化を伴う NF- κ B 活性化機構は「古典的経路」と呼ばれており、本経路においては、*de novo* のタンパク合成が必要でないため、外界からの刺激に対し速やかに NF- κ B を核移行・標的遺伝子の転写活性化を行うことができる。また、NF- κ B 活性化機構には、IKK α ホモ二量体の活性化を伴う非古典的経路もあることが知られている。

2. 新規活性作用機序をもつ NAM の効果

HIV 複製においては、ある種のシグナル伝達阻害剤や NF κ B 阻害剤が NF κ B 抑制機構を通じて NF κ B 阻害剤によりウイルス複製が抑制されることが示されていた。しかしながら、NF κ B の作用が多岐にわたるためしばしば副作用が問題になる。そこで、これらを克服する新規化合物が求められている。

われわれはその候補として、Noraristeromycin (NAM) に着目した¹⁴⁾。本化合物は五炭糖骨格を有する化合物で、抗炎症作用や抗ウイルス作用を持つことが明らかになっていた。そこで、この薬剤が HIV 複製に与える効果について検討したところ、本化合物は細胞に毒性を与えない濃度で劇的にウイルス産生を抑制した (図 3)。その作用点について確認したところ、NAM は I κ B 分解とリン酸化を抑制していた。したがって、NAM は I κ B キナーゼ活性を抑制することが示唆されたので、*in vitro* リン酸化アッセイを行った。その結果、NAM は IKK β ではなく IKK α の活性を抑制していた。NAM は IKK α をターゲットとして

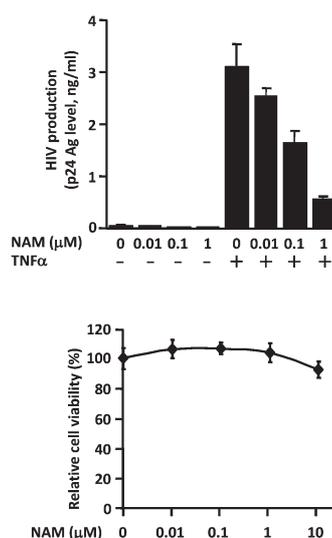


図 3 NAM が HIV 複製に与える影響

NAM を投与し 2 時間後に TNF を加え、24 時間培養後サンプルを回収し p24 antigen assay (上段) と WST アッセイ (下段) を行った。細胞は HIV 潜伏感染細胞株 OM10.1 細胞を用いた (Asamitsu *et al.*, J Biochem 144 : 581-589, 2008 より転載)¹⁴⁾。

NFκB 活性を抑制し、HIV 複製を効率的に抑制していることが示された。

3. NFκB 阻害剤と HIV 複製阻害効果

NFκB 活性化阻害の標的ステップとして、① IκB のリン酸化・分解、② NFκB の核移行、③ NFκB の DNA 結合などがあげられる。そのなかで、①は細胞質でのイベントであり、NFκB 活性化過程の初期過程であること、またキナーゼが関与しているため阻害剤開発の先行事例があることなどから、NFκB 活性化阻害のステップとしては標的となりやすい。そのため、この過程を阻害する NFκB 阻害化合物が数多く報告されており、HIV 複製を阻害する作用も有する化合物も多数存在する。われわれも IKKβ 特異的阻害剤が、効率的に HIV 複製を抑制することを見出しており¹⁵⁾、この過程が HIV 複製に重要な役割を担っていることは疑いのない事実である。

NAM は IKKα をターゲットとして作用していた。IKKα は NFκB 非古典的経路に主にかかわるとされていたが、近年では古典的経路にも積極的ににかかわることが明らかになった¹⁶⁾。また IKKα の立体構造も解析され¹⁷⁾、その重要性がますます認識されている。IKKα ターゲットとした薬剤は、化合物はきわめてまれであり、今後 IKKα 指向性阻害剤のニーズがますます高まると考えられる。今回の実験から、IKKα が HIV 複製にも重要な役割を演じていることが明らかになった。今後 IKK の指向性を視野に入れ、NFκB 活

性制御機構と HIV 複製の関連性を考えていく必要がある。

新規抗 HIV 薬のターゲットとしての転写過程研究

HIV 感染症の治療は、HAART 療法が確立され格段の進歩を遂げた。現在、治療に用いられている薬剤は、逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤、そして最近ではインテグラーゼ阻害剤も臨床応用されている。しかしながら、これらの薬剤はウイルスの酵素を標的にしているため耐性ウイルスの出現を抑えることはできない。また、その重篤な副作用からも、新規作用機構をもつ抗 HIV 薬が依然として求められている。

HIV プロウイルスからの転写を標的とした抗 HIV 薬は、①現行の HAART 療法と併用可能であり副作用等の軽減が期待される、②遺伝子の増幅過程をターゲットとしているためウイルス量を直接的に減らすことができ、結果として薬剤耐性ウイルスの出現を抑えることができるというメリットを持つ。さらに、最近ではウイルスの潜伏感染に転写因子の活性制御が関与する知見が多数得られており、転写を標的とした薬剤は潜伏感染維持の調整にも作用する可能性がある。

今後、新規作用機構を持つ抗 HIV 薬として転写阻害剤の必要性はますます高まると考えられる。その作用機構として、Tat による転写活性過程を標的とするものは Tat-CycT1 の相互作用形式をミミックするような阻害剤、NFκB を標的とするものに関しては IKKα を阻害する阻害剤が格好の標的となる。今後、*in silico* スクリーニングなどから、それらの開発に取り組みたいと考えている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり多大なご協力をいただきました名古屋市立大学大学院医学研究科細胞生物学 岡本 尚教授と教室の皆様にご心よりお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Karn J : Tackling Tat. J Mol Biol 293 : 235-254, 1999.
- 2) Peterlin BM, Price DH : Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. Mol Cell 23 : 297-305, 2006.
- 3) Garber ME, Wei P, KewalRamani VN, Mayall TP, Herrmann CH, Rice AP, Littman DR, Jones KA : The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycT1 protein. Genes Dev 12 : 3512-3527, 1998.
- 4) Asamitsu K, Hibi Y, Imai K, Victoriano AF, Kurimoto E, Kato K, Okamoto T : Functional characterization of human cyclin T1 N-terminal region for human immunodeficiency virus-1 Tat transcriptional activation. J Mol Biol 29 : 887-

- 895, 2011.
- 5) Anand K, Schulte A, Fujinaga K, Scheffzek K, Geyer M : Cyclin box structure of the P-TEFb subunit cyclin T1 derived from a fusion complex with EIAV tat. *J Mol Biol* 370 : 826–836, 2007.
- 6) Tahirov TH, Babayeva ND, Varzavand K, Cooper JJ, Sedore SC, Price DH : Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. *Nature* 65 : 747–751, 2010.
- 7) Peloponese Jr JM, Gregoire C, Opi S, Esquieu D, Sturgis J, Lebrun E, Meurs E, Collette Y, Olive D, Aubertin AM, Witvrow M, Pannecouque C, De Clercq E, Bailly C, Lebreton J, Loret EP : 1h-13c nuclear magnetic resonance assignment and structural characterization of hiv-1 tat protein. *CR Acad Sci Iii* 323 : 883, 2000.
- 8) Grégoire C, Péloponèse JM Jr, Esquieu D, Opi S, Campbell G, Solomiac M, Lebrun E, Lebreton J, Loret EP : Homonuclear (1) H-NMR assignment and structural characterization of human immunodeficiency virus type 1 Tat Mal protein. *Biopolymers* 62 : 324–335, 2001.
- 9) Shojania S, O'Neil JD : HIV-1 Tat is a natively unfolded protein : The solution conformation and dynamics of reduced HIV-1 Tat-(1-72) by NMR spectroscopy. *J Biol Chem* 281 : 8347–8356, 2006.
- 10) McAllister JJ, Phillips D, Millhouse S, Conner J, Hogan T, Ross HL, Wigdahl B : Analysis of the HIV-1 LTR NF- κ B-proximal Sp site III : Evidence for cell type-specific gene regulation and viral replication. *Virology* 274 : 262–277, 2000.
- 11) Victoriano AF, Imai K, Togami H, Ueno T, Asamitsu K, Suzuki T, Miyata N, Ochiai K, Okamoto T : Novel histone deacetylase inhibitor NCH-51 activates latent HIV-1 gene expression. *FEBS Lett* 585 : 1103–1111, 2011.
- 12) Ghosh S, Karin M : Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 9 (Suppl.) : S81–S96, 2002.
- 13) Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S : Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol* 12 : 695–708, 2011.
- 14) Asamitsu K, Yamaguchi T, Nakata K, Hibi Y, Victoriano AF, Imai K, Onozaki K, Kitade Y, Okamoto T : Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by blocking I κ B kinase with noraristeromycin. *J Biochem* 144 : 581–589, 2008.
- 15) Victoriano AF, Asamitsu K, Hibi Y, Imai K, Barzaga NG, Okamoto T : Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in latently infected cells by a novel I κ B kinase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 50 : 547–555, 2006.
- 16) Pelzer C, Thome M : IKK α takes control of canonical NF- κ B activation. *Nat Immunol* 12 : 815–816, 2011.
- 17) Xu G, Lo YC, Li Q, Napolitano G, Wu X, Jiang X, Dreano M, Karin M, Wu H : Crystal structure of inhibitor of κ B kinase β . *Nature* 472 : 325–330, 2011.