

Importin α を介したヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) Vpr の新規核移行機序

1. はじめに

細胞質から核への物質輸送は、ほとんどの場合輸送されるタンパク質中に存在する核移行シグナル (NLS) を介して行われている。これらのシグナルは Importin β ファミリーと総称される因子群によって、直接的あるいは間接的に認識され、タンパク質は細胞質から核に、核と細胞質を隔てている核膜に存在する核膜孔と呼ばれる構造体を介して輸送される。最近、これらの枠組みにあてはまらないタンパク質が次々に見つかっている。

その一つとして、後天性免疫不全症候群 (エイズ) の原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) のアクセサリタンパク質 Vpr があげられる。HIV-1 は、主として CD4 陽性 T 細胞およびマクロファージに感染し、長い潜伏期間を経たのち最終的に宿主の免疫系を破壊してエイズを発症させる。HIV-1 はレトロウイルスに属しているが、全てのレトロウイルスに共通に存在する構造遺伝子である *gag*, *pol* および *env* 以外に、調節遺伝子である *tat* と *rev*, さらにアクセサリ遺伝子である *nef*, *vpu*, *vpr*, *vif* を有するという特徴がある。中でも *vpr* 遺伝子産物は、核移行、細胞周期の G₂ 期停止、細胞の分化、アポトーシス、スプライシングなどの多様な機能を惹起することによって、ウイルス複製とエイズ病態を制御している¹⁻³⁾。特に、Vpr に非典型的な NLS として機能する配列の存在が明らかになり、Vpr の核移行に注目が集まり、その核移行機序の解明が精力的に行われてきた。96 残基からなる分子量 15 kDa の小さなタンパク質である Vpr は、ウイルス粒子中に取り込まれ、感染後にウイルス粒子内の RNA ゲノムが逆転写されて形成されたウイルスゲノムを含む核酸-タンパク質複合体であるプレインテグレーション複合体 (PIC) の構成因子として、マクロファージにおいて PIC を効率的に核内に輸送することによって、HIV-1 の感染の成立に大きな役割を果たしている¹⁾。

本稿では、Vpr の核移行に焦点をあて、Importin α を介して核移行するという Vpr の新規核移行機序とそれを標的にした新しい抗ウイルス薬の取り組みに関する著者らの最近の成果を紹介したい。

2. 細胞周期とレトロウイルスの核移行モデル

HIV-1 の特徴は非分裂細胞に感染できる点である^{1,4)}。非分裂細胞であるマクロファージは感染患者から正常人への感染拡大に寄与するだけでなく、感染患者の体内でウイルス遺伝子の発現が抑制された状態であるリザーバー細胞となり、長期にわたって体内に存在し続け、多剤併用療法 (HAART 法) の中断により速やかにウイルスを産生することが知られている。従って、HIV-1 が細胞周期が G₀ 期で停止しているマクロファージのような最終分化細胞において複製できるという事実は HIV-1 の病原性を考える上で重要である。

標的細胞に吸着・膜融合した HIV-1 は、ウイルス粒子内の RNA ゲノムを細胞質に送り込み、RNA を鋳型として逆転写反応を始める。逆転写反応後のウイルスゲノムはマトリックス (MA), インテグラーゼ (IN), Vpr に加えて、複数の細胞内因子から構成される PIC を形成する^{1,4)} (図 1)。その後、PIC は細胞骨格フィラメントに沿って細胞内を能動輸送され、核膜に到達する^{5,6)}。分子量約 40~60 kDa (直径約 10 nm) 以下の分子は核膜孔を自由拡散により通過できるのに対して、これより大きな分子量を持つタンパク質は NLS として機能するアミノ酸配列をその分子内に保有しており、Importin β ファミリー分子がその NLS を直接認識して速やかに核内へ輸送する⁷⁾。これに加えて、Importin α が NLS を有するタンパク質と Importin β 間のアダプター因子として機能して、基質タンパク質は Importin α/β と三量体を形成して核内に移行する。レトロウイルスの PIC は直径約 56nm 以上であると見積もられており、核膜孔を単純拡散により通過可能な分子の限界が直径約 25 nm とされていることを考えれば、その許容範囲を大幅に超えていることになる。しかし、多くの論文が HIV-1 の PIC は非分裂細胞の核膜孔を細胞周期非依存的に通過できることを示している^{1,4)}。一方、HIV-1 と同じレトロウイルスに属するマウス白血病 (MoMLV) は分裂細胞に感染できるが、非分裂細胞には感染できないという事実が知られている。即ち、MoMLV の PIC はインタクトな核膜孔を通過できないために、ウイルスが複製するためには細胞分裂が必要であり、分裂期 (M 期) において核膜が崩壊して初めて PIC が核内に運ばれるのである^{1,4)}。

では、何故 HIV-1 の PIC は非分裂細胞の核膜孔を核移行できるのであろうか? PIC の構成因子のうち、MA, Vpr, IN には独自の NLS が幾つか同定されており、各々の NLS とそれを特異的に認識する輸送担体を介した核移

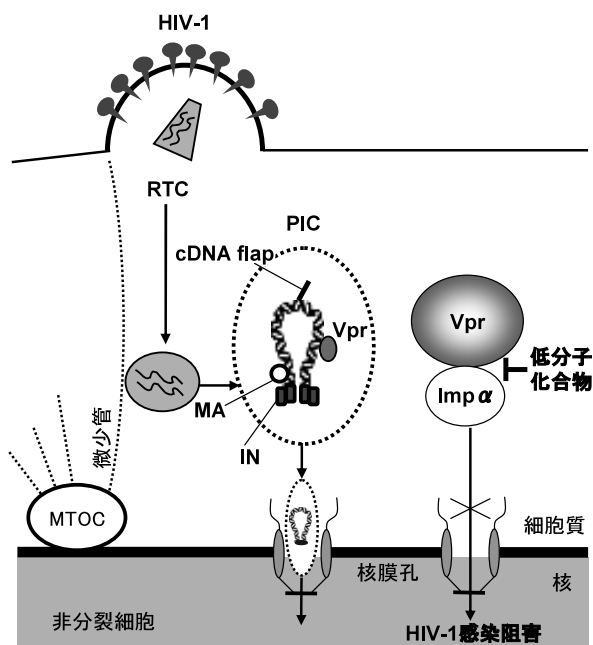


図1 PICの核移行過程およびVprの新規核移行機序とその阻害剤。標的細胞に吸着・膜融合したHIV-1は、ウイルス粒子内のRNAゲノムを細胞質に送り込み、RNAを鋳型として逆転写反応により、逆転写複合体(RTC)を形成後に微小管にそって細胞核近傍に存在するMTOC(microtubule-organizing center)領域まで運ばれ、プレインテグレーション複合体(PIC)を形成する。PICは核膜孔を介して核内に移行し、宿主の染色体DNAに組込まれてプロウイルスとなる。その後、プロウイルスからの転写が起き、子孫ウイルスが産生される。PICの構成因子として、ウイルスDNA(cDNA-flap)に加えてマトリックス(MA)、インテグラーゼ(IN)、アクセサリタンパク質Vprなどのウイルスタンパク質と細胞内因子が挙げられる。MA, Vpr, INタンパク質は核移行シグナル(NLS)を有しており、各々のNLSとそれを特異的に認識する輸送担体を介した核移行経路が複雑に相互作用しながら、核膜孔を通じて核内に輸送されることが考えられているが、非分裂細胞におけるHIV-1複製におけるこれらの相互作用の寄与については論争的になっている。PICの構成因子の一つVprは核輸送アダプター因子Importin α (Imp α)単独との結合を介して核内に移行するが、この結合を阻害する低分子化合物はマクロファージにおけるウイルス複製を核移行過程でVpr依存的に阻害した。

行経路が複雑に相互作用しながら、核膜孔を通じて核内に輸送されることが考えられている¹⁾。例えば、INもしくはMAには典型的なNLS配列が存在し、Importin α/β ヘテロ二量体を介した一般的な核移行経路によりPICの核移行を促進するというモデルが提唱されているが、最近、INには上述のNLSとは異なる新規のNLSがあり、Ran依存性核移行受容体Importin7と直接結合して核移行する経路とImportin7を介してImportin β によって核移行する経路を

使っている可能性も示された。一方、我々はVprはアダプター因子であるImportin α と結合して核移行するという新しいモデルを提唱した^{8,9)}(図1)。このように各HIV-1ウイルスタンパク質には独自のNLSが存在しており、各々に特異的な輸送経路が存在する。最近、HIV-1のPICを用いた生化学的実験により、PICはImportin α/β ヘテロ二量体、Importin7、Importin7/ β ヘテロ二量体、transpotin SRおよびtRNAによって促進されることが報告されたが、非分裂細胞におけるHIV-1核移行におけるPIC構成因子の詳細な機序は未だ明らかにはなっていない¹⁾。

3. Vprによる新規核移行機序の発見

そこで、著者らは非分裂細胞であるマクロファージにおけるPICの核移行に非常に重要な役割を演じているPIC構成因子であるVprの核移行機序の解明に取り組んだ。

Vprは三つの α -helicalドメインを持っており(図2)、細胞内因子と非常に相互作用しやすい三次元構造をとっている¹⁰⁾。そこで、著者らはこれらの α -helicalドメインに着目して、各ドメインに点変異を導入し^{11,12)}、核移行に必要な領域と相互作用する細胞内因子の同定を試みた。その結果、著者らはVprは3番目の α H3ドメインと核膜孔複合体の構成因子ヌクレオポリンとの結合を介して核膜に結合した後、1番目の α H1ドメインとNLS受容体として機能するImportin α 単独との結合を介して核内に移行することを発見した^{8,9)}。さらに、Importin β 結合領域を欠損したImportin α はVprの核移行を促進することも証明した。この成果は一般的な核移行配列NLSやM9を有するタンパク質がImportin β とそのファミリー分子あるいはImportin α/β ヘテロ二量体を介して核移行するのにに対し、Importin α がImportin β なしで核へ輸送できるVprのようなタンパク質が存在することを初めて明らかにしたものである。これまでImportin β のアダプター因子として機能することが知られていたImportin α が単独でタンパク質を核へ輸送できるということは、Importin β とそのファミリー分子に限られていた核-細胞質間タンパク質輸送の多様性を大きく広げるものである。このImportin β 依存的な核移行とは異なる新規の核移行機序を裏付けるように、著者らの発表と同時に、Importin α が単独でCa²⁺/calmodulin dependent protein kinase IV (CaMKIV)を核内輸送するという興味深い報告がなされた¹³⁾。

4. マクロファージにおけるウイルス複製に Importin α は必須である

Importin α はそのアミノ酸の相同性から三つのサブファミリーに分類され、各々の組織での発現パターンおよび認識され輸送されるタンパク質に相違があることが明らかになってきた⁹⁾。このように、細胞は様々なタンパク質を核へ輸送するために、複数の Importin α を使い分けていることがわかってきた。

そこで、Vpr の核移行に特定の Importin α に対する特異性があるか否かを各サブファミリーの代表である Importin α 1/NPI-1, Importin α 2/Rch1 および Importin α 3/Qip1 を用いて解析したところ、いずれも Vpr と結合し、Vpr の核移行を促進することが判明した⁹⁾。このように、Vpr は多種類の Importin α に認識されることによってどんな状況下でも核移行できるような仕組みを兼ね備えているらしい。

Importin α は HIV-1 の標的細胞に発現しているのだろうか？ HIV-1 は、細胞表面に CD4 分子と CCR5 または CXCR4 と呼ばれるケモカインレセプターを発現する末梢血単球/マクロファージおよび CD4 陽性 T 細胞に感染する。そこで、健康なドナー由来末梢血リンパ球から分画した CD4 陽性 T 細胞を静止期 CD4 陽性 T 細胞とし、それを抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で同時に刺激し、インターロイキン 2 (IL2) 含有培地で分化させて活性化 CD4 陽性 T 細胞を得た。一方、末梢血リンパ球から CD14 陽性細胞を分画して末梢血単球とし、それをマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 含有培地で培養して最終分化マクロファージを得て、各々の細胞における Importin α の発現を解析した (図 3A, B)。ウイルス複製が活発に行われてい

ると考えられている最終分化マクロファージおよび活性化 CD4 陽性 T 細胞において、Importin α 1, Importin α 2 および Importin α 3 はいずれも強い発現が観察されたが、分化前の末梢血単球および静止期 CD4 陽性 T 細胞ではいずれの Importin α も殆ど発現しておらず、分化に伴って Importin α の発現が誘導されることが推測された⁹⁾。次に、Importin α の高い発現が認められた最終分化マクロファージの細胞質画分を *in vitro* 核移行アッセイ系に添加したところ、Vpr は速やかに核内に移行したが、弱い発現しか認められなかった末梢血単球の細胞質画分の添加では Vpr の核移行は起こらなかった (図 3C)。上述の結果は Vpr の核移行と Importin α の発現が非常によく相関していることを示している⁹⁾。

続いて、Vpr の核移行における Importin α の重要性を調べた。まず、Importin α を認識する抗体を用いた免疫沈降法によりマクロファージの細胞質画分から Importin α を除去して *in vitro* 核移行アッセイ系に添加したところ、Vpr の核移行は著しく低下した。さらに、siRNA で Importin α の発現をノックダウンした細胞でも同様の結果が得られた。このことから、Vpr の核移行に Importin α の発現が必須であることがわかった⁹⁾。

次に、HIV-1 感染における Importin α の役割を解析した。前項で述べたように、Vpr は三つの α -helical ドメインのうち、1 番目の α H1 ドメインと Importin α の C 末端領域との結合を介して核移行する。そこで、Vpr の α H1 ドメインに複数箇所に点変異を導入することによって、Importin α の C 末端領域との結合能を失った変異体を作製したところ、その変異体は核移行能を失い、それを組込んだウイルスはマクロファージにおけるウイルス複製が激減した⁹⁾。以上の結果は、Importin α の発現、さらには Vpr と Im-

図 2 Vpr の三次元立体構造モデル

Vpr は 96 残基からなる小さなタンパク質であるが、X 線結晶構造は報告されておらず、現在までに nuclear magnetic resonance (NMR) 解析による溶液構造のみが報告されている。Vpr はそれぞれ異なる機能を有する三つの α -helical ドメイン、 α H1 (アミノ酸残基 17-33)、 α H2 (アミノ酸残基 38-50) および α H3 (アミノ酸残基 56-77) を含む。図は PDB ID: 1M8L の Vpr 構造情報を基に NOC ver 3.01 (<http://noch.sourceforge.net/>) ソフトウェアを用いて作成。

図 3 Importin α の強い発現が認められる最終分化マクロファージの細胞質画分の添加により促進される Vpr の核移行

(A, B) Importin α はそのアミノ酸の相同性から Importin α 1/NPI-1 (α 1), Importin α 2/Rch1 (α 2) および Importin α 3/Qip1 (α 3) の三つのサブファミリーに分類される。末梢血単球および最終分化マクロファージから抽出した RNA を用いた real-time polymerase chain reaction (PCR) 法により、各 Importin α の mRNA を定量した。また、末梢血単球および最終分化マクロファージの細胞質抽出液を抗-Importin α 1, 抗-Importin α 2 および抗-Importin α 3 抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。いずれの Importin α も mRNA およびタンパク質レベルにおいて、末梢血単球より最終分化マクロファージにおいて高い発現が認められた。(C) 末梢血単球および最終分化マクロファージの細胞質画分を用いて *in vitro* 核移行解析を行ったところ、Vpr の核移行は Importin α の高い発現が認められた最終分化マクロファージの細胞質画分の添加により促進された。また、Simian virus 40 large T 抗原の核移行シグナル (NLS) も同様の結果であった。

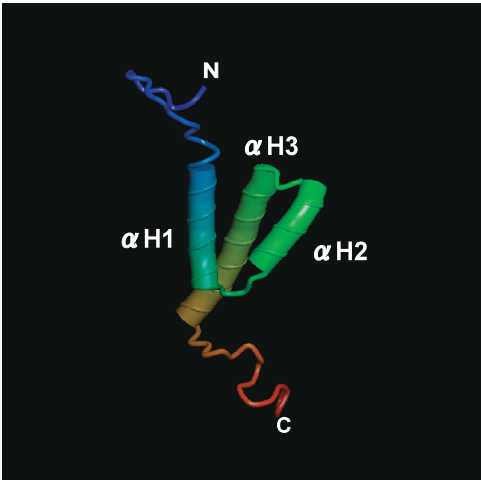


図 2

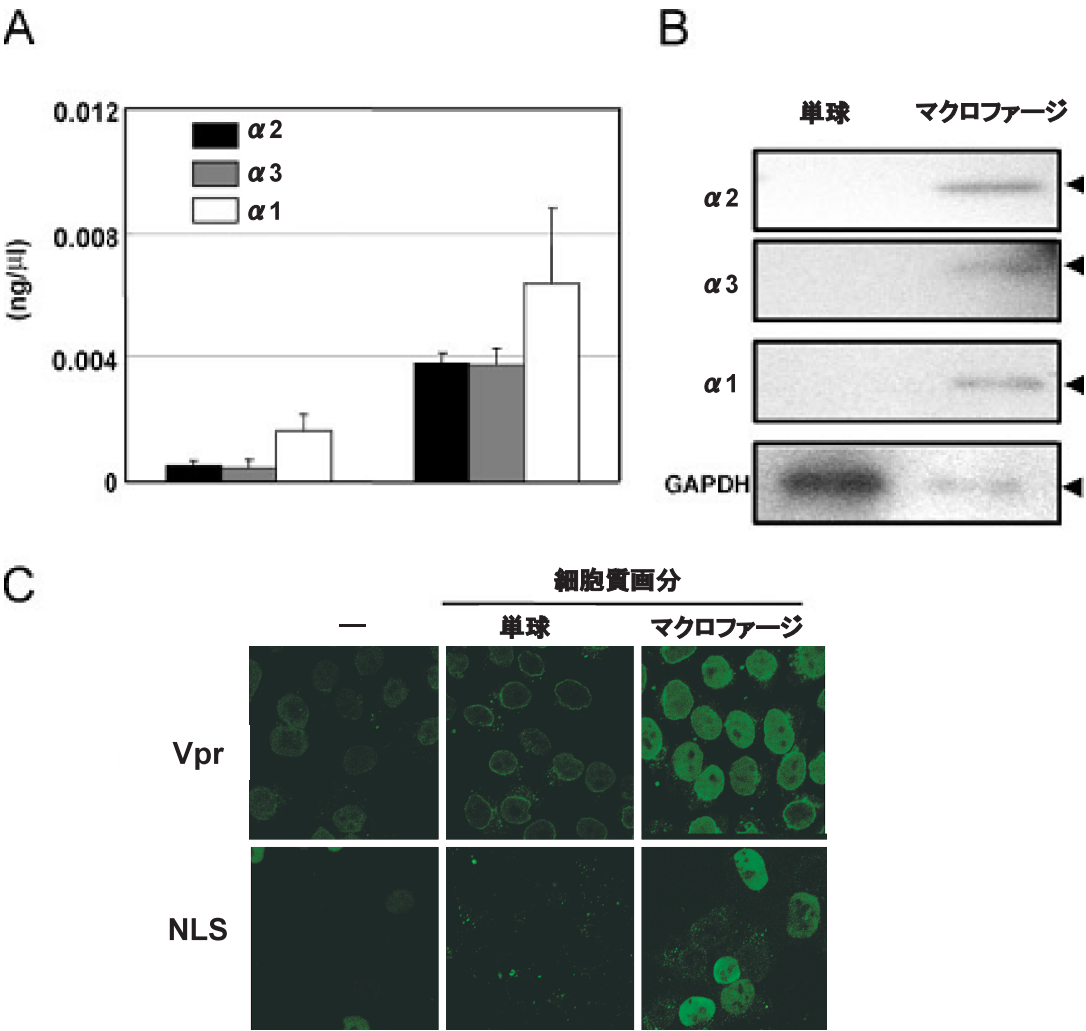


図 3

portin α の結合がマクロファージにおける HIV-1 の複製に必須であることを示唆している。興味深いことに、我々のデータを裏付けるように、HIV-1 を感染させると、末梢血単球においてウイルスの核移行が抑制されているにもかかわらず、逆転写の効率は最終分化マクロファージとほぼ同じであるという興味深い知見が得られている¹⁴⁾。

5. Vpr と Importin α の相互作用を標的にした創薬の開発

逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤を併用する HAART 法によって、死の病であったエイズは治療可能な慢性感染症と定義されるようになった。しかし、このエイズ薬は耐性株出現、副作用などの問題を抱えているのが実状である。従って、エイズを根絶するためには、HAART 法とは異なる新たな作用点を標的にした薬剤を開発することによって耐性株出現を克服することが必須である。そこで、阻害薬を開発するための作用点として、著者らはこれまでに開発が進んでいないウイルス遺伝子産物と細胞内因子との相互作用に着目した。そして、その標的として Vpr と Importin α の結合点を選択した。まず、Vpr と Importin α との結合を正確および高感度に検出する酵素免疫定量法 (ELISA) を確立し、天然物低分子化合物ライブラリーから、両分子の結合を阻害する化合物をスクリーニングした。そのうち 1 種類が *in vitro* 核移行アッセイ系において Importin α 依存的な Vpr の核移行を濃度依存的に阻害し、さらに、マクロファージにおけるウイルス複製を阻害した¹⁵⁾。HIV-1 はレセプターとの結合、脱殻、逆転写、DNA の核移行と組み込み、プロウイルスからの転写、翻訳、タンパク質の集合とウイルス粒子の遊離と成熟の過程を経て複製する。そこで、本化合物が HIV-1 の生活環のどこを阻害するのかを核移行マーカーである 2 long terminal repeat (LTR) フォームを real time polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて検出して検証したところ、逆転写から核移行過程を阻害することが明らかとなった¹⁵⁾。しかも、この阻害は Vpr 欠損ウイルスでは認められないことから、Vpr に特異的であることが伺われた。

では、化合物は Vpr と Importin α のどちらに結合するのであろうか？ 光親和性リンカーのついたセファロースビーズに目的化合物を導入し、Vpr と Importin α を加えた後に、遠心により化合物に結合したタンパク質を沈降させ、SDS-PAGE で電気泳動後にクーマシーブリリアントブルー (CBB) 染色を行った。誘導体は予測通りに、Importin α ではなく、Vpr の α H1 ドメインに結合した。興味深いことに、化合物は α H1 ドメインが機能ドメインであ

るアポトーシス誘導能を阻害したが、C 末端領域が機能ドメインである G₂ 期停止能を阻害しなかった。このことから、化合物が Vpr の α H1 ドメインに結合することが裏付けられた。

HIV-1 は非常に変異しやすいウイルスであり、1 日に体内で複製されるウイルスの中で、約 30% は遺伝子変異を組んでいると言われている。このような高頻度の遺伝子変異はワクチン開発や抗 HIV-1 薬の大きな障害となっている。そこで、抗ウイルス剤の作成にあたり、変異が入りにくい部位をターゲットにすることはとても重要である。そこで我々は、HIV-1 シークエンスデータベースより 1227 の変異ウイルスの vpr 遺伝子を収集し、その情報に基づいて Vpr の各ドメインの多様性解析を行った。その結果、Vpr の重要な構成ドメインである三つの α -helical ドメインの中でも、化合物が結合する α H1 ドメインの保存性は極めて高く、薬剤のターゲットとして最適であることが明らかとなった。このことから、Vpr は現在の多剤併用療法の問題点である耐性ウイルスの出現を軽減できる優れた標的分子であることがわかった。

6. おわりに

本研究の成果はウイルスの核移行阻害が抗ウイルス薬の標的として有用であることを強く示している。ボックスウイルスを除く全ての DNA ウイルス、そして一部の RNA ウイルスは、宿主細胞の核内でゲノムの複製を行う。従って、著者らが提案した核移行を標的とした抗 HIV 薬の開発は核内で増殖するウイルスの複製阻害薬のモデルとなるものと確信する。

謝辞

本稿で述べた著者の実験結果は多くの共同研究者との共同研究で得られたものであり、改めてここに深謝いたします。本研究の一部は、独立行政法人医薬基盤研究所・保健医療分野における基礎研究推進事業および厚生労働科学研究費補助金・エイズ対策研究事業によって行われた。

- 1) Aida, Y. & Matsuda, G. (2009) *Curr. HIV Res.*, 7, 136-143.
- 2) Zhang, X. & Aida, Y. (2009) *Curr. HIV Res.*, 7, 163-168.
- 3) Majumder, B., Venkatachari, N.J., Srinivasan, A., & Ayyavoo, V. (2009) *Curr. HIV Res.*, 7, 169-177.
- 4) Suzuki, Y. & Craigie, R. (2007) *Nat. Rev. Microbiol.*, 5, 187-196.
- 5) McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M., & Hope, T.J. (2002) *J. Cell Biol.*, 159, 441-452.

- 6) Arhel, N., Genovesio, A., Kim, K.A., Miko, S., Perret, E., Olivo-Marin, J-C., Shorte, S., & Charneau, P. (2006) *Nat. Methods*, **3**, 817–824.
- 7) Fried, H. & Kutay, U. (2003) *Cell Mol. Life Sci.*, **60**, 1659–1688.
- 8) Kamata, M., Nitahara-Kasahara, Y., Miyamoto, Y., Yoneda, Y., & Aida, Y. (2005) *J. Virol.*, **79**, 3557–3564.
- 9) Nitahara-Kasahara, Y., Kamata, M., Yamamoto, T., Zhang, X., Miyamoto, Y., Muneta, K., Iijima, S., Yoneda, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., & Aida, Y. (2007) *J. Virol.*, **81**, 5284–5293.
- 10) Morellet, N., Bouaziz, S., Petitjean, P., & Roques, B. P. (2003) *J. Mol. Biol.*, **327**, 215–227.
- 11) Iijima, S., Nitahara-Kasahara, Y., Kimata, K., Zhuang, W.Z., Kamata, M., Isogai, M., Miwa, M., Yokota-Tsunetsugu, Y., & Aida, Y. (2004) *Virology*, **327**, 249–261.
- 12) Kamata, M. & Aida, Y. (2000) *J. Virol.*, **74**, 7179–7186.
- 13) Kotera, I., Sekimoto, T., Miyamoto, Y., Saiwaki, T., Nagoshi, E., Sakagami, H., Kondo, H., & Yoneda, Y. (2005) *EMBO J.*, **24**, 942–951.
- 14) Neil, S., Martin, F., Ikeda, Y., & Collins, M. (2001) *J. Virol.*, **75**, 5448–5456.
- 15) Suzuki, T., Yamamoto, N., Nonaka, M., Takeshima, S., Hashimoto, Y., Matsuda, G., Matsuyama, M., Igarashi, T., Miura, T., Tanaka, R., Kato, S., & Aida, Y. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **380**, 838–843.

間 陽子

(理化学研究所 基幹研究所

分子ウイルス学特別研究ユニット)

A novel nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr promoted by Importin α
Yoko Aida (Viral Infectious Diseases Unit, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan)