

## 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 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590427

研究課題名（和文） Rab 蛋白質と関連宿主因子による HIV-1 細胞内輸送システムの解明

研究課題名（英文） Role of Rab proteins and related host factors in HIV-1 assembly

研究代表者

村上 努 (MURAKAMI TSUTOMU)

国立感染症研究所・エイズ研究センター・室長

研究者番号：50336385

研究成果の概要（和文）：細胞内輸送への関与が示されているRab11蛋白質とそのエフェクター蛋白質に着目し、HIV-1の細胞内輸送システムへの関与を検討した。方法論としては、Rab11を恒常的ノックダウンさせた細胞株または変異体Rab11を過剰発現させた細胞株におけるHIV-1複製とくにそのウイルス粒子形成過程への影響を検討した。その結果、Rab11がHIV-1 Env蛋白質の感染細胞表面への輸送に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that some Rab proteins play roles in HIV-1 assembly and/or release. In the present study, we focused on Rab11, one of important regulators of recycling of cellular glycoproteins to the plasma membrane, and examined its potential roles in HIV-1 assembly. The results shown by the experiments using Rab11-knock down cells or cells that over-express Rab11 mutants suggest that Rab11 is involved in the formation of infectious virions by modulating trafficking of the HIV-1 Env glycoproteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	700,000	0	700,000
2012年度	700,000	0	700,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	0	3,000,000

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：Rab 蛋白質

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

HIV-1複製における後期過程特にウイルス粒子形成過程については関与する宿主因子に報告は若干あるもののその詳細は十分解明されていなかった。申請者は、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスといった細胞内小胞輸送を担うRabタンパク質に着目した。細胞内小胞輸送において、Rab11はRecycling endosomeやEarly endosome、Trans-Golgi-Networkで働いていることが明らかになっている。また、Mason-Pfizer monkey virusやInfluenza A virusとRab11との関連性についてはいくつかの報告があるが、HIV-1に関しての報告は少ない。siRNAによるRab11のノックダウンがウイルスの複製効率を低下させたという報告や、Rab11 DN変異体の過剰発現がVpuを介したウイルス放出を抑制したという報告があがっているが、他の研究者による追試や詳細な解析の報告は今のところされていない。よって本研究では、主にRab11のHIV-1粒子形成への関与の可能性を想定し検討した。そこで申請者は、細胞内輸送への関与が疑われる数種のRabタンパク質とそれらのエフェクタータンパク質らRab11に焦点を絞ってHIV-1の細胞内輸送システムにおける解明することを目的とし研究課題を申請した。

## 2. 研究の目的

HIV-1の粒子形成における出芽・放出にESCRTタンパク質複合体が関与することが明らかになり、詳細が解明されつつある。一方で、ウイルス粒子の主要な構造タンパク質であるGagタンパク質やEnvelopeタンパク質のウイルス形成部位への輸送や、その分解がどのような宿主因子によって制御されているかについては不明な点が多い。そこで、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスといった

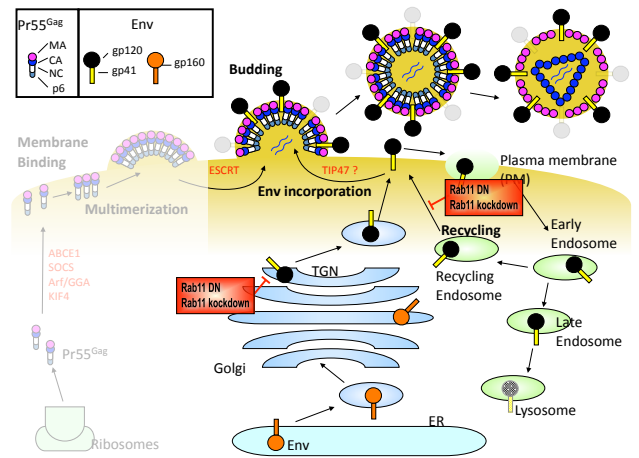
細胞内小胞輸送を担うRabタンパク質に着目し、Rab11のHIV-1粒子形成における役割について、Rab11の発現抑制や機能阻害による影響を検討する。

## 3. 研究の方法

293T細胞、HeLa細胞やT細胞株において、shRNA導入し内在性Rab11タンパク質のノックダウンにより発現抑制、またはRab11の野生型(wild type) および変異体(活性型: constitutively active および不活性型: dominant negative) を過剰発現によりRab11を機能阻害した。引き続き細胞にHIV-1分子クロンを導入し、ウイルスタンパク質の細胞内発現量やウイルス放出量を、Gagタンパク質前駆体やHIV-1のコアを構成するキャプシドタンパク質であるp24に対するウエスタンブロットティングによって解析し、HIV-1放出効率への影響を検討した。また、放出されたウイルス量はp24 ELISA法によっても測定しました。しかし、内在性Rab11のノックダウンおよび変異体の過剰発現において、HIV-1放出効率への影響はみられなかった。さらに、産生されたウイルスをTZM-bl細胞に感染し、Luciferase Assayにより感染価の測定も行った。内在性Rab11のノックダウン細胞から産生されたHIV-1の感染価の低下が認められた。また、Rab11の活性型と不活性型の過剰発現においても、Rab11発現用量依存的に感染価の低下がみられた。

#### 4. 研究成果

内在性 Rab11 のノックダウンおよび Rab11 DN 過剰発現の両方において、Gag のプロセッシングやウイルス放出量に影響は見られなかった。一方で、Env のプロセッシングおよびウイルス粒子への取り込みの低下が認められた。また、産生ウイルスの感染価が低下し、VSV-G pseudotype による回復が見られた。したがって、Rab11 が Env のプロセッシングまたは輸送に関与することによって Env のウイルス粒子への取り込み量を制御し、感染性 HIV-1 の粒子形成において一定の役割を演じている可能性を示唆している（右図参照）。



## 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)

[学会発表] (計 4 件)

1) Murakami T., H. Wu, M. Kawamata, J. Chiba, and T. Takemura. R Functional analysis of Rab11a in HIV-1 assembly. The 2012 Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor, USA, 2012.

2) 吳 鴻規、竹村太地郎、川又美弥子、千葉丈、村上 努。HIV-1 粒子形成過程における Rab11a 蛋白質の機能解析 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月 30-12 月 2 日

3) Murakami T., H. Wu, M. Kawamata, J. Chiba, and T. Takemera. Role of Rab11a in Virus Assembly of HIV-1. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 2011.

4) Murakami T., H. Wu, M. Kawamata, J. Chiba, and T. Takemura. Role of Rab11a in HIV-1 assembly. The 2011 Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor, USA, 2011.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村上 努 (MURAKAMI TSUTOMU)

国立感染症研究所・エイズ研究センター・室長

研究者番号 : 50336385