

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390137

研究課題名（和文）ウイルスエンベロープ形成とウイルス伝播を制御する細胞性分子の機能解析研究

研究課題名（英文）Functional analysis of cellular membrane proteins for generation of viral envelope and transmission

研究代表者 小柳 義夫 (KOYANAGI YOSHIO)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：80215417

研究成果の概要（和文）：HIV の伝搬過程の決定要因となるウイルスエンベロープの形成とそれに続くウイルス粒子の遊離効率を制御する細胞性膜蛋白質の解析研究をおこなった。多くのエンベロープウイルス粒子の遊離を抑制する BST2 の機能発現メカニズムの解析の結果、ヒト BST2 は多くの異種細胞から HIV 粒子の遊離を抑制することより、直接ウイルス粒子に作用することを示唆する結果を得た。次に BST2 作用を阻止する HIV-1 のアクセサリ蛋白質 VPU について、これらの相互作用と VPU 機能の発現性について解析実験を行った。種々の変異体の VPU/BST2 複合体の測定の結果、VPU と BST2 はそれぞれの膜貫通領域（TM）を介して複合体を形成し、BST2 の TM 領域の 3 アミノ酸（I34, L37, L41）すべてがその複合体形成とともに VPU のウイルス遊離促進（抗 BST2）作用に必須であることがわかった。これらの結果をもとに、BST2 の分子動力学計算解析を行い、VPU 結合部位の構造予測を行い、4 アミノ酸（I34, L37, L41, T45）が VPU 機能の発揮に介在することが示唆された。これらの結果は、VPU 作用メカニズムの基礎的知見である。一方、エンベロープ形成分子として HIV-1 ENV の取り込みに介在すると報告されていた細胞性因子 TIP47 については、その再現結果は得られなかった。

研究成果の概要（英文）：We performed a series of virological investigation of cellular membrane proteins on generation of HIV-1 envelope and release of HIV-1 particles. From functional examination of human BST2 that inhibits the release of HIV-1 particles from infected cells on release of viral particles, it was suggested that BST2 acts directly to HIV-1 because human BST2 has ability to inhibit HIV-1 from variety species of cells. Next, we found HIV-1 viral protein U (VPU), a specific antagonist of human BST2, that three amino acid (AA) residues (I34, L37, and L41) in the transmembrane (TM) domain of human BST2 are critical for the interaction with VPU and VPU-mediated antagonism of human BST2. Moreover, computer-assisted structural modeling suggests that an alignment of these four AA residues (I34, L37, L41, and T45) on the same helical face in the TM domain is crucial for the VPU-mediated antagonism of human BST2. These results contribute to the molecular understanding of human BST2 specific antagonism by HIV-1 VPU. On the other hand, we are unable to repeat to show contribution of TIP47 on incorporation of HIV-1 ENV in the viral particles.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
平成 22 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
平成 23 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：BST2、HIV、エンベロープ、テザリン、宿主因子、BiFC、アクセサリ蛋白質

### 1. 研究開始当初の背景

エンベロープウイルスの粒子には、細胞膜由来の脂質二重膜にウイルス由来のENV蛋白質と細胞由来の因子が共存し、複合体として存在する。そして、これらの形成は細胞内の種々の分子により制御されていると考えられてきた。申請者は4回膜貫通蛋白質であるtetraspanin分子群すべてはHIVのエンベロープに取り込まれることを見出していた(J. Virol. 82:1021-1033, 2008)。興味深いことに、tetraspanin分子群は標的細胞への侵入を阻害する活性があった。

一方、出芽後のHIV-1粒子の遊離に抑制的に働く分子が明らかになっていた。それは、BST2,あるいはtetherinといわれる一回膜貫通蛋白質である(Nature 451:425-430, 2008)。このBST2のウイルス捕捉機能はHIV-1のアクセサリ蛋白質であるVPUにより解除されるが、その解除機序は明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

感染細胞におけるウイルスエンベロープの形成と取り込みの解明とウイルス伝播制御メカニズムの解明を目的とした。個別の研究目的は以下に示す。

- 1) ウイルスエンベロープへのウイルス性エンベロープ蛋白質と細胞性蛋白質のそれぞれの取り込みメカニズムの解明
- 2) BST2機能発揮のために必要な細胞性因子の解明
- 3) HIV-1 VPU蛋白質によるBST2機能解除の分子メカニズムの解明

### 3. 研究の方法

1) プラスミド、細胞、HIV感染実験  
BST2あるいはHIV-1 ENVの取り込みに関与する細胞性因子を強制発現させた293細胞、さらにBST2を恒常的に発現するHeLa細胞に、HIV-1 DNAをトランスフェクションし、培養上清ならびにプロテアーゼ処理により細胞外ウイルス粒子、そして細胞内ウイルス粒子を回収した。それらのウイルス量を測定し、細胞外、細胞膜上、そして細胞内のウイルス分布量の変化をウェスタンやFlow cytometry法等により測定した。各分画のウイルス粒子量の比較をおこなった。ウイルス量の測定には成熟GAG蛋白質p17ならびにENV特異的抗体を用い、成熟ウイルス量を測定した。さらに、感染性粒子の測定には、HIV

感染によりTAT依存性にルシフェラーゼ蛋白質を発現するTZM-b1細胞を用いた。

### 2) VPU/BST2結合実験

VPUとBST2それぞれに付加したN末とC末の蛍光KGペプチドフラグメントを生細胞で発現させるbi-molecular fluorescent complementation(BiFC)法を改良し、VPU/BST2複合体定量法を開発し、各種変異体を作製し、その複合体形成能を測定した。

### 3) 分子動力学計算解析

水分子および脂質分子のパラメーターを代入し、BST2 TM領域の安定的のroot mean square deviation(RMSD)値を算出した。

### 4. 研究成果

#### 1) エンベロープ形成メカニズムの解析

エンベロープウイルスの粒子には、細胞膜由来の脂質二重膜にウイルス由来のENV蛋白質と細胞由来の因子が共存し、複合体として存在する。そして、これらの形成は細胞内の種々の分子により制御されている。まず、HIV-1 ENVの取り込みを促進する因子として報告されたTip47蛋白質(PNAS103:14947-14952, 2006)について申請者が再現実験を試みたが、その介在の可能性はいずれの実験系でも証明できなかった。

#### 2) BST2とHIV-1粒子との関係性の解析

そこで本研究は、ウイルス粒子内に取り込まれ、細胞からのウイルス粒子の遊離を抑制する細胞性膜蛋白質BST2の解析を中心にした。鳥類まで含む種々の細胞株におけるヒトBST2のHIV-1捕捉作用を検討したところ、検討したすべての細胞株において、その作用は見られた。すなわち、その抗ウイルス作用発揮には種特異性因子の介在はなく、おそらくBST2は直接ウイルス粒子に作用していることが強く示唆された。

#### 3) BST2とVPUの相互性の解明

一方、BST2とVPUとの相互作用にはBST2の種特異性がある。すなわち、ヒトBST2はVPUと複合体を形成し、マウスBST2はVPUと複合体を形成しない。そこでマウスとヒトの細胞外、細胞質内、TM領域をそれぞれ置換したキメラBST2を作製し、ヒトBST2のVPUとの相互作用部位はそのTM部にあることを見いだした。次に、1アミノ酸変異体を含む種々のBST2変異体を用いた実験からVPUとの結合に関わるアミノ酸部位は、I34、L37およびL41がそれぞれ必須

であることがわかった。すなわち、相互作用に必須のドメインはTM領域内のヘリックス片側面の3つのアミノ酸に集積すること、VPUもTM領域を介してBST2と結合すること、一方、BST2は動物種ごとにアミノ酸配列に差異がありHIV-1が特異的に有するVPUに耐性のアカゲザルやアフリカミドリザルなどの多くのサル種のBST2には同じ3アミノ酸が保存されているが、その上流の2個のアミノ酸の欠失がVPUとの結合性に影響を与えることがわかった。これらのヒトBST2の1アミノ酸変異体は、いずれもVPUによるウイルス放出促進作用(すなわち、抗BST2作用)に対して反応性を消失することから、I34、L37およびL41残基は機能的にも重要であることがわかった。

#### 4) BST2のVPUとの結合部位の構造予測

これらの1アミノ酸ごとのBST2変異体の実験結果をもとに国立感染症研究所の佐藤裕徳博士との共同研究で分子動力学計算解析を行い、BST2のTM領域の構造予測を行った。その結果、ヒトBST2とアフリカミドリザルのBST2には明らかな分子構造の差異があり、サル種のそれでは上記I34、L37およびL41の3アミノ酸が同じ面に配位しないこと、さらにその下流のT45部位がVPUに対する結合ドメイン部位であることがわかった。これらの結果から、ヒトBST2ではT45(アフリカミドリザルではI45)とその周辺構造が、I34、L37およびL41の3つのアミノ酸に加え、VPUへの感受性決定に重要なことがわかった。これらのことは、ヒトならびにサル種ごとに異なるBSTが太古のウイルス感染とともに敵対的共進化した細胞性因子であることを強く示唆する。BST2とVPUの進化的相互性については、いまだ多くのなぞがある。

#### 5) ウイルスエンベロープ機能を制御するシグナル分子の同定

細胞内のシグナル制御を司るRhoGTPaseの活性化抑制分子であるARHGDIB/D4GDIが、HIV ENVを介する侵入時にHIV ENV特異的に感染を抑制することを見いだした。この抑制作用は、VSVG蛋白質によるシュードタイプHIVではみられなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

①Watanabe T, Urano E, Koyanagi Y, Komano J. 10人中9番目 Rho GTPase inhibitor ARHGDIB/D4GDI limits HIV-1 replication. *AIDS Research and Human Retroviruses* 印刷中 10. 1089/aid. 2011. 0180 査読有

②Kobayashi T, Ode H, Koyanagi Y. 11人中

11番目 Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 VPU interaction and susceptibility. *J Virol* 85: 932-945, 2011, 10. 1128/JVI. 01668-10 査読有.

③Sato K, Izumi T, Koyanagi Y. 9人中9番目 Remarkable lethal G-to-A mutations in vif-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice. *J Virol* 84:9546-9556, 2010, 10. 1128/JVI. 00823-1 査読有.

④Yoshida T, Ebina H, Koyanagi Y. N-linked glycan-dependent interaction of CD63 with CXCR4 at the Golgi apparatus induces downregulation of CXCR4. *Microbiol Immunol* 53:629-635, 2009, 10. 1111/j. 1348-0421. 2009. 00167. x 査読有

⑤Sato K, Yamamoto SP, Misawa N, Yoshida T, Miyazawa T, Koyanagi Y. Comparative study on the effect of human BST2/Tetherin on HIV-1 release in cells of various species. *Retrovirology* 6: e53, 2009, 10. 1186/1742-4690-6-53 査読有

[学会発表] (計 26 件)

①Watanabe T, Urano E, Miyauchi K, Ichikawa R, Hamatake M, Sato K, Hirota E, Koyanagi Y, Komano J The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDIB/D4GDI limits HIV-1 replication XV International Congress of Virology 2011年9月13日札幌コンベンションセンター(札幌市)

②小柳義夫、小林朋子 HIVのアクセサリ蛋白質VPUとその阻害蛋白テザリン 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月8日あわぎんホール(徳島市)

③小林朋子、芳田剛、佐藤佳、Peter Gee、山元誠司、蝦名博貴、小柳義夫 HIV-1 VPU相互作用に必須な tetherin/BST2 膜貫通領域アミノ酸の同定 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月8日 あわぎんホール(徳島市)

④Kobayashi T, Yoshida T, Sato K, Peter Gee, Ebina H and Koyanagi Y. Live cell-based mutagenesis studies reveals the structural insights for human tetherin recognition by HIV-1 VPU. 11th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium (招待講演) 2010年10月7日 阿蘇リゾートグランヴィリオホテル(阿蘇市)

⑤Kobayashi T, Ode H, Sato H, Koyanagi Y. HIV-1 VPU counteracts the antiviral factor tetherin/BST2 by binding it in lipid bilayer. 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research (招待講演) 2010年

7月2日 National Taiwan University  
Convention Center (台湾)

⑥小柳義夫、小林朋子、大出裕高、佐藤裕徳、  
HIV 増殖制御宿主因子：BST2 の機能と構造、  
第12回白馬シンポジウム 2010年6月14  
日徳島大学附属病院 (徳島市)

⑦Kobayashi T, Yoshida T, Sato K, Peter Gee,  
Ebina H and Koyanagi Y. Characterization  
of species-specific interaction between  
BST2 transmembrane domain and HIV-1 VPU in  
lipid bilayers of living cells.  
Retroviruses Meeting 2010年5月26日  
Cold Spring Harbor (米国)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/saito/TOP.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小柳 義夫 京都大学・ウイルス研究所  
(ウイルス研)・教授

研究者番号：80215417

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：