

平成21年 5月16日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006-2008
 課題番号：18390144
 研究課題名（和文） 酵母 CytoTrap 法を用いたウイルス粒子形成責任宿主因子の同定とその阻害剤探索
 研究課題名（英文） Identification of host factors responsible for virus pararticle production and screening of its inhibitors through yeast CytoTrap system
 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：酵母“CytoTrap法”を用いて HIV 粒子形成の責任宿主因子を探索し、2 個の Gag 蛋白に結合する宿主因子（一方は既知の宿主因子 AnnexinA2、他方は新規の宿主因子 AUP1）を同定した。全長 AUP1 は HIV 粒子産生を促進したが、AUP1 N 末端断片は顕著に阻害した。この阻害機序を解析したところ、Gag 蛋白分解促進の可能性が推測された。“CytoTrap法”を利用し、酵母で Gag-Gag 阻害剤探索系を構築し、化合物ライブラリを探索した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2007年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：酵母、ウイルス、宿主因子、阻害剤探索

1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの異なるウイルス（レトロ科・フィロ科・ラブド科ウイルス）がその粒子形成出芽過程において同じ宿主因子（TSG101 や Nedd4）や宿主機構（エンドソーム輸送経路）を利用することが報告された。

(2) 下等真核細胞である酵母が、①ウイルスの複製に必須な宿主因子をほぼ備えている、②細胞クローニングが原核細胞のように簡便な唯一の真核細胞である、③Two-Hybrid 法のような蛋白質間相互作用の検出方法が確立している、④宿主遺伝子の改変（遺伝子破

壊やアミノ酸置換）が可能な真核細胞であることが報告されていた。

2. 研究の目的

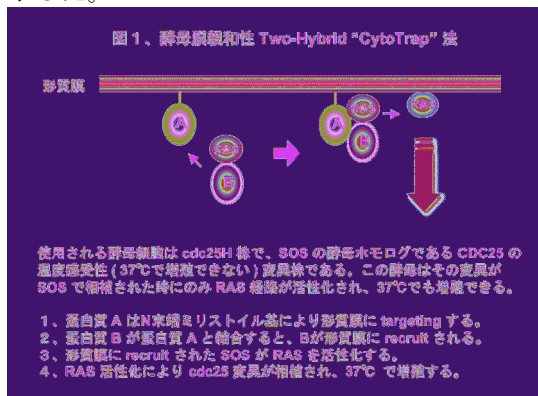
酵母 Two-Hybrid 法を用いてヒト免疫不全ウイルス（HIV）Gag 蛋白に結合する宿主因子が単離されたが、それらは細胞質遊離の蛋白であり、Gag 蛋白の細胞内輸送・粒子形成出芽に関与すると思われる膜結合領域をもつ宿主因子や細胞骨格蛋白は単離できていない。これは、酵母 Two-Hybrid 法が酵母細胞核内での蛋白質間相互作用を原理とするた

め、膜貫通部位のない細胞質遊離の蛋白で、かつ核膜孔通過が可能な低分子量蛋白しか検出できないことに起因すると思われる。我々は、HIV Gag 蛋白が酵母細胞においても形質膜に輸送され Gag 粒子が産生されること、すなわち、酵母細胞は HIV 粒子形成出芽に必須な宿主因子を備えていることを報告してきた。そこで本研究では、(1) 形質膜結合 Two-Hybrid 法である酵母 “CytoTrap 法” を用いて、ヒト cDNA ライブラリから Gag 蛋白と直接結合しかつ Gag 蛋白の細胞内輸送・粒子形成に責任のある新規宿主因子を単離同定する。(2) 酵母 “CytoTrap 法” と我々の酵母 Gag 粒子産生系を組み合わせた”酵母 CytoTrap Gag-Gag 反応系”を構築し、至適化後、Gag-Gag 相互作用を標的とした抗 HIV リード化合物探索系として試用した。

3. 研究の方法

(1) 酵母 CytoTrap 法を用いた Gag 蛋白結合性宿主因子の探索系

酵母 CytoTrap 探索キット (Stratagene 社) を用いた。ヒト胸腺 cDNA ライブラリを発現する pMyr ベクターと HIV-1 Gag 蛋白を発現する pSos ベクターで *Saccharomyces cerevisiae* cdc25Ha 株 (*MATa ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3 112 cdc25-2 Gal⁺*) を形質転換した。キットに添付のプロトコールに従い結合宿主因子を探索した。原理は図 1 に示した。



(2) 酵母 CytoTrap 法を用いた Gag-Gag 反応系とその阻害剤探索

HIV-1 Gag 蛋白を発現する pMyr 及び pSOS ベクター (Gag/pMyr と Gag/pSOS) を酵母 cdc25Ha 株に導入し Gag-Gag 反応系とした。形質転換した酵母 cdc25Ha 株を OD₆₀₀=0.1 に調製し、探索用低分子化合物ライブラリ (Enamine 社) を添加して培養した。酵母の生育率を OD₆₃₀ で調べた。

(3) DNA transfection

ヒト胸腺 cDNA ライブラリから AUP1 の

isoform1 と isoform 2 の全長、及びその断片を PCR 法で増幅し、pcDNA3-FLAG-HisC ベクターに挿入した。これと HIV-1 cDNA 分子クローン pNL432 を Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) を用いてヒト培養細胞 (HeLa, 293T 細胞) に cotransfection した。免疫染色の場合は Gag-GFP を発現する pNL432 derivative を使用した。

(4) 半定量 RT-PCR

ヒト培養細胞 (上皮系: HeLa, 293T 細胞、T リンパ球系: Jurkat, CEM174, SupT1 細胞、単球系: U937 細胞) から用いて RNA を抽出し oligo dT+random primers で逆転写反応を行った後、特異的プライマーを用いて PCR を行った。複数個人に由来する全身組織、免疫系組織、末梢血単核球の cDNA パネル (Clontech 社) を用いて同様に調べた。

(5) SDS-PAGE と Western blotting

常法に従った。抗 HIV-1 p24CA、抗 FLAG 抗体、抗アクチン抗体を用いた。

(6) 共焦点レーザー顕微鏡観察

細胞を 3.7% パラホルムアルデヒドで固定し膜透過処理を行なった。免疫染色には抗 FLAG、抗 TGN、抗 PDI、抗 CD63、抗チューブリン抗体等を用いた。

(7) HIV 粒子産生量の定量

HIV-1 p24 抗原 capture ELISA Kit (Zeptomatrix 社) を用いて定量した。

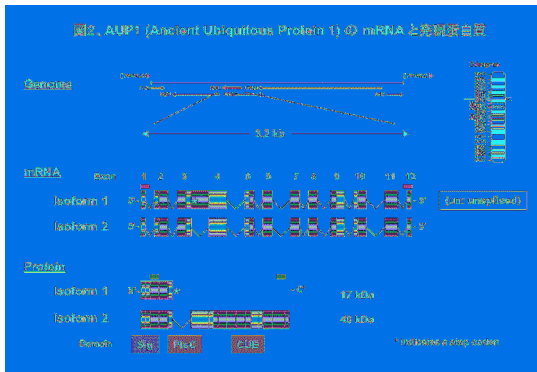
4. 研究成果

(1) 酵母 CytoTrap 法を用いた Gag 蛋白結合性宿主因子の探索系

ヒト胸腺ライブラリ発現 pMyr ベクターを導入した酵母約 800,000 コロニーを 3 個の陽性コロニーが単離できた。この 3 個は、cGMP 依存性蛋白質キナーゼ、Annexin A2、AUP1 であった。cGMP 依存性蛋白質キナーゼは RAS 経路を直接活性化することから、Gag 蛋白結合宿主因子との結合を介さず陽性を示したと判断された。Annexin A2 は Gag 蛋白と結合し HIV 粒子産生に関与することが既に報告されている。そこで本研究では新規責任宿主因子 AUP1 について作用機序を解析した。

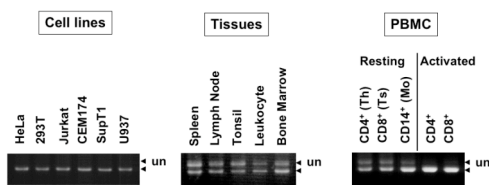
(2) AUP1 mRNA の発現プロファイル

AUP1 mRNA にはイントロンが残存する isoform 1 (unspliced form) と isoform 2 (spliced form) が報告されている。isoform 1 にはイントロン内に終止コドンが出現し、N 末端で停止した断片が発現すると考えられた (図 2)。



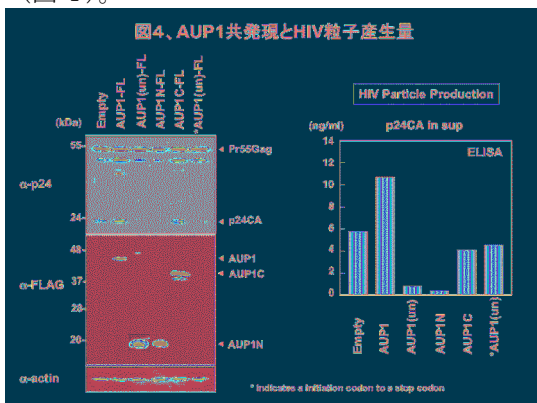
培養細胞を用いて AUP1 mRNA の発現プロファイルを調べたところ、主に isoform 2 の発現が認められた。組織パネルを用いて調べたところ、いずれの組織でも両者の isoform の発現が認められた。そこで、末梢血単核球パネルを用いて調べたところ、活性化細胞では isoform 2 の発現が認められるのに対し、休止期細胞では両 isoform の発現が認められることが判明した (図 3)。

図3、AUP1 mRNAの発現プロファイル



(3) AUP1 による HIV-1 粒子産生への影響

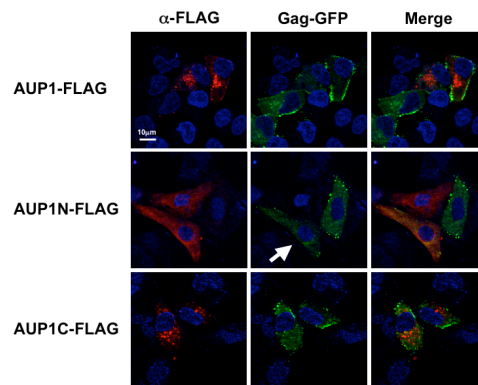
AUP1 発現ベクターを作製し HIV-1 cDNA 分子クローンと HeLa 細胞で共発現させたところ、isoform 2 は粒子産生量を増加させたのに対し、isoform 1 は粒子産生量を顕著に減少させた。そこで、isoform 1 から発現すると考えられる N 末端断片と、その下流である C 末端断片をそれぞれ作製し、上述と同様に調べたところ、N 末端断片は HIV 産生量を顕著に減少させたのに対し、C 末端断片には効果はなかった。この HIV 産生阻害活性は AUP1 N 末端約 40 アミノ酸断片においても観察された (図 4)。



(4) AUP1 による HIV-1 粒子産生への影響

共焦点レーザー顕微鏡で AUP1 の細胞内局在を調べたところ、isoform 2 すなわち全長 AUP1 や C 末端断片はいずれも細胞質の核近傍領域に局在したのに対し、N 末端断片ではそのような局在はなく細胞質全体に網状に分布した。オルガネラマーカーと共染色したところ、核近傍に認められた isoform 2 は後期エンドソームの CD63、トランスゴルジネットワークの TGN46 と共局在し、一方、N 末端断片は小胞体の PDI と共局在することが判明した。HIV-1 共発現細胞で調べたところ、Gag 蛋白は isoform 2 や C 末端断片を共発現させた場合には Gag 蛋白は形質膜に局在したが、N 末端断片を共発現させた場合は Gag は細胞質に網状に分布した。

図5、AUP1共発現とGag蛋白の細胞内局在



(5) 酵母 CytoTrap 法を用いた Gag-Gag 反応系とその阻害剤探索

酵母 CytoTrap 法を利用した Gag-Gag 反応系を作出し 96 穴プレートの high-throughput format の探索系に至適化した。この探索系を用いて、市販の低分子化合物ライブラリ (約 20,000 化合物) を探索したところ、その IC₅₀ は高いものの 6 個の Gag-Gag 特異的阻害化合物が見いだされた。

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 12 件)

- ① S. Kawada, T. Goto, H. Haraguchi, A. Ono, & Y. Morikawa. Dominant negative inhibition of human immunodeficiency virus particle production by the non-myristoylated form of Gag. *J. Virol.* 82: 4384-4399 (2008) 査読あり
- ② E. Urano, S. Shimizu, Y. Futahashi, M. Hamatake, Y. Morikawa, N. Takahashi, H. Fukazawa, N. Yamamoto, & J. Komano.

- Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/P-TEFb-dependent LTR transcription. *AIDS* 22: 1081-1083 (2008) 査読あり
- ③ S. Yamayoshi, T. Noda, H. Ebihara, H. Goto, Y. Morikawa, I. S. Lukashevich, G. Neumann, H. Feldmann, & Y. Kawaoka. Ebola virus matrix VP40 protein uses the COPII transport system for its intracellular transport. *Cell Host Microbe* 3: 168-177 (2008) 査読あり
- ④ A. Ryo, N. Tsurutani, K. Ohba, R. Kimura, J. Komano, M. Nishi, H. Soeda, S. Hattori, K. Perrem, M. Yamamoto, J. Chiba, J. Mimaya, K. Yoshimura, S. Matsushita, M. Honda, A. Yoshimura, T. Sawasaki, I. Aoki, Y. Morikawa, & N. Yamamoto. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 294-299 (2008) 査読あり
- ⑤ E. Urano, T. Aoki, Y. Futahashi, T. Murakami, Y. Morikawa, N. Yamamoto, & J. Komano. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55^{Gag} with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. *J. Gen. Virol.* (in press) 査読あり
- ⑥ E. Urano, Y. Kariya, Y. Futahashi, R. Ichikawa, M. Hamatake, H. Fukazawa, Y. Morikawa, T. Yoshida, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, & J. Komano. Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS Let* 582: 4053-4058 (2008) 査読あり
- ⑦ Y. Morikawa, T. Goto, D. Yasuoka, F. Momose, & T. Matano. Defect of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Gag Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol.* 81: 9911-9921 (2007) 査読あり
- ⑧ 森川裕子, 鶴谷直美 HIVの粒子形成と成熟機構 蛋白質核酸酵素 52:1181-1186 (2007) 査読なし
- ⑨ F. Momose, Y. Kikuchi, K. Komase, & Y. Morikawa. Visualization of microtubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein. *Microbes Infect.* 9: 1422-1433 (2007) 査読あり
- ⑩ T. Naito, F. Momose, A. Kawaguchi, & K. Nagata. Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits. *J. Virol.* 81: 1339-1349 (2007) 査読あり
- ⑪ S. Sakuragi, J. Sakuragi, Y. Morikawa, & T. Shioda. Development of a rapid and convenient method for the quantitation of HIV-1 budding. *Microbes Infect.* 8: 1875-1881 (2006) 査読あり
- ⑫ 森川裕子 酵母を用いた動物ウイルスの研究 ウイルス 56: 9-16 (2006) 査読なし
- [学会発表] (計39件)
- ① E. Urano, Y. Kariya, Y. Futahashi, M. Hamatake, Y. Morikawa, T. Yoshida, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, & J. Komano. Identification of the carboxy-terminal domain of chromatin-associated transcriptional activator bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication. CSH Retrovirus Meeting, 2008年5月、米国NY
- ② 浦野恵美子、奥長浩之、森川裕子、駒野淳 DNA J/ HSP40 Co-chaperonine family による HIV-1 複製抑制 第56回日本ウイルス学会、2008年10月、岡山
- ③ 原口日和、森川裕子 HIV-1 Gag-Pol 蛋白の発現比率は粒子産生を制御する 第56回日本ウイルス学会、2008年10月、岡山
- ④ 百瀬文隆、関本哲也、森川裕子 インフルエンザウイルス RNP 複合体のプラスミドトランスフェクションによる再構成と核外輸送機構の解析 第56回日本ウイルス学会、2008年10月、岡山
- ⑤ 周東翔、原口日和、瀧永博之、森川裕子 非ヌクレオチド系逆転転写酵素阻害剤エファビレンツによる HIV 粒子形成阻害機構 第56回日本ウイルス学会、2008年10月、岡山
- ⑥ 関本哲也、百瀬文隆、森川裕子 ライブセルイメージングによるインフルエンザウイルス子孫 RNP 複合体の細胞内輸送機構の解析 56回日本ウイルス学会、2008年10月、岡山
- ⑦ 三枝祥子、森川裕子 宿主因子 AUP1 による HIV の複製制御機構の解析 56回日本ウイルス学会、2008年10月、岡山
- ⑧ 百瀬文隆、関本哲也、森川裕子 インフルエンザウイルス RNP 複合体輸送機構のライブセルイメージング 第31回日本分子生物学会/第81回日本生化学会、2008年12月、神戸
- ⑩ E. Urano, S. Shimizu, M. Hamatake, Y. Morikawa, & J. Komano. Upregulating expression of cyclin K/CPR4 limits the replication of HIV-1. CSH Retrovirus Meeting, 2007年5月、米国NY
- ⑪ 須山真理、佐野浩二、森川裕子 HIV 潜伏感染細胞からのウイルス産生機構 第55

- 回日本ウイルス学会、2007年10月、札幌
- ⑫ 富田有里子、櫻木小百合、森川裕子、河岡義裕 Gag 出芽機構に關与する宿主因子の網羅的解析-出芽酵母を利用した遺傳学的アプローチ 第55回日本ウイルス学会、2007年10月、札幌
- ⑬ 原口日和、森川裕子 HIV-1 Gag-Pol 蛋白の細胞内輸送 第55回日本ウイルス学会、2007年10月、札幌
- ⑭ 百瀬文隆、菊池雄士、駒瀬勝啓、森川裕子 新規抗インフルエンザウイルスNPモノクローナル抗体による RNP 複合体の可視化 第55回日本ウイルス学会、2007年10月、札幌
- ⑮ 奥長浩之、鶴谷直美、森川裕子 エンドソーム分子 HRS によるヒト免疫不全ウイルスの Gag 輸送制御機能の解析 第30回日本分子生物学会/第80回日本生化学会、2007年12月、横浜
- ⑯ 原口日和、森川裕子 ヒト免疫不全ウイルスGag-Pol蛋白の細胞内輸送制御機構 第30回日本分子生物学会/第80回日本生化学会、2007年12月、横浜
- ⑰ 百瀬文隆、菊池雄士、駒瀬勝啓、森川裕子 微小管依存的なインフルエンザウイルス子孫 vRNP 複合体輸送の可視化 第30回日本分子生物学会/第80回日本生化学会、2007年12月、横浜
- ⑱ N. Tsurutani, T. Goto, I. S. Ohno, & Y. Morikawa. Identification of host cellular machinery for HIV-1 Gag trafficking. CSH Retrovirus Meeting、2006年、米国 NY
- ⑲ N. Tsurutani, T. Goto, I. S. Ohno, & Y. Morikawa. Identification of host cellular machinery for HIV-1 Gag trafficking. ASCB Meeting、2006年、米国 AL
- ⑳ F. Momose, A. Kawaguchi, A. Iwamatsu, Y. Morikawa & K. Nagata. Stimulation of influenza virus RNA synthesis by a host factor RAF-2 that is bound to viral nucleoprotein and the genome RNA. 第13回ICNSV、2006年、スペイン
- ㉑ 森川裕子、後藤俊幸 HIV 非ミリストイル化 Gag 蛋白によるドミナントネガティブな粒子形成出芽の阻害機構 第54回日本ウイルス学会、2006年11月、名古屋
- ㉒ 鶴谷直美、百瀬文隆、森川裕子 HIV Gag 蛋白の細胞内輸送及び粒子形成における責任宿主因子の關与 第54回日本ウイルス学会、2006年11月、名古屋
- ㉓ 百瀬文隆、川口敦史、森川裕子、永田恭介 宿主因子RAF-2p36に依存したインフルエンザウイルス RNP の形成促進 第54回日

- 本ウイルス学会、2006年10月、名古屋
- ㉔ Y. Morikawa. Dominant negative inhibition of HIV particle production by the non-myristoylated form of Gag. 第20回日本エイズ学会、2006年、

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

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

(2) 研究分担者

百瀬 文隆 (MOMOSE FUMITAKA)
北里大学・大学院感染制御科学府・教授
研究者番号：90332204

(3) 連携研究者