

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590548

研究課題名(和文) HIV-1 補助受容体の2量体形成がHIV-1感受性に与える影響の解析

研究課題名(英文) The role of CCR5 oligomerization in the entry of CCR5-using HIV-1

研究代表者

前田 洋助 (Maeda, Yosuke)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：30284764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：AIDSの原因ウイルスであるHIV-1は細胞内に侵入する際にCCR5と呼ばれる分子と結合することが重要である。しかしながらCCR5は細胞表面で種々の構造をとっており、どのような構造がHIV-1の認識に重要であるかはわかっていない。本研究ではCCR5分子が複数個集合して細胞表面に発現する場合があることを示し、このような複数個のCCR5で形成される立体構造はHIV-1にとっては認識しにくい構造となっていることを初めて明らかにした。このことはこのようなCCR5を多量体化する薬剤が治療薬として効果的であることを示している。

研究成果の概要(英文)：We found that CCR5 exists as constitutive homo-oligomers, which was further enhanced by its antagonists such as maraviroc (MVC). We further showed that that CCR5 oligomer was structurally different from the monomer. Infection of oligomer- and monomer-enriched cells revealed that CCR5-using HIV-1 preferential recognized monomeric CCR5. Although CCR5 antagonists enhanced oligomerization of CCR5, MVC-resistant HIV-1 was found to still recognize both MVC-bound and -unbound forms of monomeric CCR5, suggesting the constrained use of monomeric CCR5 by R5 HIV-1.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 CCR5

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 が宿主に侵入する過程は、HIV-1 のエンベロープ糖タンパク質 (Env) の gp120 がその受容体である CD4 と結合することにより gp120 の立体構造が変化し、さらにコレセプターである CCR5 あるいは CXCR4 と相互作用することで開始される。コレセプターとして CCR5 を用いる HIV-1 (R5 HIV-1) は、HIV 感染初期から後期にかけて存在する主要なウイルスであり、CCR5 を発現する CD4+T 細胞やマクロファージに感染する。一方で HIV-1 感染患者の約半数においては、感染後期になると CXCR4 をコレセプターとして用いる HIV-1 (X4 HIV-1) が出現し、CXCR4 発現 CD4+T 細胞株に感染するようになる。CCR5 と CXCR4 のどちらも使用することができる HIV-1 は R5X4 HIV-1 と呼ばれ、さらに R5X4 HIV-1 は CCR5 により強い指向性を有する dual-R5 と、CXCR4 により強い指向性を有する dual-X4 に分類される。CXCR4 を利用できる HIV-1 は CD4+T 細胞の枯渇や病態進行に関与するため、AIDS 発症に重要なウイルスとされている。

2. 研究の目的

これまでの研究において、CCR5 は天然リガンドの添加により二量体や多量体化すること、さらには天然リガンドが存在しない状態でも CCR5 はすでにホモ二量体ないし多量体として存在することが明らかにされているが、このような多量体形成が HIV-1 感受性に与える影響については報告がなかった。一方 TAK-779 や MVC といった CCR5 のアンタゴニストは、天然リガンドとは異なり、CCR5 の 7 回膜貫通領域で構成される疎水性ポケットに結合し、CCR5 のアロステリックな立体構造の変化を誘導することで R5 HIV-1 の感染を阻害することから、HIV-1 は CCR5 の何らかの特定の立体構造を認識して細胞内に侵入しているものと考えられている。さらには、抗 CCR5 モノクローナル抗体である CCR5-02 が CCR5 の二量体化形成を誘導することにより R5 HIV-1 の細胞内侵入を阻害することが報告されていることから、二量体や多量体化することにより構造変化を起こした CCR5 が HIV-1 の感染感受性に影響を与えることは十分に考えられた。本研究ではコレセプターである CCR5 のホモ二量体更には多量体化した CCR5 が単量体 CCR5 と立体構造が異なるかどうか検討

し、さらに CCR5 を使用する R5 ないし R5X4 HIV-1 がこのようなホモ二量体ないし多量体化した CCR5 を認識できるかどうかについて研究を行うことを目的とした。

また CCR5 アンタゴニストが CCR5 の二量体ないし多量体形成に与える影響についても検討した。

3. 研究の方法

CCR5 のホモ二量体ないし多量体形成の確認には bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法を用いた。BiFC 法は蛍光タンパク質を応用した技術であり、生細胞中におけるタンパク質間の相互作用を解析することが可能である。分割した蛍光タンパク質の N 末端と C 末端をそれぞれ目的タンパク質に結合させ、目的タンパク質が相互作用を示した時のみ分割した蛍光タンパク質が元の蛍光タンパク質複合体に戻ることで蛍光を発するため、タンパク質間の相互作用を間接的に検出することが可能である。本実験では CCR5 の発現ベクターとして、CCR5 の C 末端に蛍光タンパク質 (Kusabira Green ; KG) の N 末端 (CCR5-KGN) と C 末端 (CCR5-KGC) を結合したベクターを構築した (図 1)。これらの分子を細胞に同時に発現させ、CCR5 同士が近接して存在した時のみ蛍光を発する (CCR5-KG) ことで、二量体ないし多量体形成を確認できることになる。

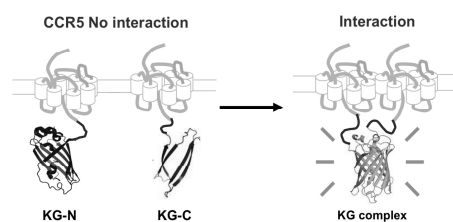


図1 BiFCの原理

具体的には 293T 細胞に両者を導入し、フローサイトメトリーにて多量体形成細胞を検出する。さらに CCR5 の種々のエピトープを認識するモノクローナル抗体で染色し、単量体と二量体ないし多量体形成を形成している細胞への抗体の反応性の違いにより構造的な違いがないか検討した。

次に多量体 CCR5 の HIV-1 感受性を解析するために、単量体発現細胞と二量体な

いし多量体発現細胞をフローサイトメトリーによりソーティングし、これに種々の Env との Pseudotyped HIV を感染させ luciferase 活性によりそれぞれの細胞集団における HIV-1 感受性を測定した。

4. 研究成果

まず多量体化 CCR5 が HIV-1 の侵入に影響するかどうか解析するため、CCR5 の C 末端にそれぞれ N 末端と C 末端に分割した蛍光タンパク質 (Kusabira Green:KG) を結合させた CCR5-KGN と CCR5-KGC を 293T 細胞に発現させた後、BiFC 法により CCR5 の多量体を検出する手法を確立した (図 1)。また CCR5 の立体構造を解析するため、CCR5-KGN と CCR5-KGC を導入した細胞を CCR5 のエピトープを認識する種々のモノクローナル抗体により染色した後、フローサイトメーターを用いて解析を行った (図 2 上段)。抗 CCR5 モノクローナル抗体としては、CCR5 の N 末端を認識する抗体 (clone CTC8, 3A9)、2 番目の細胞外ループ (ECL-2) を認識する抗体 (clone 2D7, 45531) そして CCR5 の立体構造を認識する抗体 (clone 45549) を用いた。

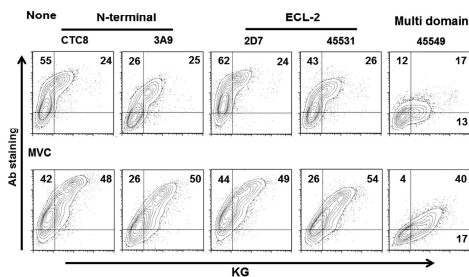


図2 MVC存在、非存在下におけるCCR5-KG発現293T細胞の抗CCR5モノクローナル抗体染色

解析の結果、45549 抗体以外では、CCR5 抗体陽性かつ KG 陽性の比率は 24-26%とほぼ同率であることがわかった。一方 CCR5 抗体陽性かつ KG 陰性フラクションでは、抗体によって異なる比率を示すことが分かった。45549 抗体は KG 陽性、KG 陰性細胞どちらの CCR5 に対しても反応性が乏しいことがわかった。

これまでの研究において、CCR5 の天然リガンドである CCL3, CCL4 と CCL5 は、CCR5 の多量体化形成を促進させることが示されている。天然リガンド以外にも、CCR5 のリガンドになり得る化合物として、アンタゴニストである TAK-779 や maraviroc (MVC) が存在する。しかし、これらアンタゴニストが CCR5 の多量体化形成に影響を与えるのか、さらにはこれ

らのアンタゴニストの結合した多量体 CCR5 と単量体 CCR5 の立体構造の違いについては、今まで報告がなかった。そこで、CCR5-KGN と CCR5-KGC を導入した 293T 細胞を MVC の存在下で培養し、CCR5 の様々なエピトープを認識する抗 CCR5 抗体を用いて染色を行い、リガンド非存在下での CCR5 単量体ならびに多量体の立体構造との差異について解析を行うとともに、MVC の CCR5 多量体化への影響について解析した (図 2 下段)。

その結果、MVC 添加により CCR5 抗体陽性かつ KG 陽性率は 40-54%とすべて増大していることがわかった。一方、MVC 存在下の KG 陰性フラクションにおいては MVC 非存在下と同様に抗体陽性率は異なっていた。この結果からも、同じ CCR5 の部位を認識する抗体であっても認識するエピトープの違いによりその反応性が異なることがわかり、MVC 非存在下における結果と同様に多量体と単量体では、構造が異なることが分かった。またもう一つの CCR5 アンタゴニストである TAK-779 でも同様に CCR5 の多量体形成増大が確認でき、さらに 293T 以外の細胞 (HeLa, NP2/CD4) においても同様の結果が得られた。一方 CXCR4 アンタゴニストである AMD3100 では CCR5 の多量体形成は促進されなかった (データ非掲載)。

次に MVC の CCR5 多量体化形成の促進を BiFC 以外の手法を用いて検出するため、ウエスタンブロット法を用いて CCR5 の多量体検出を試みた。まず CCR5 の C 末端に FLAG タグを結合させた分子を 293T 細胞に導入した後、分子間の相互作用を保持する化合物 (cross linker: DSP) で処理し、1%Brij 010 溶解緩衝液で溶解し、ウエスタンブロット法により CCR5 を検出した (図 3)。

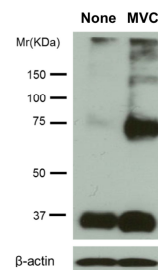


図3 SDS-PAGE、ウエスタンブロット法によるMVCのCCR5ホモ多量体化形成促進の検出

その結果、MVC で処理していない細胞において、CCR5 の単量体 (推定 40kDa) の位置にバンドが認められ、さらに二量体である位置にバンドが見られることも分かった (図 3)。また MVC を添加したトランスフェクション細胞においては、二量体の CCR5 のバンドの濃度が未処理のものと比較して増大していることが分かった。さらに二量体のバンドよりも上の位置にバンドが出現しており、MVC が CCR5 の多量体形成を促進させることを確認した。

抗 CCR5 モノクローナル抗体を用いた抗体染色結果から、CCR5 の単量体と多量体では立体構造が異なっていることが示唆されたことから、単量体や多量体で存在する CCR5 の立体構造が HIV-1 の侵入過程において影響を与えている可能性が考えられた。そこで本研究では、CD4 を恒常的に発現している 293T 細胞に CCR5-KG 発現ベクターをトランスフェクションし、この細胞を CTC8 抗体で染色した後、CTC8 抗体陽性かつ KG 陽性フラクションと、CTC8 抗体陽性かつ KG 陰性フラクションを FACS によりそれぞれ分取した。この抗体は KG 陽性、KG 陰性のどちらの CCR5 も同等に認識する抗体であり、さらに HIV-1 に対して中和活性を示さないことから、この染色により HIV-1 の感受性を保持した状態で KG 陽性細胞と KG 陰性細胞における CCR5 の発現量を揃えた細胞を調整することが可能となる (図 4A)。CCR5 の発現量を揃え、なおかつ KG 陽性細胞と KG 陰性細胞を分取するために図 4A に示すようにそれぞれのフラクションにゲートをかけ、FACS を用いて分取を行った。その結果、KG 陽性細胞と KG 陰性細胞が明確に分取出来ていることがわかった (図 4A)。

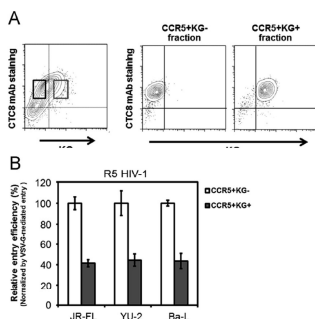


図4 CCR5 + KG-とCCR5 + KG+フラクションへのソーティングとシフェラーゼレポーターHIV-1シュードタイプR5 Env感染

これら分取した細胞集団に CCR5 指向性を持つ Env を有するシュードタイプの R5

HIV-1 (JR-FL, YU-2, BaL) を感染させ、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、それぞれのフラクションにおけるウイルス侵入効率を算定した。その結果、どの株の Env を用いた場合においても、KG 陰性細胞に対する感染効率の方が KG 陽性細胞よりも有意差を持って高いことが示された (図 4B)。このことから、R5 HIV-1 は多量体よりも単量体 CCR5 を効率的に認識して感染することが示唆された。

CCR5 をコレセプターとして使用できる R5X4 HIV-1 においても R5 HIV-1 と同様に KG 陰性細胞と KG 陽性細胞への感染効率を解析した (図 5)。今回 dual-X4 として 89.6 ウイルス株を用い、dual-R5 として KMT、TIK そして 89.6 株に R308S 変異を導入することで dual-X4 から dual-R5 に変異した 89.6R308S 変異体を用いた。これらの解析により、dual-R5 の HIV-1 (89.6 R308S, KMT, TIK) では R5 HIV-1 と同様に KG 陽性細胞よりも KG 陰性細胞においてその侵入効率が高いことが分かった (図 5)。しかしながら、dual-X4 に属する R5X4 (89.6) の侵入効率は KG 陽性細胞と KG 陰性細胞との間に有意な差は認められなかった (図 5)。これらの結果から、dual-R5 HIV-1 は R5 HIV-1 と同様に単量体 CCR5 を認識して感染し、dual-X4 HIV-1 は単量体と多量体 CCR5 を同様に認識して感染していることが示唆された。

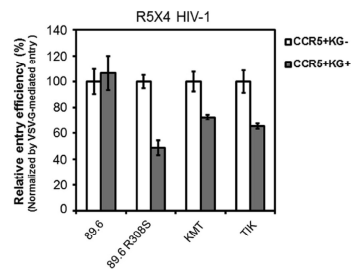


図5 CCR5 + KG-とCCR5 + KG+フラクションにおけるルシフェラーゼレポーターHIV-1シュードタイプR5X4 Env感染

CCR5 のアンタゴニストである MVC が CCR5-KG の陽性率を増大させることから (図 2)、MVC 耐性の HIV-1 (文献 5, 8) では KG 陰性細胞よりも KG 陽性細胞に優位に感染する可能性が考えられた。そこでこの仮説を検証するため、MVC 存在、非存在における KG 陰性細胞と KG 陽性細胞に対する感染効率について解析を行った。その結果、MVC 存在、非存在に関わらず KG 陰性細胞への感染効率が、KG 陽性細胞よりも高いことが示された (図 6A)。

さらに今回用いた MVC 耐性 HIV-1 が、KG 陽性細胞と KG 陰性細胞のどちらに対しても耐性を獲得しているのかを解析するため、それぞれの細胞集団における MVC 耐性 HIV-1 の最大抑制効果 (Maximum Plateau Inhibition, MPI) を算定した。CCR5-KG 発現 CD4-293T 細胞を MVC 未処理または 100nM から 10 μ M までの濃度範囲で処理した KG 陽性、KG 陰性細胞を準備し、これらに MVC 耐性のシュードタイプ HIV-1 を感染させ、MVC 耐性 HIV-1 に対する MVC の最大抑制効果 (MPI) をそれぞれの細胞において算定した (図 6B)。その結果 MVC 耐性 HIV-1 は、MVC の存在、非存在に関係なく KG 陰性細胞への感染効率が KG 陽性細胞と比較して高いことが分かった。さらに、MVC 耐性 HIV-1 に感受性の KG 陰性細胞集団において、高濃度の MVC でもその阻害効果が増大せず、逆に高濃度の MVC で感染性が増大することから、以前から報告されているように (文献 8)、このウイルスは MVC の結合した単量体の CCR5 を認識して細胞内に侵入していることが示された。

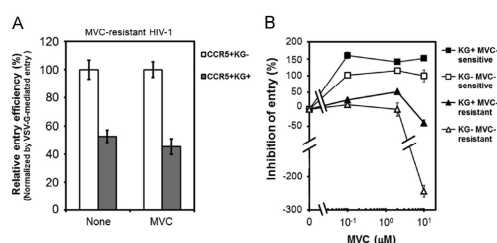


図6 CCR5+KG-とCCR5+KG+フラクションにおけるルシフェラーゼレポーター-HIV-1シュードタイプJR-FLとMVC耐性Env感染効率

以上の結果から CCR5 は天然リガンド非存在下でも単量体だけでなく多量体として存在できることを示し、さらにその構造が異なることを初めて明らかにした。さらに CCR5 アンタゴニストはその多量体化を促進することを示した。このような多量体化の機序については現時点では明らかではないが、CCR5 へのアンタゴニスト結合により CCR5 の立体構造が安定することが多量体化形成に重要であることが考えられる。

また R5 や R5X4 のうち CCR5 を優位に使用する dual-R5 ウイルスは多量体化した CCR5 を認識できないことを初めて明らかにした。一方で CXCR4 を優位に認識するが CCR5 の使用が可能な dual-X4 は単量体も多量体も認識できる可能性を示した。

さらに CCR5 アンタゴニストが CCR5 の多量体化を促進し、このような多量体化が R5 HIV-1 の感染阻止に関与している可能性を示したが、CCR5 アンタゴニストである MVC に耐性のウイルスは MVC が CCR5 の多量体化を促進するにも関わらず単量体の CCR5 を認識して細胞内に侵入することから、CCR5 を利用して感染する HIV-1 は単量体の CCR5 しか認識できない可能性が高いと考えられた。このような知見は CCR5 を標的にする今後の新たな機序を有する薬剤の開発の基盤となるものと考えられる。

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 10 件)

Nakano Y, Monde K, Terasawa H, Yuan Y, Yusa K, Harada S, Maeda Y (2014) Preferential recognition of monomeric CCR5 expressed in cultured cells by the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 for the entry of R5 HIV-1. *Virology* 452-453, 117-124 (査読有)

Maeda Y, Terasawa H, Nakano Y, Monde K, Yusa K, Oka S, Takiguchi M, Harada S (2014) V3-independent competitive resistance of a dual-X4 HIV-1 to the CXCR4 inhibitor. *AMD3100 Plos One* e89515 (査読有)

Yoshimura K, Harada S, Boonchawalit S, Kawanami Y, Matsushita S (2014) Impact of maraviroc-resistant and low-CCR-adapted mutations induced by in vitro passage on sensitivity to anti-envelope neutralizing antibodies. *J Gen Virol* 95, 1816-1826 (査読有)

Suzuki K, Hattori S, Marks K, Ahlenstiel C, Maeda Y, Ishida T, Millington M, Boyd M, Symonds G, Cooper DA, Okada S, Kelleher A (2013) Promoter targeting RNA suppresses HIV-1 infection in vivo through transcriptional gene silencing. *Molecular Therapy Nucleic Acids* e137 (査読有)

Yuan Y, Yokoyama K, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato Y, Yusa K (2013) Structure and dynamics of the gp120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1JR-FL to maraviroc. *Plos One* 8: e65115 (査読有)

Harada S, Yoshimura K, Yamaguchi A,

Boonchawalit S, Yusa K, Matsushita S (2013) Impact of antiretroviral pressure on selection of primary human immunodeficiency virus type 1 envelope sequences in vitro. *J Gen Virol* 94, 933-943 (査読有)

Toda T, Kuwahara K, Kondo N, Matsuda Z, Maeda Y, Maeda K, Sakaguchi N (2012) Dynamic appearance of antigenic epitopes effective for viral neutralization during membrane fusion initiated by interactions between HIV-1 envelope proteins and CD4/CXCR4. *Immunobiology* 217:864-872 (査読有)

Yuan Y, Maeda Y, Terasawa H, Monde K, Harada S, Yusa K (2011) A combination of polymorphic mutations in V3 loop of HIV-1 gp120 can confer noncompetitive resistance to maraviroc. *Virology* 413, 293-299(査読有)

Yokoyama M, Nagasawa S, Yoshimura K, Matsushita S, Sato H (2012) Structural dynamics of HIV-1 envelope Gp120 outer domain with V3 loop. *Plos One* e37530 (査読有)

Maeda Y, Yusa K, Nakano Y, Harada S (2011) Involvement of inhibitory factors in the inefficient entry of HIV-1 into the human CD4 positive HUT78 cell line. *Virus Res* 155, 368-371 (査読有)

〔学会発表〕(計9件)

Maeda Y, Terasawa H, Ishiguro H, Nakano Y, Harada S: Reversion of CXCR4-using CRF01_AE to CCR5-using HIV-1 by a CXCR4 antagonist in vitro. XV International Congress of Virology, Sapporo Sept. 15, 2011

前田洋助, 寺沢広美, 中野雄介, 門出和精, 遊佐敬介, 原田信志: HTLV-1エンペロープタンパク質の膜融合能におけるウイルス産生細胞内のエンドソームの酸性化の関与 第60回日本ウイルス学会学術集会・総会 大阪 2012年11月13日

寺沢広美, 前田洋助, 河野里奈, 中野雄介, 門出和精, 遊佐敬介, 原田信志: CRF01_AE HIVのV3非依存的CXCR4阻害剤逃避 第26回日本エイズ学会学術集会・総会 熊本 2012年11月24日

Terasawa H, Maeda Y, Nakano Y, Monde K, Kawano R, Yusa K, Harada S: Competitive resistance of a CXCR4-using HIV-1 lacking amino acid substitutions in the V3 loop of gp120 to a CXCR4 inhibitor. 14th

Kumamoto AIDS seminar, Kumamoto Oct. 30, 2013

Nakano Y, Maeda Y, Monde K, Terasawa H, Yusa K, Harada S: Preferential recognition of monomeric forms of CCR5 by HIV-1 envelope glycoprotein gp120 for the entry of R5 HIV-1. 14th Kumamoto AIDS seminar, Kumamoto Oct. 30, 2013

中野雄介, 前田洋助, 門出和精, 寺沢広美, 遊佐敬介, 原田信志: HIV-1のcoreceptorのoligomer形成がHIV-1の感染感受性に与える影響 第61回日本ウイルス学会学術集会・総会 神戸 2013年11月11日

前田洋助, 寺沢ひろみ, 光浦智将, 中野雄介, 門出和精, 遊佐敬介, 原田信志: ウイルス産生細胞におけるGLUT1発現によるHTLV-1エンペロープタンパク質の膜融合能の減弱 第61回日本ウイルス学会学術集会・総会 神戸 2013年11月10日

寺沢広美, 前田洋助, 中野雄介, 遊佐敬介, 原田信志: CRF01_AE X4 HIV-1のCXCR4阻害剤耐性獲得機構の解析 第27回日本エイズ学会学術集会・総会 熊本 2013年11月20日

前田洋助, 寺沢広美, 光浦智将, 中島詩織, 門出和精, 田中勇悦, 遊佐敬介, 原田信志 (2014) HTLV-1 Env発現ウイルス産生細胞におけるHTLV-1受容体GLUT1の制御機構の解析 第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014年11月11日

〔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〕
ホームページ等
当研究室のホームページにて更新予定

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
前田 洋助 (Maeda, Yosuke)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号: 30284764
- (2) 研究分担者
吉村 和久 (Yoshimura, Kazuhisa)
国立感染症研究所・エイズ研究センター・室長
研究者番号: 60315306
- 原田 信志 (Harada, Shinji)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 60173085