

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659211

研究課題名(和文) MHCクラスI及びIIによる抗原提示経路の分子操作

研究課題名(英文) Molecular modification for MHC class I and II antigen presentation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：HIV-1 Gag蛋白をHeLa細胞で、インフルエンザHA蛋白をMDCK細胞で発現させた。細胞内での分解を調べたところ、Gag蛋白の半減期は約8-9時間と概算された。HA蛋白の半減期はやや短かった。GagおよびHA蛋白は、N末端にユビキチンを付加するとより効率よくプロテアソーム経路で分解されるようになった。N末端法則に従い、Gag蛋白のN末端をメチオニンからアルギニンにすると、効率良くプロテアソーム経路で分解されようになった。一方、LAMP1を付加すると、Gag蛋白の分解経路がプロテアソーム経路からリソソーム経路に変化した。

研究成果の概要(英文)：HIV-1 Gag protein was expressed in HeLa cells and influenza virus HA in MDCK cells. When the protein degradation kinetics were analyzed by Western blotting, we found the $t_{1/2}$ of Gag 8-9 hr and that of HA slightly shorter. Gag and HA were more rapidly degraded by the proteasome pathway, when ubiquitin was added to their N-termini. Based on the N-end rule, when the N-terminal methionine of Gag after ubiquitin cleavage was substituted with arginine, the Gag was more efficiently degraded by the ubiquitin/proteasome pathway. In contrast, the addition of LAMP1 to Gag altered the major degradation pathway for Gag from the proteasome pathway to the lysosomal pathway.

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：分子修飾 抗原提示

1. 研究開始当初の背景

MHC クラス II による抗原提示経路は、外来性 (exogenous) 抗原がエンドサイトーシスにより取り込まれて分解された後、エンドソーム内で MHC クラス II 分子に結合し、細胞表面に逆輸送されヘルパー T 細胞に提示される経路である。一方、細胞内で合成された内在性 (endogenous) 抗原 (の一部) は、プロテアソームで分解された後、粗面小胞体 (ER) 内で MHC クラス I 分子に結合し、細胞表面に輸送され細胞傷害性 T 細胞に提示される。いずれの経路も、抗原が特定コンパートメントへ輸送され分解されることが必須であり、それらが制御できれば抗原提示効率が増加すると期待された。ウイルス蛋白質によってはエンドソームに輸送される変異体や ER に輸送される変異体が報告されていることもある。しかし、こうした変異体の利用では他のウイルス蛋白質に応用できないと思われる。

2. 研究の目的

本研究では、効率の良い抗原提示を目標に、一般化できる分子修飾・分子操作の原理を考案することを目的とした。すなわち、粗面小胞体あるいはエンドソームの局在分子・局在機構を利用し、ウイルス抗原が効率良く MHC クラス I あるいは II 陽性コンパートメントに輸送され、提示ペプチドへと分解されるよう分子修飾を試みた。

3. 研究の方法

(1) DNA 構築

真核細胞発現 pCAGGS プラスミドを用いて、HIV-1 Gag およびインフルエンザ HA 蛋白を発現させた。細胞内局在の解析には、C 末端に EGFP を付加した。MHC クラス I 経路へ誘導するため、開始コドンメチオニン Gag 蛋白と開始コドンアルギニン Gag 蛋白 (いずれも、N 末端にユビキチン Ub を付加) (Ub-MGag、Ub-RGag) を、クラス II 経路へ誘導するため、LAMP1 融合 Gag (LAMP1-Gag) 蛋白を発現させた。また、HA 蛋白の場合は、小胞体膜透過のシグナル配列を除去した HA 蛋白の N 末端に Ub を付加した。

(2) 細胞培養と阻害剤処理

HeLa 細胞に HIV-1 Gag および Gag-EGFP 発現プラスミドを、MDCK 細胞にインフルエンザ HA 発現プラスミドを transfection した。18 hr

後、サイクロヘキシミド (蛋白質合成阻害剤) と MG-132+cLL (プロテアソーム阻害剤) あるいはクロロキン (リソソーム阻害剤) を添加して培養し、経時的に細胞を回収した。

(3) Gag および HA 分解の定量

細胞内 Gag および HA 蛋白を Western blotting で検出した。Image J でバンドの intensity を測定した。

(4) Gag 抗原の局在

Gag-EGFP 発現細胞を固定した。オルガネラマーカーに対する抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) Gag および HA 蛋白の細胞内分解

HeLa 細胞で Gag 蛋白を、MDCK 細胞で HA 蛋白を発現させた。サイクロヘキシミドを添加して経時的に調べた。細胞内の Gag および HA 蛋白を Western blotting で検出し Image J で定量したところ、細胞内 Gag の半減期は約 8-9 時間と概算された。HA 蛋白の半減期はやや短かった。

(2) Ub 付加 Gag および HA 蛋白の細胞内分解

Gag 蛋白の N 末端に Ub を付加した。また、シグナル配列を除去した HA 蛋白の N 末端に Ub を付加した。それぞれ、HeLa 細胞と MDCK 細胞で発現させ、サイクロヘキシミドとプロテアソーム阻害剤 (MG-132+cLL) を添加して経時的に Western blotting で調べた。Ub 付加 Gag および HA 蛋白は、Gag および HA 蛋白より効率よくプロテアソーム経路で分解された。

(3) N 末端アルギニン Gag 蛋白の分解経路の解析

N 末端法則 (Ub が除去されて露出する蛋白質 N 末端のアミノ酸の種類によりその蛋白質の半減期が異なる) が報告されている。塩基性アミノ酸 (R, K, H) と疎水性アミノ酸 (F, L, W, Y, I) は不安定性を与えるアミノ酸である。そこで、開始コドンメチオニンとアルギニンの Ub-MGag と Ub-RGag 蛋白 (いずれも、N 末端にユビキチン Ub を付加) を作製して、HeLa 細胞で発現させた。サイクロヘキシミドとプロテアソーム阻害剤 (MG-132+cLL) を添加して経時的に細胞を回収し Western blotting で調べたところ、RGag は MGag より速く分解

されることが確認できた。これにプロテアソーム阻害剤を処理するといずれの M/R-Gag でもこの減少が止まった。従って、開始コドンアルギニンの Gag 蛋白はメチオニン Gag 蛋白より、効率良くプロテアソーム経路で分解されると考えられた。

Ub-MGag-EGFP と Ub-RGag-EGFP 蛋白を HeLa 細胞で発現させた後、サイクロヘキシミドを添加して培養した。共焦点顕微鏡で観察したところ、RGag-EGFP はほとんど検出できなかったが、MGag-EGFP はわずかには残存していたことから、RGag-EGFP の方が分解されやすいと考えられた。

(4)LAMP1 融合 Gag 抗原の分解経路の解析
LAMP1 は I 型膜貫通糖蛋白質であり、ゴルジ装置を経て形質膜に到達した後、取り込まれエンドソームで MHC クラス II 分子と共局在することが知られている。LAMP1-Gag 蛋白を HeLa 細胞に発現させた後、サイクロヘキシミドと、プロテアソーム阻害剤 (MG-132+cLL) あるいはリソソーム阻害剤 (クロロキン) を添加して経時的に Western blotting で調べた。細胞内 LAMP1-Gag は経時的に分解された。この分解はクロロキンで阻止されたが、プロテアソーム阻害剤では止められなかったことから、LAMP1 付加により Gag 蛋白の分解経路がプロテアソーム経路からリソソーム経路に変化したと考えられた。

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 6 件)

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

Urano E, Morikawa Y, Komano, J. Novel role of HSP40/DNAJ in the regulation of HIV-1 replication. *J AIDS* 64: 154-162, 2013 (査読有)
DOI: 10.1097/QAI.0b013e31829a2ef8

Ikeno S, Suzuki M, Mahmud M, Ishige M, Kobayashi M, Ohno S, Takeda M, Nakayama T, Morikawa Y, Terahara K, Okada S, Takeyama H, Tsunetsugu-Yokota Y. Sensitive detection of measles virus infection in the blood and tissues of

humanized mouse by one-step quantitative RT-PCR. *Front Microbiol* 4: 1-8, 2013 (査読有)
DOI: 10.3389/fmicb.2013.00298

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(6): 3348-3360, 2013 (査読有)
DOI: 10.1128/JVI.02306-12

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(10): e47828, 2012 (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0047828

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+ T cells. *J Virol* 86(13): 7227-7234, 2012 (査読有)
DOI: 10.1128/JVI.06681-11

〔学会発表〕(計 8 件)

百瀬文隆、森川裕子．感染細胞内インフルエンザウイルス vRNP の非変性検出を可能とする手法改良の試み．第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/11/2013.

林浩司、竹村太地郎、藤野真之、百瀬文隆、森川裕子、村上努．HIV-1 複製における Rab7 の機能解析．第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/10/2013.

池野翔太、鈴木基臣、寺原和孝、石毛真行、駒瀬勝啓、竹田誠、森川裕子、中山哲夫、柳雄介、竹山春子、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 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/10/2013.

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、大阪、11/13/2012.

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学術集会、大阪、11/13/2012.

百瀬文隆、森川裕子．インフルエンザウイルス vRNP 陽性リサイクリングエンドソーム

の極性輸送に関する宿主因子の機能解析．第
60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、
11/13/2012.

大倉喬、齋藤桃子、百瀬文隆、森川裕子．
インフルエンザウイルス膜タンパク質の協
調的極性輸送機構の解析．第 60 回日本ウイ
ルス学会学術集会、大阪、11/13/2012.

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 GagPol dimerization. CSH
Retrovirus Meeting, New York, 5/23/2012.

〔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

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