

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790338

研究課題名 (和文) 高分子複合体によるレトロウイルスの宿主細胞ゲノムへの同化機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis of retroviral nucleoprotein complex that executes viral DNA integration into host genome

研究代表者

鈴木 陽一 (SUZUKI YOUICHI)

京都大学・ウイルス研究所・特別教育研究准教授

研究者番号：40432330

研究成果の概要：レトロウイルスの特徴は、ウイルスゲノムを標的細胞の染色体に組み込むことである。この組み込み反応は様々な蛋白質から成る高分子複合体によって実行されるが、本研究ではその細胞性構成因子として報告されているラミナ関連蛋白質 (BAF、LAP2 $\alpha$ ) のウイルスゲノム組み込みに果たす役割を解析した。その結果、これらの蛋白質はウイルス性高分子複合体の安定性を高め、染色体への架橋を促進していることが示された。一方、高分子複合体の機能不全を誘起しうる細胞性因子の同定に至った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：レトロウイルス・高分子複合体・インテグレーション・ラミナ関連蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus: HIV) に代表されるレトロウイルスの特徴として、そのゲノム RNA から合成されたウイルス DNA を標的細胞の染色体に組み込むことがあげられる。この組み込み反応はインテグレーションとよばれ、ウイルス複製に必須の過程であることから、エイズなどのレトロウイルス感染症の治療を目的とした薬剤開発の新たな標的として注目されている。インテグレーションを触媒する酵素はウイルス由来のインテグラーゼであるが、実際の感染細胞においてはウ

ルス DNA とインテグラーゼを内包し、様々な蛋白質からなる高分子複合体がその実行ユニットであると考えられている。しかし、この高分子複合体のすべての構成因子や、それらがウイルスゲノム組み込みに果たす役割はまだ明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

レトロウイルスが感染細胞内で形成する高分子インテグレーション複合体は preintegration complex (PIC) とよばれる。研究代表者はこれまでに、マウス白血病ウイルス (Moloney murine leukemia virus:

MoMLV) を用いた解析により、細胞核のラミナ構造構成蛋白質である barrier-to-autointegration factor (BAF) と lamina-associated polypeptide 2 $\alpha$  (LAP2 $\alpha$ ) がレトロウイルス PIC の細胞性構成因子であり、両蛋白質が協調してインテグレーション反応の効率を高めていることを明らかにしてきた (Suzuki *et al.*, *EMBO J.*, 23, 4670-4678, 2004)。本研究では PIC を包括的に解析し、BAF や LAP2 $\alpha$  などのラミナ関連蛋白質がインテグレーションを制御するその分子機序を明らかにすることによって、レトロウイルスゲノムと宿主細胞ゲノムの同化機構の全容解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

PIC の抽出は MoMLV が感染した NIH3T3 細胞の細胞質分画をジグトニンで分離することでおこなった。*In vitro* 解析に用いる組換え体蛋白質は、大腸菌に発現させ、FPLC を用いて精製した。

インテグレースに結合する細胞性因子を新規に同定するため、streptavidin-binding peptide (SBP) タグならびに calmodulin-binding peptide (CBP) タグをタンデムにもつ MoMLV インテグレースを作製し、NIH3T3 細胞に恒常的に発現させた。この細胞溶出液から SBP および CBP それぞれに対するアフィニティービーズを用いて、タグ付加インテグレースと、それに結合している蛋白質群を高純度に精製した。精製された蛋白質 SDS-PAGE で分離し、質量分析法によって同定した。

### 4. 研究成果

(1) これまでに研究代表者は、レトロウイルス感染細胞から抽出した PIC に組換え体 BAF ならびに LAP2 $\alpha$  を添加すると、*in vitro* において、PIC によるウイルス DNA の標的 DNA への組み込みが促進されることを報告している。しかし、その分子機序は明らかになっていない。BAF と LAP2 $\alpha$  はともに DNA 結合性蛋白質であることから、PIC に存在するこれらのラミナ関連蛋白質は、ウイルス DNA と標的 DNA を架橋し、その結果 PIC のインテグレーション効率を高めていることが推測された。このことを証明するために、マグネティックビーズを結合した DNA 標的 DNA として用い、BAF もしくは LAP2 $\alpha$  の添加によって、PIC の標的 DNA への結合活性がどのように変化するかを解析した。BAF または LAP2 $\alpha$  の存在下で PIC と標的 DNA をインキュベーションし、マグネティックスタンドを用いて標的 DNA とそれに会合している PIC を回収した。回収された PIC は、ウイルス DNA に対するサザンブロット法によって検出した。その結果、PIC の標的 DNA への結合活性は、BAF や LAP2 $\alpha$

の添加によって有意に高まることが示された (図 1)。

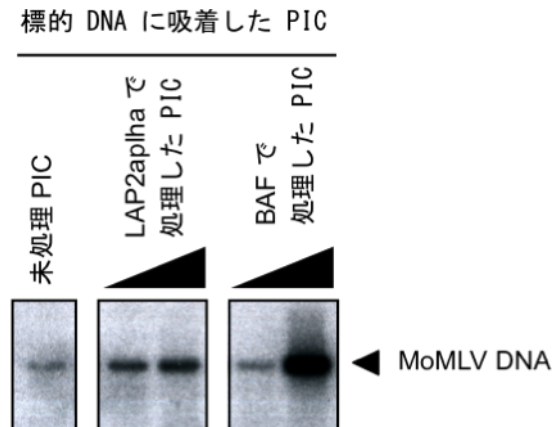


図 1 LAP2 $\alpha$  と BAF による PIC の標的 DNA への結合促進

(2) LAP2 $\alpha$  は BAF に結合し、さらに BAF/LAP2 $\alpha$  は DNA と複合体を形成する。*In vitro* 実験の結果より、この BAF/LAP2 $\alpha$ /DNA 複合体は高濃度の塩 (KCl) に対して耐性であるが、LAP2 $\alpha$  と DNA のみの複合体では高濃度の塩で処理すると LAP2 $\alpha$  が DNA から解離することが示されている。しかし PIC 中の LAP2 $\alpha$  は、BAF が存在しなくても、高濃度塩処理後もウイルス DNA に結合していることがわかっている。これらの事実は、PIC には LAP2 $\alpha$  の DNA 結合活性を高める別の因子が存在することを示唆するものである。細胞内で LAP2 $\alpha$  は BAF 以外にも、lamin A と retinoblastoma protein (Rb<sup>p110</sup>) に結合することが報告されていることから、これらの細胞性蛋白質が実際に PIC に含まれているのか否かを各蛋白質に対する抗体を用いた免疫沈降法にて調べた。その結果、Rb<sup>p110</sup> が PIC の構成因子であることが明らかになった (図 2A)。次に、Rb<sup>p110</sup> の組換え蛋白質を作製し、*in vitro* において LAP2 $\alpha$ /DNA 複合体の安定性を高めるかどうかを確認したところ、Rb<sup>p110</sup> は LAP2 $\alpha$  ならびに DNA と高塩濃度に対して安定な複合体を形成した。さらに、この複合体の安定性は BAF の添加によって増加した (図 2B)。この結果は、BAF、LAP2 $\alpha$  そして Rb<sup>p110</sup> がウイルス DNA に結合することで、機能的な PIC の安定性を高めていることを示唆するものである。

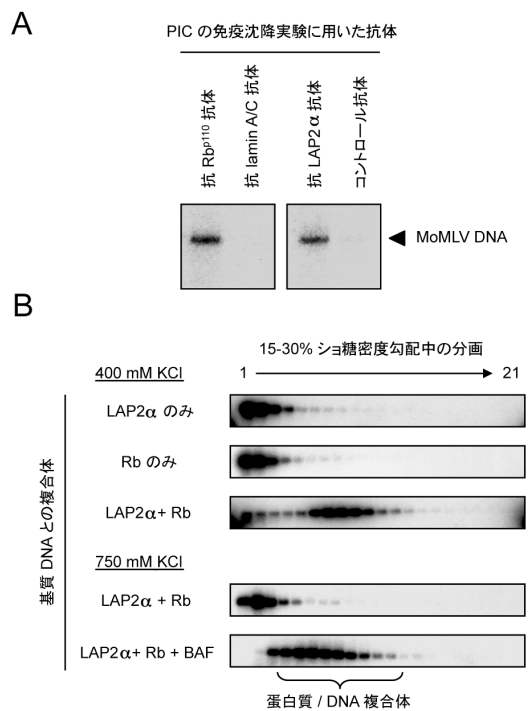


図2 MoMLV PIC 構成因子 Rb<sup>p110</sup> の新規同定 (A) と BAF/LAP2α/DNA 複合体の Rb<sup>p110</sup> による安定化 (B)

(3) LAP2αは6種類あるLAP2スプライシングバリエントのひとつであり、このLAP2バリエントは共通したN末端領域をもっている。そしてこのN末端領域がBAF結合領域であることはすでに報告されている。一方、C末端領域は各バリエントに固有の配列を有しており、LAP2αの場合、C末端領域の機能は明らかになっていない。そこで、このLAP2αのC末端領域(LAP2α-CTD)の結晶構造解析をおこなった。その結果、LAP2α-CTDは二量体を形成することが示された(図3)。細胞においてもLAP2αは多量体を形成することから、LAP2αのC末端領域は多量体形成領域であることが明らかとなった。また、このC末端領域を欠くLAP2αはPICに会合することができず、LAP2αの多量体化がPICへの取り込みに必須であることも示された。

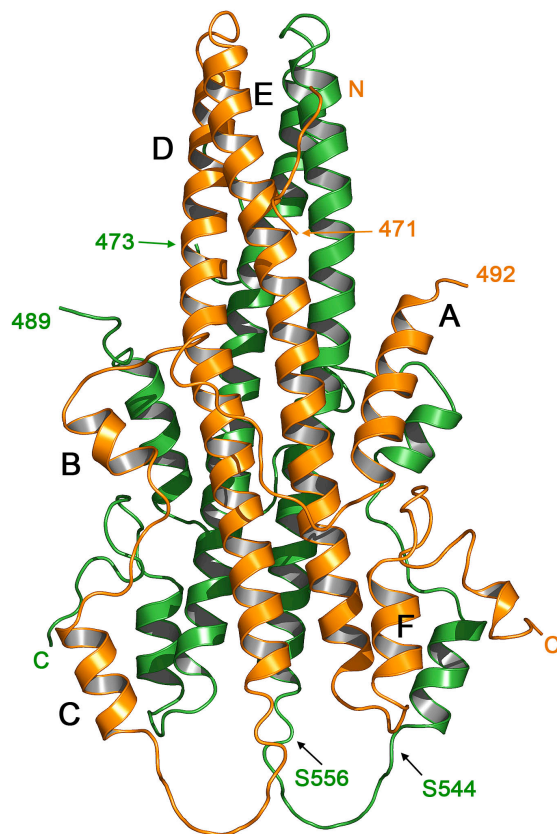


図3 LAP2α C末端領域の結晶構造解析

(4) 細胞内のBAFはリン酸化修飾を受ける。最近、vaccinia-related kinase 1 (VRK1) とよばれる細胞性キナーゼがBAFのリン酸化を触媒し、リン酸化されたBAFはすみやかにDNAから解離することが報告された。レトロウイルスPICにおいて、BAFはウイルスDNAに結合することでインテグレーション活性を促進すると考えられることから、リン酸化修飾によってBAFをウイルスDNAから解離させれば、結果的にPICのインテグレーション反応を阻害できるかもしれない。このことを検討するために、PICを組換え体VRK1で処理し、インテグレーション効率をみたところ、VRKの添加によってPICのインテグレーション活性が喪失した(図4A)。そして、抗BAF抗体を用いた免疫沈降実験によって、VRK1処理によってBAFは実際にPICから解離することが示された(図4B)。この結果は、細胞内にはBAFのリン酸化を介してレトロウイルスのゲノム組み込み反応を抑制する因子が存在することを示唆するものであり、レトロウイルス感染症に対する新たな治療戦略の確立という意味において極めて興味深いものである。

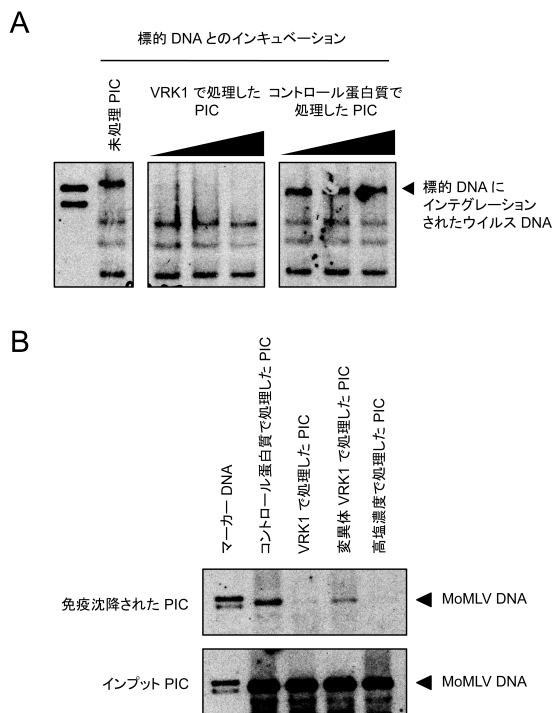


図4 VRK1 による PIC の *in vitro* インテグレーション活性の抑制 (A) と BAF の PIC からの解離 (B)

(5) PIC の最も重要な構成分子は、ウイルス DNA の組み込み反応を触媒するインテグレースである。本研究では、MoMLV インテグレースに結合する細胞性因子の同定を試みた。この目的のために、タンデムアフィニータグを融合したインテグレースを細胞に発現させ、2種類のアフィニティビーズを用いたタンデムアフィニティ精製法にてインテグレースとそれに結合する蛋白質群を精製した。SDS-PAGE で分離した蛋白質の質量分析によって、インテグレース結合性新規分子として E3 ユビキチンライゲース Huwe1 を同定した。MoMLV インテグレースと Huwe1 の相互作用は免疫沈降-ウエスタンブロッティング法によっても確認され、さらに Huwe1 は HIV のインテグレースにも結合することが明らかとなった (図5)。Huwe1 はウイルス感染細胞内で PIC にも会合していることが示されたが、インテグレースのユビキチン化には関与しておらず、さらには MoMLV や HIV の複製におけるインテグレーションまでの過程には影響を及ぼしていなかった。しかし、Huwe1 をノックダウンした細胞から放出されてくるウイルスの感染性が変化することから、Huwe1 はウイルスゲノムの組み込みではなく、ウイルス粒子の産生に関与することが示唆された。この結果は、インテグレース結合性因子の新たな役割を示すものである。

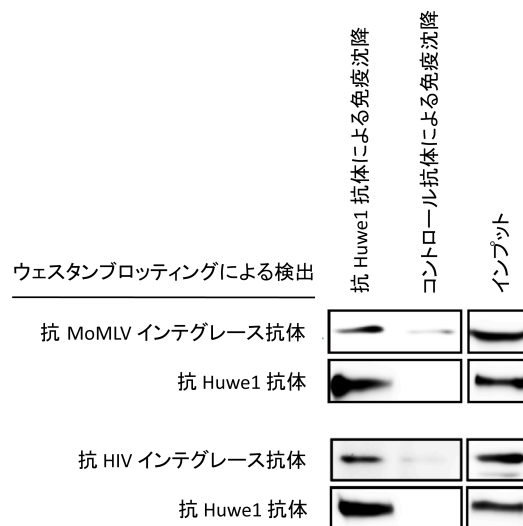


図5 E3 ユビキチンライゲース Huwe1 と MoMLV (上段) ならびに HIV (下段) インテグレースとの結合

## 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4件)

- ① 鈴木陽一、小柳義夫、エイズウイルス：細胞とウイルスのせめぎあい、細胞工学、27、1261-1268、2008、査読無
- ② 鈴木陽一、小柳義夫、HIV 増殖を制御する宿主因子、蛋白質核酸酵素、52、1207-1213、2007、査読無
- ③ Christina Bradley, Sarah Jones, Ying Huang, Youichi Suzuki, Mamuka Kvaratskhelia, Alison Burgess Hickman, Robert Craigie, Fred Dyda, Structural basis for dimerization of LAP2 $\alpha$ , a component of the nuclear lamina, Structure, 15, 643-653, 2007、査読有
- ④ Youichi Suzuki, Robert Craigie, The Road to chromatin - nuclear entry of retroviruses, Nature Reviews Microbiology, 5, 187-196, 2007、査読有

[学会発表] (計12件)

- ① 篠田康彦、インターフェロンオメガ1による HIV-1 感染抑制機構の解析、第22回日本エイズ学会学術集会・総会、11月26日、2008、大阪
- ② 渡部匡史、Small GTPase Rac2 による HIV-1 産生抑制、第22回日本エイズ学会学術集会・総会、11月26日、2008、大阪
- ③ 山元誠司、TAP-MS 法によるインテグレース結合因子 Huwe1 の同定とその解析、第22

回日本エイズ学会学術集会・総会、11月26日、2008、大阪

- ④ 鈴木康嗣、細胞性キナーゼ VRK1 によるレトロウイルスインテグレーション機能の阻害とその分子メカニズム、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、10月26日、2008、岡山
- ⑤ 渡部匡史、Small GTPase Rac2 による HIV-1 増殖抑制、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、10月26日、2008、岡山
- ⑥ Seiji Yamamoto, Functional association of HIV-1 and MoMLV integrase with HECT-domain ubiquitin ligase Huwe1 The 9th Kumamoto AIDS Seminar, September 18-19, 2008, Kumamoto
- ⑦ Youichi Suzuki, Functional disruption of the MoMLV PIC by a cellular kinase, VRK, 3rd International Conference on Retroviral Integrase, September 14, 2008, Woods Hole, USA
- ⑧ Yasutsugu Suzuki, VRK induces dysfunction of the MoMLV PIC through phosphorylation of BAF, 3rd International Conference on Retroviral Integrase, September 14, 2008, Woods Hole, USA
- ⑨ Yasuhiko Shinoda, Interferon- $\omega$  is a powerful inhibitor for HIV-1 infection, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, May 19, 2008, Cold Spring Harbor, USA
- ⑩ Seiji Yamamoto, Identification of cellular interactors to MoMLV integrase using tandem affinity purification-mass spectrometry analysis, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, May 19, 2008, Cold Spring Harbor, USA
- ⑪ 鈴木陽一、Non-stimulated PBMC において増殖する HIV-1 の分離とその性状の解析、第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、2007 年 11 月 28 日、広島
- ⑫ 篠田康彦、インターフェロンオメガ 1 による HIV-1 感染抑制、第 55 回日本ウイルス学会、2007 年 10 月 21 日、札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 陽一 (SUZUKI YOUICHI)  
京都大学・ウイルス研究所・  
特別教育研究准教授  
研究者番号：40432330

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

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

### (4) 研究協力者

小川 加那子 (OGAWA KANAKO)  
京都大学・ウイルス研究所・教務補佐員

山元 誠司 (YAMAMOTO SEIJI)  
京都大学・ウイルス研究所・大学院生

鈴木 康嗣 (SUZUKI YASUTSUGU)  
京都大学・ウイルス研究所・大学院生

Robert Craigie  
National Institutes of Health・  
Laboratory of Molecular Biology・  
Senior Investigator

Fred Dyda  
National Institutes of Health・  
Laboratory of Molecular Biology・  
Senior Investigator