

新規抗エイズ標的としての細胞膜ナノチューブ伸長

熊本大学 エイズ学研究センター
鈴 伸也

1. 目的

近年、細胞膜ナノチューブ（あるいはtunneling nanotube）と呼ばれる構造体に大きな注目が集まる様になっている（文献1）。なぜなら、遠隔の細胞同士をつなぐ、この細長い管を通して、カルシウム等のシグナルだけでなくHIV-1ウイルスが移動する可能性が示唆されているからである（文献2）。通常の感染・伝播ルート（感染細胞から外へ放出され、受容体を介して別の細胞に感染）よりも、はるかに確実・直接にウイルスを別の細胞に注入する可能性が予想される。また、ウイルスが細胞の外に出ないため、免疫や薬剤の攻撃から、より免れやすいことも予想される。さらには、悪用するだけでなく、HIV-1は自身のNef蛋白質を使って、特に、マクロファージでナノチューブそのものを伸長させる事も分かってきた（文献3）。そのため、宿主本来のマシーナリーを逆手に取ったこの新伝播ルートは、HIV-1伝播阻害の有効な標的と期待されている。しかし、研究は始まったばかりで、課題が多く残されている。

一方、私達はHIV-1のNef蛋白質の機能を、特に病原性発現機構との関連に着目しながら研究を続けてきた（文献4-7）。本研究では、これら背景もふまえ、マクロファージ・ナノチューブ伸長阻害剤を新たな抗エイズ薬として開発する事を目標と定め、HIV-1ウイルスがナノチューブを伸長させる分子メカニズムを解明することを目的として行った。

2. 方法

HIV-1 Nef発現プラスミドおよびHIV-1全遺伝子を含む発現プラスミド（JRFL株）は既報に従って調製した（文献4-6）。M-Sec発現プラスミドおよびRAW264.7細胞は理化学研究所大野博士より供与を受けた（文献8）。既報に従って、上記プラスミドをRAW264.7あるいはHeLa細胞に導入・発現させ（文献4-6）、抗NefおよびGag抗体等を用いて免疫染色を行った（文献5）。細胞内およびナノチューブ内の蛋白質局在観察は共焦点レーザー顕微鏡にて行った。また、HIV-1 Nef蛋白質とM-Sec蛋白質の会合を共免疫沈降法およびWestern blot法で解析した（文献4-6）。

3. 結果

HIV-1 Nefがナノチューブを伸長させることは報告されているが、その機構については全く分かっていなかった。最近、大野博士らがナノチューブ形成を促進する細胞内蛋白質としてM-Sec（別名Tnfrap2）およびRalA（低分子量GTPaseの1つ）を同定していたが（文献8）、本研究では、HIV-1 Nef蛋白質がマクロファージからナノチューブを伸長させる際に、これらが必須であることを初めて明らかにした。マクロファージ系細胞株RAW264.7は内在性にM-SecとRalAを発現しているが、この細胞にNefを発現させるとナノチューブの形成が促進される（図1、WT）。一方、M-Secを欠損させたRAW264.7細胞（ΔM-Sec）、およびRalAの機能をドミナントネガティブRalA変異体の過剰発現で阻害したRAW264.7細胞（RalA DN）では、もともとのナノチューブ形成能が弱く、重要なことに、これら細胞に対してNefは何ら効果を示さなかった（図1）。これらの結果は、NefはM-SecおよびRalA依存性にマクロファージからナノチューブを伸長させることを示している。また、共免疫沈降の結果から、少なくともNefとM-Secが蛋白質複合体を形成していることも明らかとなった（結果は省略）。

一方、M-Secのみの過剰発現でもナノチューブの形成は十分に促進されるメリットを応用して、次に、これらナノチューブをHIV-1蛋白質が実際に移動するかを解析した。そのために、HIV-1全遺伝子を含む発現プラスミドとM-SecプラスミドをHeLa細胞等に共発現させ、免疫染色後に共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。まず、HIV-1 Nef蛋白質がナノチューブ内を移動することが観察された（結果は省略）。一方、HIV-1 Gag蛋白質はHIV-1粒子形成に中心的な役割を果たし、このGag蛋白質だけで基本的な粒子様構造が形成されることが分かっているため、Gag蛋白質について詳細に観察した。その結果、Gag蛋白質は粒子様構造の形成を反映してドット状の染色像を示し、重要なことに、ナノチューブ内に多数、検出された（図2）。さらに、ナノチューブでつながれた遠隔の細胞へ移動する像も認められた（図2）。以上のことから、実際に、HIV-1ウイルスがナノチューブ内を移動して、非感染細胞に伝播される可能性が大きく示唆された。

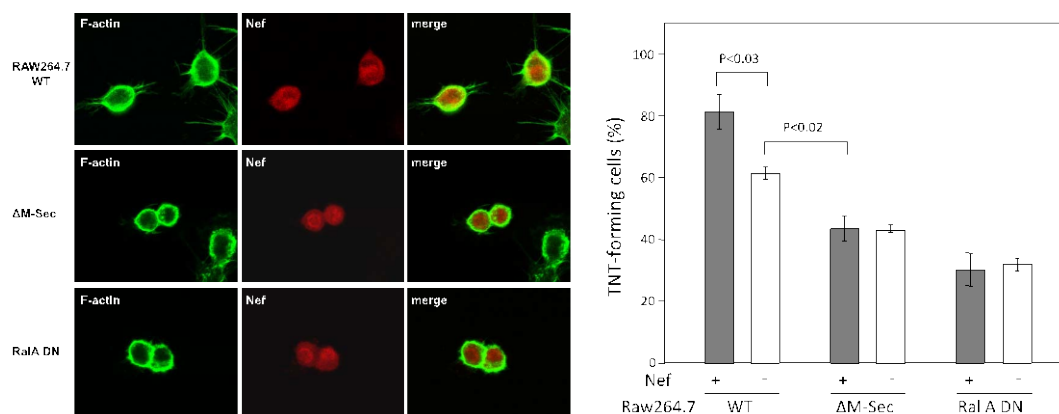


図1. 野生型 (WT)、M-Sec欠損 (Δ M-Sec) およびドミナントネガティブRalA変異体を過剰発現する (RalA DN) RAW264.7細胞にHIV-1 Nefを遺伝子導入・発現させ、ナノチューブの形成を測定した結果を示す。左図において、緑はF-actin、赤はNefを示す。右図はナノチューブの形成を定量化した結果を示す。

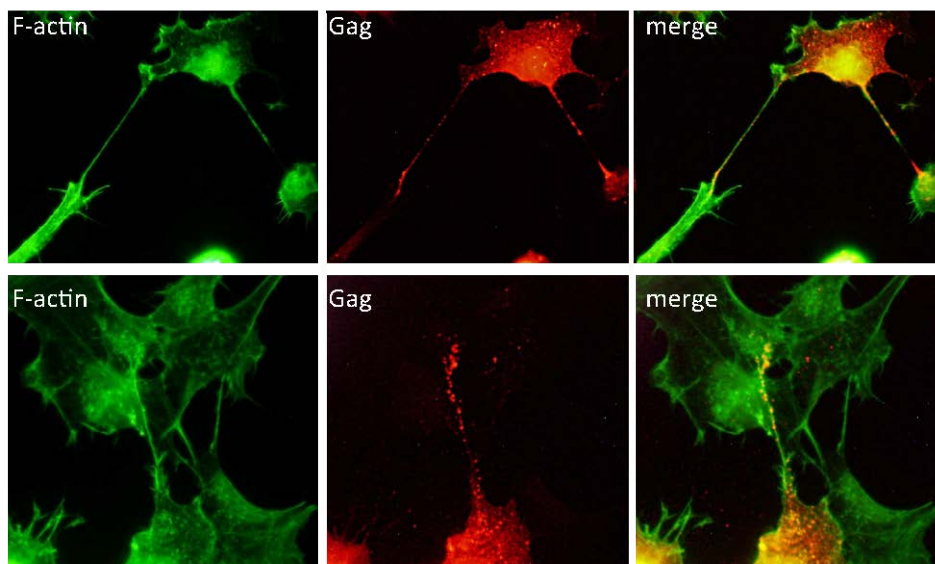


図2. M-Secを安定的に発現するHeLa細胞に、HIV-1全遺伝子を含む発現プラスミド (JRFL株) を遺伝子導入・発現させ、ナノチューブの伸長およびHIV-1 Gag蛋白質の局在を解析した結果を示す。緑はF-actin、赤はGag蛋白質を示す。右端はイメージを重ねた結果を示す。

4. 考察

エイズは多くの薬剤でコントロール可能な慢性疾患となった。しかし、薬剤耐性ウイルスの出現は重要課題であり、人類にとって脅威な事に変わりはなく、新たな作用機序の薬剤開発は常に不可避である。ナノチューブを経由するHIV-1ウイルスの細胞間移動あるいは直接注入は新たな伝播ルートであり、ナノチューブ伸長阻害剤は既存薬剤と作用点が大きく異なる事から、新たな抗エイズ薬となる可能性がある。本研究でナノチューブのHIV-1による伸長機構、特にM-SecおよびRalA依存性機構が明らかにできたことは、今後の応用研究に展開できる。

また、HIV-1感染者では感染しないはずの血液幹細胞やB細胞にもしばしば機能異常が見られ、HIV-1抗原も検出されるが、その理由は全く分かっていない。マクロファージから伸長したナノチューブの関与が可能性として考えられ、本研究結果は、これら血液幹細胞・B細胞異常の機構解明への応用も期待される。

5. 参考文献

1. Gerdes HH, Carvalho RN. Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. *Curr Opin Cell Biol.* 20(4):470-475, 2008.
2. Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O, Purbhoo MA, Chauveau A, Köhler K, Oddos S, Eissmann P, Brodsky FM, Hopkins C, Onfelt B, Sattentau Q, Davis DM. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol.* 10(2):211-219, 2008.
3. Xu W, Santini PA, Sullivan JS, He B, Shan M, Ball SC, Dyer WB, Ketas TJ, Chadburn A, Cohen-Gould L, Knowles DM, Chiu A, Sanders RW, Chen K, Cerutti A. HIV-1 evades virus-specific IgG2 and IgA responses by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits. *Nat Immunol.* 10(9):1008-1017, 2009.
4. Suzu S, Harada H, Matsumoto T, Okada S. HIV-1 Nef interferes with M-CSF receptor signaling through Hck activation and inhibits M-CSF bioactivities. *Blood.* 105(8):3230-3237, 2005.
5. Hiyoshi M, Suzu S, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, Akari H, Motoyoshi K, Okada S. Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. *Blood.* 111(1): 243-250, 2008.
6. Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Mwimanzi P, Ueno T, Adachi A, Ode H, Sato H, Fackler OT, Okada S, Suzu S. The identification of a small molecule compound that reduces HIV-1 Nef-mediated viral infectivity enhancement. *PLoS One.* 6(11):e27696, 2011.
7. Chihara T, Hashimoto M, Osman A, Hiyoshi-Yoshidomi Y, Suzu I, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Okada S, Suzu S. HIV-1 proteins preferentially activate anti-inflammatory M2-type macrophages. *J Immunol.* 188(8):3620-3627, 2012.
8. Hase K, Kimura S, Takatsu H, Ohmae M, Kawano S, Kitamura H, Ito M, Watarai H, Hazelett CC, Yeaman C, Ohno H. M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex. *Nat Cell Biol.* 11(12):1427-1432, 2009.