

5. HIV 出芽と Tsg101

安田 二郎

科学警察研究所・法科学第一部

エンベロープウイルスである HIV は細胞膜由来のエンベロープを粒子の最外層に被る形で細胞膜から出芽する。ウイルス出芽に必要なウイルス側モチーフ (L-ドメイン) として Gag の C 末に位置する p6 領域内の PTAP 配列が同定され、また、この L-ドメインと相互作用する宿主因子として MVB sorting に関わる Tsg101 が同定された。MVB sorting は、ある種のユビキチン化タンパク質を積み荷として認識し、エンドソーム膜に輸送した後、エンドソーム膜の内腔側への陥入によって形成される小胞 (MVB: Multivesicular body) に積み荷を封入するという細胞内膜輸送系 (メンブレントラフィック) の一つである。Tsg101 の同定を手がかりに出芽解析が進められた結果、HIV 出芽はエンドソーム膜で起こる MVB sorting の機構をウイルスが細胞膜上で利用したものであることが明らかになった。ウイルス出芽機構の解明と出芽阻害法の確立は HIV のみならず、幅広いウイルス種に対しても応用可能であり、個体内および個体間の感染拡大を共通の抗ウイルス作用により防ぐことで疾患の制御に寄与することが期待される。

はじめに

HIV の発見以来、ウイルス感染の初期過程である吸着・侵入に関しては、ワクチン開発や感染阻害への応用を目指して多くの研究者により盛んに研究が進められて来たが、感染後期過程、特にウイルス出芽に関しては HIV だけでなく他のウイルスにおいてもこれまであまり研究者の興味を引くことなく、ほとんど解析が進んでいなかった。ところが、ウイルス出芽に必要なウイルス側モチーフ (L-ドメイン) の発見及び宿主因子の同定により最近 10 年間で急速にウイルス出芽研究が進展し、HIV 出芽についても 2001 年以降格段にその理解が深まった。本稿では HIV 出芽に関わる宿主因子として同定された Tsg101 を中心に出芽メカニズムに関する最新の知見を紹介する。

L-ドメインの同定

感染細胞の細胞膜直下で新たに粒子形成 (assembly) された HIV 子孫ウイルス粒子は出芽 (budding) 過程を経て細胞外へ放出される (図 1)。細胞膜から出芽したウイルス粒子は、自身のプロテアーゼにより Gag 前駆体 (Pr55^{Gag}) を切断 (Processing) し、感染性をもった成熟ウイルス粒子となる (maturation)。

培養細胞で Gag を単独発現させるだけでウイルス様粒子 (VLP) が培養上清に産生されることが、以前から HIV をはじめ多くのレトロウイルスで確認されており、ウイルス出芽に必要な十分なエレメントが Gag に存在することが示唆されていた。Rous sarcoma virus (RSV), Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV) の Gag の機能領域解析は、RSV Gag の p2b 領域、M-PMV Gag の pp24/16 領域がウイルス出芽に必要な役割を担っていることを示し、更に詳細な解析により p2b, pp24/16 に存在する PPxY 配列が出芽に必須であることも明らかになった^{24, 26)}。この配列は、レンチウイルスを除くほとんどのレトロウイルスの Gag で保存されており、この配列に変異を導入した変異体ウイルスの出芽は細胞表面から pinch off する段階、すなわち出芽の後期段階 (Late budding) で停止してしまうため、L-ドメインと名付けられた。L-ドメインモチーフである PPxY 配列は、その後レトロウイルス以外にもラブドウイルス、フ

連絡先

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-1
科学警察研究所・法科学第一部
TEL : 04-7135-8001
FAX : 04-7133-9159
E-mail : yasuda@nrrips.go.jp

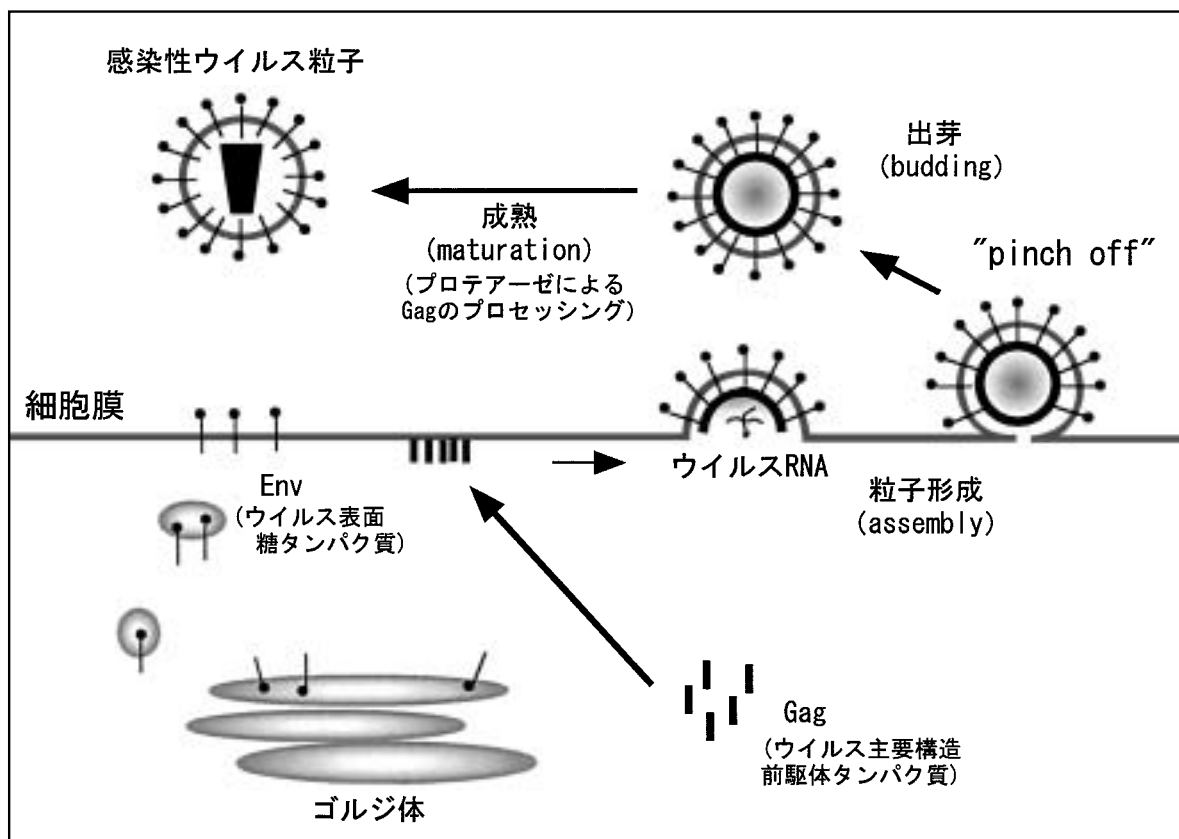


図1 HIVの出芽
HIVは細胞膜直下で粒子形成され，“pinch off”により出芽する。

表1 ウイルスの出芽モチーフ (Lドメイン)

ウイルス	ウイルスタンパク質	コンセンサス配列		宿主因子
		PPxY	PT/SAP	
レトロウイルス科				
HIV	p6	-	PTAP	Tsg101
HTLV-1	p19MA	PPPY	PTAP	Nedd4
BLV	MA	PPPY	-	N.D
RSV	p2b	PPPY	-	LDI-1?
M-PMV	pp24	PPPY	PSAP	BUL1
MuLV	MA/p12	PPPY	PTAP	N.D
EIAV	p9		YPDL	AIP1/ALIX
ラブドウイルス科				
VSV	M	PPPY	PSAP	N.D
フィロウイルス科				
エボラウイルス	VP40	PPEY	PTAP	Nedd4, Tsg101
マールブルグウイルス	VP40	PPPY	-	N.D
アレナウイルス科				
ラッサウイルス	Z	PPPY	PTAP	Tsg101

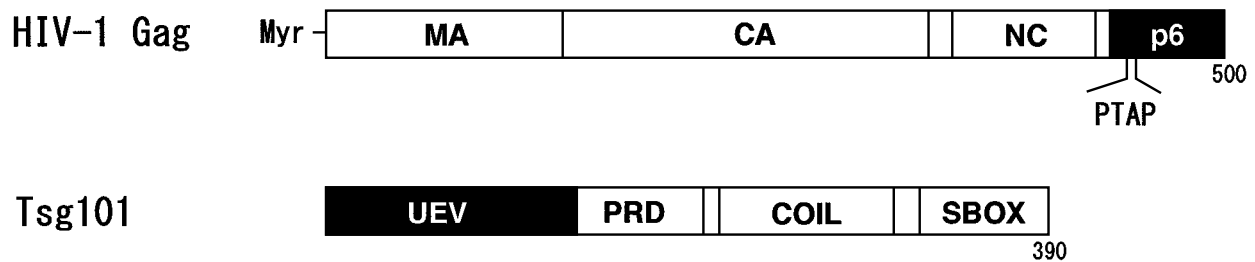


図2 HIV-1 Gag と Tsg101 のドメイン構造

イロウイルス、アレナウイルスなど多くのエンベロープウイルスのマトリクスタンパク質で保存されていることが判明している (表1)。

HIV に関しては、Gag の C 末に位置する p6 領域が出芽に重要であることがわかっていたが^{6,7)}、p6 には PPxY 配列はなく、代わりに P (T/S) AP 配列が L-ドメインとして機能していた⁷⁾ (図2)。因みに、p2b 領域を欠失させて出芽能を失った RSV の Gag 変異体に P (T/S) AP 配列を挿入すると出芽能が回復することも示されており、PPxY と P (T/S) AP の両モチーフは相互に入れ換えが可能であることも明らかになっている¹¹⁾。更に、Equine infectious anemia virus (EIAV) の出芽解析により、EIAV の Gag の C 末 p9 領域に存在する YxxL 配列が第3の L-ドメインモチーフとして同定されている¹⁶⁾。ウイルス種によって一つのモチーフのみを持つもの、複数のモチーフを持つものがある²⁸⁾ (表1)。

L-ドメインと相互作用する宿主因子

L-ドメインの発見後、L-ドメインと相互作用し、出芽を制御する宿主因子の同定が進められた。レトロウイルスに関する当時の知見として、(1) ウイルス粒子内に存在する Gag の一部がユビキチン化されていること¹⁰⁾、(2) プロテアソーム阻害剤でウイルス出芽が阻害されること^{12,18)}、(3) タンパク質間相互作用に関わるモジュールの一つである WW ドメインの認識配列が PPxY であるということがわかっていたので⁴⁾、WW ドメインをもつ E3 ユビキチンリガーゼである Nedd4 が PPxY モチーフと相互作用する宿主因子の有力候補として解析された。しかしながら、レトロウイルスの出芽に Nedd4 が機能的に関与しているという成績は得られていなかった。筆者らは、M-PMV 出芽における Nedd4 の関与を解析する過程で、このウイルスの PPxY モチーフと相互作用して出芽を制御する宿主因子は Nedd4 ではなく、Nedd4 様の新規ユビキチンリガーゼである BUL1 (Budding-associated Ubiquitin Ligase 1) であることを世界に先駆けて発見した²⁷⁾。更に、その後 HTLV-I の出芽には Nedd4 が関与することも明らかにしている¹⁷⁾。

一方、P (T/S) AP については、HIV Gag/p6 と相互作用する細胞性因子が Yeast two-hybrid スクリーニングにより探索され、その結果、Tsg101 (tumor susceptibility gene 101) が同定された^{5,22)}。Tsg101 は E2 ユビキチン結合酵素と類似した構造をもつが、この酵素の活性中心部位で保存されているシステイン残基を欠くため、ユビキチンと結合して標的タンパク質や E3 にそのユビキチンを転移するという E2 活性をもたない UEV (Ubiquitin E2 variant) である。これまでに明らかになっている生理機能としては細胞内分子輸送、転写制御、細胞周期の調節などがある^{2,8,21,25,29)}。

Tsg101 は N 末から UEV, Proline-rich (PRD), Coiled coil (COIL), Steadiness box (SBOX) というドメイン構造をもち、UEV ドメインを介して L ドメインの P (T/S) AP 配列およびユビキチンと結合する (図2)^{5,9,14,22)}。Tsg101 の C 末を欠失させた変異体の過剰発現や siRNA による Tsg101 のノックダウンは宿主細胞からの HIV 産生を著しく阻害し、何れの場合においても、HIV 出芽は L ドメインに変異を導入した場合と同様に pinch off のステップで阻害されることから、Tsg101 は HIV 出芽に必須な宿主因子であると考えられる^{3,5)}。

また、第3の L-ドメインモチーフ YxxL と相互作用する宿主因子としては、AIP1/ALIX が同定されている^{20,23)}。

HIV 出芽と MVB pathway

Tsg101, AIP1/ALIX は何れもエンドソームにおける MVB sorting に必須な役割を担っていることが知られている。MVB sorting は、ある種のユビキチン化タンパク質を積み荷 (cargo) として認識し、エンドソーム膜に輸送した後、エンドソーム膜の内腔側への陥入によって形成される小胞 (MVB: Multivesicular body) に積み荷を封入するという細胞内膜輸送系 (メンブレントラフィック) であり、シグナル伝達に関わるレセプターの脱感作やある種の酵素のプロセッシングなどに関与することが示されている (図3)。

L-ドメインと相互作用する宿主因子として同定された Nedd4 等の E3 は MVB sorting の選別シグナルであるユビ

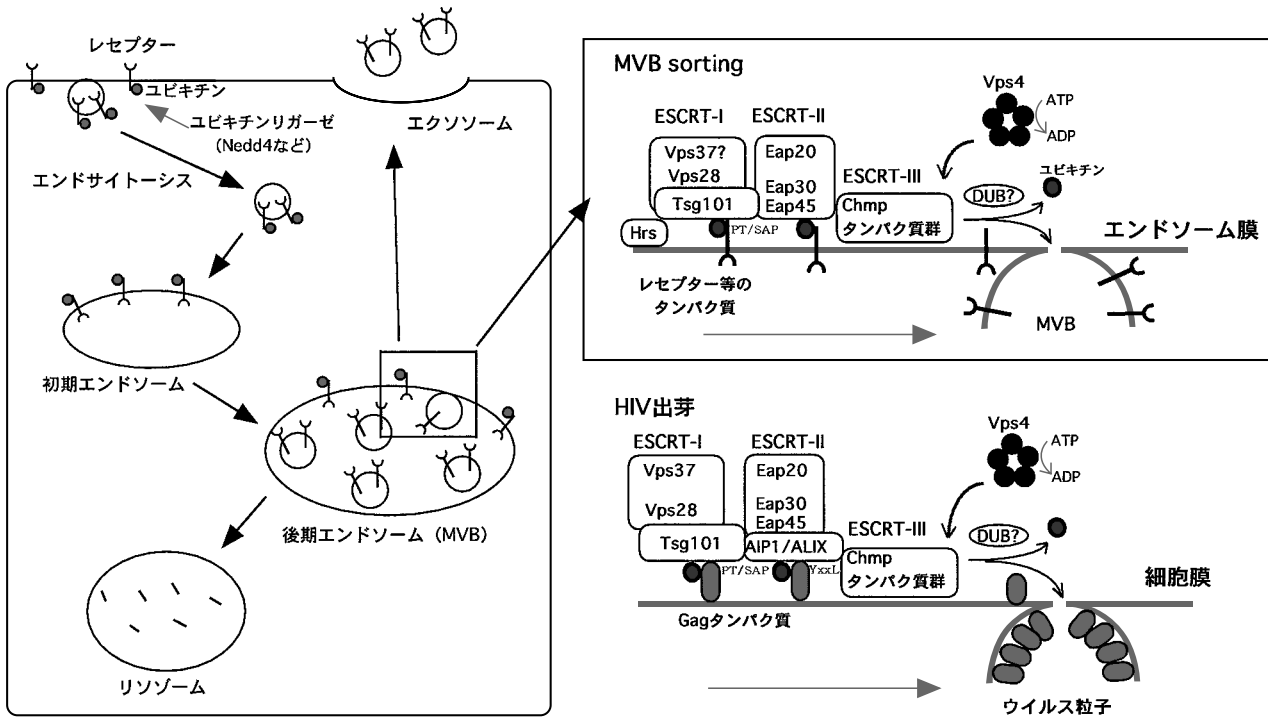


図3 HIV 出芽と MVB sorting

HIV 出芽はエンドソームで起こる MVB sorting のメカニズムをウイルスが細胞膜上で利用しているものと考えられる。

キチン化を触媒する酵素であり、Tsg101 は MVB sorting の初期過程で働く ESCRT-I 複合体の構成因子の一つで直接ユビキチン化タンパク質と相互作用する因子である。ESCRT-I と結合したユビキチン化タンパク質は、その後 ESCRT-II, III と連続的に相互作用した後、AAA-ATPase である Vps4 により複合体が解体され、これが引き金となって小胞形成へと進む (図 3)。sorting されるタンパク質は小胞への取り込みに先立ち脱ユビキチン化される。また、AIP1/ALIX は Tsg101 および ESCRT-III の構成因子と相互作用し、MVB sorting に関わることが報告されている^{20, 23)}。

したがって、L-ドメインと相互作用する宿主因子のすべてが MVB sorting に関わっており、MVB sorting とウイルス出芽の過程を比較してみると実に多くの共通点が見られ、ウイルス出芽はエンドソーム膜で起こる MVB sorting の機構をウイルスが細胞膜上で利用したものである可能性が高い (図 3)¹⁴⁾。実際に Vps4 の AAA-ATPase 活性を失活させた変異体の過剰発現などにより MVB sorting を阻害するとウイルス出芽も阻害されることや、ユビキチン変異体を用いた解析でプロテアソームへの分解シグナルとなるポリユビキチン鎖形成に関わる 48 番目のリジンではなく、エンドサイトーシスやメンブレントラフィックに重要である 4 番目のフェニルアラニンや 63 番目のリジンが HIV 出

芽に重要であるということも明らかになっている¹⁹⁾。また、MVB sorting において Hrs が Tsg101 を含む ESCRT-I 複合体をエンドソーム膜上にリクルートする役割を果たすが、HIV Gag は Hrs の機能を模倣する形で Tsg101 を含む ESCRT-I 複合体を細胞膜の内側にリクルートするという成績も報告されている^{9, 15)}。また、ウイルス粒子内の Gag の 2-5% しかユビキチン化されていないのは、脱ユビキチン化の結果であると解釈できる。したがって、現在、MVB sorting とウイルス出芽はほぼ同一のメカニズムで起こる事象であろうと考えられている。

但し、マクロファージでは、HIV の出芽は必ずしも細胞膜ではなく、MVB sorting と同様に後期エンドソームで内腔に向けて行われ、それがエクソソームとして細胞外へ分泌されることが示唆されている¹³⁾。

また、最近、Tsg101 をモノユビキチン化し、Tsg101 の機能を制御する E3 として Tal (Tsg101-associated ligase) が同定されており¹⁾、Tal は HIV Gag のユビキチン化には関与しないが、Tsg101 のユビキチン化を通じて間接的に出芽制御に関わっているかもしれない。

おわりに

抗 AIDS 療法としてプロテアーゼ阻害剤、抗インフルエンザ薬としてノイラミニダーゼ阻害剤の有効性が既に臨床

レベルで証明されており，感染細胞からの感染性子孫ウイルス放出を抑制することが新規抗ウイルス戦略として有効であると考えられる．これまでの解析で，HIV，HTLV-1，VSV，狂犬病，エボラ，マールブルグ，ラッサウイルスなど重篤な疾患を引き起こす多くのエンベロープウイルスが共通のメカニズムで宿主細胞から出芽することが示唆され，更に，プロテアソーム阻害剤や宿主因子のドミナントネガティブ変異体が出芽を阻害するという成績も得られていることから，出芽阻害法の確立はHIVのみならず，幅広いウイルス種に対しても応用可能であり，個体内および個体間の感染拡大を共通の抗ウイルス作用により防ぐことで疾患の制圧に寄与することが期待される．更に，抗AIDS療法としてHAART（多剤併用療法）が劇的な効果をもたらしたように出芽阻害剤と標的の異なる既存の抗ウイルス剤（療法）を組み合わせることで，より効果的な抗ウイルス療法の開発が期待できる．

欧米でのウイルス出芽研究の盛り上がり比べ，日本ではこの分野の研究者は極めて少なく，注目度も低い．本稿を機に若い世代の研究者の方々がウイルス粒子形成・出芽に興味を持っていただければ幸いである．

文 献

- 1) Amit I, Yakir L, Katz M, Zwang Y, Marmor MD, Citri A, Shtiegman K, Alroy I, Tuvia S, Reiss Y, Roubini E, Cohen M, Wides R, Bacharach E, Schubert U, Yarden Y: Tal, a Tsg101-specific E3 ubiquitin ligase, regulates receptor endocytosis and retrovirus budding. *Genes Dev* 18: 1737-1752, 2004.
- 2) Babst M, Odorizzi G, Estepa EJ, Emr SD: Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. *Traffic* 1: 248-258, 2000.
- 3) Demirov DG, Ono, A Orenstein JM, Freed EO: Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 955-960, 2002
- 4) Garnier L, Wills JW, Verderame MF, Sudol M: WW domains and retrovirus budding. *Nature* 381: 744-745, 1996.
- 5) Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Cote M, Rich RL, Myszka DG, Sundquist WI: Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107: 55-65, 2001.
- 6) Gottlinger HG, Dorfman T, Sodroski JG, Haseltine WA: Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3195-3199, 1991
- 7) Huang M, Orenstein JM, Martin MA, Freed EO: p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* 69: 6810-6818, 1995.
- 8) Lemmon JD, Yoganathan AP: Three-dimensional computational model of left heart diastolic function with fluid-structure interaction. *J Biomech Eng* 122: 109-117, 2000.
- 9) Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD: HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* 7: 1313-1319, 2001.
- 10) Ott DE, Coren LV, Copeland TD, Kane BP, Johnson DG, 2nd Sowder RC, Yoshinaka Y, Oroszlan S, Arthur LO, Henderson LE: Ubiquitin is covalently attached to the p6Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus and to the p12Gag protein of Moloney murine leukemia virus. *J Virol* 72: 2962-2968, 1998.
- 11) Parent LJ, Wilson CB, Resh MD, Wills JW: Evidence for a second function of the MA sequence in the Rous sarcoma virus Gag protein. *J Virol* 70: 1016-26, 1996.
- 12) Patnaik A, Chau V, Wills JW: Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13069-13074, 2000.
- 13) Pelchen-Matthews A, Kramer B, Marsh M: Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* 162: 443-455, 2003.
- 14) Pornillos O, Alam SL, Rich RL, Myszka DG, Davis DR, Sundquist WI: Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. *EMBO J* 21: 2397-2406, 2002.
- 15) Pornillos O, Higginson DS, Stray KM, Fisher RD, Garrus JE, Payne M, He GP, Wang HE, Morham SG, Sundquist WI: HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J Cell Biol* 162: 425-434, 2003.
- 16) Puffer, BA, Parent LJ, Wills JW, Montelaro RC: Equine infectious anemia virus utilizes a YXXL motif within the late assembly domain of the Gag p9 protein. *J Virol* 71: 6541-6546, 1997.
- 17) Sakurai A, Yasuda J, Takano H, Tanaka Y, Hatakeyama M, Shida H: Regulation of human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) budding by ubiquitin ligase Nedd4. *Microbes Infect* 6: 150-156, 2004.
- 18) Schubert U, Ott DE, Chertova EN, Welker R, Tessmer U, Princiotta MF, Bannink JR, Krausslich HG, Yewdell JW: Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13057-13062, 2000.
- 19) Strack B, Calistri A, Accola MA, Palu G, Gottlinger HG: A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13063-13068, 2002.
- 20) Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Gottlinger HG: AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114: 689-699, 2003.
- 21) Sun Z, Pan J, Hope WX, Cohen SN, Balk SP: Tumor susceptibility gene 101 protein represses androgen receptor transactivation and interacts with p300. *Cancer* 86: 689-696, 1999.
- 22) VerPlank L, Bouamr F, LaGrassa TJ, Agresta B,

- Kikonyogo A, Leis J, Carter CA: Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55Gag. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7724-7729, 2001.
- 23) von Schwedler UK, Stuchell M, Muller B, Ward DM, Chung HY, Morita E, Wang HE, Davis T, He GP, Cimbora DM, Scott A, Krausslich HG, Kaplan J, Morham SG, Sundquist WI: The protein network of HIV budding. *Cell* 114: 701-713, 2003.
- 24) Wills JW, Cameron CE, Wilson CB, Xiang Y, Bennett RP, Leis J: An assembly domain of the Rous sarcoma virus Gag protein required late in budding. *J Virol* 68: 6605-6618, 1994.
- 25) Xie W, Li L, Cohen SN: Cell cycle-dependent subcellular localization of the TSG101 protein and mitotic and nuclear abnormalities associated with TSG101 deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1595-1600, 1998.
- 26) Yasuda J, Hunter E: A proline-rich motif (PPPY) in the Gag polyprotein of Mason-Pfizer monkey virus plays a maturation-independent role in virion release. *J Virol* 72: 4095-4103, 1998.
- 27) Yasuda J, Hunter E, Nakao M, Shida H: Functional involvement of a novel Nedd4-like ubiquitin ligase on retrovirus budding. *EMBO Rep* 3: 636-640, 2002.
- 28) Yasuda J, Nakao M, Kawaoka Y, Shida H: Nedd4 regulates egress of Ebola virus-like particles from host cells. *J Virol* 77: 9987-9992, 2003.
- 29) Zhong Q, Chen Y, Jones D, Lee WH: Perturbation of TSG101 protein affects cell cycle progression. *Cancer Res* 58: 2699-2702, 1998.

HIV budding and Tsg101

Jiro YASUDA

National Institute of Police Science
6-3-1 Kashiwanoha, Kashiwa 277-0882
yasuda@nrips.go.jp

HIV, as well as many enveloped viruses, exits the cells by budding directly from the plasma membrane. HIV budding is dependent on a PTAP motif, which is located within the p6 domain of Gag. Recent studies have shown that the cellular protein Tsg101 binds to the PTAP L-domain motif of HIV p6 and facilitates the final stages of virus release.

Tsg101 function in the cellular vacuolar protein sorting pathway, where they play central roles in selecting cargo for incorporation into vesicles that bud into the maturing endosome to create multi-vesicular bodies (MVBs). Vesicle budding into the MVB and viral budding at the plasma membrane are topologically equivalent, and the same machinery could catalyze both processes. It will be important to understand the mechanism of virus budding in detail, since virus budding may be a potential target for interference with HIV propagation.