

15. 粒子としての HIV の成り立ちとふるまい —包装・出芽から吸着・侵入まで—

櫻木 淳一

多くのウイルスと同じように、HIV も感染サイクルの中でウイルス粒子（ビリオン）の形になることで感染を拡大し、時に標的細胞を変えて渡り歩き、宿主の免疫系を凌駕して繁栄している。こうしたことからビリオンとなり、細胞外に存在するときの HIV についての知見を得ていくことは細胞内での HIV の動向を知ろうとするのと同様に重要なことである。

HIV のビリオンが初めてとらえられたのは1983年のことであり、当初それは（おそらく思いこみと出版を急いだために）「典型的なC型RNA腫瘍ウイルスの形状」とであると報告されたが¹⁾、以後の報告によって、「VISNA ウイルスに酷似した形状」となり、レンチウイルスであることが判明した¹⁴⁾。HIV の粒子は直径約120nmの球状で、ウイルス糖タンパク Env (gp120, gp41) が植え付けられた宿主細胞由来の脂質二重膜からなるエンベロープ、エンベロープを裏打ちするウイルス蛋白群 Gag の一つであるマトリックス (MA)、その内側にやはり Gag の1つ、カプシド (CA) 蛋白からなる円錐台状をしたコアが存在する。コアの内側にヌクレオカプシド蛋白 (NC) に取り巻かれて二量体化しているポジティブ一本鎖 RNA のウイルスゲノムが存在する。ウイルス酵素であるプロテアーゼ (PR)、逆転写酵素 (RT)、インテグラーゼ (IN)、さらにウイルス由来のアクセサリ蛋白のいくつかも粒子内に存在しており、様々な働きをしていると考えられている (図1)。ここでは HIV の生活環に合わせて各ステップごとに順を追って研究の現状や最近のトピックを取り上げ、併せて将来の展望を述べてみたい。図2には HIV 粒子が生成してから感染するまでに経るイベントを模式的に示した。

ウイルス蛋白の輸送・粒子形成 (Transportation/Assembly)

HIV では他のレトロウイルスと同様に構造ウイルス蛋

大阪大学微生物病研究所ウイルス感染制御分野 (〒565-0871 吹田市山田丘3-1)

Structure and Function of HIV Virion

Junichi Sakuragi

Department of Viral Infections, Research Institute for Microbial Diseases Osaka University

3-1 Yamadaoka, Suita-city, Osaka 565-0871 Japan

TEL: 06-6879-8348

FAX: 06-6879-8347

E-mail: sakuragi@biken.osaka-u.ac.jp

白群 Gag が一本の前駆体 (Pr55) として発現され、3種類のウイルス酵素は Gag 前駆体のC末端にさらに融合した長い前駆体 (Pr160) として発現される。通常 Pr55 と Pr160 の発現量比は10~20:1程度であり、これらの前駆体はそのN末端がミリスチル化され、細胞膜へターゲットする。一方ゴルジ体を経由して細胞膜上に発現する HIV の糖蛋白 Env のうち膜貫通蛋白 gp41 はパルミトイル化されており、これらのウイルス構成要素が細胞膜上に集合した後、出芽することになる。この際、Gag 前駆体や Env 中の様々な部位にウイルス RNA やアクセサリ蛋白・宿主因子が結合し、出芽時に粒子内に取り込まれる¹²⁾。

粒子形成に必要な領域は Gag 前駆体の中いくつか見つかっている (図3)。一つは MA の M ドメインで、こ

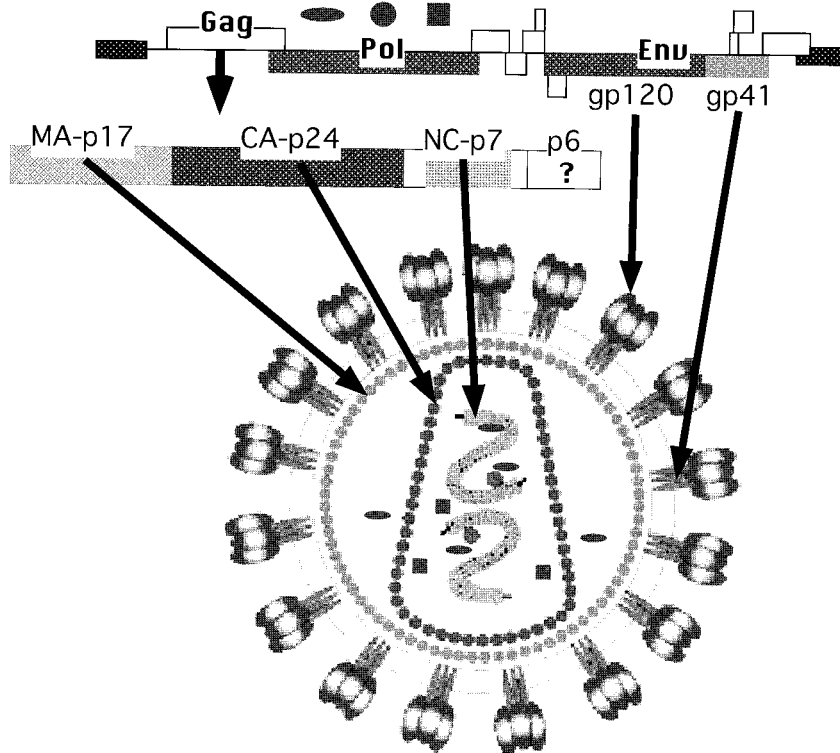


図1 HIV-1 構造タンパクの粒子内の所在

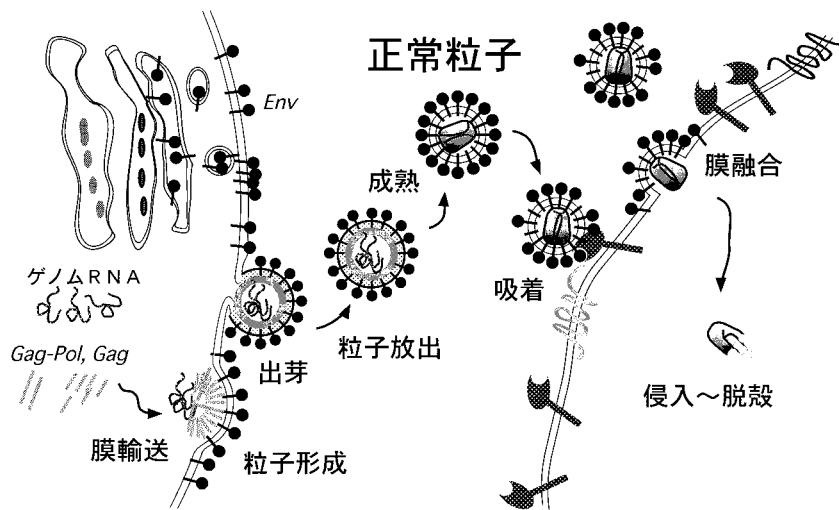


図2 HIV 粒子の成り立ちとふるまい

れはミリスチル化シグナルでありほとんどのレトロウイルスに共通している。NCのN末にはI (Interaction) ドメインがある。この領域はGag 同士の自己集合に必須と考えられ、正しい密度の粒子を形成するために必要であるが、詳しい作用は判っていない。もう一つ Gag 前駆体のC末に位置する p6 蛋白内にL (Late) ドメインがあるが、これについては後述する。

近年細胞膜上にコレステロールやスフィンゴ糖脂質に富

んだ密度の高い領域が筏のように点在していて、これらの糖脂質に親和性の高いシグナル伝達分子などがここに集合して機能単位をなしているという概念が提唱され、この領域はRAFTと名付けられている²⁹⁾。ミリスチン酸やパルミチン酸といった飽和アシル鎖修飾は普通のリン脂質よりRAFTと親和性が高いと考えられるため、HIVの出芽場所をRAFTと考える説もあり、これを支持するデータも報告されている²⁾。またごく最近ウイルスGagはRAFT

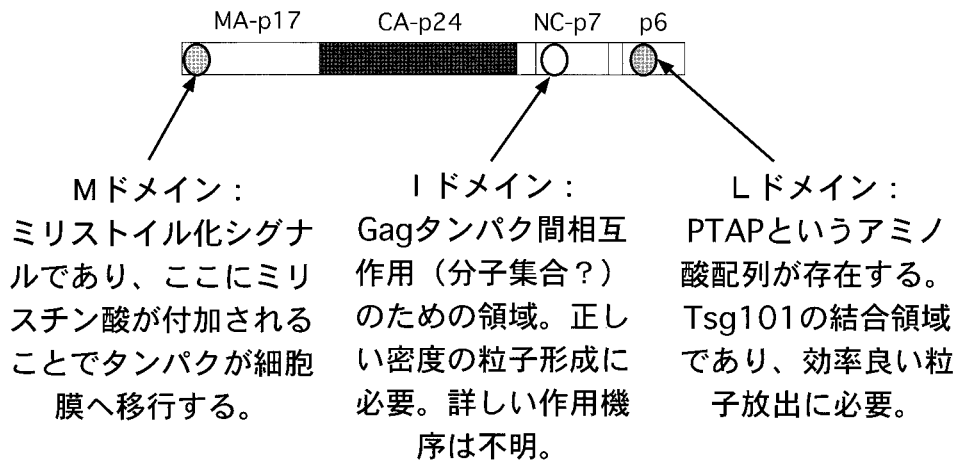


図3 粒子形成における Gag の機能領域

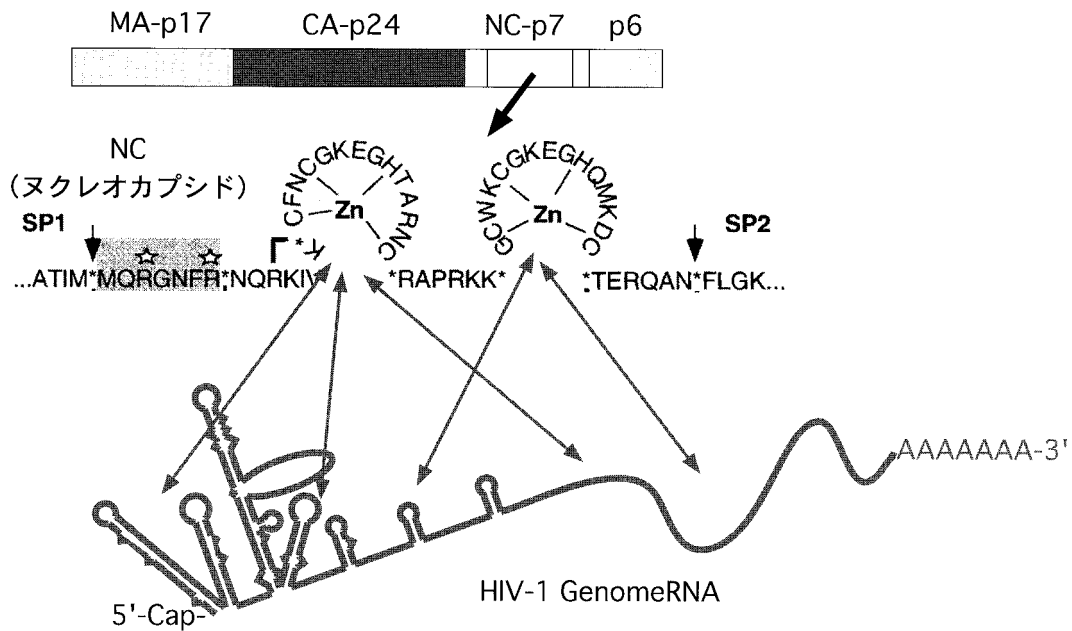


図4 ウイルス RNA ゲノムのパッケージング
 NCは塩基性で、2カ所のZnフィンガーを持つ核酸結合蛋白である。
 HIVの1本鎖RNAゲノムの5'末端領域は特徴的な二次構造を取り、NCに特異的に結合する。

よりも高密度な膜画分に局在しているという報告もあり、この画分はBarge（艇）と提唱されている¹⁷⁾。

出芽・包装 (Budding/Packaging)

細胞膜上に集合したウイルスの構成要素は集合しながら細胞膜を被って出芽する。出芽のきっかけが何であるのか、エネルギー依存的なのか、細胞側の因子が必要なのかなど、詳しいことはまだほとんど明らかにされていない。最近コムギ胚芽抽出物を用いて無細胞系でHIVのウイルス様粒子 (VLP) を産生させる系が報告され、こうした系を用いた細胞側因子の探求も始まっている^{18,32)}。

一般にビリオンが自己のゲノムを取り込むことをパッケージング (包装) という。HIVの場合はゲノムもウイルス構成要素として出芽時に集合するので、包装は出芽と同時に起こると言える。HIVゲノムの特異的包装に必要な因子はゲノム上と、Gag蛋白上にある (図4)。ゲノム上の因子はパッケージングシグナル (E/Psi) と呼ばれ、ゲノムRNAの5'末端から約800塩基分の領域とされる。E/Psiは一本鎖RNAに特徴的な二次構造を取っていると考えられ、7つのステムループが存在する。この特異的構造を認識するのが、Gag上のNC蛋白中に存在する2つのジンクフィンガーモチーフであり、この2因子の反応によ

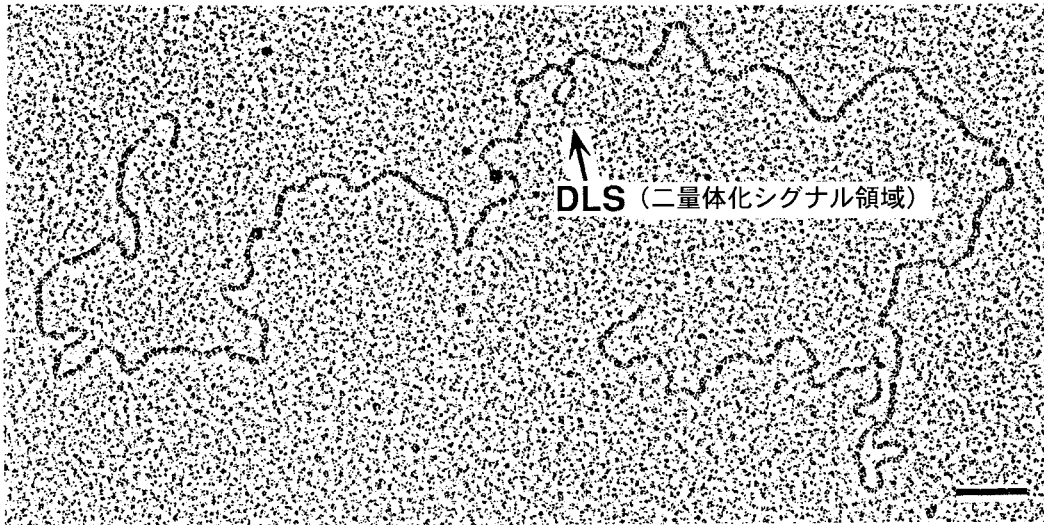


図5 HIV-1 RNA の電子顕微鏡像
5'末端で非共有結合をしている。
Hoglund S., et al., Virology, 1997, Vol 233, 271-9 より改変して引用。

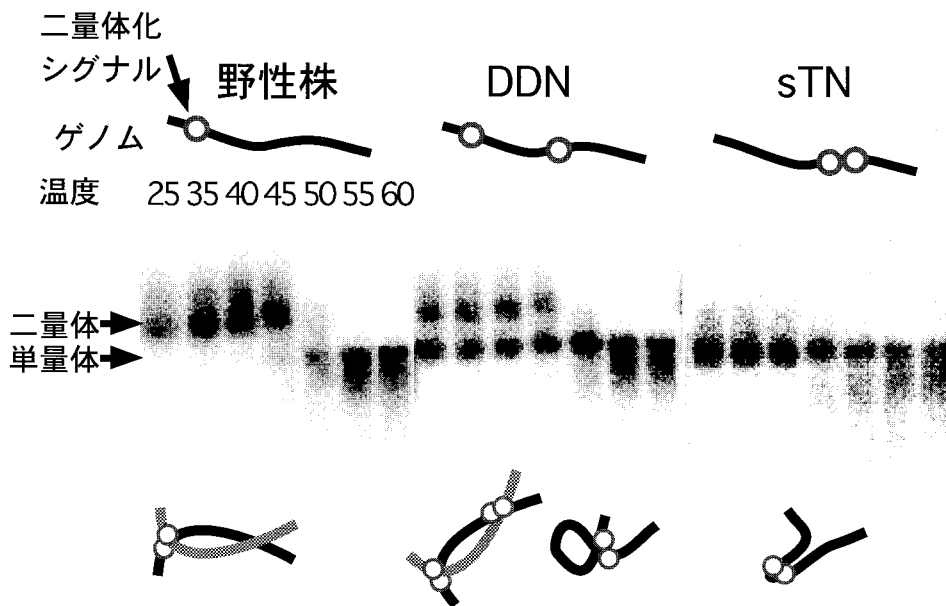


図6 単量体ゲノムのみを含む HIV-1 粒子の作成
このことから、粒子形成や粒子成熟にゲノムの二量体形成は必須ではないことが明らかとなった。

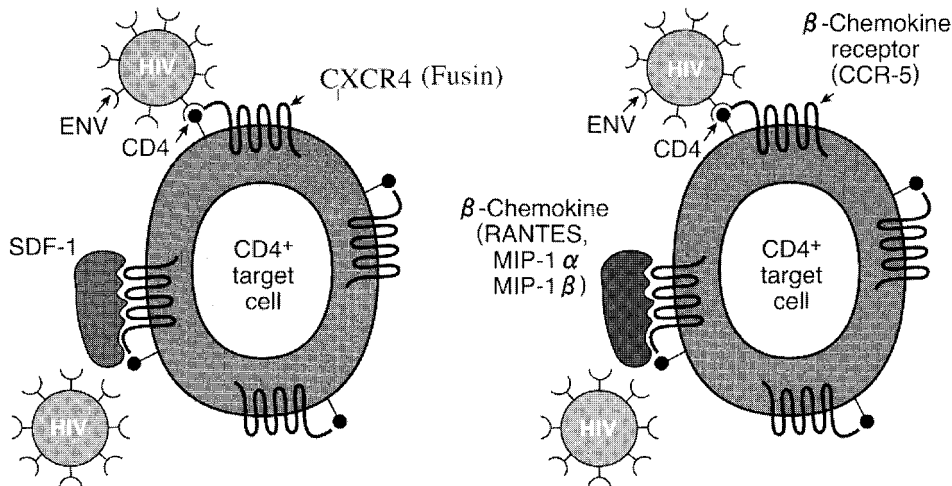
ってウイルスゲノムは特異的に効率よくピリオンに包装される³³⁾。

レトロウイルスは、Gag 前駆体のみを細胞内で発現させるだけで、それが VLP を作り、細胞膜をかぶって細胞上清中に放出されるという特徴がある。Gag と Gag-Pol 前駆体を発現させれば成熟した VLP を得ることが出来るし、他のウイルスの膜タンパクを同時に発現させることでそのタンパクをまとったシュードタイプ VLP も簡単に作ることが出来る。パッケージングシグナルの下流に任意の

遺伝子をプロモーターとともに配置すれば VLP に遺伝子を包装させ、細胞に導入・発現させることが可能である。こうしたことからレトロウイルスを細胞への遺伝子導入のためのウイルスベクターとして利用することも盛んに行われている。特に HIV は分裂停止期にある細胞にも遺伝子導入が可能のため、その応用範囲は広い²¹⁾。

粒子放出・成熟 (Release/Maturation)

出芽したピリオンは球状に形を作りながら細胞からくび



T細胞系親和性株の場合 マクロファージ親和性株の場合

図7 HIV 受容体 CD4 分子と第二受容体ケモカインレセプター (CXCR4, CCR5)

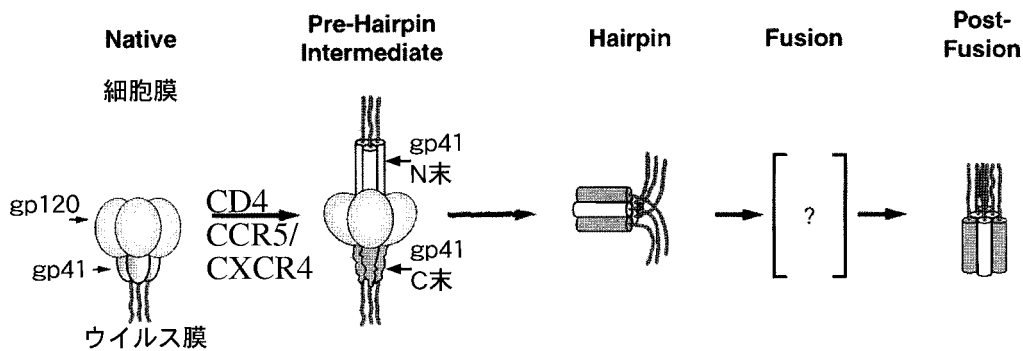


図8 HIV-1 Env 蛋白による膜融合モデル

Chan, DC. and Kim, PS. 1998, Cell v. 93, p681-4 より改変して引用.

り切れ、細胞上清に放出される。この放出の段階については近年急激に研究が進んでいる。ここで働くのは先に触れた p6 蛋白である (図3)。ウイルス粒子内の p6 の一部はユビキチン化されていること²²⁾、p6 変異ウイルスは出芽はできるが細胞よりの放出が抑制されることが指摘されており¹⁵⁾、p6 は細胞とビリオンとの Pinching-Off (切り離し) 蛋白と考えられていた。p6 蛋白内にある L ドメインには PTAP というアミノ酸モチーフがあり、この配列は近縁ウイルス間で保存されている特徴的な配列であるが、最近 L ドメイン特異的に結合する細胞側因子が単離された。それは液胞蛋白選別経路関連蛋白である Tsg101 で、Tsg101 と p6 との特異的結合が HIV 粒子放出に必須であるという報告であった¹³⁾。しかしユビキチン化にしても液胞経路にしても、細胞の内側への輸送に関連した現象であり、それがなぜ細胞外への放出というイベントに関わるのかの明確な説明はまだついておらず、今後も研究が必要と思われる。

放出の最中もしくは直後に Pr160 中の PR が活性化して前駆体を切断し、上記の構造を持つビリオンへと成熟させ、ここで初めてビリオンは感染性を獲得する。レトロウイルスのゲノム RNA はビリオン内で非共有的に二量体化していることが知られている (図5) が、粒子成熟のステップを経ることでこの結合は飛躍的に安定する。RNA から蛋白をすべて取り去っても二量体は結合しているため、この安定化は成熟時に出現する NC による RNA シャペロン活性とすべき反応の結果と考えられている¹⁰⁾。

ゲノム二量体化の理由については、ウイルスが相同組換えによる遺伝的多様性の獲得や、ゲノム損傷の補償を行っているためと言われる。しかしそれらの理由が二量体化という複雑で手間のかかるイベントを、物理的制約を抱えるウイルスが捨てずにいることを十分説明できるとは考えにくい。筆者らは二量体化の機序・役割を知るために、ウイルス粒子中のゲノム RNA を対象に様々な解析を行ってきた。特に HIV-1 ゲノム RNA 上の二量体化領域 (DLS)

を同一 RNA 上に複数配置することによって正常ウイルス粒子内に単量体のゲノムを存在させることに初めて成功した(図6)^{23,24)}。つまり HIV-1 においてゲノムがウイルス粒子にパッケージングされる際には、二量体化したウイルスゲノムが必要なのではなく、E/DLS が二つ存在していることが必要十分であることを示したのである。さらに現在までに進めた解析の結果は、HIV-1 のゲノムパッケージングは複数の段階を含んでいる現象であり、その1ステップとして E/DLS 領域の RNA が二本結合して形づく高次構造がパッケージングシグナルとして認識されるという必須の段階が存在する可能性を強く示唆していた。この仮説は長年の命題であった二量体化の理由に対する簡潔で合理的な説明となり得るものであると考えている。

吸着・融合・侵入 (Binding/Fusion/Penetration)

細胞外に放出されたウイルス粒子が標的細胞を認識して感染するためには通常ウイルスの外殻に存在するウイルス因子と、それによって識別されウイルスが吸着するために必要な細胞側因子(レセプター)が必要である。HIV の場合1986年に特異的レセプター分子 CD 4 が報告された²⁰⁾。その際ヒト CD 4 を強制発現させたマウス細胞に HIV が侵入できないことから同時に指摘された、第二受容体(コレセプター)の存在はその後長い間証明されなかった。一方1988年頃から HIV-1 には合胞体形成株(SI)と合胞体非形成株(NSI)という性質の異なる株が存在することが知られるようになった^{4,31)}。さらに解析が進むと SI は株化 T 細胞指向性株であり、NSI はマクロファージ指向性であり、この二つの株の違いは主に gp120 内の V 3 と呼ばれる易変異部分のアミノ酸配列パターンの変化によって説明が出来ること^{27,28)}、感染者体内ではマクロファージ指向性株がドミナントであるが病態進行に伴い株化 T 細胞指向性株が出現し、増加してくる等が明らかになり²⁶⁾、これらの事実からも第二受容体の存在と、その分布が HIV-1 の細胞指向性を決定している可能性が示唆されていた。1996年に、株化 T 細胞指向性 HIV-1 株の第二受容体として CXCR 4 がクローニングされた⁹⁾。この分子は 7 回膜貫通型の G 蛋白結合型受容体の一種と考えられ、後にケモカインの一つ SDF-1 のレセプターであることが明らかとなった。間をおかずにマクロファージ指向性株の第二受容体としてやはりケモカインレセプターの一つである CCR 5 が報告された^{5~8)}。今日一般的には HIV-1 の第二受容体といえば CXCR 4 と CCR 5 のことを指す(図7)が、そのほかにも現在までにいくつかのケモカインレセプターに HIV-1 の第二受容体活性があることが報告されている。

HIV-1 の細胞侵入機構は、まずビリオンの Env 蛋白のうち外側に位置する gp120 と標的細胞膜上の CD 4 分子が特異的に結合することを始まりとする。すると gp120 の立

体構造が変化して V 3 領域が細胞膜近傍に露出し、V 3 を含む立体構造上の領域が CXCR 4 や CCR 5 と結合できるようになる。これら第二受容体と結合した gp120 はおそらくさらに構造変化を起こす。それに伴い細胞融合活性を持つ gp41 の N 末端の疎水性部分が露出して細胞膜に刺さると膜を引き寄せするように gp41 が構造変化し、ウイルス膜と細胞膜の融合を起こさせて、ウイルスコアが細胞質内に侵入するものと考えられている(図8)³⁾。

また、ウイルスの感染性獲得に必須の興味深い細胞側因子としてサイクロフィリン A (CypA) を挙げておきたい。CypA は免疫抑制剤サイクロスポリンに対する特異的結合タンパクとして見いだされ¹⁶⁾、ペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼ活性を持ち³⁰⁾、タンパク質の折り畳みに関わっている(シャペロン活性)。酵母を用いた Two-Hybrid スクリーニングから HIV-1 の Gag 前駆体 Pr55 と特異的に結合することが発見され、注目を集めた。結合部位はコアタンパクの中央部分で、ビリオン内に濃縮して存在し、粒子産生能には影響しないが粒子の感染能獲得に寄与することが知られている^{11,19)}。最近ビリオン中の CypA は標的細胞表面のヘパラン類と結合することで、ウイルスと受容体の結合前の非特異的結合を仲介している可能性が示唆された²⁵⁾。しかしこの報告は、コアというウイルス内部構造と結合する因子がウイルス表面の反応に関与しているという点にやや無理があり、説得力のある新知見が必要であろう。

終わりに

AIDS の原因ウイルスとして HIV が報告されてから 20 年が経とうとしている。この間、ウイルス学的に HIV を解析した数え切れない論文が出版され、教科書を見ればもはやウイルスとしての HIV に判らないことなど無いかのよう詳細なストーリーが語られている。しかしひとたび研究を始めてみれば、こうしたことは教科書には載っていても、多くのことは想像や傍証によってのみ説明されており、依然として解明されるべきことが多いことはだれしもが感じることであろう。そのいくつかをここで紹介させていただいたが紙面の都合上ごく一部に言及できたに過ぎない。未だ残されている多くの「何故？」に興味をもって多くの方が HIV のウイルス学に参画していただければ、拙文がそのささやかなきっかけになればと願っている。

謝 辞

第49回日本ウイルス学会において粒子形成セッションの overview を発表する機会を与えてくださった前ウイルス学会長の大阪大学医学部・山西弘一教授と、本稿を執筆する機会を与えてくださった編集委員長の東京大学医科学研究所・岩本愛吉教授に深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautuet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) *Science*. **220** : 868-871.
- 2) Campbell, S. M., S. M. Crowe, and J. Mak 2001. Lipid rafts and HIV-1 : from viral entry to assembly of progeny virions *J Clin Virol*. **22** : 217-227.
- 3) Chan, D. C., and P. S. Kim 1998. HIV entry and its inhibition *Cell*. **93** : 681-684.
- 4) Cheng-Mayer, C., D. Seto, M. Tateno, and J. A. Levy 1988. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host *Science*. **240** : 80-82.
- 5) Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. Wu, C. R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski 1996. The beta-chemokine receptors CCR 3 and CCR 5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates *Cell*. **85** : 1135-1148.
- 6) Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1 *Nature*. **381** : 661-666.
- 7) Doranz, B. J., J. Rucker, Y. Yi, R. J. Smyth, M. Samson, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collman, and R. W. Doms 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2 b as fusion cofactors *Cell*. **85** : 1149-1158.
- 8) Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, and W. A. Paxton 1996. HIV-1 entry into CD4 + cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5 *Nature*. **381** : 667-673.
- 9) Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger 1996. HIV-1 entry cofactor : functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor *Science*. **272** : 872-877.
- 10) Feng, Y. X., T. D. Copeland, L. E. Henderson, R. J. Gorelick, W. J. Bosche, J. G. Levin, and A. Rein 1996. HIV-1 nucleocapsid protein induces "maturation" of dimeric retroviral RNA *in vitro* *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93** : 7577-7581.
- 11) Franke, E. K., H. E. Yuan, and J. Luban 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions *Nature*. **372** : 359-362.
- 12) Freed, E. O., and M. A. Martin 2001. HIVs and Their Replication, p. 1971-2041. *In* D. M. Knipe, and P. M. Howley (eds), *Fields Virology*, 4th edition ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 13) Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Cote, R. L. Rich, D. G. Myszka, and W. I. Sundquist 2001. Tsg 101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding *Cell*. **107** : 55-65.
- 14) Gonda, M. A., F. Wong-Staal, R. C. Gallo, J. E. Clements, O. Narayan, and R. V. Gilden 1985. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus *Science*. **227** : 173-177.
- 15) Gottlinger, H. G., T. Dorfman, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88** : 3195-3199.
- 16) Handschumacher, R. E., M. W. Harding, J. Rice, R. J. Drugge, and D. W. Speicher 1984. Cyclophilin : a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A *Science*. **226** : 544-547.
- 17) Lindwasser, O. W., and M. D. Resh 2001. Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains *J Virol*. **75** : 7913-7924.
- 18) Lingappa, J. R., R. L. Hill, M. L. Wong, and R. S. Hegde 1997. A multistep, ATP-dependent pathway for assembly of human immunodeficiency virus capsids in a cell-free system *J Cell Biol*. **136** : 567-581.
- 19) Luban, J., K. L. Bossolt, E. K. Franke, G. V. Kalpana, and S. P. Goff 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B *Cell*. **73** : 1067-1078.
- 20) Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and R. Axel 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain *Cell*. **47** : 333-348.
- 21) Naldini, L., and I. M. Verma 2000. Lentiviral vectors *Adv Virus Res*. **55** : 599-609.
- 22) Ott, D. E., L. V. Coren, T. D. Copeland, B. P. Kane, D. G. Johnson, R. C. Sowder, 2nd, Y. Yoshinaka, S. Oroszlan, L. O. Arthur, and L. E. Henderson 1998. Ubiquitin is covalently attached to the p6 Gag 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.
- 23) Sakuragi, J., A. Iwamoto, and T. Shioda 2002. Dissociation of Genome Dimerization from Packaging Functions and Virion Maturation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 *J. Virol*. **76**.
- 24) Sakuragi, J., T. Shioda, and A. T. Panganiban 2001. Duplication of the Primary Encapsidation and Dimer Linkage Region of HIV-1 RNA Results in the Appearance of Monomeric RNA in virions. *J Virol*. **75** : 2557-2565.
- 25) Saphire, A. C., M. D. Bobardt, and P. A. Galloway 1999. Host cyclophilin A mediates HIV-1 attachment to target cells via heparans *Embo J*. **18** : 6771-6785.
- 26) Schuitemaker, H., M. Koot, N. A. Kootstra, M. W. Dercksen, R. E. de Goede, R. P. van Steenwijk, J. M. Lange, J. K. Schattenkerk, F. Miedema, and M. Tersmette 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection : progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus

- population *J Virol.* **66** : 1354-1360.
- 27) Shioda, T., J. A. Levy, and C. Cheng-Mayer 1991. Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene *Nature.* **349** : 167-169.
- 28) Shioda, T., J. A. Levy, and C. Cheng-Mayer 1992. Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1 *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89** : 9434-9438.
- 29) Simons, K., and E. Ikonen 1997. Functional rafts in cell membranes *Nature.* **387** : 569-572.
- 30) Takahashi, N., T. Hayano, and M. Suzuki 1989. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin *Nature.* **337** : 473-475.
- 31) Tersmette, M., R. A. Gruters, F. de Wolf, R. E. de Goede, J. M. Lange, P. T. Schellekens, J. Goudsmit, H. G. Huisman, and F. Miedema 1989. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome : studies on sequential HIV isolates *J Virol.* **63** : 2118-2125.
- 32) Zimmerman, C., K. C. Klein, P. K. Kiser, A. R. Singh, B. L. Firestein, S. C. Riba, and J. R. Lingappa 2002. Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids *Nature.* **415** : 88-92.
- 33) 櫻木淳一1999. HIV ゲノムのパッケージング. *医学のあゆみ.* **189** : 1011-1012.