

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390136

研究課題名（和文）HIV-1 タンパク質の細胞内ダイナミクス制御機構の解明

研究課題名（英文）Tracking the intracellular dynamics of HIV-1 proteins

研究代表者

梁 明秀 (RYO AKIHIDE)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：20363814

研究成果の概要（和文）：

HIV 感染症の成立には宿主タンパク質と HIV タンパク質間の機能的相互作用が必要である。今回我々は、サイトカインシグナル抑制因子である SOCS1 が HIV-1 Gag に結合し、Gag の細胞内輸送とウイルス粒子形成を促進することを見出した。SOCS1 は Gag のユビキチン化を促進し、Gag と微小管の相互作用を促進することで Gag の細胞内輸送と HIV 粒子産生を促進することが明らかとなった。これらの結果は Gag の細胞内輸送を阻害する新たな AIDS/HIV 治療法の開発に結びつくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) utilizes the macromolecular machinery of the infected host cell to produce progeny virus. We have identified suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) as a host factor that positively regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. SOCS1 can directly bind to Gag and enhance its stability and trafficking, resulting in the efficient production of HIV-1 particles. We found also that SOCS1 can enhance the ubiquitination of Gag and facilitate its interaction with microtubule network. These findings will be useful for developing a new anti-HIV therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,600,000	0	5,600,000
2009 年度	4,400,000	471,815	4,871,815
2010 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	1,791,815	16,191,815

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：ヒト免疫不全ウイルス、エイズ、宿主因子、細胞内輸送

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染症の成立には宿主タンパク質と HIV タンパク質間の相互作用が必須であり、ウイルスの増殖・生活環、および病原性発現機構

に重要な役割を果たす。また、感染にともなう宿主個体のウイルスに対する細胞内免疫応答機構の 1 つとして、ウイルス-宿主タンパク質複合体の形成について考慮するため

にはその質的、時間的、空間的な関係を十分に理解する必要がある。しかしながら、現在までの研究ではウイルス側の遺伝子構造の解析に力が注がれており、実際の抗エイズ薬は HIV タンパク質を標的にしたものが主流である。

2. 研究の目的

本研究では、特に HIV-1Gag タンパク質の細胞内ダイナミズムに焦点を当て、その宿主側制御因子を同定し、ウイルス粒子産生における役割を明らかにすることで、新規の治療標的を同定することを目的とする。また、HIV-1Gag の翻訳後修飾を基盤としたウイルス粒子産生機構を明らかにする。下記5つの課題を実施した。

1) HIV-1Gag 細胞内トラフィック制御機構の解明と関連因子の同定; 2) HIV-1Gag の翻訳後修飾制御因子の同定; 3) 候補タンパク質のバリデーションおよびウイルス感染との関連についての検索; 4) ウイルス感染モデルを用いた細胞側因子の解析および創薬ターゲットの選定; 5) 宿主因子に対する HIV 変異の影響の検討

3. 研究の方法

3.1 抗体

抗体 (Abs) および蛍光標識試薬は以下を用いた。rabbit polyclonal anti-myc (A-14), rabbit polyclonal anti-SOCS1 (H-93) Abs (Santa Cruz Biotechnology); rabbit polyclonal anti-SOCS1 (Zymed Laboratories); mouse monoclonal anti-FLAG (M2), anti- α -tubulin (Sigma, MO); rabbit polyclonal anti-stathmin antibody (Calbiochem); mouse monoclonal anti-myc antibody (9B11, Cell Signaling Technology); mouse monoclonal anti-cytokeratin 7, cytokeratin 18, vimentin and HIV-p24 Ab (Dako Cytomation).

3.2 プラスミドおよびシーケンス

SOCS1 発現コンストラクトとして pCDNA-myc-SOCS1 を使用した。また、コドン最適化した HIV-1 Gag を発現プラスミドに挿入して利用した。使用したプライマーは下記のとおりである。

5' -AGCAAGCTTGCCACCATGGCTTCTCTGATATCCAGG-3'

5' - GACGGATCCGTCAGCTTCAGTCTCGTCAG-3'

pcDNA3.1-myc-Ubiquitin およびその変異体は上記プライマーを用いて PCR 法にて作製した。siRNA 配列は下記のとおりである。SOCS1-siRNA, GGCCAGAACCCTCCTCCTCTT; control-siRNA, TCGTATGTTGTGGAATT

3.3 microtubule spin-down assay

微小管結合タンパク質は、microtubule-associated protein spin-down assay kit (Cytoskeleton, BK029)を用い、操作手順に従って回収した。簡単に示すと下記のとおりである。

まず、293T 細胞に 0.5 ml の PEM buffer (80 mM PIPES, pH 6.9, 0.3 % Triton X-100, 1 mM EGTA, 100 μ M GTP, 1 mM MgCl₂) と 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml aprotinin, 1 mM sodium orthovanadate および 5 mM NaF を加えて溶解し、細胞ライセートを作製した。次にタキゾールおよび GTP 存在下で重合させたウシ微小管と混合後、50000rpm で 40 分間超遠心を行い、ペレットを微小管結合分画とした。

3.4 in Vitro 相互作用解析

in Vitro における HIV-1 Gag と SOCS1-E3 複合体の相互作用は、下記のとおり行った。小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて ¹⁴C ラベルしたリコンビナントタンパク質 (SOCS1, elongin B/C, Rbx1, ビオチン化標識 Cullin 2 および HIV-1 Gag) を合成し、120 μ l の reaction buffer (50 mM Tris-HCl pH7.6, 50 mM MgCl₂, 500 mM CH₃COOK, 0.1 mM DTT and 1 mg/ml BSA) とストレプトアビジンビーズ (Promega, Madison, WI) を混合し、23°C で 1 時間インキュベートした。reaction buffer で 3 回洗浄後、オートラジオグラフィーに供した。

4. 研究成果

4.1 SOCS1 は HIV 感染細胞において発現が上昇する

2 種類の T 細胞株 Jurkat および MT-4 に HIV-1 を感染させ、RT-PCR 法を用いて SOCS1 の mRNA 量を定量した。その結果、2 種の細胞で、共に SOCS1 の発現量が上昇していることがわかった。同様に、健常者の末梢血 PBMC についても RT-PCR を行ったところ、SOCS1 の発現が増加していた。このことから、SOCS1 は HIV 感染により、その遺伝子発現が誘導され、AIDS の発症に関わっている可能性があることが示唆された。

4.2 SOCS1 は HIV のウイルス粒子形成を促進する

次に、SOCS1 を強制発現させたときのウイルス粒子形成について検討した。293T 細胞に HIV-1 の分子クローンである pNL4-3 および SOCS1 を強制発現させ、細胞上清中のウイルス量について p24 抗体を用いた ELISA にて定量した。また細胞上清および細胞ライセートをウエスタンブロットに供した。その結果、SOCS1 の濃度依存的にウイルス量の増加が見られた。さらに、pNL4-3 および SOCS1 を強制発現させた 293T 細胞について電子顕微鏡を

用いて観察したところ、コントロールに比べて成熟ウイルス粒子の増加が認められた。

4.3 SOCS1 は微小管に沿って局在する

COS-1 細胞を用いて SOCS1 抗体で蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡にて観察した結果、細胞内の SOCS1 は、核周囲から細胞膜に向かって放射状に点在していた。次に、微小管構成因子である α -チューブリン抗体を用いて同様に蛍光免疫染色をおこなったところ、SOCS1 と共局在する様子が見られた(図 3A)。しかしながら、 γ -チューブリンやアクチン、ビメンチンといった他の細胞骨格因子や、サイトケラチン 7、サイトケラチン 18 などの中間系フィラメントと SOCS1 との共局在は認められなかった。以上のことから、SOCS1 は微小管を介した Gag の輸送に関わることが示唆された。

4.4 SOCS1 は HIV-1Gag の微小管への結合を促進させる

Gag-FLAG と myc-SOCS1 またはコントロールベクターを共発現させた 293T 細胞のライセートと、タキソールおよび GTP 存在下で重合させたウシ微小管とを混合した後、50000rpm で超遠心を行い、ペレットを回収した。ウエスタンブロットにより、Gag および SOCS1 を定量した結果、SOCS1 は Gag との共発現に関わらず、定常的に微小管に結合することがわかった。一方、Gag は SOCS1 を共発現させると、微小管に結合する Gag の量が増加した。このことから、SOCS1 は HIV-Gag の微小管への結合を促進させることが示唆された。

4.5 SOCS1 は HIV-1Gag のユビキチン化を促進する

小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて SOCS1、elonginB/C、Rbx1 および、ビオチン化標識 Culin 2 を合成し、リコンビナント Gag タンパク質と混合した後、ストレプトアビジンビーズを用いてプルダウンをおこなった。その結果、HIV-1Gag は SOCS1-ElonginB/C-Rbx-Culin2 と複合体を形成することが明らかとなった。次に Gag-FLAG と myc-Ubiquitin および empty vector または SOCS1 を 293T 細胞に共発現させ、FLAG 抗体で免疫沈降後、myc 抗体でユビキチン化 Gag を定量した結果、SOCS1 は Gag のユビキチン化を顕著に促進した。次に、SOCS1 によって促進された Gag のユビキチン化が、Gag タンパク質の細胞内輸送や、ウイルス粒子形成に必須であるかどうかを確認するため、C 末端の 2 つのグリシンを欠如させたユビキチン (myc-Ub Δ GG) を作製した。myc-Ub Δ GG を共発現させると、 α -チューブリンに結合する Gag の量が減少することが明らかとなった。また、SOCS1 による HIV-1 粒子産生増強効果が減弱

した。

4-6 結論

以上のことから、SOCS1 は HIV-1 Gag のユビキチン化を担うことで、Gag の微小管への結合を促進し、HIV-1 粒子産生を増大させることが示唆された。この結果は細胞内における Gag タンパク質の細胞への輸送機構をはじめて明らかにしたものであり、細胞側因子を標的とした新しい抗体 HIV-1/AIDS 治療に道を開くものである。

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 18 件)

1. Sugiyama R, Nishitsuji H, Furukawa A, Katahira M, Habu Y, Takeuchi H, Ryo A, Takaku H. Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G. *J Biol Chem*. 2011 Mar 25;286(12):10051-7.
2. Yoshizaki S, Nishi M, Kondo A, Kojima Y, Yamamoto N, Ryo A. Vaccination with human induced pluripotent stem cells creates an antigen-specific immune response against HIV-1 gp160. *Frontiers in Microbiology*, 2011 Feb 22;2:27.
3. Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem*, 2011 Feb 4;286(13):11593-603.
4. Inagaki N, Takeuchi H, Yokoyama M, Sato H, Ryo A, Yamamoto H, Kawada M, Matano T. A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology* 2010 Oct 18, 7:90

5. Kojima Y, Ryo A. Pinning down viral proteins: A new prototype for virus-host cell interaction. *Frontiers in MICROBIOLOGY*. 2010 Sep 9;1:107
6. Shimada M, Yoshizaki S, Jounai N, Kondo A, Ichino M, Ryo A, Okuda K. DNA vaccine expressing HIV-1 gp120/immunoglobulin fusion protein enhances cellular immunity. *Vaccine*. 2010 Jul 12;28(31):4920-7.
7. Pulikkan JA, Dengler V, Peer Zada AA, Kawasaki A, Geletu M, Pasalic Z, Bohlander SK, Ryo A, Tenen DG, Behre G. Elevated PIN1 expression by C/EBPalpha-p30 blocks C/EBPalpha-induced granulocytic differentiation through c-Jun in AML. *Leukemia*. 2010 May;24(5):914-23.
8. Yashima S, Yoshizaki S, Shinoda K, Yoshida A, Kondo A, Mizuguchi H, Ryo A, Okuda K, Shimada M. Co-administration of viral vector-based vaccines suppresses antigen-specific effector CD8 T cells. *Vaccine*. 2010 Apr 19;28(18):3257-64.
9. Murakami T, Eda Y, Nakasone T, Ami Y, Someya K, Yoshino N, Kaizu M, Izumi Y, Matsui H, Shinohara K, Yamamoto N, Honda M. Postinfection passive transfer of KD-247 protects against simian/human immunodeficiency virus-induced CD4+ T-cell loss in macaque lymphoid tissue. *AIDS*. 2009 Jul 31;23(12):1485-94.
10. Murakami T, Kumakura S, Yamazaki T, Tanaka R, Hamatake M, Okuma K, Huang W, Toma J, Komano J, Yanaka M, Tanaka Y, Yamamoto N. The novel CXCR4 antagonist KRH-3955 is an orally bioavailable and extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jul;53(7):2940-8.
11. Ohba K, Ryo A, Dewan MZ, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Nagashima Y, Tanaka Y, Okamoto T, Terashima K, Yamamoto N. Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand 1. *J Immunol*. 2009 Jul 1;183(1):524-32.
12. Ryo A, Wulf G, Lee TH, Lu KP. Pinning down HER2-ER crosstalk in SMRT regulation. *Trends Biochem Sci*. 2009 Apr;34(4):162-5.
13. Yamamoto T, Tsunetsugu-Yokota Y, Mitsuki YY, Mizukoshi F, Tsuchiya T, Terahara K, Inagaki Y, Yamamoto N, Kobayashi K, Inoue J. Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. *PLoS Pathog*. 2009 Jan;5(1):e1000279.
14. Urano, E., T. Aoki, Y. Futahashi, T. Murakami, Y. Morikawa, N. Yamamoto, and J. Komano : Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. *J. Gen. Virol.* , 2008 Dec;89:3144-9.
15. Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J. 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 Lett. 2008 Dec 10;582(29):4053-8.

16. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T and Akira S.
Loss of Atg16L1, an autophagy regulator, enhances endotoxin-induced IL-1 β production Nature, 2008 Nov 13;456(7219):264-8.

17. Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, Sugimoto H, Martinez Bruyn VJ, Iwasaki Y, Matsubara K, Qi X, Saitoh T, Imoto I, Inazawa J, Utsunomiya A, Watanabe T, Masuda T, Yamamoto N, Yamaoka S.
Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. Blood. 2008 May 15;111(10):5118-29.

18. Urano E, Shimizu S, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Takahashi N, Fukazawa H, Yamamoto N, Komano J.
Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/positive transcription elongation factor b-dependent long terminal repeat transcription. AIDS. 2008 May 31;22(9):1081-3.

[学会発表] (計 20 件)

1. Masaoka T, Morishita R, Sawasaki T, Sugiura W, Yamamoto N, Ryo A: Evaluating HIV-1 reverse transcriptase inhibitor resistance by in vitro enzymatic assay using a wheat-germ cell-free translation

system. 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, America, 2011, 2.

2. K Miyakawa, T Sawasaki, S Matsunaga, N Yamamoto, A Ryo: Identification of a Host Factor Antagonizing Vpu-Mediated Tetherin Down-Regulation. The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting, Philadelphia, 2010, 12.

3. 梁 明秀: 革新的技術を応用した次世代エイズ研究の展望, 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2010, 11.

4. 宮川 敬, 澤崎達也, 松永智子, 山下暁朗, 山本直樹, 梁 明秀: 包括的キノーム解析による HIV-1 Vpu のリン酸化調節機構の解明. 第 58 回日本ウイルス学会総会, 徳島, 2010, 11.

5. 宮川 敬, 梁 明秀: A New Host Restriction Factor Promoting HIV-1 Particle Destruction. 第 5 回日独エイズシンポジウム, 東京, 2010, 5.

6. 梁 明秀: Identification of host proteins required for HIV-1 infection. 第 3 回日中科学フォーラム, 中国, 2010, 3.

7. 宮川 敬, 梁 明秀: 宿主蛋白質 BCA2/Rabring7 は tetherin と協調して HIV-1 粒子産生を抑制する. 第 3 回先端医科学研究センター国際学術フォーラム, 神奈川, 2010, 2.

8. Kei Miyakawa, Akihide Ryo, Tsutomu Murakami, John Guatelli, Naoki Yamamoto: BCA2/Rabring7 promotes tetherin-dependent HIV-1 restriction. The 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, USA, 2010, 2.

9. Takashi Masaoka, Ryo Akihide: Novel High-throughput HIV-1 Protease-resistance Phenotypic Assay Using Cell-free Protein

Production System. The 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, USA, 2010, 2.

10. 小島良績, 後藤さやか, 近藤麻美, 木下茂美, 梁 明秀: 滑膜細胞における C/EBP- β に対する Pin1 の効果. 第 32 回分子生物学会年会, 神奈川, 2009, 12.

11. 熱田翠薫, 吉田篤司, 吉崎慎二, 八島さやか, 松永智子, 澤崎達也, 梁 明秀: 免疫抑制受容体 PD-1 を阻害する新規抗体の作製. 第 32 回分子生物学会年会, 神奈川, 2009, 12.

12. 高濱正吉, 澤崎達也, 岡山明子, 赤木達也, 遠藤弥重太, 山本直樹, 梁 明秀: 細胞極性制御キナーゼ aPKC による HIV-1 Gag のリン酸化及びその生理的意義. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会, 愛知, 2009, 11.

13. 宮川 敬, 梁 明秀, 大庭賢二, 西真由子, 村上 努, John Guatelli, 山本直樹: Identification of a tetherin-interacting protein that restricts HIV-1 particle production. 第 9 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 兵庫, 2009, 9.

14. Takahama S, Sawasaki T, Okayama A, Akagi T, Endo Y, Yamamoto N, Ryo A: Atypical protein kinase C positively regulates the Vpr incorporation into HIV-1 particles by phosphorylating Gag p6. The 10th Kumamoto AIDS Seminar, 熊本, 2009, 9.

15. 梁 明秀: ペプチジルプロリルイソメラーゼ Pin1: 疾患や分化を司る新しいリン酸化後修飾因子. 日本ヒトプロテオーム機構 (JHUPO) 第 7 回大会, 東京 2009, 7.

16. 梁 明秀: The peptidyl-prolyl isomerase Pin1: A novel post-phosphorylation modifier in development and diseases. 先端融合領域イノベーション創出拠点の形成翻訳後修飾

プロテオミクス医療研究拠点の形成 第 1 回公開シンポジウム「分析技術の発達により見えてきた蛋白質の翻訳後修飾とその異常」, 神奈川, 2009, 6.

17. 宮川 敬, 梁 明秀, 山本直樹: 宿主蛋白質 BCA2/Rabring7 は tetherin と協調して HIV-1 粒子産生を抑制する. 第 19 回抗ウイルス療法研究会, 東京, 2009, 6.

18. 梁 明秀, 山本直樹: HIV-1 産生を制御する tetherin 相互作用蛋白の同定. 特定領域研究「感染現象のマトリックス」縦系研究会, 愛知, 2009, 5.

19. 梁 明秀: HIV-1 Gag タンパク質の細胞内ダイナミクス関連因子の同定とその制御機構の解明. 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 熊本, 2009, 5.

20. 梁 明秀: 無細胞タンパク質合成系を用いた HIV/AIDS 研究の新たな展開. 第 22 回日本エイズ学会学術集会, 大阪, 2008,

[産業財産権]
○出願状況 (計 1 件)

名称: Method For Screening Anti-HIV Drugs and A Diagnostic Method of AIDS
発明者: 梁明秀, 山本直樹
権利者: 国立感染症研究所、株式会社セルフサイエンス
種類: 米国特許
番号: 20100034744
出願年月日: 2010年2月11日
国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梁 明秀 (RYO AKIHIDE)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 20363814

(2) 研究分担者

山本 直樹 (YAMAMOTO NAOKI)
国立感染症研究所・エイズ研究センター・センター長 (20~21 年度)
研究者番号: 00094053

(3) 連携研究者

なし