

2. HIV-1 のウイルス粒子形成は細胞のどこで起こるか

小野 陽

Department of Microbiology and Immunology
University of Michigan Medical School
Ann Arbor, MI 48109, USA

HIV-1 のウイルス粒子形成はウイルス構造タンパク質 Gag の働きにより起こる。T 細胞を含む多くの細胞種では Gag はウイルス粒子を細胞膜で形成する。一方、マクロファージでは、Gag やウイルス粒子は細胞内の小胞に蓄積することが示されている。このような違いがどのように起こるかはいまだ明確にはわかっていない。しかし、ここ数年の間に Gag が細胞の膜系とどのように関わっているかについて研究が進み、ウイルス粒子形成がどこで起こるかを決定するメカニズムについて、我々の理解が深まりつつある。本稿では、endosome 輸送経路、膜の microdomain、細胞膜の脂質分子などがどのような役割を果たしているかについて、最近の知見を中心に現在報告されていることを紹介し、その生理的意義を検討する。

HIV-1 の粒子形成

HIV-1 を含むレトロウイルスの粒子形成は、ウイルス構造タンパク質の一つである Gag の発現により起こる^{1, 25, 83)}。HIV-1 の場合、Gag は前駆体タンパク質 Pr55^{Gag} として合成される。Pr55^{Gag} は構造的には matrix (MA), capsid (CA), nucleocapsid (NC), p6 の 4 つの主領域と二つの spacer peptide (SP1, SP2) からなり、ウイルス粒子が放出される際あるいはその直後に、ウイルスのプロテアーゼにより切断されて、それぞれ p17MA, p24CA, p7NC, p6, p2, p1 となる (図 1)。レトロウイルス粒子形成の過程は主に、1) Gag の脂質 2 重層への結合、2) Gag 同士の結合による多量体化、3) ウイルス粒子の出芽と放出、の 3 段階に分けることができる (図 1)。これらの段階はそれぞれ

Gag に存在する幾つかの独立した機能的領域の働きにより進行する。たとえば、HIV-1 Gag の膜結合には MA の N 末端の myristyl 化と、同じく MA の N 末端近傍にある塩基性領域が必要であり、Gag 多量体化には CA の C 末端側ドメインから NC にかけての広い領域が関与している。一方、ウイルス粒子の放出は、p6 と ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) と呼ばれる一連の宿主タンパク質複合体の結合に依存する。ESCRT は本来、Late Endosome/Multivesicular Bodies (LE/MVB) において、endosome 膜の一部が内腔側に出芽する際に中心的な役割を果たすことが知られている。そのため、p6 は、ESCRT と結合して本来の ESCRT の機能をウイルス粒子の出芽に転用するために必要であると考えられている^{15, 52)}。

Gag の局在シグナル

HIV-1 のウイルス粒子形成は、HeLa 細胞や自然宿主細胞の一つである T 細胞では主に細胞膜で、同じく自然宿主細胞であるマクロファージでは、細胞の内膜系において起こることが早くから報告されている^{26, 66)}。上述のように、ウイルス粒子形成の各段階 (Gag の膜結合、多量体化、出芽・放出) については、Gag のどの領域がどのような役割を果たすか、かなり詳細まで明らかになっているが、Gag の細胞膜への局在についても、変異体を用いた研究により、少なくとも MA が不可欠であることが知られている。MA の N 末端近傍にある塩基性領域にアミノ酸置換を導入した

連絡先

Department of Microbiology and Immunology
University of Michigan Medical School
5736 Medical Science Building II
1150 W. Medical Center Drive
Ann Arbor, MI 48109-0620
TEL: 734-615-4407 (office) or 734-615-4086 (lab)
FAX: 734-764-3562
E-mail: akiraono@umich.edu

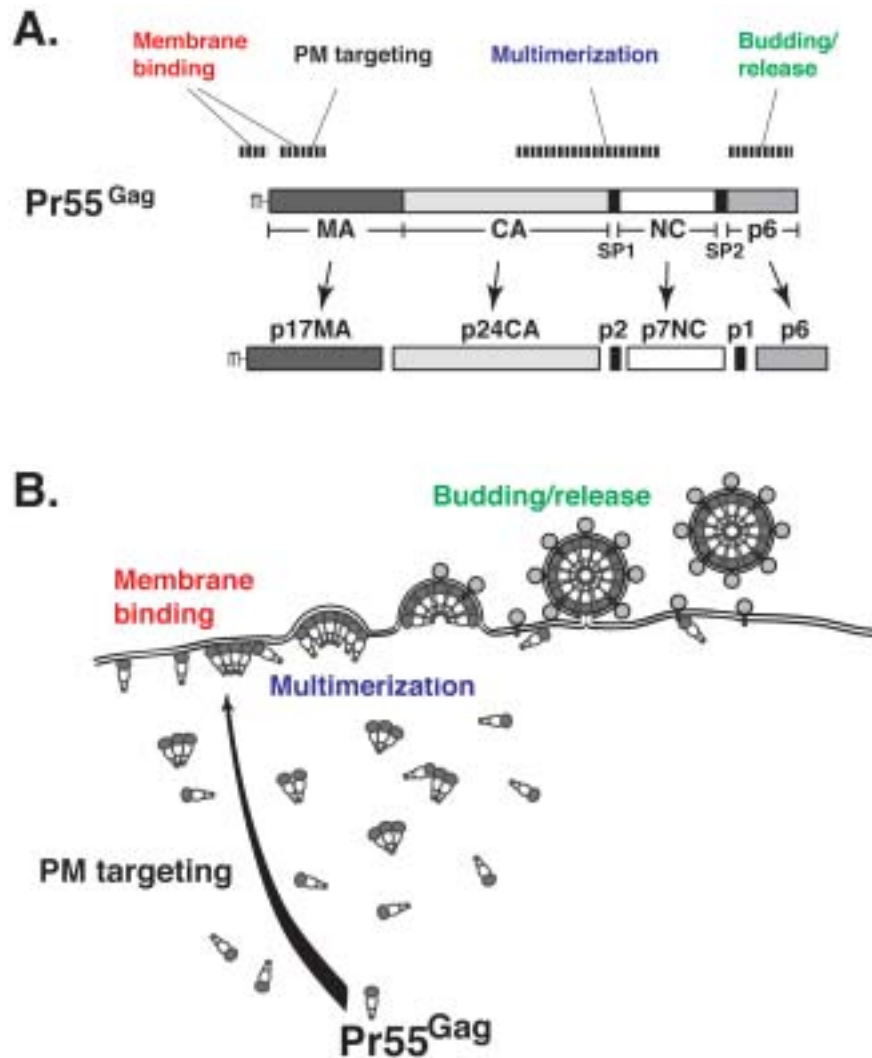


図1 HIV-1 Gag の構造とウイルス粒子形成

- A. HIV-1 Gag の構造と機能的領域 Gag はいくつかの機能的領域を持つ前駆体 Pr55^{Gag} として合成され、ウイルス粒子の主要構造タンパク質としてウイルス粒子形成を推進する。細胞から子ウイルスとして放出される際に、ウイルスプロテアーゼにより、p17MA, p24CA, p7NC, p6, p2, p1 に切断される。(m-) は myristyl 化された N 末端を示す。
- B. ウイルス粒子形成の各段階 ウイルス粒子形成の過程は主に、Gag の脂質 2 重層への結合、Gag 同士の結合による多量体化、ウイルス粒子の出芽と放出、の 3 段階に分けることができる。細胞膜 (PM) への局在と他の各段階の相関関係については不明な点が多い。細胞膜への局在は必ずしも Gag が単量体の時のみおこるとは限らない。

変異体ウイルスを HeLa 細胞や T 細胞で発現すると、野生型とは異なり、ウイルス粒子形成が細胞膜ではなく核近傍の小胞でおこる^{24, 33, 59, 62, 86}。したがって、MA の塩基性領域は前述のように一般的な膜結合を担うだけでなく、特異的な細胞膜局在シグナルを構成していると考えられる。興味深いのは、このシグナルに変異を導入しても、非特異的にどのオルガネラでもウイルス粒子が形成されるようになるわけではない点である。変異体 Gag がウイルス粒子を形成する小胞は LE/MVB のマーカーとしてよく用いられる CD63 を含むが、他のオルガネラのマーカータンパク質

とはほとんど重ならない⁶²。このことから、細胞膜局在シグナルが機能しない場合に Gag を endosome に局在させる第 2 のメカニズムがあると考えられる。p6 と結合する ESCRT は LE/MVB に存在するが、この結合が Gag の endosome への局在に関与している可能性は低い。なぜなら、核近傍の小胞に局在する MA 変異体 Gag に、更に p6 欠損変異を導入しても、その局在パターンには影響しないからである⁶²。現在のところ、Gag のどの領域が endosome 局在を担っているかは不明であるが、後述するように、細胞膜に安定的に結合できない Gag が受動的に endocytosis

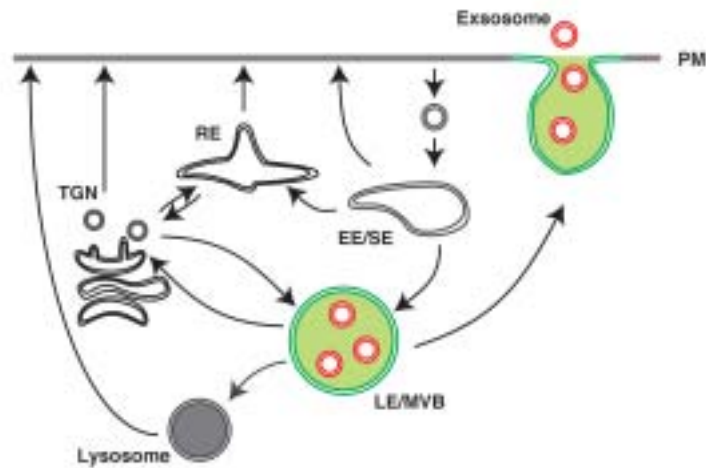


図2 endosomeの輸送経路

Late endosome/multivesicular bodies (LE/MVB) (緑)の内腔に出芽した小胞(赤)はLE/MVBと細胞膜(PM)の融合により, exosomeとして細胞外に放出される. HIV-1粒子がこの経路により放出されるという仮説については, 当てはまらない証拠が多い(本文参照). しかし, Gagが他のendosome経路により輸送される可能性はある. EE/SEはearly endosome/sorting endosome, REはrecycling endosome, TGNはtrans-Golgi networkの略.

により細胞膜から取り込まれて, endosome輸送経路によりLE/MVBに到達する可能性も考えられる.

エンドソームとウイルス粒子形成

マクロファージでウイルス粒子が蓄積する小胞は, 当初Golgi由来のものとされたが⁶⁶⁾, 免疫電顕や免疫蛍光染色を用いた研究により, MHC class II, CD63など主にLE/MVB由来の膜胞に局在するタンパク質を含むことが明らかになった^{62, 67, 71)}. さらに, 感染マクロファージの培養上清に放出されたウイルス粒子もいくつかのLE/MVBマーカータンパク質を含むことが示された^{55, 67)}. 免疫細胞を含む多くの細胞は(おそらくendosome膜と細胞膜の融合により)LE/MVB内腔に存在する小胞をexosomeとして細胞外に放出することが知られている(図2). これらの知見に基づき, マクロファージでは, ウイルス粒子形成はLE/MVBでおこり, その中に蓄積したウイルス粒子は細胞膜とendosome膜の融合により放出されるという仮説が提唱されている^{28, 68)}. しかし, 後述するように, マクロファージ内でウイルス粒子が蓄積している膜小胞(virus-containing compartment, VCC)はLE/MVBマーカーを含むものの, 一般に見られるLE/MVBとは異なることが明らかになりつつある.

マクロファージに限らず他の細胞種でもGagあるいはウイルス粒子の輸送にendosomeの輸送経路(図2)の一部が関わっている可能性が, 多くの報告で示唆されている. 例えば, 293T細胞など主に細胞膜でHIV-1のウイルス粒

子形成が起こると考えられていた細胞種においても, Gagやウイルス粒子の一部がLE/MVBマーカーを含む小胞に観察される^{29, 57, 69, 80)}. さらに, AP-3 adaptor complexやRab9など, endosome輸送経路の制御などに関与するいくつかの宿主タンパク質が, HIV-1 Gagの局在やウイルス粒子の放出に重要な役割を果たすことが示唆されている^{4, 19, 23, 27, 54, 84)}. 加えて, 他のレトロウイルスでもendosomeの輸送経路がGagの細胞膜への輸送に必要であることが報告されている^{5, 77, 78)}.

上記の報告の多くは, Gagあるいはウイルス粒子がendosomeを経由して細胞膜へ到達するという仮説を支持しているが, これに合致しないデータも報告されている. 例えば, テトラシスチン・タグを用いて合成直後のGagを蛍光標識した実験では, HeLaやT細胞では, ほとんどのGagが細胞膜に局在し, LE/MVBには観察されない⁷⁴⁾. また, HeLa細胞ではLE/MVBに局在するGag変異体を発現させても, あまり細胞外へウイルス粒子として放出されない^{59, 62)}. これらの報告はむしろ, 少なくともHeLaやT細胞では, GagがLE/MVBを介さずに細胞膜へ到達する可能性を支持する. これらの知見に加えて, 最近Bieniaszらは, a) 微小管の破壊などLE/MVBの移動を阻害する処理は, 293T細胞でもマクロファージでもウイルス粒子の形成・放出に影響しない, b) どちらの細胞種でも, Gagの蓄積は先に細胞膜で見られ, 細胞内小胞への蓄積はその後おこる, c) Gagの細胞内小胞への局在はendocytosisやphagocytosisを阻害すると抑えられるが, このような細胞からもウイルス粒子は効率的に放出される, d) 293T細胞

でもマクロファージでも、MA を endosome 指向性の FYVE あるいは PX ドメインに置換することにより強制的に Gag を LE/MVB に局在させると、ウイルス粒子は endosome 内に形成されるが、このウイルス粒子は細胞外には放出されない、という結果を報告した⁴¹⁾。これらのデータは、293T 細胞などで LE/MVB 内に蓄積したウイルス粒子は細胞外へのウイルス放出には結びつかないことをよく示している。しかし、細胞種によって、また一つの細胞種の中でも、endosome の輸送経路には多様なコンパートメントがあり、recycling endosome など LE/MVB と異なるコンパートメントが Gag 輸送などに果たす役割についてはさらなる解析が必要である。

これに関連して、HIV-1 感染マクロファージでウイルス粒子の形成あるいは蓄積が見られる VCC は、実際には通常の endosome とは異なるという結果が最近相次いで報告された^{16, 85)}。これらの報告では細胞膜を特異的に標識する方法を用いて電顕による詳細な解析を行っており、VCC の多くが実際には細胞膜が深く陥入したもので、依然として細長い膜腔を介して細胞外に通じているということが明らかになった。従って、VCC は細胞内部のコンパートメントでありながら、細胞膜の microdomain と見なすこともできる (以下参照)。興味深いことに、VCC には CD63 だけでなく、CD81 や CD9 といった他の tetraspanin ファミリーのタンパク質も局在する¹⁶⁾。特に CD81 や CD9 は、CD63 と異なり、感染マクロファージでは通常の endosome には見られず VCC に集中しているようである。ウイルス粒子がどのように VCC に蓄積するか、また、蓄積したウイルス粒子が実際に細胞外に放出されるかは今のところ不明である。

HIV-1 が VCC で形成されることの生理的意義

マクロファージにおいてウイルス粒子形成が VCC で起こることは HIV-1 にとってどのような利点があるのだろうか。第一に考えられるのは、免疫系からの防御である。VCC 内腔は細胞外とつながっているが、両者をつなぐ空間は 20 nm 程度の狭いもので、10 nm 程度の抗体分子でも細胞外から VCC 内に拡散していくには障害があると推測されている¹⁶⁾。したがって、VCC 内に蓄積するウイルス粒子は細胞外のものに比べて、中和抗体などの影響を受けにくい可能性がある。第2の利点は、reservoir の確立である。Stevenson らの報告によれば、マクロファージの細胞内で蓄積しているウイルス粒子は形成されてから長い期間経っても感染性を失わないらしい。このようなマクロファージは、ウイルス複製が阻害されてから6週間経っても、T細胞にウイルスを伝播できることが示めされている⁷⁹⁾。したがって、VCC に蓄積するウイルス粒子は HIV-1 の持続感染に一定の役割を果たしている可能性がある。第3の利

点として、効率的な細胞間伝播が考えられる。CD81 は T 細胞と抗原提示細胞が接触して免疫シナプスを形成するとき、そのシナプスに局在することが知られている⁵¹⁾。マクロファージも抗原提示細胞の一つであり、CD81 が VCC ごと T 細胞との接触面に集中する可能性がある。そのような場合に、VCC 内のウイルス粒子は効率よく T 細胞表面に向けて放出されるかもしれない。

細胞膜の microdomain におけるウイルス粒子形成

マクロファージの場合とは異なり、HIV-1 を発現している T 細胞ではウイルス粒子形成・出芽は明らかに細胞膜上で起こっているのが容易に観察される。ここ数年の研究で、さらに、この過程が細胞膜の特定の部位で起こることがわかってきた。細胞膜を含む多くの生体膜には、特定のタンパク質や脂質から成る microdomain が何種類か存在し、その組成、構造、動態が細胞機能の調節に重要な役割を果たすと考えられている。中でも、いわゆる lipid raft として知られる microdomain は、それに結合する分子に共通の足場を提供し、分子間の相互作用を促進することで、シグナル伝達、細胞内輸送、細胞の極性決定などの過程に重要な役割を果たすとされている^{8, 82)}。このように数多くの重要な細胞機能に関与している可能性があるため、lipid raft は多くの注目を集める一方、それを解析するための手法に関する問題点などから論争の種ともなっている^{32, 47, 53)}。ここでは頁数の都合上触れないが、lipid raft の詳細やそれに関する論争について興味のある方は、最近の総説をご参照いただきたい^{21, 36, 43, 50)}。以下には、HIV-1 の粒子形成と lipid raft の関わりについてわかっていることをまとめる。

HIV-1 をはじめとするレトロウイルスのエンベロープ膜は、細胞膜に由来するにもかかわらず、細胞膜に比べて、特定の脂質、特にコレステロールやスフィンゴ糖脂質を多く含むことが早くから知られていた^{3, 10)}。これはウイルス粒子が細胞膜の特定の領域で形成されることを反映していると解釈されてきた。Lipid raft も細胞膜全体に比べて、スフィンゴ糖脂質などの飽和脂質やコレステロールに富む^{8, 82)}。これらの知見から HIV-1 などのレトロウイルスの粒子形成は lipid raft で起こる可能性が示唆された。実際に、以下に挙げるとおり、我々を含む複数のグループがいくつかの異なる解析方法を用いて得た実験結果はこの可能性を強く支持している。1) ウイルス粒子には raft マーカーとしてよく使われる GPI アンカータンパク質が選択的に取り込まれる一方、細胞膜に多量に存在する nonraft タンパク質の CD45 は除外される⁵⁶⁾。2) 細胞膜に存在する Gag や Env は raft マーカーとは colocalize するが、nonraft タンパク質とは colocalize しない^{34, 56, 63, 70)}。3) raft に存在する膜タンパク質は、一般に TritonX-100 などの界面活性剤に比較的不溶性の膜画分 (Detergent Resistant Membrane ;

DRM)に回収される傾向があるが^{7, 76)}, Gag や Env も, そのかなり多くが DRM に回収される^{22, 31, 34, 48, 56, 60, 70, 73)}. 3) については, DRM に回収される Gag は raft に結合した Gag ではなく膜に結合していない Gag 多量体であるという反証が報告された¹⁷⁾. しかし, これは iodixanol gradient を DRM 単離に用いたことによる技術的問題であり, sucrose gradient を用いた場合には, このような混入は見られず, TritonX-100 不溶性の膜に結合した Gag のみが DRM 画分に回収されることがその後明らかになった⁶⁴⁾. 以上に列挙した知見を総合すると, raft は何らかの形でレトロウイルス粒子形成の場を作るのに関わっている可能性が高い. 現在推定されている範囲では, 一つ一つの raft は非常に小さく (10-50 nm), これらが細胞の状態によって凝集したり分散したりするとされている^{36, 43, 50)}. レトロウイルスの粒子はひとつひとつの raft よりかなり大きい (100-150 nm) ことを考慮すると, ウイルス粒子の形成・出芽は, 細胞膜の raft に富んだ領域, あるいは raft の集合体で起こると考えるのが適当であろう. このような raft の凝集は一つ一つの raft に結合した Gag が多量体を形成することによって誘導されるのかもしれない.

ウイルス粒子形成が raft に富んだ領域で起こることは HIV-1 にとっていくつかの利点があるようである. たとえば, 細胞のコレステロールを減少させて, raft 形成を妨げると, ウイルス粒子の放出が著しく低下する^{60, 70)}. このような細胞では, ウイルス粒子形成の各段階のうち, 特に Gag の膜結合と多量体形成の段階が阻害されている⁶⁵⁾. また, raft 結合能のない脂肪酸を myristate の代わりに Gag に付加することにより Gag-raft 結合を阻害すると, 膜結合した Gag のレベルに変化は見られないものの, 効率的なウイルス粒子放出は抑制される⁴⁹⁾. 異なるアプローチを用いたこれらの知見を総合すると, raft はウイルス粒子形成・放出の複数の段階を促進すると考えられる. また, ウイルス産生細胞およびウイルス粒子自体のコレステロール濃度はウイルス粒子の感染性にも重要である^{12, 13, 30, 46, 60, 87)}. したがって, 粒子形成が raft で起こることは, 何らかの形で子ウイルスの感染性を増強すると考えられる. さらに, Sattentau らは, HIV-1 感染 T 細胞と標的 T 細胞が接着したときに形成される virological synapse (VS) に raft マーカーが局在することを報告した⁴⁰⁾. VS はウイルスの細胞間伝播を増進すると考えられており^{38, 39)}, raft が VS 形成あるいは VS でのウイルス粒子形成を促進することでウイルス伝播を助けている可能性がある.

最近 raft とは異なる microdomain が HIV-1 の粒子形成に関わっている可能性が示唆されている. CD63 など幾つかの tetraspanin は主に LE/MVB に局在するが, その一部は細胞表面で tetraspanin-enriched microdomain (TEM)

を形成している⁴⁵⁾. Thali らと Gould らは HeLa および T 細胞で HIV-1 の Gag 及び Env が高い頻度で CD63 や CD9 などを含む TEM と colocalize することを報告した^{6, 58)}. これらの報告を前述の endosome/VCC 局在 Gag に関連づけてみると, endosome や VCC に局在する Gag は TEM とともに細胞膜から取り込まれたものである可能性が考えられる. 実際, CD63 の一部は細胞膜を經由して lysosome に輸送されることが知られており³⁷⁾, マクロファージでは Gag が結合した TEM はこの経路の一部を使って VCC に蓄積するのかもしれない.

Phosphatidylinositol- (4,5)-bisphosphate (PIP2) と Gag の細胞膜局在

上述のように Gag は細胞膜の特定の microdomain に親和性を持ち, そこでウイルス粒子を形成すると考えられるが, これらの microdomain は直接 Gag を細胞膜特異的に局在させる働きを担っているのだろうか. myristate の代わりに raft に親和性のない不飽和脂肪酸を Gag に取り込ませると, 一部の Gag は ER に局在すると報告されており, raft が何らかの形で Gag を細胞膜に指向させる働きをしている可能性と矛盾しない⁴⁹⁾. しかし, この知見は, 単に Gag に付加された不飽和脂肪酸が ER 膜に高い親和性を持つという解釈でも説明されうる. さらに, 我々が調べた限りでは, 細胞のコレステロールを減少させても, 野生型 Gag の局在パターンに質的変化は見られない⁶⁵⁾. 加えて, raft は細胞膜だけではなく Golgi や endosome にも存在している^{8, 82)}. したがって, raft が Gag の細胞膜への局在に中心的な役割を果たしているとは考えにくい. TEM に関しては, 今のところ, Gag の細胞膜への局在を決定しているという知見はない.

それでは細胞膜のどのような因子が Gag を細胞膜に局在させる役割を果たしているのだろうか. 現在我々は phosphatidylinositol- (4,5)-bisphosphate (PIP2) という脂質分子に注目している. PIP2 は phosphoinositides と総称されるリン脂質の一種で, 主に細胞膜に局在する^{20, 72)}. 塩基性ドメインを持つ数多くのタンパク質が PIP2 と結合することが知られており, この結合はこうしたタンパク質の細胞膜局在に必須である^{18, 35, 44)}. 前述のように, HIV-1 の Gag の細胞膜局在も MA の塩基性ドメインに依存しており^{24, 33, 59, 62, 86)}, また, Gag は PIP2 と構造的に近いイノシトール 5 リン酸と結合しうる¹¹⁾. これらの知見に基づき, 我々は PIP2 が Gag の細胞膜局在とウイルス粒子形成・放出に重要な役割を果たすという仮説を立て, 実際に細胞の PIP2 の動態を変化させて, ウイルス粒子放出への影響を解析した⁶¹⁾. HeLa 細胞に small G protein の一つ, Arf6 の constitutively active mutant, Arf6/Q67L を発現させると, 細胞内に PIP2 に富む液泡が誘導されることが知られてい

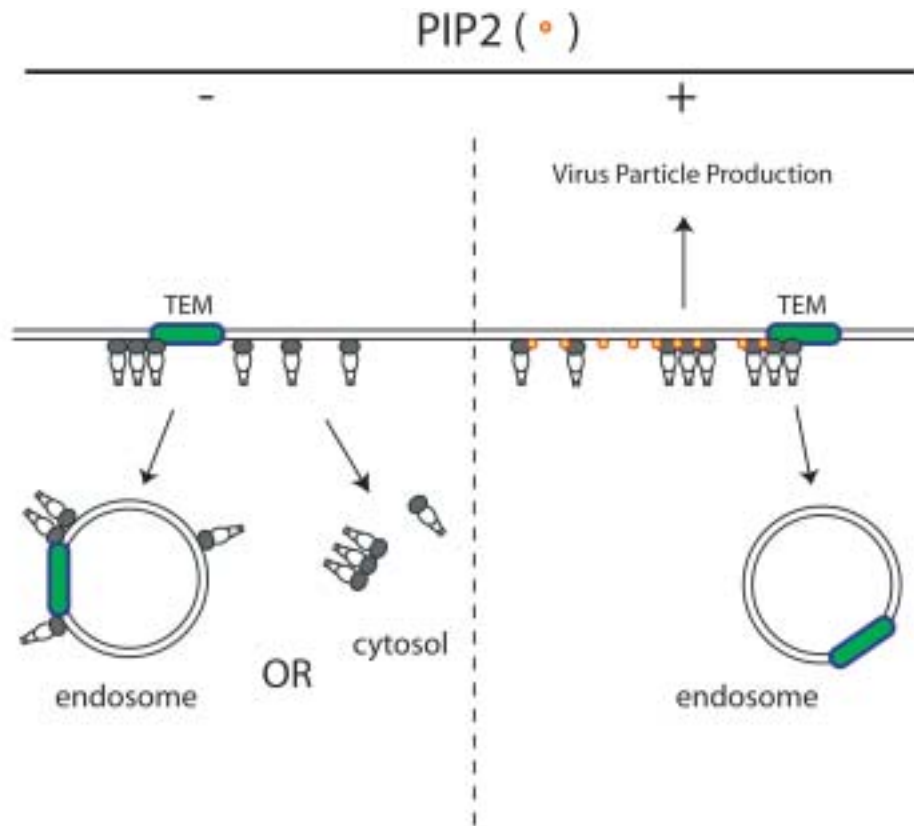


図3 細胞膜 PIP2 の HIV-1 Gag 局在における役割 (作業仮説)

PIP2 存在下では Gag は安定的に細胞膜に結合し、endocytosis により取り込まれることはない。一方、PIP2 非存在下では Gag は細胞膜から解離するか、endocytosis により endosome へ輸送される。この際、tetraspanin-enriched microdomain (TEM) が同時に取り込まれる可能性も考えられる。図には示していないが、細胞膜から解離した、あるいは、細胞膜に結合できない Gag が endosome に直接結合する可能性もある。

るが^{2,9)}、このような細胞では、Gag は細胞膜ではなく、この液胞に蓄積し、ウイルス放出量は 2-3 倍減少した⁶¹⁾。また、PIP2 の 5 位のリン酸基を加水分解する酵素、5-phosphatase IV (5ptase IV)⁴²⁾、を HeLa 細胞に高発現させたところ、細胞の PIP2 量は減少し、同時にウイルス放出も 5-8 倍減少した⁶¹⁾。こうした細胞では Gag はあまり細胞膜には見られず、主に endosome あるいは細胞質に存在していることが明らかになった^{14, 61)}。T 細胞でも同様で、5ptase IV を高発現させた細胞では Gag は細胞膜ではなく細胞質中にのみ検出された (未発表)。これらの結果は、PIP2 が Gag と直接結合することで Gag を細胞膜に特異的に局在させている可能性を示唆する。実際、現在までに 2 つのグループが、異なる方法で Gag と PIP2 の結合を検証している。Kvaratskhelia らは myristyl 化されていない Gag を PIP2 と混合すると、MA 内の二つの Lys が solvent に露出されなくなることを protein footprinting により見だし、Gag と PIP2 の直接の結合を示唆した⁸¹⁾。Summers らは、PIP2 と単離した MA ドメインとの複合体の構造を NMR に

より解析し、MA が PIP2 と結合するとそれまで MA 分子内に埋没していた myristate が露出することを見いだした⁷⁵⁾。この結果に基づき、PIP2 はそれ自身が Gag の膜結合のための錨になるだけでなく、myristate 露出を誘起することによっても、Gag の膜結合を促進すると Summers らは主張している。しかしながら、この 2 つの報告はいずれも技術的な理由によりアシル鎖の短い水溶性の PIP2 を用いており、また、myristyl 化された全長の Gag については解析していない。そこで、生理的な条件下で Gag と PIP2 が結合するか、つまり、ウイルス粒子形成能を持つ Gag が脂質 2 重層の PIP2 と結合するかどうかについて、我々は liposome を使った実験系で調べた。その結果、myristyl 化された全長の Gag は確かに PIP2 濃度依存的に liposome に結合することがわかった¹⁴⁾。この liposome への結合には N 末端の myristate と MA の塩基性領域の両方が必要であり、塩基性アミノ酸残基 Lys29 と Lys31 を別のアミノ酸に置換すると liposome 結合は著しく減少した¹⁴⁾。特筆すべきことに、HeLa 細胞や T 細胞で、Lys29 と Lys31 にアミ

ノ酸置換変異を持つ Gag を発現させると、この Gag は細胞膜ではなく LE/MVB 様の小胞に局在することが明らかになっている^{24, 59, 62}。

以上の知見を総合すると、一つの仮説として、Gag が PIP2 と結合することは Gag の細胞膜局在を安定させるが、この結合が阻害されると、一部の Gag は細胞膜から細胞質中に解離し、細胞膜に残った Gag は受動的に endocytosis により取り込まれて LE/MVB などに輸送されるという可能性が考えられる (図 3)。それではマクロファージの場合、PIP2 はどこに分布しているのだろうか。我々の preliminary な実験では、マクロファージでは、PIP2 は細胞膜だけでなく、Gag や CD81 が局在する VCC にも強く局在していることが観察された (未発表)。したがって、PIP2 は HeLa や T 細胞だけでなく、マクロファージでも Gag の局在を制御する役割を果たしているかもしれない。

まとめと今後の展望

ウイルス粒子あるいは Gag が細胞内のどこにどのようにして局在するかという問題について、過去数年の間に数多くのデータが報告され、少しずつそのメカニズムが明らかになりつつある。マクロファージでは VCC という新しいコンパートメントにウイルス粒子が蓄積することがごく最近報告された。T 細胞などウイルスが細胞膜表面で形成される細胞種では、lipid raft や TEM などの細胞膜ドメインが粒子形成の場を作っている。細胞膜への Gag の局在は PIP2 によって調節されていることは複数のグループが示している。これらの知見を通して、ウイルス粒子形成の場について我々の理解は深まりつつあるが、一方で依然として多くの重要な疑問が残っている。例えば、VCC がどのように形成されるかは不明であり、また、VCC 内のウイルスは実際に細胞外に放出されるのかについてもわかっていない。今後、この endosome 様の小胞がどのような由来のものかを明らかにすることが、マクロファージでのウイルス粒子形成の機序を知る上で不可欠となるであろう。細胞膜で粒子形成が起こる細胞種に関しては、Gag が TEM に局在するメカニズムはわかっておらず、TEM が HIV-1 の粒子形成や細胞間伝播にどのような意義を持つかについても明らかではない。TEM と raft、また、PIP2 とこれらの microdomain がウイルス感染細胞の表面でどのように関わり合っているか、というのも今後の研究課題であろう。これらの点を明らかにしていくことで、HIV-1 の細胞間伝播や持続感染など感染病態についての理解も深まると考えられる。さらに、PIP2 と Gag の相互作用など、ウイルスの局在や放出に関わる宿主因子とウイルスタンパク質の関係について詳細に解析していくことは、抗 HIV 薬の開発などにも発展することが期待される。

謝 辞

本稿を執筆する機会を与えてくださった柳雄介先生と小柳義夫先生に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Adamson, CS and Jones, IM: The molecular basis of HIV capsid assembly--five years of progress. *Rev Med Virol* **14**: 107-121 (2004).
- 2) Aikawa, Y and Martin, TF: ARF6 regulates a plasma membrane pool of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate required for regulated exocytosis. *J Cell Biol* **162**: 647-659 (2003).
- 3) Aloia, RC, Tian, H and Jensen, FC: Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5181-5185 (1993).
- 4) Alroy, I, Tuvia, S, Greener, T, Gordon, D, Barr, HM, Taglicht, D, Mandil-Levin, R, Ben-Avraham, D, Konforty, D, Nir, A, Levius, O, Bicoviski, V, Dori, M, Cohen, S, Yaar, L, Erez, O, Propheta-Meirán, O, Koskas, M, Caspi-Bachar, E, Alchanati, I, Sela-Brown, A, Moskowitz, H, Tessmer, U, Schubert, U and Reiss, Y: The trans-Golgi network-associated human ubiquitin-protein ligase POSH is essential for HIV type 1 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1478-1483 (2005).
- 5) Basyuk, E, Galli, T, Mougél, M, Blanchard, JM, Sitbon, M and Bertrand, E: Retroviral genomic RNAs are transported to the plasma membrane by endosomal vesicles. *Dev Cell* **5**: 161-174 (2003).
- 6) Booth, AM, Fang, Y, Fallon, JK, Yang, JM, Hildreth, JE and Gould, SJ: Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol* **172**: 923-935 (2006).
- 7) Brown, DA and Rose, JK: Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**: 533-544 (1992).
- 8) Brown, DA and London, E: Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* **275**: 17221-17224 (2000).
- 9) Brown, FD, Rozelle, AL, Yin, HL, Balla, T and Donaldson, JG: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol* **154**: 1007-1017 (2001).
- 10) Brugger, B, Glass, B, Haberkant, P, Leibrecht, I, Wieland, FT and Krausslich, HG: The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2641-2646 (2006).
- 11) Campbell, S, Fisher, RJ, Towler, EM, Fox, S, Issaq, HJ, Wolfe, T, Phillips, LR and Rein, A: Modulation of HIV-like particle assembly in vitro by inositol phosphates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10875-10879 (2001).
- 12) Campbell, S, Gaus, K, Bittman, R, Jessup, W, Crowe, S and Mak, J: The raft-promoting property of virion-associated cholesterol, but not the presence of virion-

- associated Brij 98 rafts, is a determinant of human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol* **78**: 10556-10565 (2004).
- 13) Campbell, SM, Crowe, SM and Mak, J: Virion-associated cholesterol is critical for the maintenance of HIV-1 structure and infectivity. *Aids* **16**: 2253-2261 (2002).
 - 14) Chukkappalli, V, Hogue, I, Boyko, V, Hu, W-S and Ono, A: Efficient membrane binding and plasma membrane localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag requires the interaction between the MA domain and phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate. *submitted* (2007).
 - 15) Demirov, DG, Ono, A, Orenstein, JM and Freed, EO: Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 955-960 (2002).
 - 16) Deneka, M, Pelchen-Matthews, A, Byland, R, Ruiz-Mateos, E and Marsh, M: In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J Cell Biol* **177**: 329-341 (2007).
 - 17) Ding, L, Derdowski, A, Wang, JJ and Spearman, P: Independent segregation of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein complexes and lipid rafts. *J Virol* **77**: 1916-1926 (2003).
 - 18) DiNitto, JP, Cronin, TC and Lambright, DG: Membrane recognition and targeting by lipid-binding domains. *Sci STKE* **2003**: re16 (2003).
 - 19) Dong, X, Li, H, Derdowski, A, Ding, L, Burnett, A, Chen, X, Peters, TR, Dermody, TS, Woodruff, E, Wang, JJ and Spearman, P: AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly. *Cell* **120**: 663-674 (2005).
 - 20) Downes, CP, Gray, A and Lucocq, JM: Probing phosphoinositide functions in signaling and membrane trafficking. *Trends Cell Biol* **15**: 259-268 (2005).
 - 21) Edidin, M: The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**: 257-283 (2003).
 - 22) Feng, X, Heyden, NV and Ratner, L: Alpha interferon inhibits human T-cell leukemia virus type 1 assembly by preventing Gag interaction with rafts. *J Virol* **77**: 13389-13395 (2003).
 - 23) Finzi, A, Brunet, A, Xiao, Y, Thibodeau, J and Cohen, EA: Major histocompatibility complex class II molecules promote human immunodeficiency virus type 1 assembly and budding to late endosomal/multivesicular body compartments. *J Virol* **80**: 9789-9797 (2006).
 - 24) Freed, EO, Orenstein, JM, Buckler-White, AJ and Martin, MA: Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production. *J Virol* **68**: 5311-5320 (1994).
 - 25) Freed, EO: HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* **251**: 1-15 (1998).
 - 26) Gelderblom, HR: Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *Aids* **5**: 617-637 (1991).
 - 27) Goff, A, Ehrlich, LS, Cohen, SN and Carter, CA: Tsg101 control of human immunodeficiency virus type 1 Gag trafficking and release. *J Virol* **77**: 9173-9182 (2003).
 - 28) Gould, SJ, Booth, AM and Hildreth, JE: The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10592-10597 (2003).
 - 29) Grigorov, B, Arcanger, F, Roingard, P, Darlix, JL and Muriaux, D: Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines. *J Mol Biol* **359**: 848-862 (2006).
 - 30) Guyader, M, Kiyokawa, E, Abrami, L, Turelli, P and Trono, D: Role for human immunodeficiency virus type 1 membrane cholesterol in viral internalization. *J Virol* **76**: 10356-10364 (2002).
 - 31) Halwani, R, Khorchid, A, Cen, S and Kleiman, L: Rapid localization of Gag/GagPol complexes to detergent-resistant membrane during the assembly of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **77**: 3973-3984 (2003).
 - 32) Hancock, JF: Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 456-462 (2006).
 - 33) Hermida-Matsumoto, L and Resh, MD: Localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging. *J Virol* **74**: 8670-8679 (2000).
 - 34) Holm, K, Weclawicz, K, Hewson, R and Suomalainen, M: Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly and Lipid Rafts: Pr55(gag) Associates with Membrane Domains That Are Largely Resistant to Brij98 but Sensitive to Triton X-100. *J Virol* **77**: 4805-4817 (2003).
 - 35) Hurley, JH and Meyer, T: Subcellular targeting by membrane lipids. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 146-152 (2001).
 - 36) Jacobson, K, Mouritsen, OG and Anderson, RG: Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol* **9**: 7-14 (2007).
 - 37) Janvier, K and Bonifacino, JS: Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins. *Mol Biol Cell* **16**: 4231-4242 (2005).
 - 38) Jolly, C, Kashefi, K, Hollinshead, M and Sattentau, QJ: HIV-1 Cell to Cell Transfer across an Env-induced, Actin-dependent Synapse. *J Exp Med* **199**: 283-293 (2004).
 - 39) Jolly, C and Sattentau, QJ: Retroviral spread by induction of virological synapses. *Traffic* **5**: 643-650 (2004).
 - 40) Jolly, C and Sattentau, QJ: Human immunodeficiency virus type 1 virological synapse formation in T cells requires lipid raft integrity. *J Virol* **79**: 12088-12094 (2005).
 - 41) Jouvenet, N, Neil, SJ, Bess, C, Johnson, MC, Virgen, CA, Simon, SM and Bieniasz, PD: Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol* **4**: e435 (2006).
 - 42) Kisseleva, MV, Wilson, MP and Majerus, PW: The isolation and characterization of a cDNA encoding phospholipid-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J Biol Chem* **275**: 20110-20116 (2000).
 - 43) Kusumi, A, Koyama-Honda, I and Suzuki, K: Molecu-

- lar dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic* **5**: 213-230 (2004).
- 44) Lemmon, MA: Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* **4**: 201-213 (2003).
 - 45) Levy, S and Shoham, T: The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* **5**: 136-148 (2005).
 - 46) Liao, Z, Graham, DR and Hildreth, JE: Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**: 675-687 (2003).
 - 47) Lichtenberg, D, Goni, FM and Heerklotz, H: Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem Sci* **30**: 430-436 (2005).
 - 48) Lindwasser, OW and Resh, MD: Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. *J Virol* **75**: 7913-7924 (2001).
 - 49) Lindwasser, OW and Resh, MD: Myristoylation as a target for inhibiting HIV assembly: unsaturated fatty acids block viral budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13037-13042 (2002).
 - 50) Mayor, S and Rao, M: Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. *Traffic* **5**: 231-240 (2004).
 - 51) Mittelbrunn, M, Yanez-Mo, M, Sancho, D, Ursa, A and Sanchez-Madrid, F: Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC. *J Immunol* **169**: 6691-6695 (2002).
 - 52) Morita, E and Sundquist, WI: Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 395-425 (2004).
 - 53) Munro, S: Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**: 377-388 (2003).
 - 54) Murray, JL, Mavrikakis, M, McDonald, NJ, Yilla, M, Sheng, J, Bellini, WJ, Zhao, L, Le Doux, JM, Shaw, MW, Luo, CC, Lippincott-Schwartz, J, Sanchez, A, Rubin, DH and Hodge, TW: Rab9 GTPase is required for replication of human immunodeficiency virus type 1, filoviruses, and measles virus. *J Virol* **79**: 11742-11751 (2005).
 - 55) Nguyen, DG, Booth, A, Gould, SJ and Hildreth, JE: Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem* **278**: 52347-52354 (2003).
 - 56) Nguyen, DH and Hildreth, JE: Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* **74**: 3264-3272 (2000).
 - 57) Nydegger, S, Foti, M, Derdowski, A, Spearman, P and Thali, M: HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic* **4**: 902-910 (2003).
 - 58) Nydegger, S, Khurana, S, Kremmentsov, DN, Foti, M and Thali, M: Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J Cell Biol* **173**: 795-807 (2006).
 - 59) Ono, A, Orenstein, JM and Freed, EO: Role of the Gag Matrix Domain in Targeting Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly. *J Virol* **74**: 2855-2866 (2000).
 - 60) Ono, A and Freed, EO: Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13925-13930 (2001).
 - 61) Ono, A, Ablan, SD, Lockett, SJ, Nagashima, K and Freed, EO: Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14889-14894 (2004).
 - 62) Ono, A and Freed, EO: Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *J Virol* **78**: 1552-1563 (2004).
 - 63) Ono, A and Freed, EO: The role of lipid rafts in virus replication (2005) *Advances in Virus Research Elsevier*
 - 64) Ono, A, Waheed, AA, Joshi, A and Freed, EO: Association of human immunodeficiency virus type 1 gag with membrane does not require highly basic sequences in the nucleocapsid: use of a novel Gag multimerization assay. *J Virol* **79**: 14131-14140 (2005).
 - 65) Ono, A, Waheed, AA and Freed, EO: Depletion of cellular cholesterol inhibits membrane binding and higher-order multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag. *Virology* **360**: 27-35 (2007).
 - 66) Orenstein, JM, Meltzer, MS, Phipps, T and Gendelman, HE: Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *J Virol* **62**: 2578-2586 (1988).
 - 67) Pelchen-Matthews, A, Kramer, B and Marsh, M: Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* **162**: 443-455 (2003).
 - 68) Pelchen-Matthews, A, Raposo, G and Marsh, M: Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol* **12**: 310-316 (2004).
 - 69) Perlman, M and Resh, MD: Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag. *Traffic* **7**: 731-745 (2006).
 - 70) Pickl, WF, Pimentel-Muinos, FX and Seed, B: Lipid rafts and pseudotyping. *J Virol* **75**: 7175-7183 (2001).
 - 71) Raposo, G, Moore, M, Innes, D, Leijendekker, R, Leigh-Brown, A, Benaroch, P and Geuze, H: Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* **3**: 718-729 (2002).
 - 72) Roth, MG: Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiol Rev* **84**: 699-730 (2004).
 - 73) Rouso, I, Mixon, MB, Chen, BK and Kim, PS: Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13523-13525 (2000).
 - 74) Rudner, L, Nydegger, S, Coren, LV, Nagashima, K, Thali, M and Ott, DE: Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling. *J Virol* **79**: 4055-4065 (2005).
 - 75) Saad, JS, Miller, J, Tai, J, Kim, A, Ghanam, RH and Summers, MF: Structural basis for targeting HIV-1

- Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11364-11369 (2006).
- 76) Schuck, S, Honsho, M, Ekroos, K, Shevchenko, A and Simons, K: Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5795-5800 (2003).
- 77) Sfakianos, JN and Hunter, E: M-PMV capsid transport is mediated by Env/Gag interactions at the pericentriolar recycling endosome. *Traffic* **4**: 671-680 (2003).
- 78) Sfakianos, JN, LaCasse, RA and Hunter, E: The M-PMV cytoplasmic targeting-retention signal directs nascent Gag polypeptides to a pericentriolar region of the cell. *Traffic* **4**: 660-670 (2003).
- 79) Sharova, N, Swingler, C, Sharkey, M and Stevenson, M: Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans. *Embo J* **24**: 2481-2489 (2005).
- 80) Sherer, NM, Lehmann, MJ, Jimenez-Soto, LF, Ingmundson, A, Horner, SM, Cicchetti, G, Allen, PG, Pypaert, M, Cunningham, JM and Mothes, W: Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* **4**: 785-801 (2003).
- 81) Shkriabai, N, Datta, SA, Zhao, Z, Hess, S, Rein, A and Kvaratskhelia, M: Interactions of HIV-1 Gag with assembly cofactors. *Biochemistry* **45**: 4077-4083 (2006).
- 82) Simons, K and Toomre, D: Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31-39 (2000).
- 83) Swanstrom, R and Wills, JW: Synthesis, Assembly, and Processing of Viral Proteins. (1997) in JM Coffin, SH Hughes and HE Varmus: *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York).
- 84) von Schwedler, UK, Stuchell, M, Muller, B, Ward, DM, Chung, HY, Morita, E, Wang, HE, Davis, T, He, GP, Cimbara, DM, Scott, A, Krausslich, HG, Kaplan, J, Morham, SG and Sundquist, WI: The protein network of HIV budding. *Cell* **114**: 701-713 (2003).
- 85) Welsch, S, Keppler, OT, Habermann, A, Allespach, I, Krijnse-Locker, J and Krausslich, HG: HIV-1 Buds Predominantly at the Plasma Membrane of Primary Human Macrophages. *PLoS Pathog* **3**: e36 (2007).
- 86) Yuan, X, Yu, X, Lee, TH and Essex, M: Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block intracellular transport of the Gag precursor. *J Virol* **67**: 6387-6394 (1993).
- 87) Zheng, Y-H, Plemenitas, A, Linneman, T, Fackler, OT and Peterlin, BM: Nef increases infectivity of HIV via lipid rafts. *Current Biology* **11**: 875-879 (2001).

Subcellular Locations at which HIV-1 Assembles.

Akira ONO

Department of Microbiology and Immunology
University of Michigan Medical School
Ann Arbor, MI 48109, USA

Virus particle formation of HIV-1 is driven by the viral structural protein Gag. In most cell types including T cells, Gag assembles into virus particles at the plasma membrane whereas, in HIV-1-infected macrophages, Gag and virus particles have been shown to accumulate in intracellular vesicles. At the moment, what causes this difference between cell types remains unknown. However, recent findings on the relationships between Gag and the cellular membrane system have substantially increased our understanding of the mechanisms by which sites of virus assembly are determined. I will review our current knowledge regarding the roles played by endosomal trafficking pathways, membrane microdomains, and plasma membrane lipids, and discuss the physiological significance of the interactions between Gag and specific membrane structures.