

計畫編號：DOH90-DC-1057

行政院衛生署疾病管制局九十年度委託研究計畫

由蛋白酵素取代 matrix 蛋白所形成愛滋病毒顆粒之分析

成 果 報 告

執行機構：國立陽明大學

研究主持人：王錦鈿

執行期間 90 年 1 月 1 日至 90 年 12 月 12 日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 *

中文摘要：

愛滋病毒(HIV)顆粒主要由 gag 基因所釋出的 Gag 蛋白構造而成，其先驅物(precursor)為一個 Pr55 多蛋白，在病毒組裝或釋出時 HIV 的蛋白酵素(protease; PR)將之分解成大小不同的片段，其最靠近 N 端的 matrix(MA)蛋白(p17)已被實驗證實對病毒的組裝不是絕對必要的。我們之前用 HIV 的蛋白酵素(PR)來替換 HIV Pr55^{gag} 上的 MA 蛋白，將構造出來的變種表現在一個複製缺陷的 HIV 質體，以 Western Immunoblot 的方法來檢測 chimeric protein 的蛋白分解(proteolytic processing)及病毒顆粒的組裝與釋出(assembly and release)。

我們之前的研究發現以具有酵素活性的 HIV 蛋白酵素置放於 HIV Gag 蛋白的 MA 位置上，病毒粒子無法形成，如將蛋白酵素的活性抑制或破壞，則可產生病毒粒子，可能是因為蛋白酵素表現量過高，而在過多的蛋白酵素活性之下，Gag 蛋白在未組合成病毒粒子前即被蛋白酵素分解，我們以這樣可表現蛋白酵素的 chimeric Gag 蛋白質體與只表現野生型(wide-type)的

HIV Gag 蛋白質體一起在 293T 細胞表現，我們發現帶有蛋白酵素的 chimeric Gag 可被帶入由野生型 Gag 蛋白所形成的病毒粒子，但其蛋白酵素卻無法有效地將 Gag 蛋白分解，這表示蛋白酵素的活性不能適度的展現，可能因被移位而失去酵素活性所需有的正常調控。

中文關鍵字：愛滋病毒，蛋白酵素，Gag

英文摘要：

We constructed HIV mutants by replacing the matrix domain of Gag with the protease (PR) domain. The resulting construct was cloned into an HIV replication-defective vector, which carries a *gpt* gene in *env* region and an inactivated PR in the *pol* gene. The chimeric construct MA(PR) was unable to produce particles when expressed alone in 293T cells. This mutant could also transdominantly interfering with wild-type virus particle production when co-expressed with a wild-type (wt) Gag protein expression plasmid. The *trans* interference effect of the mutant on wt virus budding was dose-dependent. Virus particle production was abolished when cotransfected DNA of Gag versus MA(PR) was at a ratio of 1:1. However, levels of released virus particles were increased when the MA(PR) DNA amount used for cotransfection was reduced. MA(PR) could be efficiently incorporated into wt Gag particles based on *in vitro* reverse transcription (RT) assay when cotransfected plasmid DNA ratio of Gag/MA(PR) was kept at 20:1 to 10:1. Although the MA(PR) was incorporated into virus particles at a level comparable to that of wt, the PR within the context of MA(PR) did not appear to be functional appropriately since the Pr55^{gag} represented the major form of released virus particles. This suggests that sequences outside the PR domain may be involved in the process of PR activity regulation and that the a proper position may also affect the acquisition of PR enzymatic activity.

Keyword: human immunodeficiency virus, protease, Gag

本文：

前言：

愛滋病毒結構蛋白 Gag 最初以一複合體形式 Pr55^{gag} 被合成出來 (2, 24) , 在細胞膜處 , Pr55^{gag} 分子自行組裝形成病毒顆粒並自胞膜以出芽方式送出細胞(3, 5)。在送出細胞的過程中(7) , Pr55^{gag} 會被病毒的蛋白酵素(protease)水解為小片段 p17(MA)、 p24(CA)、 p2、 p7(NC)、 P1 及 p6(4, 9, 11) , 至此 , 病毒顆粒才具有感染力。除了蛋白酵素之外 , *pol* 基因所表現之酵素還有返轉錄酵素 , RNA 水解酵素 H 型及嵌合酵素 (integrase) , 這些酵素皆參與病毒之複製。在轉譯 Pr55^{gag} 的同時有 5-10% 之機率發生密碼讀取移轉機制 , 即避掉了停止密碼而轉錄出一融合蛋白分子 $\text{Pr160}^{\text{gag-pol}}$, *pol* 基因產物即是以此方式生成 (6)。Gag-Pol 中 p6^{gag} domain 被取代以 p6^* 表示(13)。 Gag-Pol 是透過其 N 端的 Gag 與 Pr55^{gag} 作用而被帶入病毒顆粒中(16)。其後之 Gag-Pol 分子間複合作用使活化蛋白酵素水解 Pr55^{gag} 及 $\text{Pr160}^{\text{gag-pol}}$ (7)。

我們已知返轉錄病毒 *gag* 基因帶有足夠之訊息負責顆粒之形成(1,19, 23)。研究顯示從 HIV MA 中去除掉 105 個氨基酸似乎對

於顆粒組裝及釋放沒有顯著之影響(20)，甚至刪除掉大部份的 Rous sarcoma virus 之 CA domain 對病毒顆粒組裝及釋出也無明顯之影響(22)。

最近的研究發現，*gag* 基因上對於病毒組裝非必要的某些序列可被外來的蛋白序列取代 (22)，這些 *gag* 變種所構造出的 chimeric protein 依然可組裝成病毒顆粒。之前的研究發現在 HIV MA 蛋白上的氨基酸去掉 80% 約 105 個氨基酸後，對病毒顆粒組成與釋出也沒明顯的影響。這些結果表示可能 MA 蛋白是 HIV Gag 蛋白中可能被外來的蛋白所取代而病毒的組成與釋出的過程可以依然進行。我們提出此計劃的目的主要探討是否可以用具有潛在生物活性的蛋白來取代 HIV MA 蛋白，來觀察這些 chimeric protein 是否還可以形成病毒顆粒，而被包含在這些 chimeric virus-like particles 的外來蛋白是否仍具生物活性，chimeric virus-like particles 在免疫學上或疾病的治療上，將是一個有相當潛力發展的工具。

材料與方法：

將所構建的質體去氧核糖核酸轉控感染人類的 293T 細胞，
在 48 至 72 小時後，將細胞與細胞培養液收集起來，培養液在經過超
高速離心後將離心下來的病毒粒子與細胞溶解液以蛋白電泳分析配合
西方點墨的方法使用 anti-HIV p24 的單株抗體來檢測 HIV 的 Gag 蛋白
，詳細實驗步驟如前述(1,19)。

結果：

以帶有 PR 於 MA 位置上的質體與可產生病毒粒子的質體 Gag 一起表現於 293T 細胞時，MA(PR)會阻斷病毒粒子的產生，當兩者的 DNA 量同時為 1:1 時，如把 MA(PR)的 DNA 量降低，讓 MA(PR)與 Gag DNA 量的比接近到 1:10 或 1:20 則可產生病毒粒子，這驗證了之前的結論 (8)，也就是表現過量的 PR 會因為過早分解 Gag 蛋白使 Gag 無法組合成病毒粒子。使用較低量的 MA(PR)質體核酸或以蛋白酶抑制劑處理時則可有病毒粒子產生，這表示當蛋白酶活性較低時，則有較多的 Gag 蛋白先驅物 pr55 可組合成病毒粒子，唯這些釋出的 Gag 蛋白粒子只檢測到少量被水解完全的 p24 片段(圖 1)，顯示被組裝入病毒粒子的 MA(PR)量不多或是其帶有 PR 的活性不足，以 *in vitro* 返轉錄酶活性來定量則發現釋出的 chimeric virus particles 內含有足量的返轉錄酶，這表示 MA(PR)非無法組合入野生型的病毒粒子，而是可能 MA(PR) 上的 PR 其酶活性無法充分發揮作用。

討論：

愛滋病毒的蛋白酵素(PR)於病毒粒子組合之際才活化而將組合成粒子的結構蛋白 Gag 分解切成大小不一的 Gag 蛋白片段，而 PR 的活性調控機制仍不清楚。已知使 PR 表現量高於平常則病毒粒子不能形成，維持 Gag 與 PR 或 pol 適度比例的表現才能有足量的病毒粒子形成。以 PR 來取代 Gag 蛋白上的 MA，病毒粒子非但無法形成，也會阻斷正常野生型病毒粒子的組合，當 Gag-pol 過度表現時也會減少病毒粒子的產生，不同於 Gag-pol 的是，當 Gag-pol 表現量降低時，病毒粒子的產量增加，而所釋出的病毒粒子可適度的被 PR 分解，反而是 MA(PR)雖然在低度表現時，也可被組裝入野生型的病毒粒子（以返轉錄酵素活性來定量），但野生型病毒的 Gag 蛋白被 MA(PR)分解的不多，以西方點墨檢測到的多為未被分解的 pr55，成熟的 p24 相當少，表示 PR 雖位於 Gag 蛋白上的 MA 位置，其活性不如其位於下游的 pol 上，正常 PR 的位置才能展現適度的酵素活性(25,26)。

結論與建議：

- 1.愛滋病毒的蛋白酵素置放於 Gag 蛋白的 MA 位置上，雖仍具有酵素活性，但功能不如其位於下游 pol 上的蛋白酵素，表示 PR 所在的位置與其活性大小有關。
- 2.剛組合的愛滋病毒粒子須被蛋白酵素分解後才有感染力，由 MA(PR) 表現的 chimeric protein 可干擾野生型病毒粒子的組合與成熟化，可供發展抗愛滋病毒的疫苗或基因治療的應用。

參考文獻：

1. Chen YL, Ts'ai PW, Yang CC, Wang CT: Generation of infectious virus particles by transient co-expression of human immunodeficiency virus type 1 *gag* mutants. *J Gen Virol* 1997;78:2497-2501.
2. Freed EO; HIV Gag proteins: Diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 1998;251:1-15.
3. Gelderblom HR: Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* 1991;5:617-638.
4. Henderson LE, Bowers MA, Sowder II RC, Serabyn SA, Johnson DG, Bess Jr JW, Arthur LO, Bryant DK, Fenselau C : Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processing, and complete amino acid sequences. *J Virol* 1992; 66:1856-1865.
5. Hunter E : Macromolecular interactions in the assembly of HIV and other retroviruses. *Semin. Virol* 1994; 5:71-83.
6. Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE : Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* (London) 1988; 331:280-283.

7. Kaplan AH, Manchester M, Swanstorm R : The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J Virol* 1994; 68:6782-6786.
8. Krausslich HG: Human immunodeficiency virus proteinase dimer as component of the viral polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1991;88:3213-3217.
9. Leis J, Baltimore D, Bishop JB, Coffin J, Fleissner E, Goff SP, Oroszlan S, Robinson H, Skalka AM, Temin H.M, Vogt V : Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J Virol* 1988;62:1808-1809.
10. Louis JM, Nashed NT, Parris KD, Kimmel AR, Jerina DM: Kinetics and mechanism of autoprocessing of human immunodeficiency virus type 1 protease from an analog of the Gag-Pol polyprotein. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1994; 91:7970-7974.

11. Mervis RJ, Ahmad N, Lillehoj EP, Raum MG, Salazar FHR, Chan HW, Venkatesan S : The *gag* gene products of human immunodeficiency virus type 1: alignment within the *gag* open reading frame, identification of posttranslation modifications, and evidence for alternative *gag* precursors. *J Virol* 1988; 62:3993-4002.
12. Page KA, Landau NR, Littman DR : Construction and use of a human immunodeficiency virus: Vector for analysis of virus infectivity. *J Virol* 1990;64:5270-5276.
13. Partin K, Krausslich HG, Ehrlich L, Wimmer E, Carter C : Mutational analysis of a native substrate of the human immunodeficiency virus type 1 proteinase. *J Virol* 1990;64:3938-3947.
14. Partin, K., G. Zybarth, L. Ehrlich, M. DeCrombrughe, E. Wimmer, and C. Carter. 1991. Deletion of sequences upstream of the proteinase improve the proteolytic processing of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4776-4780.

15. Roberts , N. A., J. A. Martin, D. Kinchington, A. V. Broadhurst, J. C. Craig, J. B. Duncan, S. A. Galpin, B. K. Handa, J. Kay, A. Krohn, R. W. Lambert, J. H. Merrett, J. S. Mills, K. E. B. Parkes, S. Redshaw, A. J. Ritchie, D. L. Taylor, G. J. Thomas, and P. J. Machin. 1990. Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. *Science* 248: 358-361.
16. Srinivasakumar N, Hammarskjold ML, Rekosh D : Characterization of deletion mutations in the capsid region of human immunodeficiency virus type 1 that affect particle formation and Gag-Pol precursor incorporation. *J Virol* 1995;69:6106-6114.
17. Tessmer U, Krausslich HG: Cleavage of human immunodeficiency virus type 1 proteinase from the N-terminally adjacent p6* protein is essential for efficient Gag polyprotein processing and viral infectivity. *J Virol* 1998;72:3459-3463.
18. Wang CT, Barklis E: Assembly, processing, and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 Gag mutants. *J Virol* 1993;67:4264-4273.

19. Wang, CT, Lai HY, Li JJ : Analysis of minimal human immunodeficiency virus type 1 *gag* coding sequences capable of virus-like particle assembly and release. *J Virol* 1998;72: 7950-7959.
20. Wang, CT, Zhang Y, McDermott J, Barklis E: Conditional infectivity of a human immunodeficiency virus matrix domain deletion mutant. *J Virol* 1993;67:7067-7076.
21. Weber IT : Comparison of the crystal structures and inter subunit interactions of human immunodeficiency virus and Rous sarcoma virus protease. *J Biol Chem* 1990;265:10492-10496.
22. Weldon Jr RA, Erdie CR, Oliver MG, Wills JW: Incorporation of chimeric Gag protein into retroviral particles. *J Virol* 1990;64:4169-4179.
23. Weldon RA, Wills JW: Characterization of a small (25-kilodalton) derivative of the Rous sarcoma virus Gag protein competent for particle release. *J Virol* 1993;67:5550-5561.
24. Wills JW, Craven RC: Form, function, and use of retroviral *gag* proteins. *AIDS* 1991;5:639-654.

25. Zybarth G, Carter C : Domains upstream of the protease (PR) in human immunodeficiency virus type 1 Gag-Pol influence PR autoprocessing. *J Virol* 1995;69:3878-3884.
26. Zybarth G, Krausslich HG, Partin K, Carter C : Proteolytic activity of novel human immunodeficiency virus type 1 proteinase proteins from a precursor with a blocking mutation at the N terminus of the PR domain. *J Virol* 1994;68:240-250.

圖表

圖 1

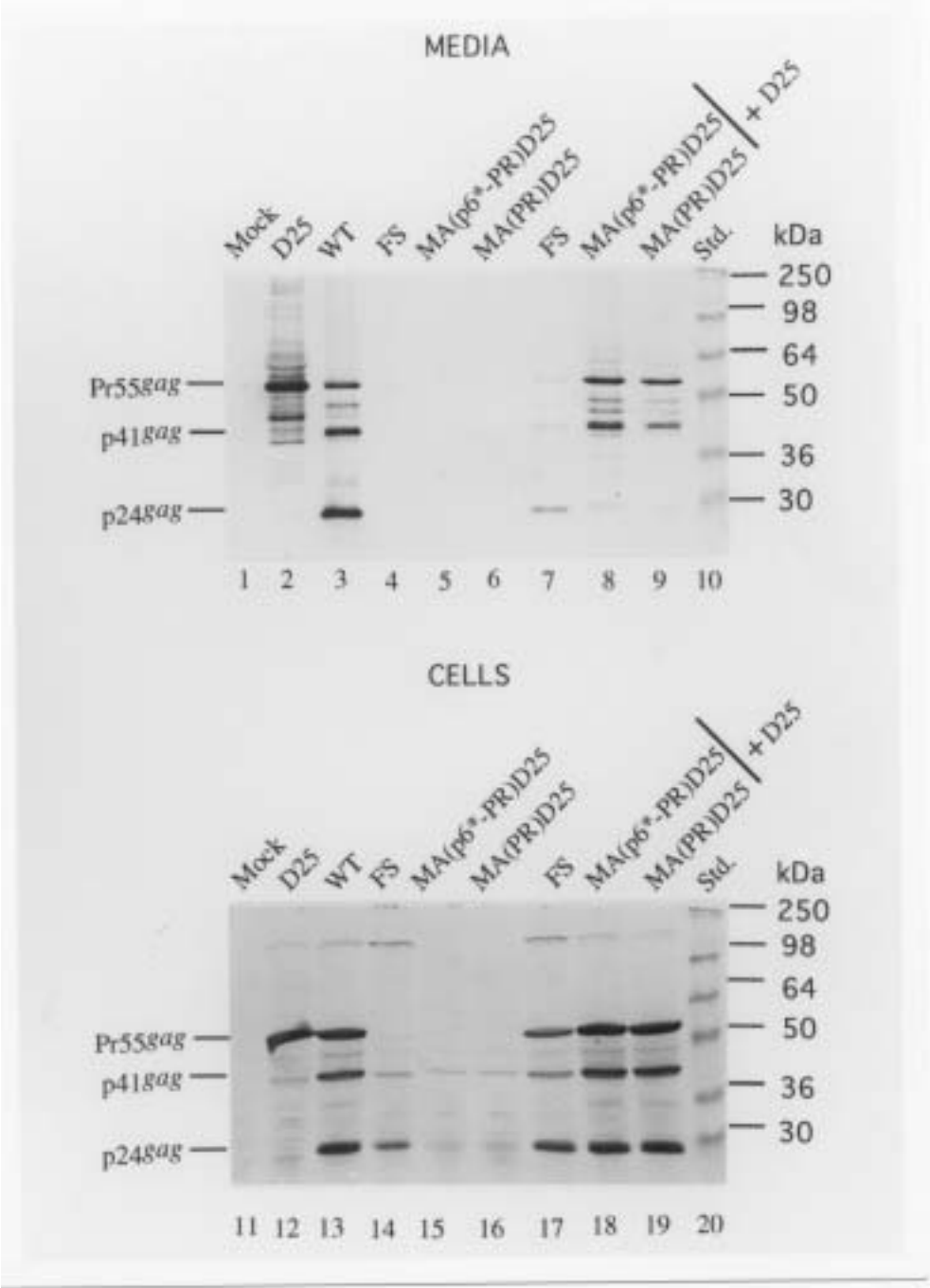


Figure 2

