

4. HIV-1 粒子には複数の cyclophilin isoform が存在する

三 隅 将 吾

熊本大学・大学院医学薬学研究部・薬学生化学

HIV-1 粒子内に peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophilin A (CyPA) が取り込まれることは、周知の事実である。しかし、ウイルス粒子を精製し、プロテオーム解析により蛋白質レベルで詳細に解析してみると、すくなくとも4個の isoform (等電点 6.0, 6.4, 6.53, 6.88) が存在することが判った。これらの内 CyPA_{6.00}, CyPA_{6.40}, CyPA_{6.53} はウイルス粒子内に存在し、CyPA_{6.53} はアミノ末端がアセチル化を受けていることが同定された。一方 CyPA_{6.88} のウイルス粒子外への再分布のメカニズムはまだ判っていないが、ウイルスが出芽後移ウイルス膜を通過することが明らかになった。

はじめに

Cyclophilin A (CyPA) は、大腸菌からヒトに至る生物に存在し、細胞質に大量に存在する蛋白質である¹⁾。CyPA は、そもそも免疫抑制剤 cyclosporin A (CsA) の特異的リガンドとして発見され²⁾、ポリペプチドのプロリンのアミド結合のシスからトランスへの異性化を触媒する活性 (peptidyl prolyl isomerase (PPIase) 活性)^{3,4)} を有する。さらに、細胞性シャペロンとしてもよく知られている^{5,6)}。CyPA は、HIV-1 のアセンブリーの時点でカプシド蛋白質に特異的に結合することによって^{7,9)}、粒子中におよそ Gag 蛋白質の 1/10 程度取り込まれ、CsA によってその取り込みが阻害されることが知られている^{7,11)}。HIV-1 以外の vaccinia virus, vesicular stomatitis virus などのウイルス粒子内にも取り込まれることが報告されている一方で^{12,13)}、一部の例外を除いて HIV-2 や SIV など HIV-1 に近縁のレトロウイルスには、取り込まれないとされている¹¹⁾。本稿では、HIV-1 の複製と CyPA の関わりを概説してみたい。

HIV-1 粒子内の CyPA isoform の発見

我々は、蛋白質分子レベルでウイルスの複製過程を理解するために HIV-1 粒子中のプロテオーム解析をおこなっている。その解析のための HIV 粒子は、感染細胞由来の microvesicle のコンタミネーションをさけるために精製した。それを用いたプロテオーム解析によって、ウイルス粒子中の未知の宿主蛋白質の同定やウイルス構成蛋白質の翻訳時・後修飾の同定、さらに、詳細なディファレンシャルプロテオーム解析により HIV 準種間の粒子成分の生化学的性質の違いを同定し、HIV 複製における生物学的意義を検証するための多くの情報を提供してくれる。その過程で、当初我々はウイルス粒子内に等電点の異なる CyPA isoform (等電点 6.40, 6.53, and 6.88) が3種類存在することを報告したが¹⁴⁾、現在では等電点 6.00 の CyPA も含めて少なくとも4種類の CyPA isoform が存在することが判った (図 1)。

これら CyPA isoform の内、等電点 6.53 の isoform は、N 末端がアセチル化を受けていることを N 末端 tryptic peptide (1-18) の PSD 解析 (図 2, 3) 及び N-acylamino acid releasing enzyme を用いた解析により明らかにした (data not shown)。さらに等電点 6.88 の isoform は、subtilisin 処理により 2D gel 上からそのスポットが消失するとともに (subtilisin 処理は、サンプル中の microvesicle を除去するためにおこなわれるが、その際にウイルス粒子表面の蛋白質も切断されることが判っている)、実際に電子顕微鏡を用いたウイルス粒子の解析からウイルス粒子表面に存在することを明らかにしてきた¹⁴⁾ (図 4)。CyPA_{6.88} がどのような

連絡先

〒 862-0973 熊本市大江本町 5-1
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・薬学生化学
 TEL : 096-371-4363
 FAX : 096-371-4363
 E-mail : misumi@gpo.kumamoto-u.ac.jp

2D-MAP of HIV-1_{LAV-1}

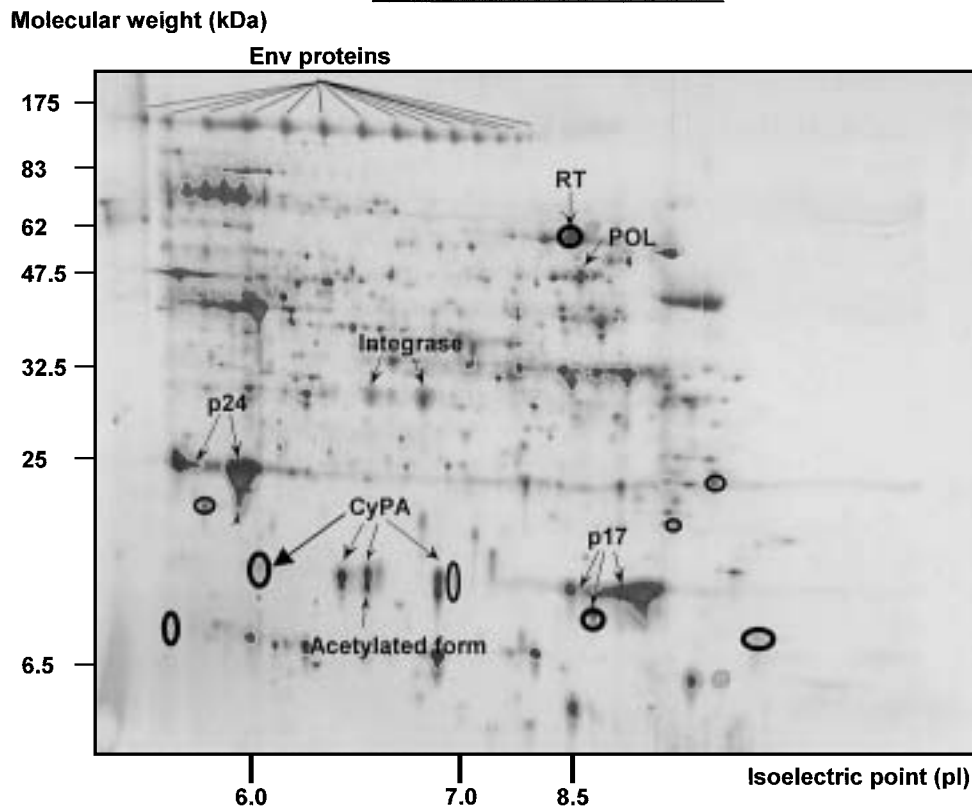


図1 HIV-1_{LAV-1}の2D-MAP
4種類のCyPA isoformは図中に表示している。

メカニズムによってウイルス粒子の表面に存在するのかわかりませんが、少なくともFACS分析の結果より、ウイルスが出芽している感染細胞の表面にはCyPAの発現が見られないことから、ウイルスが出芽後成熟する際にウイルス粒子内から外へ移行していると考えられる。

HIV-1 粒子内のCyPAの役割

90年代前半にLubanらやGottlingerらによってCyPAが感染性のHIV-1粒子形成に重要な蛋白質であるということが報告された^{7,8)}。CyPAは、HIV-1のアセンブリーの時点でカプシド蛋白質に特異的に結合することによってウイルス粒子内へ取り込まれるが⁷⁻⁹⁾、CsAやその誘導体処理すること、またカプシド蛋白質の89残基目のGlyや90残基目のProの変異によってCyPAのカプシド蛋白質への結合が阻害されるだけでなく、宿主細胞における実質的なウイルスの複製ができなくなること^{7,11,15-17)}、さらに、HIV-1の感染性は、宿主細胞におけるCyPA発現レベルによって調節されていることなどが報告されたことから¹⁸⁾、HIV-1の複製が、何故CyPAのウイルス粒子内への取込み

に依存するのかわかる様々な議論がなされた。これらは、歴史的な順序も考慮すると大きく2つに分類することができるように思われる。第一に、アセンブリーから成熟化までのウイルスライフサイクルの後期に関するものと、第二に、エントリーからポストエントリーまでのウイルスライフサイクルの前期における役割に関するものである。

ウイルスライフサイクルの後期に CyPAが必要か？

CyPAがPPIase活性を有すること、およびHIV-1カプシド蛋白質のアミノ末端側に結合している様子が結晶解析により明らかにされていたため^{19,20)}、当初からCyPAがHIV Gag蛋白質のアセンブリーやウイルス構成蛋白質のコンフォメーション変化に要求されると考えられていた。しかしながら、CyPA非存在下においてもHIV Gag蛋白質のアセンブリーは観察され²¹⁾、CsA処理しても形態的に異常なウイルスの産生が観察されないこと、さらに最近試験管内でペプチド基質ではなく、カプシド蛋白質のアミノ末端ドメインを用いてシス-トランス異性化を触媒すること

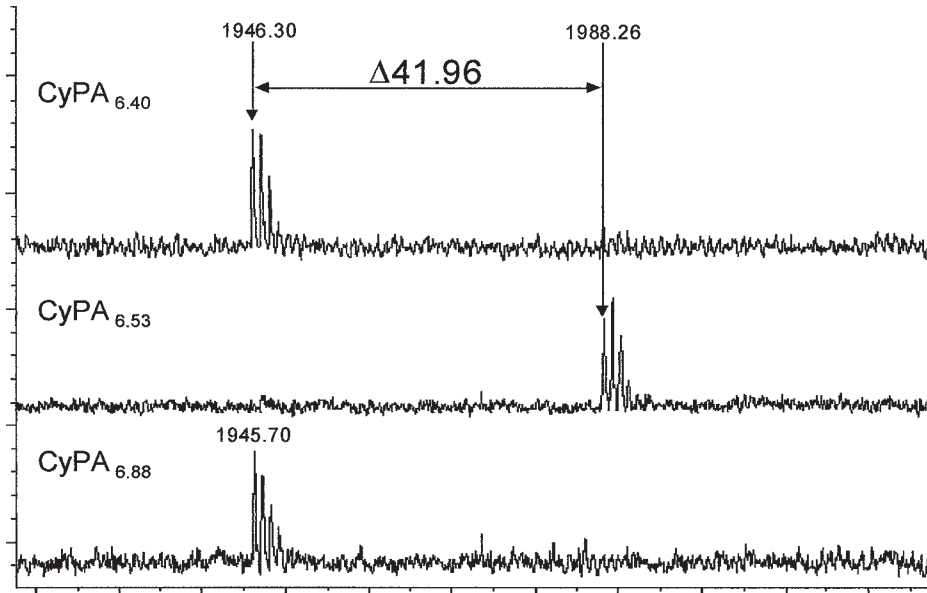


図2 Cyclophilin isoform のアミノ末端 tryptic peptide の解析
 CyPA_{6.53} は分子量 42 シフト (アセチル基由来) が観察された。

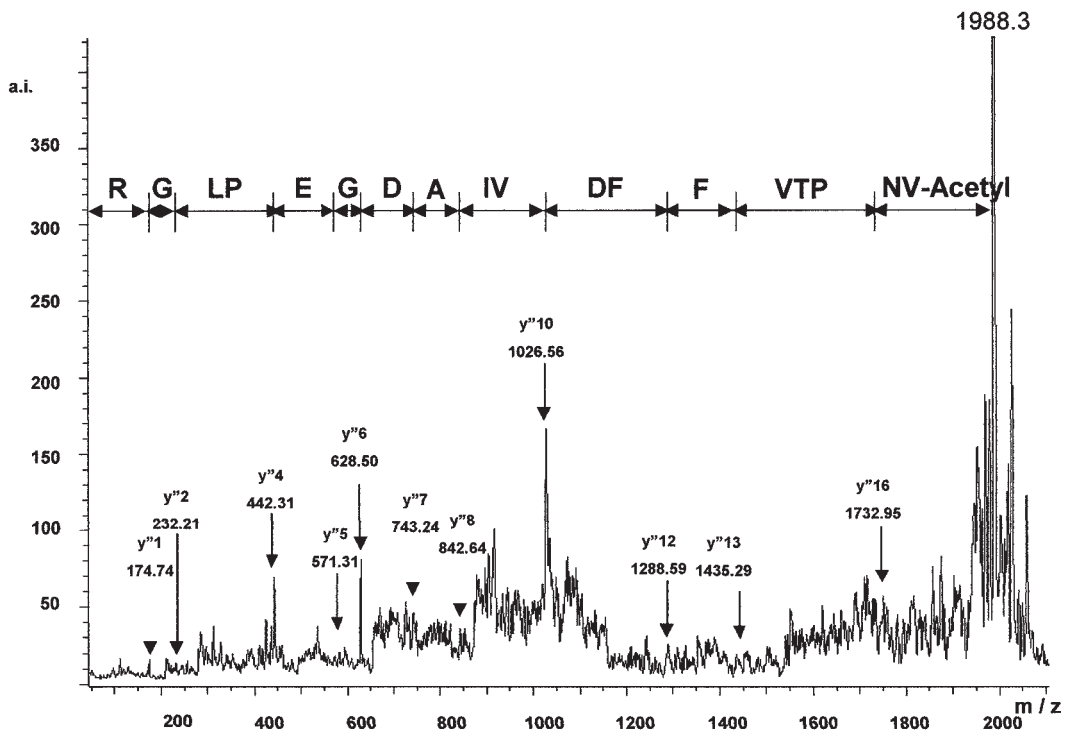


図3 Cyclophilin isoform (pI 6.53) の PSD 解析
 CyPA_{6.53} は、アミノ末端がアセチル化を受けている。

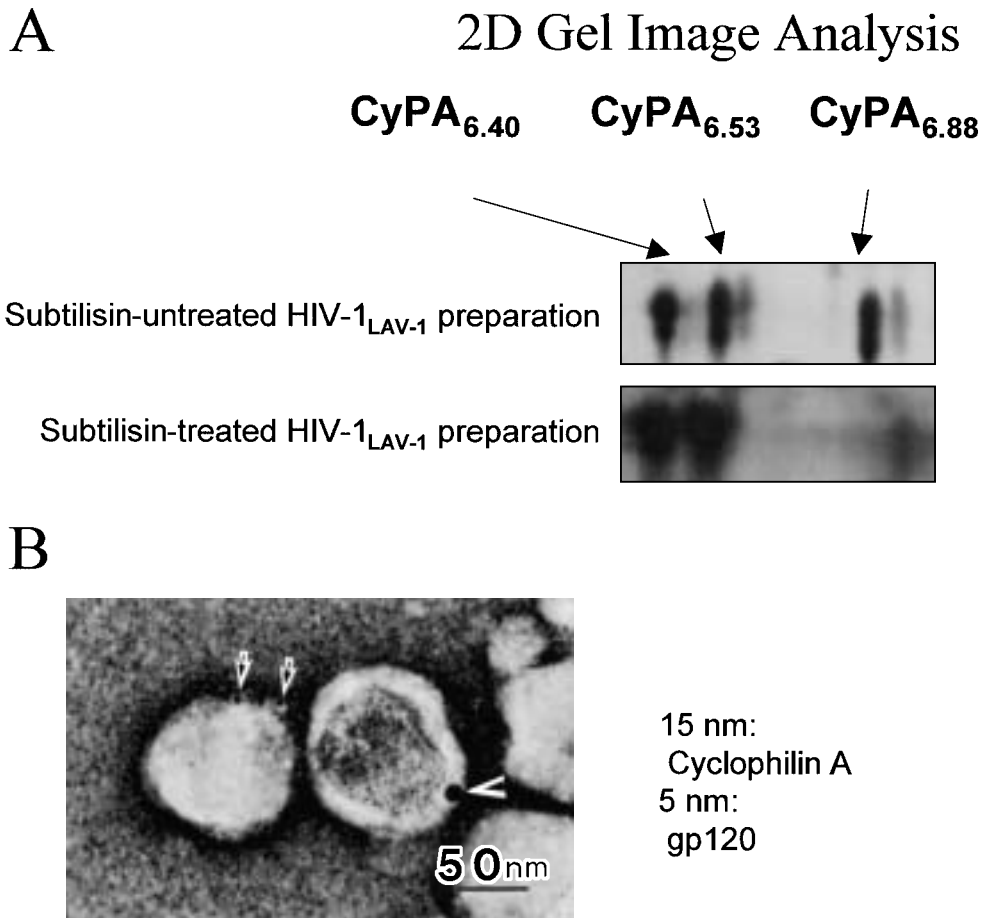


図4 Cyclophilin isoform (pI 6.88) の解析

A Subtilisin 処理によりウイルス表面の CyPA_{6.88} のスポットが消失する。

B Immunoelectron Microscopic Analysis によりウイルス表面に存在することを確認した。

が証明されたものの²²⁾、ウイルスの感染性の維持のためには不活性な CyPA がウイルス粒子内に取り込まれていれば十分で、ウイルスの PPIase 活性は関係ないとの報告もあることから²³⁾、CyPA がアセンブリーからウイルス成熟化に伴うウイルス形態形成までの間の HIV-1 カプシド蛋白質のコンフォメーション変化にどのように要求されるのか未だ明解な結論が得られていない。

ウイルスライフサイクルの前期に CyPA が必要か？

ウイルス粒子内の CyPA の機能に関する研究が進められていた中で、Bukrinsky らによって、CyPA のエントリー時に関連する報告がなされた。彼らは、ウイルスが宿主細胞に結合する際に、ウイルス表面に存在する CyPA が、メディアーターとしても機能していると提唱した²⁴⁾。その後、Gallay らによって CyPA を介したウイルスの宿主細胞表面へ結合は宿主細胞表面に発現しているヘパラン硫酸を介し

てであること²⁵⁾、さらに Bukrinsky らによってイムノグロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通糖タンパク質である CD147 も CyPA のレセプターであることが明らかにされた²⁶⁾。実際に、ウイルス粒子表面に CyPA が存在することは、われわれのプロテオーム解析の結果からも明らかであるが、¹⁴⁾ どのような機構によりウイルス粒子内の CyPA がウイルス粒子表面へ移行するのかは明らかにされていない。少なくとも、我々が行った anti-CyPA 抗体を用いた HIV 持続感染細胞の FACS 分析やウイルス粒子を直接 anti-CyPA 抗体を用いて免疫沈降をおこなった実験結果から、持続感染細胞表面には CyPA が存在しないこと、また免疫沈降操作によってウイルスが回収できることから、比較的強固にウイルス表面に結合していることが示唆された。

次に、ポストエントリーに関する CyPA の研究を概説してみたい。カプシド蛋白質がウイルスゲノムをコートし、CyPA が PPIase 活性を有することから、早くから CyPA が脱核因子として機能するのではないかという提案がなされ

た²⁷⁾. CyPA が脱核因子として機能するためには, CyPA がカプシド蛋白質間の相互作用を不安定化させ, カプシド蛋白質のシェルを崩壊させなければならない. これまでに, カプシド蛋白質間の相互作用を阻害することによって CyPA がカプシド蛋白質複合体を崩壊させるという報告²⁸⁾ や, カプシド蛋白質の C 末端ドメインに存在する Gly-Pro¹⁵⁷ や Gly-Pro²²⁴ という高親和性 CyPA 結合部位がカプシド蛋白質の成熟化に伴って新たに露出し, CyPA が Gly-Pro⁹⁰ から, それらあらたな結合部位へ結合し直し, カプシド蛋白質の C 末端のコンフォメーションを変化させることにより脱核がおこるのではないかという報告がなされた²⁹⁾. 一方で, 以下のような *in vitro* の実験がなされた. CyPA のウイルスへの取込みを阻害しておいて, 界面活性剤を用いて得られたウイルス粒子内の CA の安定性を WT と比較すると, その安定性に変化が見られなかった^{30, 31)}. したがって, CyPA の脱核に関する機能に関しては, 未だ明解な結論が出ていないが, もしも CyPA が脱核因子として機能するのであれば, CyPA の有する PPIase 活性以外の性質によりウイルスの脱核をサポートするのもかもしれない.

ここまで, ウイルスが宿主細胞より出芽後, そのウイルス粒子に取り込まれた CyPA の機能に関して, 多くの研究者によってなされた研究をもとにまとめてきたが, 標的細胞内の CyPA がウイルスの感染を調節しているという CyPA の HIV-1 ポストエントリーに関する新たな知見が得られている³²⁾. Bieniaz らは, CyPA はアセンブリーの際に Gag タンパク質と相互作用することによりウイルス粒子内へ取り込まれるが, カプシド蛋白質の標的細胞への取込みに続いておこる CyPA-カプシド蛋白質相互作用が HIV-1 複製における CyPA の効果を決定すると報告した. つまり, ウイルス産生細胞からのウイルス粒子内への CyPA 取込みの有無に関係なくウイルスは, 標的細胞に感染し, ヒト由来の標的細胞内に CyPA が発現している方が発現していない細胞よりも, HIV-1 の感染が増強される. さらに, CyPA-カプシド蛋白質相互作用を CsA で阻害する場合, ウイルス産生細胞ではなく, 標的細胞が処理された時のみ, 標的細胞内で発現している CyPA の量に依存して感染が阻害されたり, 増強されたりする. このヒト細胞への HIV-1 感染における CsA の効果は, TRIM5alpha のポリモルフィズムによって引き起こされているのではなく, 未知の宿主因子に CyPA が直接もしくは間接的に調節することにより侵入してきたカプシド蛋白質の運命を決定づけていると, 彼らは結論づけている.

さらに, Luban らも, ヒト標的細胞内の CyPA が HIV-1 の感染を調節していると主張している³³⁾. 彼らの場合, カプシド蛋白質が CyPA と結合することにより, HIV-1 を antiviral restriction activity (Ref-1 activity) から保護しているとし, また最近, 旧世界サル由来の細胞において TRIM5alpha を介した HIV-1 感染に対する抵抗性は CyPA を

要求することも報告した³⁴⁾.

これらの結果は, ウイルスライフサイクルにおけるウイルス産生細胞由来の CyPA と標的細胞由来の CyPA の相対的な重要性に結論を与える結果であり, いったい CyPA はどこで必要なのかという長年の疑問に終止符を与えるかもしれない.

おわりに

ウイルスは, 宿主細胞に感染することに複製できる. そのため, 宿主の監視から逃れ, 宿主細胞内での環境に適応するためのすべを獲得しながら進化してきた. そこには, ウイルス自身の遺伝的多様性や, 多くの宿主蛋白質や翻訳時・後修飾が関与している. 我々は, まだウイルスのほんのわずかな一面を見ているにすぎないのかもしれない. AIDS に対する究極の治療法を見いだすためには, ウイルス自身をもっと知る必要があるのかもしれない. わたしは, proteome 解析によりウイルスそのものを直接解析することにより, ウイルスの真の姿を明らかにしてみたい.

謝 辞

HIV-1 のプロテオーム解析を行うにあたりご指導をいただきました熊本大学大学院 医学薬学研究部薬学生化学分野 庄司省三教授に感謝申し上げます. また, HIV-1 のプロテオーム解析は厚生労働省エイズ対策研究事業の御支援を受け, 佐藤裕徳先生に御礼申し上げます.

文 献

- 1) Ryffel B, Woerly G, Greiner B, Haendler B, Mihatsch MJ, Foxwell BM: Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues. *Immunology* 72: 399-404, 1991.
- 2) Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW: Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226: 544-547, 1984.
- 3) Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX: Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337: 476-478, 1989.
- 4) Takahashi N, Hayano T, Suzuki M: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 337: 473-475, 1989.
- 5) Schmid FX: Prolyl isomerases. *Adv. Protein Chem.* 59: 243-282, 2001.
- 6) Gothel SF, Marahiel MA: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol. Life Sci.* 55: 423-436, 1999.
- 7) Franke EK, Yuan HE, Luban J: Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372: 359-362, 1994.
- 8) Thali M, Bukovsky A, Kondo E, Rosenwirth B, Walsh CT, Sodroski J, Gottlinger HG: Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* 372: 363-

- 365, 1994.
- 9) Colgan J, Yuan HE, Franke EK, Luban J: Binding of the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein to cyclophilin A is mediated by the central region of capsid and requires Gag dimerization. *J. Virol.* 70: 4299-4310, 1996.
 - 10) Halwani R, Cen S, Javanbakht H, Saadatmand J, Kim S, Shiba K, Kleiman L: Cellular distribution of Lysyl-tRNA synthetase and its interaction with Gag during human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J. Virol.* 78: 7553-7564, 2004.
 - 11) Braaten D, Franke EK, Luban J: Cyclophilin A is required for the replication of group M human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and simian immunodeficiency virus SIV(CPZ)GAB but not group O HIV-1 or other primate immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 70: 4220-4227, 1996.
 - 12) Castro AP, Carvalho TM, Moussatche N, Damaso CR: Redistribution of cyclophilin A to viral factories during vaccinia virus infection and its incorporation into mature particles. *J. Virol.* 77: 9052-9068, 2003.
 - 13) Bose S, Mathur M, Bates P, Joshi N, Banerjee AK: Requirement for cyclophilin A for the replication of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype. *J. Gen. Virol.* 84: 1687-1699, 2003.
 - 14) Misumi S, Fuchigami T, Takamune N, Takahashi I, Takama M, Shoji S: Three isoforms of cyclophilin A associated with human immunodeficiency virus type 1 were found by proteomics by using two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Virol.* 76: 10000-10008, 2002.
 - 15) Billich A, Hammerschmid F, Peichl P, Wenger R, Zenke G, Quesniaux V, Rosenwirth B: Mode of action of SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus (HIV) type 1: interference with HIV protein-cyclophilin A interactions. *J. Virol.* 69: 2451-2461, 1995.
 - 16) Franke EK, Luban J: Inhibition of HIV-1 replication by cyclosporine A or related compounds correlates with the ability to disrupt the Gag-cyclophilin A interaction. *Virology* 222: 279-282, 1996.
 - 17) Luban J, Bossolt KL, Franke EK, Kalpana GV, Goff SP: Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* 73: 1067-1078, 1993.
 - 18) Yin L, Braaten D, Luban J: Human immunodeficiency virus type 1 replication is modulated by host cyclophilin A expression levels. *J. Virol.* 72: 6430-6436, 1998.
 - 19) Gething MJ, Sambrook J: Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33-45, 1992.
 - 20) Gamble TR, Vajdos FF, Yoo S, Worthylake DK, Houseweart M, Sundquist WI, Hill CP: Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell* 87: 1285-1294, 1996.
 - 21) Streblow DN, Kitabwalla M, Pauza CD: Gag protein from human immunodeficiency virus type 1 assembles in the absence of cyclophilin A. *Virology* 252: 228-234, 1998.
 - 22) Bosco DA, Eisenmesser EZ, Pochapsky S, Sundquist WI, Kern D: Catalysis of cis/trans isomerization in native HIV-1 capsid by human cyclophilin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99 : 5247-5452, 2002.
 - 23) Saphire AC, Bobardt MD, Gallay PA: trans-Complementation rescue of cyclophilin A-deficient viruses reveals that the requirement for cyclophilin A in human immunodeficiency virus type 1 replication is independent of its isomerase activity. *J. Virol.* 76: 2255-2262, 2002.
 - 24) Sherry B, Zybarth G, Alfano M, Dubrovsky L, Mitchell R, Rich D, Ulrich P, Bucala R, Cerami A, Bukrinsky M: Role of cyclophilin A in the uptake of HIV-1 by macrophages and T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1758-1763, 1998.
 - 25) Saphire AC, Bobardt MD, Gallay P A: Host cyclophilin A mediates HIV-1 attachment to target cells via heparans. *EMBO J.* 18: 6771-6785, 1999.
 - 26) Pushkarsky T, Zybarth G, Dubrovsky L, Yurchenko V, Tang H, Guo H, Toole B, Sherry B, Bukrinsky M. CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6360-6365, 2001.
 - 27) Luban J: Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions. *Cell* 87: 1157-1159, 1996.
 - 28) Agresta BE, Carter CA. *J. Virol.* 71: 6921-6927, 1997.
 - 29) Endrich MM, Gehrig P, Gehring H: Maturation-induced conformational changes of HIV-1 capsid protein and identification of two high affinity sites for cyclophilins in the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 274: 5326-5332, 1999.
 - 30) Grattinger M, Hohenberg H, Thomas D, Wilk T, Muller B, Krausslich HG: In vitro assembly properties of wild-type and cyclophilin-binding defective human immunodeficiency virus capsid proteins in the presence and absence of cyclophilin A. *Virology* 257: 247-260, 1999.
 - 31) Wieggers K, Rutter G, Schubert U, Grattinger M, and Krausslich HG: Cyclophilin A incorporation is not required for human immunodeficiency virus type 1 particle maturation and does not destabilize the mature capsid. *Virology* 257: 261-274, 1999.
 - 32) Hatziioannou T, Perez-Caballero D, Cowan S, Bieniasz PD: Cyclophilin interactions with incoming human immunodeficiency virus type 1 capsids with opposing effects on infectivity in human cells. *J. Virol.* 79: 176-183, 2005.
 - 33) Sokolskaja E, Sayah DM, Luban J: Target cell cyclophilin A modulates human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J. Virol.* 78: 12800-12808, 2004.
 - 34) Berthouix L, Sebastian S, Sokolskaja E, Luban J: Cyclophilin A is required for TRIM5{alpha}-mediated resistance to HIV-1 in Old World monkey cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102: 14849-14853, 2005.

Multiple isoforms of cyclophilin A associated with human immunodeficiency virus type 1

Shogo MISUMI

Department of Pharmaceutical Biochemistry,
Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University
5-1 Oe-honmachi, Kumamoto 862-0973 Japan
E-mail: misumi@gpo.kumamoto-u.ac.jp

It is well-known that a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophilin A (CyPA) is incorporated into Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) particle. The proteome analysis of the purified HIV-1 strain LAV-1 (HIV-1_{LAV-1}) reveals that three isoforms of CyPA with an isoelectric point (pI) of 6.00, 6.40, and 6.53 are inside the viral membrane and another isoform with a pI of 6.88 is outside the viral membrane; and that the CyPA isoform with a pI of 6.53 is N-acetylated. The mechanisms that permit the redistribution of CyPA with a pI of 6.88 on the viral surface have not yet been clarified, but it penetrates the viral membrane after budding.