

## HIV 粒子のプロテオーム解析と HIV 脱殻過程の解析

### 1. はじめに

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) ゲノムは約 9.2 kbp であり、構造タンパク質や調節タンパク質、アクセサリタンパク質に分類されるわずか 20 種足らずのタンパク質をコードしているにすぎない。したがって、宿主標的細胞に侵入し、新たなウイルスを効率的に放出するという HIV-1 の複製過程において、ウイルスが複製に関与するタンパク質の機能発現に翻訳時修飾・翻訳後修飾を利用することが知られている。実際に HIV-1 感染細胞からウイルス粒子が産生される際、標的細胞内で合成された Pr55<sup>gag</sup> および p160<sup>gag-pol</sup> 前駆体タンパク質は、形質膜直下に集積するために、宿主酵素である *N*-myristoyltransferase による *N* 末端のミリスチル化を必要とする<sup>1)</sup>。さらに HIV-1 は未成熟なウイルス粒子として出芽後に、自身が有する HIV-1 プロテアーゼがウイルス粒子内の前駆体タンパク質 Pr55<sup>gag</sup> および p160<sup>gag-pol</sup> をプロセシングすることにより感染性を有する成熟したウイルスとなる。この HIV-1 プロテアーゼによる前駆体タンパク質の特異的な切断もウイルス複製に必要な機能性タンパク質を生み出すために巧みに翻訳後修飾を利用している例といえる。これまでに HIV-1 が利用する翻訳後修飾として知られているものとして、外被糖タンパク質の糖鎖付加やパルミトイル化<sup>2,3)</sup>、マトリックスタンパク質や逆転写酵素のリン酸化<sup>4,5)</sup>、インテグラーゼのアセチル化<sup>6)</sup>なども知られており、これらの知見は、HIV-1 の真の複製メカニズムを説き明かすためには、ウイルスゲノムレベルの解析だけでは不十分であることを意味している。そこで、著者らのグループはウイルス粒子そのものを用いたプロテオーム解析により、ウイルス複製に関与する未知の翻訳時修飾・翻訳後修飾を明らかにすることを試みている。得られた結果より、未だ十分明らかにされていない HIV-1 複製機構を明らかにし、新たな創薬ターゲットを見いだしたいと思っている。

著者らのグループは、これまでの HIV-1 粒子のプロテオーム解析の結果、HIV-1 を構成する細胞性およびウイルス性タンパク質が受けるいくつかの翻訳後修飾を同定してきた。ウイルス構造タンパク質のフォールディング等に関与する細胞性シャペロン分子サイクロフィリン A が HIV-

1 の出芽時点にカプシドタンパク質 (CA) に特異的に結合することによって粒子中に取り込まれ、それらには等電点の異なる複数のアイソザイムが存在することを明らかにしている<sup>7)</sup>。さらに、それらのアイソザイムのうちアセチル化を受けるものやウイルスの出芽後、ウイルス粒子内からウイルス粒子外へ分布を変化させるアイソザイムも存在することを明らかにしている<sup>7)</sup>。さらに、ウイルス RNA を保護する役割を持つ CA は、Pr55<sup>gag</sup> および p160<sup>gag-pol</sup> から HIV-1 protease によってプロセシングを受けることにより生じ、少なくとも 4 種類のアイソフォームがウイルス粒子内に存在することを明らかにするとともに、それらの内の一つの CA アイソフォームのアミノ末端がホルミル化を受けること<sup>8)</sup>、また別の CA アイソフォームのアミノ末端側の Ser<sub>16</sub>-Pro<sub>17</sub> モチーフにおいて Ser 残基特異的にリン酸化を受けていることを明らかにすることができた<sup>9)</sup>。

本稿では、Ser<sub>16</sub>-Pro<sub>17</sub> モチーフの Ser 残基特異的なリン酸化に焦点をあて、このリン酸化を受けたモチーフを細胞内のペプチジルプロリルイソメラーゼ Pin1 が認識することにより、HIV-1 RNA を保護していた CA の集合体である CA コアが崩壊するという HIV-1 複製機構における脱殻過程の新たなモデルに関する著者らの最近の成果を紹介したい。

### 2. HIV-1 脱殻モデル

HIV-1 は、多種多様なウイルスの中でも最も研究が進んでいるものの一つである。しかしながら、これまで HIV-1 複製過程において HIV-1 が標的細胞に吸着侵入後、CA コアが崩壊し、ウイルスゲノムを標的細胞内に放出する脱殻過程に関しては、十分理解されていなかった。ウイルス粒子内では安定な CA コアが、標的細胞内に侵入すると不安定化し、適切なタイミングで崩壊する。非常に興味深い過程である。しかしながら、ウイルスの侵入後すぐに起こる現象であることから観察することが難しく、また、円錐形の CA コアを試験管内で人工的に調製することができないなど、実験方法の確立が不十分であることから、HIV-1 複製過程において最も解明が遅れていた。その一方で、脱殻の重要性を示す報告はいくつか存在し、逆転写反応過程に影響を与えていることが知られていた<sup>10,11)</sup>。さらに、HIV-1 を含むレンチウイルス属の特徴として、マクロファージなどの非分裂細胞への感染がある。レンチウイルスは、核膜の消失を伴わずにウイルスゲノムを細胞の核内へ移行させ、感染を成立させることができる。しかしながら、核膜孔の内径が~30 nm である一方で CA コアの大きさは~60

nmであり、核膜孔を通過するのは不可能であるように思われる。つまり、ここで脱殻が要求されるのである。CAタンパク質で構成される殻(CAコア)を脱ぎ捨てることで、ウイルスゲノムはpre-integration complex (PIC)となり、核膜孔を通過して核内へと移行する。実際に、HIV-1のPICにはCAタンパク質は含まれていないことが報告されている<sup>12)</sup>。これらの知見からも、脱殻過程はHIV特有の重要な複製過程といえる。

著者らは、HIV-1粒子を用いたプロテオーム解析を基に種々の生化学的な実験を行うことにより以下のような脱殻モデルを提唱するにいたった。具体的には、HIV-1は、感染細胞より出芽する際に、宿主細胞由来の細胞性キナーゼをウイルス粒子内に取り込む(図1中Step 1)。

その後、ウイルスが成熟化する過程でHIVゲノムを保護しているCAコア中のSer<sub>16</sub>-Pro<sub>17</sub>モチーフがウイルス粒子内でSer<sub>16</sub>残基特異的にリン酸化される(図1中Step 2)。そのリン酸化を受けたCAコアが標的細胞内へ放出される(図1中Step 3)と標的細胞の細胞質に存在しているペプチジルプロリルイソメラーゼPin1によりそのモチーフが認識され、リン酸化されたSer<sub>16</sub>のC末側にあるプロリンのシス・トランス異性化によって、コアタンパク質の立体

構造が変化しCAコアが崩壊し、ウイルスゲノムが放出される(図1中Step 4および5)というモデルである<sup>9)</sup>。

### 3. Ser<sub>16</sub>-Pro<sub>17</sub>モチーフのリン酸化とウイルス学的意義

Ser<sub>16</sub>-Pro<sub>17</sub>モチーフのSer残基がリン酸化を受けていることは、そのモチーフを含むCAのトリプシン消化物(PIVQNIQGQMVHQAI<sup>18</sup>SPR<sup>18</sup>, 理論値:2016.36)が約80シフトしたピークとして検出され(実測値:2096.55)、このピークはアルカリホスファターゼ処理によって消失したことから、リン酸化であることが分かった(図2A, B)。さらに、著者らは、CAのSer<sub>16</sub>-Pro<sub>17</sub>モチーフを認識するモノクローナル抗体を作製し、ウイルス粒子内のCAのリン酸化の程度を確認したところ、CAコアを形成しているCAのSer<sub>16</sub>残基が特異的にリン酸化を受けていることを明らかにできた<sup>9)</sup>。

Ser<sub>16</sub>-Pro<sub>17</sub>モチーフのSer残基がリン酸化を受ける意義をウイルス学的に明らかにするためにこのモチーフのAla変異株を作製したところ、ウイルスの出芽そのものや形態には影響がなかった<sup>9)</sup>。しかしながら、Ala変異株が標的細胞内でWTと同様に脱殻しているのかどうかをSodroskiらが構築したFate-of-Capsid assay<sup>13)</sup>によって検証したところ、Ala変異株が野生株よりも脱殻しにくいことが分かった(図2C)。以上の結果から、リン酸化Ser<sub>16</sub>-Pro<sub>17</sub>モチーフは脱殻過程において機能し、HIV-1の感染性に大きな影響を与える重要なモチーフであることが明らかになった。

### 4. HIV-1の脱殻に関与する細胞性因子Pin1の同定とPin1依存性脱殻過程の分子機構

リン酸化Ser<sub>16</sub>-Pro<sub>17</sub>モチーフが脱殻過程において機能するためには、標的細胞内に侵入後に何らかの因子と相互作用する必要があると考えた。そこで、相互作用因子の同定を試みた。また、同定された因子の脱殻作用を*in vitro* uncoating assay<sup>14)</sup>を一部改変して解析し、脱殻メカニズムの解明に取り組んだ。リン酸化Ser-Proモチーフを特異的に認識するタンパク質は極めて珍しい。Pin1は、cyclophilinやFK506 binding proteinと同様にXaa-Pro(Xaaは任意のアミノ酸)のペプチド結合のcis-trans異性化反応を触媒する酵素であるが、他の酵素と大きく異なる点として、リン酸化Ser/Thr-Proモチーフを基質とすることが挙げられる。Pin1のリン酸化依存的に基質の構造を変化させる性質は、生体内においてリン酸化が基質タンパク質の活性化スイッチとなったり、分解スイッチとなったりする「リン酸化修飾後タンパク質機能制御機構」を成立させている<sup>15)</sup>。そこ

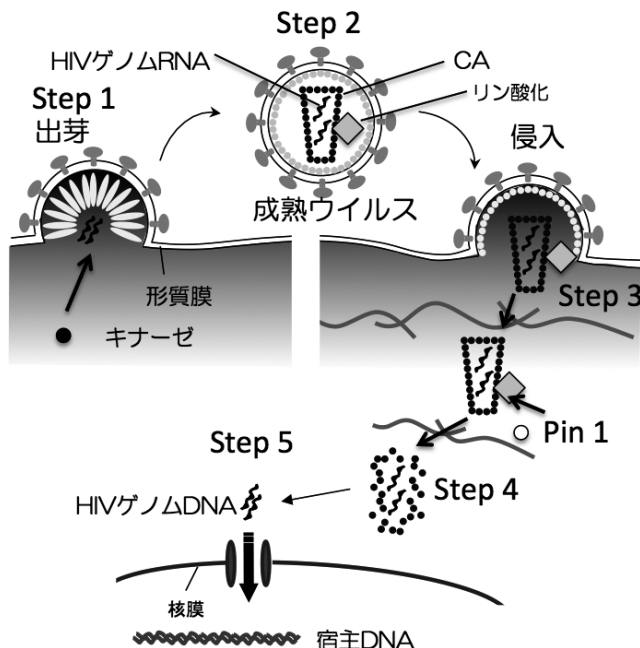


図1 HIV-1脱殻モデル

HIV粒子内のCAのSer<sub>16</sub>がリン酸化を受け(Step 2)、リン酸化Ser<sub>16</sub>-Pro<sub>17</sub>モチーフを宿主細胞内のPin1が認識することによってCAコアの脱殻が行われる(Step 4)。

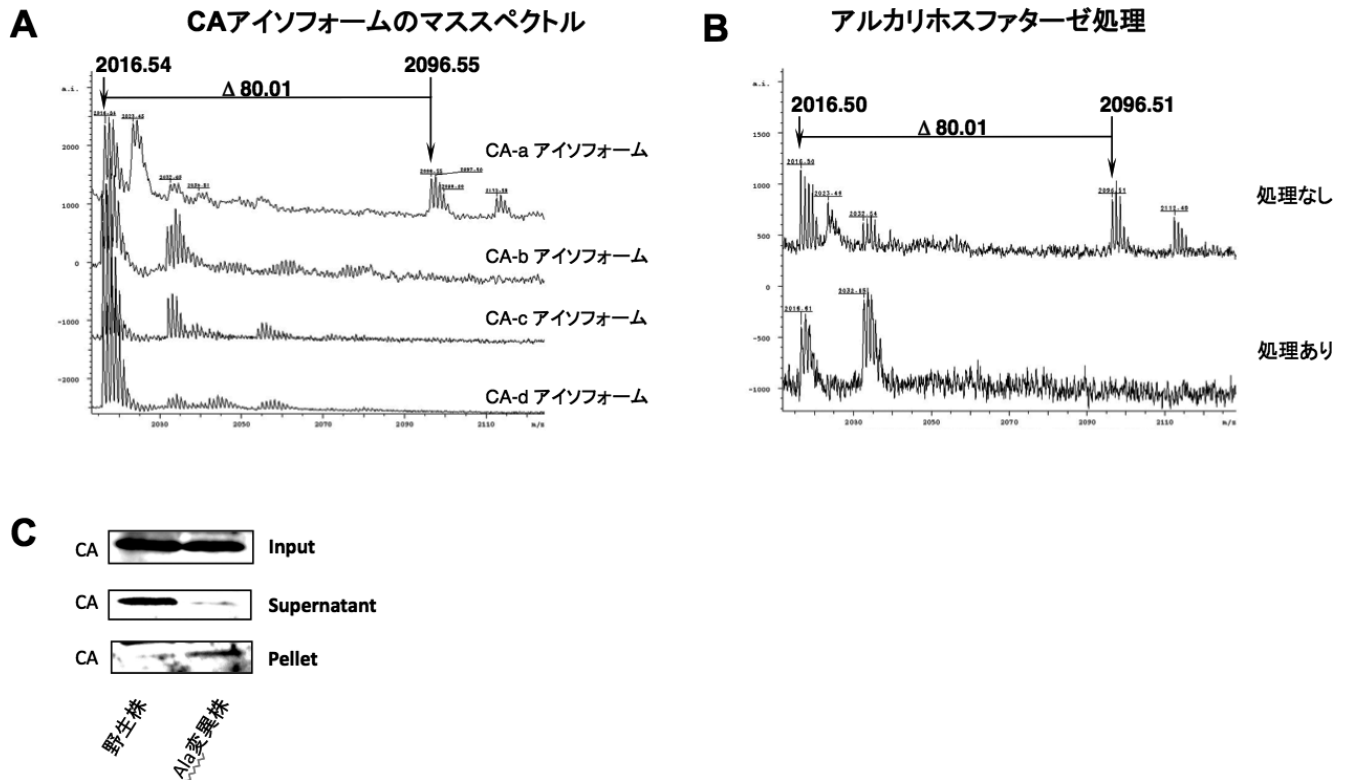


図2 Ser<sub>16</sub>-Pro<sub>17</sub>モチーフのリン酸化と Fate-of-Capsid assay

A, CA-a アイソフォームの Ser<sub>16</sub> が特異的にリン酸化を受けている。B, CA-a アイソフォームの Ser<sub>16</sub> のリン酸化はアルカリホスファターゼ処理により除かれる。C, Fate-of-Capsid assay では、崩壊していない CA コアは pellet に、崩壊した CA コアは supernatant に密度勾配を利用して分離後、SDS-PAGE を行い、CA に対する抗体で western immunoblotting を行う。Input は、ウイルス量が野生株と Ala 変異株間で同じであることを示している。Supernatant は、Ala 変異株のバンドが薄いので、脱殻した CA の量が少ないことを示している。Pellet は、Ala 変異株のバンドが濃いので、脱殻していない CA コアの量が多いことを示している。

で、Pin1 を CA コアの相互作用分子の候補として、HIV-1 粒子から調製した CA コアと Pin1 が直接結合するのかどうか GST-Pin1 pull-down assay によって検討した。その結果、Pin1 は CA コアに結合し、アルカリホスファターゼ処理によって Ser<sub>16</sub>-Pro<sub>17</sub> モチーフが脱リン酸化されると CA コアには結合しなかったことから、Pin1 はリン酸化 Ser<sub>16</sub>-Pro<sub>17</sub> モチーフを認識して CA コアに結合することがわかった (図 3A, B)。

Pin1 が CA コアに結合しうることが明らかになったため、HIV-1 感染における Pin1 の寄与を検討した。Pin1 をノックダウンさせた MAGIC-5 細胞に HIV-1 を感染させると、HIV-1 の感染性が低下した。したがって、Pin1 は HIV-1 の感染の成立に必須な因子であることが示唆された (図 3C)。次に脱殻過程における Pin1 ノックダウンの影響をするために Fate-of-Capsid assay を行い、感染細胞の細胞質で野生型ウイルスがどの程度脱殻しているのかを調べ

た。その結果、Pin1 ノックダウン細胞では、ウイルスの CA コアが脱殻しにくいことが分かった (図 3D)。さらに、ウイルス RNA の逆転写によって生じるウイルス DNA を qPCR で定量した結果、Pin1 ノックダウン細胞におけるウイルス DNA はほとんど検出されず、逆転写が進んでいないことが分かった (図 3E)。これらの結果は、Ser<sub>16</sub>-Pro<sub>17</sub> モチーフの Ala 変異体の phenotype と非常によく似ていた。つまり Pin1 は、脱殻過程において CA コアのリン酸化 Ser<sub>16</sub>-Pro<sub>17</sub> モチーフに働きかけることにより、HIV-1 の感染を成立させると考えられた。

## 5. おわりに

本研究は、HIV-1 感染における脱殻メカニズムを初めて明らかにしたものであり、HIV-1 の脱殻には、CA コアのリン酸化とそのリン酸化を介した Pin1 との相互作用が要求されることが明らかになった。したがって、Ser<sub>16</sub> をリ

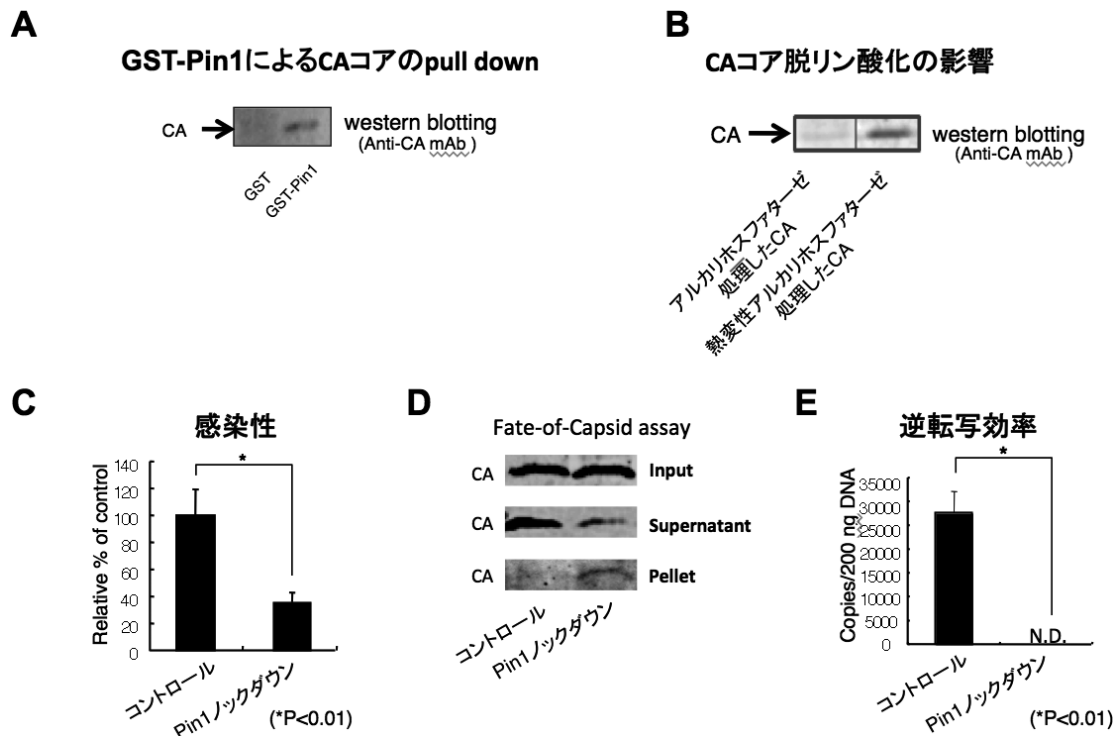


図3 HIV-1の脱殻に参与する細胞性因子Pin1の同定とPin1依存性脱殻過程

A, GST-pull down assayは、Pin1とCAコアが特異的に結合できることを示した。B, CAのSer<sub>16</sub>のリン酸化の除去は、Pin1とCAの結合を消失させた。Ser<sub>16</sub>のリン酸化の除去は、anti-pS16/P17抗体で確認済み。C, HIV標的細胞内のPin1をノックダウンするとHIV感染効率が低下。D, Pin1ノックダウン処理後、Fate-of-Capsid assayを行うとsupernatantのバンドが薄くなった。この結果は、脱殻したCAの量が少なかったことを示している。また、pelletのバンドが濃いので脱殻していないCAコアの量が多いことを示している。E, HIV標的細胞内のPin1をノックダウンすると脱殻過程が適切に行われないために、HIV逆転写後期産物の量をqPCRで定量すると著しく低下することがわかった。

ン酸化するリン酸化酵素やPin1は、新規の抗HIV剤の標的となり得ると期待している。

#### 謝辞

本稿で述べられた実験結果は、井上睦美博士を中心とした多くの共同研究者との共同研究により得られたものであり、深謝する。

- 1) Shoji, S., Tashiro, A., & Kubota, Y. (1988) *J. Biochem.*, **103**, 747-749.
- 2) Allan, J.S., Coligan, J.E., Barin, F., McLane, M.F., Sodroski, J. G., Rosen, C.A., Haseltine, W.A., Lee, T.H., & Essex, M. (1985) *Science*, **228**, 1091-1094.
- 3) Yang, C., Spies, C.P., & Compans, R.W. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9871-9875.
- 4) Gally, P., Swingler, S., Aiken, C., & Trono, D. (1995) *Cell*, **80**, 379-388.
- 5) Idriss, H., Kawa, S., Damuni, Z., Thompson, E.B., & Wilson,

S.H. (1999) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **31**, 1443-1452.

- 6) Cereseto, A., Manganaro, L., Gutierrez, M.I., Terreni, M., Fittipaldi, A., Lusic, M., Marcello, A., & Giacca, M. (2005) *EMBO J.*, **24**, 3070-3081.
- 7) Misumi, S., Fuchigami, T., Takamune, N., Takahashi, I., Takama, M., & Shoji, S. (2002) *J. Virol.*, **76**, 10000-10008.
- 8) Fuchigami, T., Misumi, S., Takamune, N., Takahashi, I., Takama, M., & Shoji, S. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 1107-1113.
- 9) Misumi, S., Inoue, M., Dochi, T., Kishimoto, N., Hasegawa, N., Takamune, N., & Shoji, S. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 25185-25195.
- 10) Iordanskiy, S., Berro, R., Altieri, M., Kashanchi, F., & Bukrinsky, M. (2006) *Retrovirology*, **3**, 4.
- 11) Fassati, A. & Goff, S. P. (2001) *J. Virol.*, **75**, 3626-3635.
- 12) Farnet, C.M. & Haseltine, W.A. (1991) *J. Virol.*, **65** 1910-1915.
- 13) Stremlau, M., Perron, M., Lee, M., Li, Y., Song, B., Javanbakht, H., Diaz-Griffero, F., Anderson, D. J., Sundquist, W. I., & Sodroski, J. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 5514-5519.

- 14) Auewarakul, P., Wacharapornin, P., Srichatrapimuk, S., Chutipongtanate, S., & Puthavathana, P. (2005) *Virology*, 337, 93-101.
- 15) Ryo, A., Liou, Y.C., Lu, K.P., & Wulf, G. (2003) *J. Cell Sci.*, 116, 773-783.

三隅 将吾

(熊本大学大学院生命科学研究部・薬学生化学分野)

Biochemical analyses of HIV-1 uncoating process based on proteome analysis

Shogo Misumi (Department of Pharmaceutical Biochemistry, Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-Honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan)

## AMP キナーゼの新規基質 CLIP-170 の同定と微小管伸長スピード制御機構の解明

### 1. はじめに

AMPK (AMP-activated protein kinase) は現在最も関連する論文数が多いリン酸化酵素といっても過言ではない。ATP の加水分解産物である AMP を感知して活性化されるという AMPK の特異的な活性制御機構は、エネルギー代謝に重要であることは容易に推測される。それ故、糖尿病などの治療につながる創薬標的としても非常に注目を集めている。ところが AMPK には生化学的にいまだ多くの謎が残されている。確かに AMPK は生体外での反応系では AMP によって顕著に活性誘導されるが、実際に生体内でも AMP によって活性化されているのか、あるいは AMPK 自体のリン酸化酵素である LKB1 はどのように生体内で AMPK の活性化に関与しているかなど、重要な課題が未解決のままである。加えて近年おびただしい数の新規基質が同定されその数は増え続けている。それだけ多彩な基質を AMPK はどのように判別し、機能しているかなども不明のままである。ノックアウトマウスを使用した解析も散見されるがこのような多様な機能を持ったリン酸化酵素の解析には不向きであると思われる上にそもそも胎生致死となり解析そのものに難渋している。本稿では、もう一度 AMPK の生化学に立ち戻って基質とのカイネティクスに基づいてこの酵素の働きについて概説する。その中でも最近 *de novo* スクリーニングにより同定した新規の基質である CLIP-170 の非常にユニークな細胞生物学的側面につい

て併せ紹介する。

### 2. AMPK の活性制御機構

AMPK 自身の構造及び機能に関しては、すでに多くの総説が出版されているので詳しくはそれらを参照していただき<sup>1)</sup>、本稿ではごく簡単にその特徴を述べる。AMPK のリン酸化酵素としての最も重要な働きは名前の通り AMP により活性化されるという性質である。生体外でリン酸化酵素と基質を反応させる単純な系において、AMP は殆どのリン酸化酵素の活性を抑制する。その中で、AMP により顕著に活性化される AMPK の特異性は実験開始当初は驚きであった。その独特の活性制御機構は当然結晶学者たちの注目も集め、酵母および哺乳類の AMPK の結晶構造が部分的ではあるが解かれた<sup>2)</sup>。これにより予想通り、AMPK にはリン酸基ドナーである ATP が結合する部位以外に AMP や ADP が ATP に比し比較的高い結合能で結合するであろう部位が複数存在した。

このことは AMPK に結合した AMP がアロステリックに AMPK の活性を上げることを示唆する。現在は AMP が結合することにより AMPK 自身がリン酸化されやすくなるのが活性化につながると考えられている<sup>3)</sup>。AMPK をリン酸化する上流のリン酸化酵素としては特に LKB1 が重要と考えられている<sup>4)</sup>。ただしそれでもまだ本当に細胞内でこういった活性制御が起こっているかは厳密には証明されていない。それは細胞内の AMP の濃度がいまだリアルタイムで正確に測定できないため、AMPK の活性と直接リンクしているかが証明できないからである。しかし AMPK が細胞に対するエネルギー枯渇を主とするストレスに対して活性化されるリン酸化酵素であることは間違いない。

### 3. AMPK のエネルギー代謝における役割

AMPK は 1987 年に Hardie らにより acetyl-CoA carboxylase (ACC) をリン酸化してその活性を低下させる酵素として発見された<sup>5)</sup>。AMPK はエネルギーが枯渇した状態すなわち ATP が消費され AMP が増加する状況で活性化される。そうであれば増加した AMP により活性化された AMPK が基質である ACC を抑制することにより TCA 回路へ回る acetyl-CoA が増加し、より ATP が産生されるというこの分子機構は極めて合目的に思える。他にもエネルギー代謝にかかわる酵素が次々に AMPK の基質として同定され<sup>6)</sup>、それぞれが AMPK によって活性化されることにより異化反応をすすめ同化反応を抑制する方向に向かう