

# ヒト免疫不全ウイルスによる CD4 分解機構

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 生化学分野  
田邊 賢司

## 1. 緒言

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は、感染した細胞の細胞内輸送を巧みに利用することで免疫機構からの回避や免疫不全を引き起している。細胞内輸送はタンパク質の選別、局在に必要な不可欠な細胞内活動である。なかでも細胞外から取り込んだ物質の最初の選別器官である初期エンドソームは、リサイクルするか分解するかを選別の場として重要である。分解経路への選別はタンパク質のユビキチン化などによってESCRT複合体に認識され、内腔内小胞への取り込み、Multi Vesicular Body (MVB) の形成、リソソームとの融合が行われる。Nefの発現によって、CD4は細胞膜からの取り込みが促進され、さらに初期エンドソームにおいて分解経路に選別させると考えられている。細胞膜からの取り込み促進に関する分子メカニズムは明らかになりつつある一方、初期エンドソームでどのようにCD4の選別を制御しているのかは不明な点が多い。CD4のような膜タンパク質の分解機構には、初期エンドソームからMVBを経てリソソームで分解される経路の他に、細胞質内にある不溶性タンパク質複合体や古くなった細胞内器官、細菌などを分解するためのオートファジーが知られている。オートファジーは近年様々な疾患に関与していることが報告され、最近ではHIVが細胞内で複製する際にオートファジーを利用することも報告されている。一方、NefによるCD4分解に必要なとされている  $\beta$  COP やESCRT複合体がオートファジーに必要であることも報告されている。そこで我々はオートファジーも含めたCD4分解経路の解析を行った。その結果、Nefは従来考えられていたようなMVBを介する分解経路を経ていないことが明らかになり、MVB 経路ではない別の経路で分解されている可能性が考えられ、オートファジーによって分解している可能性を示唆する結果を得た。

## 2. 方法・結果および考察

### 1. Nef 発現時のCD4分解経路

本研究では細胞内輸送経路を観察しやすいHeLa細胞にCD4 を恒常的に発現させたT4細胞 (NIH AIDS researchcenterより入手)を用いた。T4細胞ではCD4は細胞膜に主に局在していた。一方でNefを発現させた場合、CD4のダウンレギュレーションが認められたことから、本細胞でもNefによる輸送制御が行われていると考えられた。正常な細胞ではCD4はエンドサイトーシスが殆ど行われない。一方、T4 細胞にNefを発現させた場合、CD4が消失している細胞も多く認められたが、一部の細胞でCD4が核付近に多く局在していることが認められた。この凝集塊のような構造物はNef非発現細胞ではほとんど認められないことから、これらの構造物はCD4が分解される直前のものと考えられた。

### 2. CD4の細胞内局在と細胞内輸送への影響

CD4は通常細胞膜に局在している。Nefの発現によってクラスリン依存性のエンドサイトーシスで取り込まれ、その後、初期エンドソームでMVBを介した分解経路に選別されると考えられている。そこで我々はNef発現時のCD4分解が本当にMVBを介した分解経路なのかどうかを検証した。MVBを介した分解

経路をたどることが知られている上皮成長因子(EGF)を蛍光標識したものをトレーサーとして取り込ませ、CD4との局在を比較した。CD4がMVBを介して分解されるのであれば、蛍光標識したEGFと同じ局在を示すと思われた。その結果、予想に反してCD4はEGFの共局在はほとんど認められなかった。このことはCD4がMVBを介した分解経路を辿ってはいないことを示唆している。

細胞膜から取り込まれた膜タンパク質は、分解経路にいくものと細胞膜へリサイクルされるものを選別される。そこで、リサイクルされる分子としてよく知られるトランスフェリンと比較したところ、強い共局在を示した。Nef発現によってリサイクル経路が阻害されることは既に報告されており、これらの結果からCD4は分解経路へ選別されているのではなく、リサイクルエンドソームに留まっていると考えられた。

### 3. オートファジーによるCD4分解

CD4がリサイクル経路に局在していることから、別の分解機構が存在していると考えられた。そこで我々は、近年さまざまな疾患・感染症と関連しているオートファジーに着目した。オートファジーは飢餓時などに引き起こされる非選択的な分解機構として発見されたが、最近では選択的オートファジーがあることがわかってきた。CD4がリサイクル経路にとどまって凝集塊を形成、その凝集塊を細胞が認識し、オートファジーで分解しているのではないかと考え、CD4とオートファゴソームのマーカであるLC3との共局在を観察した。結果を図1に示す。Nef発現時では非発現時と比較して明らかなLC3のシグナルが観察されたが、共局在は認められなかった(図1 上段)。しかし、微小管阻害剤を用いてオートファジーを阻害すると、明らかな共局在が認められた(図1 下段)。このことはCD4がオートファジーによって分解されており、その分解が早いために通常はLC3との共局在が認められにくいことを示している。

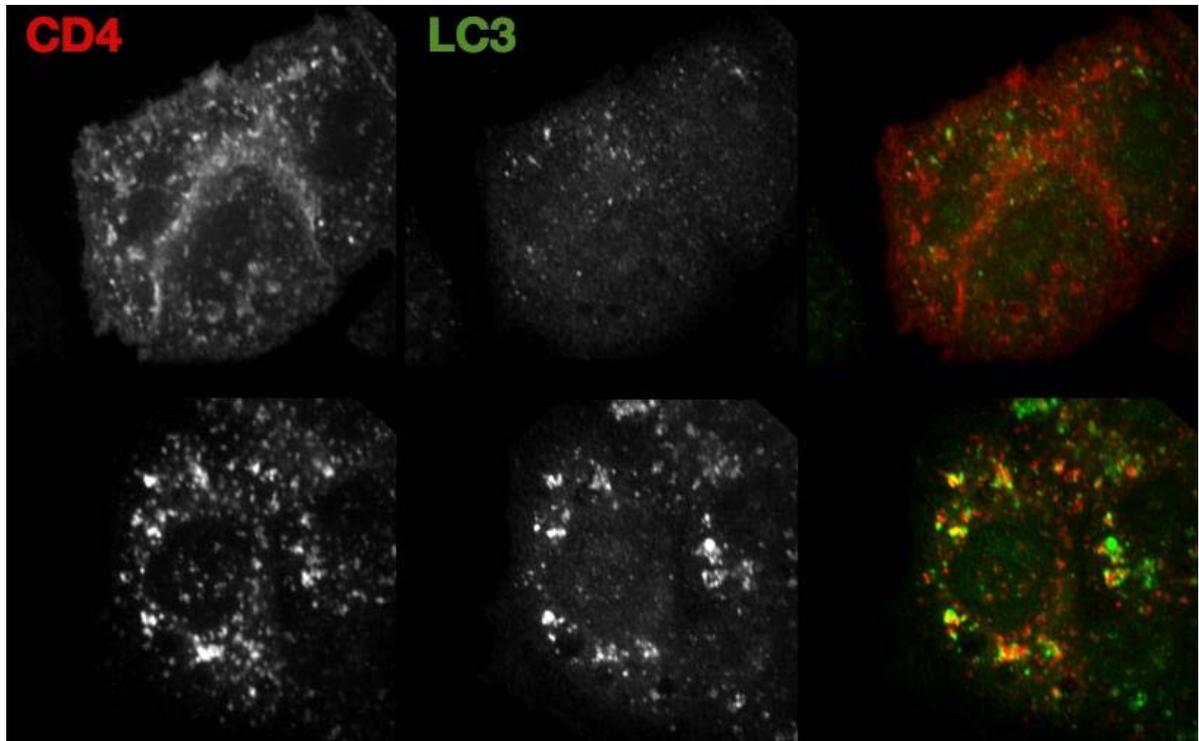


図1 CD4はNef発現時にオートファゴソームへ局在する。

T4細胞にNefを発現させ、固定後に抗CD4抗体と抗LC3抗体で染色を行なった。Nefを発現させただけでは一部のCD4がLC3と共局在するのみだが(上段)、微小管重合阻害剤を用いてオートファジーを阻害すると、明らかな共局在が認められた(下段)。

以上の結果から, Nefはリサイクル経路を阻害することでCD4を細胞内にとどめおき, 最終的にオートファジーで分解させるという, 従来とは全く異なる分解経路が存在する可能性が考えられた.

### 3. 発表論文、参考文献

- 1) Tanabe, K., Kon, S., Natsume, W., Torii, T., Watanabe, T., Satake, M. : Involvement of a novel ADPribosylation factor GTPase-activating protein, SMAP, in membrane trafficking: implications in cancer cell biology. *Cancer Sci.*, 97 : 801-806, 2006.
- 2) Tanabe, K., Takei, K. : Dynamic instability of microtubules requires dynamin 2 and is impaired in a Charcot-Marie-Tooth mutant. *J Cell Biol.* 185 : 939-948, 2009.
- 3) Mesaki, K.#, Tanabe, K.#, Obayashi, M., Oe, N., Takei, K. : Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement. *PLoS ONE* 6 : e19764, 2011. #equally contributed
- 4) Ohashi, E.#, Tanabe, K.#, Henmi, Y., Kobayashi, Y., and Takei, K. : Receptor Sorting within Endosomal Trafficking Pathway is Facilitated by Dynamic Actin Filaments. *PLoS ONE.* 6 : e19942, 2011. #equally contributed