

## 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25年 5月23日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390091

研究課題名（和文）生細胞イメージングによる HIV 複製コンポーネントの輸送とアセンブリの分子機構解析

研究課題名（英文）Live-cell imaging of HIV replication component trafficking and assembly

研究代表者

森川 裕子（MORIKAWA YUKO）

北里大学・大学院感染制御科学府・教授

研究者番号：20191017

研究成果の概要（和文）：

生細胞分子イメージングにより、GagPol 蛋白は Gag 蛋白と複合体を形成すること、3つの異なる動態を遷移すること（confined（ほとんど動かないもの）→diffusive（ある範囲内で往来するもの）→linear（長距離移動するもの））が判明した。linear は微小管系輸送であった。diffusive と linear は、いくつかの Rab や SNARE 蛋白質と部分的に共局在した。パッケージング配列 $\phi$ 部位をもつゲノム RNA は Gag/GagPol 蛋白と複合体を形成したが、 $\phi$ 部位を欠損させた RNA の場合には複合体を形成しなかった。 $\phi$ 部位欠損の場合の Gag/GagPol 蛋白複合体では linear が顕著に減少し、微小管系輸送が抑制された。

研究成果の概要（英文）：

Live-cell imaging revealed that Gag and GagPol proteins moved together with the transition from “confined” to “diffusive” and “linear” movements. The linear movement was microtubule-based. The Gag/GagPol with the diffusive and linear movements were partially colocalized with some Rab and SNARE proteins. The RNA containing the Psi site, the signal for genome RNA packaging but not the RNA lacking the signal, was partially merged to Gag/GagPol. In the latter case, Gag/GagPol did not show a long linear movement.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：病理・ウイルス学

キーワード：分子イメージング、細胞内輸送、アセンブリー、宿主因子、リアルタイム

## 1. 研究開始当初の背景

HIV 粒子の主構造蛋白である Gag 蛋白は、その単独発現で Gag 粒子と呼ばれるウイルス様粒子を形成する。それゆえ、多くの研究者が Gag 単独発現系で細胞内輸送を解析し、また

Gag を bait とした Two-Hybrid screening で宿主因子を探索してきた。しかし、HIV の特徴である逆転写酵素（RT）やインテグラーゼ（IN）およびプロテアーゼ（PR）は GagPol 蛋白の Pol 蛋白領域に存在し、GagPol 蛋白の

細胞内輸送の解析は感染性 HIV 粒子の産生を理解する上で必須である。また、感染性の本体である HIV ゲノム RNA の可視化も必要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

HIV の感染性複合体である複製コンポーネント (GagPol 蛋白とゲノム RNA) を蛍光可視化し、生細胞イメージングによりそれらの細胞内輸送とアセンブリーを 3 次元かつリアルタイムで解析する。宿主オルガネラマーカー (膜小胞、エンドソーム、微小管、アクチン等) との 2 蛍光解析によりその輸送経路を特定するとともに、時系列解析を加えて、HIV 粒子形成過程の全容を時空間的に理解することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) DNA 構築

HIV-1 cDNA 分子クローン pNL43 の PR の触媒中心を D25N 置換した PR(-) を親株として用いた。このクローンの Gag 蛋白 C 末端に EGFP あるいは mStrawberry を付加し Pol 蛋白領域を欠損させて Gag-EGFP/mStrawberry 発現分子クローンとした。Gag から Pol への frameshift 部位を欠損しかつ D25N 置換した PR(-) をもつ分子クローンを作製し、これの PR-RT あるいは RT-IN 間に EGFP あるいは mStrawberry を挿入して GagPol-EGFP/mStrawberry 発現分子クローンとした。また、ゲノム RNA の SL1 部位および SL3 部位 (パッケージング配列 $\phi$ 部位) を欠損させた。ゲノム RNA の可視化には、MS2 フェージの RNA パッケージング配列と coat 蛋白-GFP の共発現系を用いた。すなわち、PR(-) 分子クローンの Pol 領域に MS2 RNA パッケージング配列を挿入した。

mStrawberry-tubulin および mStrawberry-Actin、AcGFP-Rab および EGFP/mCherry-SNARE の発現には pCAGGS あるいは pcDNA を用いた。

### (2) 細胞培養と阻害剤処理

Lipofectamine2000 (Lifetech 社) を用いて HeLa 細胞に上記の DNA を transfection した。いくつかの実験においては、transfection 18-24 hr 後に、サイクロヘキシミド (蛋白合成阻害剤)、ノコダゾール (微小管重合阻害剤)、サイトカラシン D あるいはラトランキュリン (アクチン重合阻害剤) を添加した。

### (3) 生細胞分子イメージング

温度湿度制御型培養チャンバー (東海ヒット) を設置したスピンドディスク型高速共焦点顕微鏡 (横河電機) を用いて 2 蛍光を交互に撮影した。CCD 画像は ImageJ にて、色調補正・退色補正・SN 比補正を行い、蛍光シグナルを tracking した。

## 4. 研究成果

### (1) Gag/GagPol 蛋白の輸送

Gag-Strawberry、GagPol-EGFP、Gag-Strawberry +GagPol-EGFP 発現細胞をリアルタイムで観察した。

① Gag-Strawberry の場合は、“confined” (ほとんど動かない)、“diffusive” (ある範囲内で往來する)、“linear” (長距離移動する) の 3 つの異なる動態が認められるとともに、形質膜の集積が観察された。② GagPol-EGFP の場合は、ほとんどが “confined” であり、形質膜への集積も極めて少なかった。③ Gag-Strawberry を共発現させると、GagPol-EGFP の “confined” は減少し “diffusive” と “linear” が増加した。この “diffusive” と “linear” は Gag-Strawberry と GagPol-EGFP が merge した蛍光シグナルであった。以上の結果から、GagPol 蛋白は Gag 蛋白と複合体を形成して輸送されることが判明した。

(2) Gag/GagPol 蛋白の輸送経路と宿主因子 “confined”、“diffusive”、“linear” の輸送経路を明らかにする目的で、Gag-EGFP 発現細胞を各種の阻害剤で処理した。また、mStrawberry/mCherry で蛍光標識した宿主因子と Gag-EGFP との共発現細胞を 2 蛍光リアルタイムで観察した。

① サイクロヘキシミドで新規蛋白合成を阻害して観察したところ、“confined” が減少し、“linear” が増加したことから、“confined” → “diffusive” → “linear” と動態が遷移すると考えられた。

②  $\gamma$ -tubulin や EB1 を蛍光標識して MTOC を可視化したところ、“confined” は MTOC 近傍に局在することが判明した。

③ ノコダゾール処理で微小管を脱重合させたところ、“linear” と “diffusive” が消失し “confined” が増加したことから、“linear” と “diffusive” は微小管系輸送であることが判明した。

④ サイトカラシン D やラトランキュリンでアクチンを脱重合させても “diffusive” は消失しなかった。

⑤ Rab family や SNARE family を蛍光標識して Gag-EGFP/mStrawberry と共発現させたところ、Gag 蛋白はいくつかの Rab や SNARE と merge し、“diffusive” と “linear” に動いたことから、これらは Gag 蛋白が結合した輸送小胞の微小管系輸送と考えられた。

### (3) ゲノム RNA のパッケージング

GFP で標識したゲノム RNA あるいは SL1/SL3 部位 (パッケージング配列 $\phi$ 部位) 欠損の RNA を Gag-Strawberry と共発現させた。

① SL1/SL3 部位をもつゲノム RNA は Gag-Strawberry と merge したが、SL1/SL3 部

位欠損の RNA の場合には merge しなかった。  
②SL1/SL3 部位欠損のゲノムが共発現する場合、Gag/GagPol 蛋白複合体の“linear”が顕著に減少し、微小管系の長距離輸送が抑制された。

#### 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 19 件)

- ① Tomo N, Goto T, Morikawa Y. Trans-packaging of human immunodeficiency virus type 1 genome into Gag virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 12:28, 2013. 査読有. DOI: 10.1186/1475-2859-12-28
- ② Sudo S, Haraguchi H, Hirai Y, Gatanaga H, Sakuragi J-I, Momose F, Morikawa Y. Efavirenz enhances HIV-1 Gag processing at the plasma membrane through Gag-Pol dimerization. *J Virol* 87: 3348-3360, 2013. 査読有. DOI: 10.1128/JVI.02306-12
- ③ Haraguchi H, Noda T, Kawaoka Y, Morikawa Y. A large extension to HIV-1 Gag, like Pol, has negative impacts on virion assembly. *PLOS One* 7: e47828, 2012. 査読有. DOI: 10.1371/journal.pone.0047828
- ④ Mitsuki Y, Terahara K, Shibusawa K, Yamamoto T, Tsuchiya T, Ishige M, Kobayashi K, Morikawa Y, Nakayama T, Takeda M, Yanagi Y, Tsunetsugu-Yokota Y. HIV-1 infection *ex vivo* accelerates measles virus infection by upregulating signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) in CD4<sup>+</sup> T cells. *J Virol* 86: 7227-7234, 2012. 査読有. DOI: 10.1128/JVI.06681-11
- ⑤ Urano E, Kuramochi N, Ichikawa R, Yamagata Murayama S, Miyauchi K, Tomoda H, Takebe Y, Nermut M, Komano J, Morikawa Y. Novel postentry inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 replication screened by yeast membrane-associated two-hybrid system. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 4251-4260, 2011. 査読有. DOI: 10.1128/AAC.00299-11
- ⑥ Tomita Y, Noda T, Fujii K, Morikawa Y, Kawaoka Y. The cellular factors Vps18 and Mon2 are required for efficient production of infectious HIV-1 particles. *J Virol* 85: 5618-5627, 2011. 査読有. DOI: 10.1128/JVI.00846-10
- ⑦ Yamamoto SP, Okawa K, Nakano T, Sano K, Ogawa K, Masuda T, Morikawa Y, Koyanagi Y, Suzuki Y. Huw1, a novel cellular interactor of Gag-Pol through integrase binding, negatively influences HIV-1 infectivity. *Microbes Infect* 13: 339-349,

2011. 査読有. DOI: 10.1016/j.micinf.2010.12.002

- ⑧ Urano E, Ichikawa R, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Komano J. T cell-based functional cDNA library screening identified SEC13-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. *Vaccine* 28: B68-B73, 2010. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.07.084
- ⑨ Haraguchi H, Sudo S, Noda T, Momose F, Kawaoka Y, Morikawa Y. Intracellular localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and GagPol products and virus particle release: Relationship with the Gag-to-GagPol ratio. *Microbiol Immunol* 54: 734-746, 2010. 査読有. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2010.00276.x

[学会発表] (計 23 件)

- ① Sudo S, Haraguchi H, Hirai Y, Gatanaga H, Sakuragi J-I, Momose F, Morikawa Y. Efavirenz enhances HIV-1 Gag processing on the plasma membrane through Gag-Pol dimerization. *CSH Retrovirus Meeting*. 5/23/2012 米国 NY
- ② 原口日和、森川裕子. 生細胞分子イメージングによる HIV-1 Gag/GagPol 蛋白の細胞内動態解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 第 60 回日本ウイルス学会、11/13/2012、大阪
- ③ 池野翔太、寺原和孝、石毛真行、鈴木基臣、光木裕也、森川裕子、中山哲夫、横田恭子. ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系への応用. 第 60 回日本ウイルス学会、11/13/2012、大阪
- ④ Haraguchi H, Noda T, Kawaoka Y, Morikawa Y. Human immunodeficiency virus GagPol negatively regulates its membrane binding and particle assembly. *CSH Retrovirus Meeting*, 5/24/2011 米国 NY.
- ⑤ Mitsuki Y, Shibusawa K, Terahara K, Kobayashi K, Morikawa Y, Nakayama T, Takeda M, Yanagi Y, Tsunetsugu Yokota Y. HIV infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. 第 15 回国際ウイルス学会、9/15/2011、札幌
- ⑥ Haraguchi H, Noda T, Kawaoka Y, Morikawa Y. The Pol region of human immunodeficiency virus GagPol negatively regulates its membrane binding and particle assembly. 第 15 回国際ウイルス学会、9/13/2011、札幌
- ⑦ 中山順之、百瀬文隆、森川裕子. Rab 蛋白質を指標とした HIV Gag 蛋白質の細胞内

輸送経路の解析. 第 34 回日本分子生物学会学術集会、12/15-16/2011、横浜

- ⑧ Urano E, Kuramochi N, Tomoda H, Takebe Y, Miyauchi K, Komano J, Morikawa Y. Inhibitor of HIV-1 Gag assembly screened by yeast membrane-associated system. CSH Retrovirus Meeting, , 5//2010 米国 NY.
- ⑨ Yamamoto SP, Okawa K, Masuda T, Morikawa Y, Koyanagi Y, Suzuki Y. Modulation of HIV-1 infection at late phase by an integrase-interactor Huw1. CSH Retrovirus Meeting, 5//2010 米国 NY..
- ⑩ Haraguchi H, Morikawa Y. Live-cell imaging of human immunodeficiency virus Gag and Gag-Pol trafficking. 第 10 回感染症免疫フォーラム、9/9/2010、淡路島
- ⑪ Hoshino Y, Okunaga H, Morikawa Y. Overexpression of HRS induces BST-2 downregulation through its clathrin-binding domain. 第 10 回感染症免疫フォーラム、9/9/2010、淡路島

[その他]

ホームページ等

<http://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/life/chart/LSI-lab12.html>

<http://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/labo/ViralInfection2/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森川 裕子 (MORIKAWA YUKO)

北里大学・大学院感染制御科学府・教授

研究者番号：20191017