

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08499

研究課題名(和文) 新規インターフェロン 誘導性ミトコンドリア蛋白質によるウイルス感染抑制機構の解明

研究課題名(英文) Understanding the mechanism by which an interferon-gamma-induced, mitochondria-localized novel protein inhibits virus infection

研究代表者

久保 嘉直 (KUBO, Yoshinao)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：30273527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：宿主はウイルス感染を抑制する様々な因子を持っているが、それらの全容は不明である。本研究では新規ウイルス防御因子を同定することを目標とした。この研究成果は、ウイルス感染症に対する新規治療薬の開発に貢献する。宿主ウイルス防御因子の多くはインターフェロンによって誘導されるので、インターフェロンによって発現が増加する宿主因子をマイクロアレイにより同定し、それらのヒト免疫不全症ウイルス(HIV)感染に及ぼす影響を網羅的に解析した。その結果、IFI6、FAT10、IDO1がHIV感染を抑制することを突き止めた。IDO1は必須アミノ酸トリプトファン分解によるオートファジー誘導を介してHIV感染を抑制した。

研究成果の概要(英文)：Hosts contain factors that inhibit virus infection, but many host anti-virus factors are waiting to be identified. In this research, we aimed to identify novel host anti-virus factors. This study would contribute to development of novel therapy against virus infection. Because many of such anti-virus factors are induced by interferon, we first identify interferon-induced factors by microarray. Then, impacts of the interferon-induced factors on human immunodeficiency virus (HIV) infection was comprehensively analyzed. As the result, we found that IFI6, FAT10, and IDO1 inhibit HIV infection. IDO1 catalyzes one of the essential amino acids, tryptophan, and induces autophagy. IDO1 inhibits HIV infection through tryptophan depletion-induced autophagy.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV インターフェロン

1. 研究開始当初の背景

多くの細胞は、ウイルスを感知すると I 型インターフェロン (IFN) を分泌するが、II 型 IFN を発現するのは免疫細胞のみである。I 型 IFN である IFN- $\alpha$  や  $\beta$  による HIV 感染抑制機構は精力的に研究されている。これらの IFN によって発現が増加し HIV 増殖を抑制する宿主防御因子は APOBEC3G や tetherin など既に幾つか同定された。一方、II 型 IFN である IFN- $\gamma$  も HIV ベクター感染を抑制するが、あまり研究されておらず、そのメカニズムは不明である。我々は、以前に IFN- $\gamma$  によって誘導される Gamma-IFN inducible Lysosomal Thiolreductase (GILT) がウイルスのエンベロープ蛋白質の S-S 結合を切断することにより HIV を含む様々なウイルス感染を抑制することを発見した。TE671 細胞における shRNA による GILT のノックダウンは、IFN- $\gamma$  の感染抑制作用を消失させたが、HeLa 細胞では消失しなかった。この結果は、HeLa 細胞では GILT 以外の HIV 感染を抑制する宿主防御因子が IFN- $\gamma$  によって誘導されることを示している。その防御因子を同定するため、IFN- $\gamma$  によって発現が増加する細胞因子をマイクロアレーにより解析し、それらの HIV ベクター感染に及ぼす影響を網羅的に測定した。その結果、FAT10 と IFI6 が感染を抑制することを突き止めた。FAT10 はユビキチン様蛋白質で標的蛋白質に結合した後、プロテアソーム分解を誘導することが知られている。IFI6 はミトコンドリアに局在することから、HIV 感染においてミトコンドリアが関与する可能性が考えられた。しかし、IFI6 の生物学的機能は未だに不明である。

2. 研究の目的

IFN- $\gamma$  によって発現が増加する細胞因子の中で、まだ HIV ベクター感染に及ぼす影響を測定していない因子が存在したので、それらの影響を測定する。FAT10、IFI6、新たに同定した防御因子の HIV ベクター感染抑制機構を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

マイクロアレーの結果、IFN- $\gamma$  により発現が増加することが分かった細胞因子の cDNA を RT-PCR を用いて単離した。その cDNA を発現するマウス白血病ウイルスベクターを構築し、その細胞因子を安定的に発現する HeLa 細胞を作成した。それらの細胞に、LacZ もしくは Luciferase をマーカーとしてコードする HIV ベクターを接種し、感染価を測定した。目的細胞因子をノックダウンした細胞は、それに対する shRNA を発現するレンチウイルスベクターを接種して構築した。目的蛋白質の発現はウエスタンブロッティングによって解析した。

4. 研究成果

まだ解析していなかった細胞因子の HIV ベクター感染に及ぼす影響を測定した結果、新たに IDO1 が HIV ベクター感染を抑制する宿主防御因子として働くことを突き止めた。最終的に、HIV ベクター感染を抑制する新規宿主因子 FAT10、IFI6、IDO1 の 3 つの因子を発見した (図 1)。

FAT10 はユビキチン様蛋白質である。HA タグが結合した FAT10 を恒常的に発現する HeLa 細胞を構築した。この細胞も HIV ベクターに対する感受性が低かった。その細胞をプロテアソーム阻害剤で処理すると FAT10 蛋白質量が増加した。これらの結果から、IDO1 はウイルス蛋白質もしくは感染に必須な宿主蛋白質のプロテアソーム分解を誘導することにより感染を抑制すると考えられた。この細胞に HIV ベクターを接種し、3 時間後にプロテアソーム阻害剤 3 時間処理を行い、cell lysate を調製した。抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロット解析の結果、HIV ベクターを接種した細胞において、接種していない細胞には存在しない蛋白質は検出されなかった。しかし、接種した細胞においても接種しなかった細胞においても、FAT10 よりも分子量の大きな蛋白質が検出された。これらの結果は、FAT10 が HIV 感染に必須な細胞因子の分解を誘導することにより HIV 感染を抑制することを示唆している。

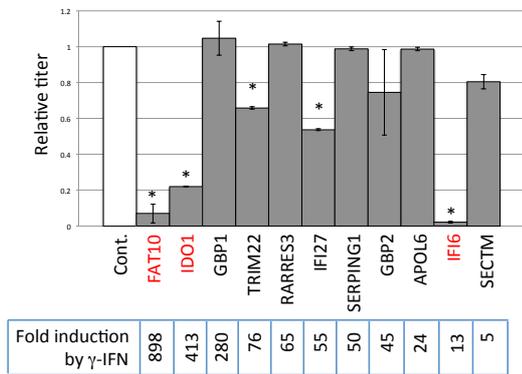


図 1 IFN- $\gamma$  誘導性因子の HIV ベクター感染に及ぼす影響

IFI6 を安定的に発現する HeLa 細胞およびコントロール細胞に HIV ベクターを接種し、逆転写産物を PCR で解析した。その結果、IFI6 発現細胞では逆転写産物が検出されなかった。この結果は、IFI6 が HIV 増殖サイクルの逆転写以前の過程を抑制していることを示している。IFI6 は、他に類似した細胞因子が存在せず、その機能もまったく解明されていない。IFI6 による HIV 感染抑制機構は、現在も継続して分析している。

IDI1 は必須アミノ酸であるトリプトファンを代謝する酵素である。過剰量のトリプトワンの添加は、IDO1 の HIV 感染抑制作用を消失させた (図 2)。次に、HIV ベクター接種後 3 日目に過剰量のトリプトファンを添加し、感染価を測定した。それでも感染価を測定するためのマーカー蛋白質発現は低いま

までであった。宿主染色体 DNA にインテグレートした HIV ベクターゲノムを PCR により増幅した結果、IDO1 発現細胞では PCR 産物は検出されなかった。これらの結果は、トリプトファン代謝がマーカー蛋白質の合成を抑制し、感染が低下したように見えた訳ではなく、IDO1 が HIV ベクター感染そのものを抑制したことを示している。IDO1 はトリプトファンを枯渇することによりオートファジーを誘導すること、オートファジーは HIV 感染を抑制することが既に知られていた。事実、IDO1 発現細胞では LC3-II レベルが高く、オートファジーが誘導されていた (図 3)。オートファジーに必須な Atg3 をノックダウンすると、IDO1 の HIV 感染抑制活性が低下した (図 4)。IDO1 はトリプトファン代謝によりオートファジーを誘導し、そのオートファジーが HIV 感染を抑制することを突き止めた。

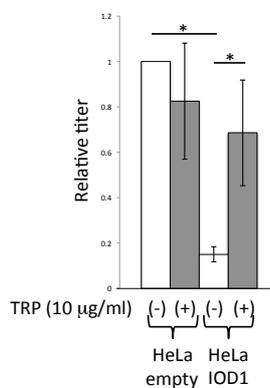


図 2 過剰量のトリプトファンは IDO1 の HIV 感染抑制活性を低下させる

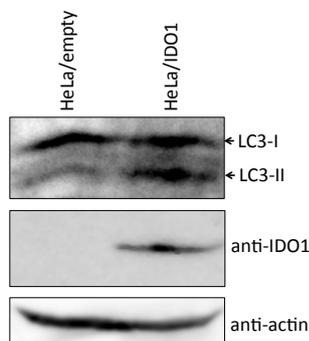


図 3 IDO1 はオートファジーを誘導する

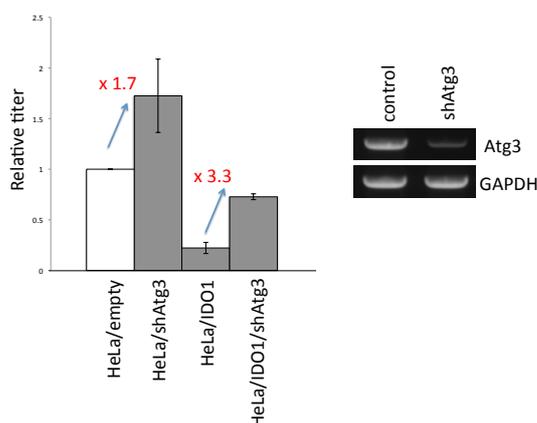


図 4 Atg3 ノックダウンは IDO1 の HIV 感染抑制活性を低下させる

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. K. Yasui, M. Izumida, T. Nakagawa, Y. Kubo, H. Hayashi, T. Ito, H. Ikeda, T. Matsuyama. MicroRNA-3662 expression correlates with antiviral drug resistance in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, in press, 2018. (査読有)
2. H. Hayashi, Y. Kubo, M. Izumida, E. Takahashi, H. Kido, K. Sato, M. Yamaya, H. Nishimura, K. Nakayama, T. Matsuyama. Enterokinase enhances influenza A virus infection by activating trypsinogen in human cell lines. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Vol. 8, 2018, Article 91. (査読有) Doi:10.3389/fcimb.2018.00091.
3. Y. Kubo, H. Masumoto, M. Izumida, K. Kakoki, H. Hayashi, T. Matsuyama. Rab3a-bound CD63 is degraded and Rab3a-free CD63 is incorporated into HIV-1 particles. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 6, 2017, Article 1653. (査読有) Doi:10.3389/fmicb.2017.01653.
4. Y. Kubo, M. Izumida, Y. Yashima, H. Yoshii-Kamiyama, Y. Tanaka, K. Yasui, H. Hayashi, T. Matsuyama. Gamma-interferon-inducible, lysosome/endosome-localized thiolreductase, GILT, has anti-retroviral activity and its expression is counteracted by HIV-1. *Oncotarget*, Vol. 7, 2016, pp71255-71273. (査読有) Doi:10.18632/oncotarget.12104.

[学会発表] (計 4 件)

1. Y. Kubo, M. Izumida, H. Hayashi. Rab3a, a small GTP-binding protein, is required for virion formation of murine leukemia virus. 29th International Workshop on Retroviral Pathogenesis, 2017, Czech.
2. Y. Kubo, M. Izumida, H. Hayashi. Rab3a is required for virion production of murine leukemia virus. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017 年、大阪.
3. Y. Kubo, M. Izumida, H. Masumoto, K.

Yasui, H. Hayashi, T. Matsuyama. Role of a small GTP-binding protein, Rab3a, in virion formation of HIV-1. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年、札幌.

4. Y. Kubo, M. Izumida, H. Masumoto, K. Yasui, H. Hayashi, T. Matsuyama. Identification of a CD63 binding protein and its role in HIV replication. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年、福岡.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久保 嘉直 (KUBO, Yoshinao)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)  
准教授  
研究者番号 : 30273527

### (2) 研究分担者

安井 潔 (YASUI, Kiyoshi)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)  
助教  
研究者番号 : 50372777