

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07105

研究課題名(和文) HIVプロテアーゼによる自然免疫回避機構の解明

研究課題名(英文) Identification of host factors cleaved by HIV protease for elucidating the mechanism of innate immune evasion.

研究代表者

松永 智子 (MATSUNAGA, Satoko)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20779342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：HIVが感染細胞から排除されない要因の一つとして、自然免疫応答が十分に活性化しないことが挙げられる。本研究では、HIVプロテアーゼが宿主自然免疫関連因子を直接切断することで免疫応答活性化を抑制する可能性を検証した。In vitro 基質切断アッセイ系を用いて、HIVプロテアーゼが4種類の自然免疫関連因子を切断することを見出し、そのうちプログラム細胞死に関与するカスパーゼ1に着目した。培養細胞を用いた共発現系においても、カスパーゼ1はHIVプロテアーゼにより切断され、また細胞傷害性マーカーの上昇が見られたことから、HIVプロテアーゼがカスパーゼ1を介した細胞死へ導くことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the cleavage of host factors related to innate immune response by HIV protease (HIV-PR). We identified 4 host substrates being cleaved by HIV-PR using in vitro assay system with recombinant proteins. Among them, we selected CASP1 since it is a key factor for pyroptotic cell death. We confirmed that HIV protease cleaved CASP1 in cells leading to the secretion of intracellular LDH to extracellular space due to the cell membrane damage. We also found that a protease inhibitor DRV specifically suppressed the CASP1 cleavage and resultant cell toxicity by HIV-PR. These results indicate a possibility that HIV-1 protease is involved in the pyroptotic cell death mediated CASP1.

研究分野：タンパク質工学、ウイルス学

キーワード：HIV プロテアーゼ 自然免疫 細胞死

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染に対する生体防御として、パターン認識受容体 (PRRs) とよばれる受容体分子群がウイルス抗原すなわち病原体由来分子パターン (PAMPs) を認識することで自然免疫が活性化され、型インターフェロン (IFN) が誘導される。IFN は感染細胞および周囲の非感染細胞において IFN 誘導遺伝子 (ISG) の発現を誘導することで、ウイルスの増殖が阻止される。一方、エイズの原因であるヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染細胞では、自然免疫応答が十分誘導されないため、ウイルスが除去されず、慢性持続感染が成立すると考えられている。しかしながら、HIV がどのようにして自然免疫応答を抑制しているかについてはいくつか報告がされている。HIV は自然免疫回避機構として、ウイルスカプシドタンパク質および宿主タンパク質群による Cloaking (隔離) 機構が明らかとなっている (Rasaiyaah et al., Nature, 2013)。

HIV 感染様式には、ウイルスが直接細胞に感染する cell-free 感染系以外に感染細胞と非感染細胞間で直接ウイルスを受け渡す cell-to-cell 感染系がある。Cell-to-cell 感染系では、cell-free 感染系と比較して約 1000 倍のウイルスが直接非感染細胞へ受け渡されると言われており、Cloaking が十分に行われなため、自然免疫シグナルが活性化しやすと考えられる。さらに、局所的にウイルス構成員濃度が高くなり、逆転写阻害剤などの治療薬の細胞内薬効効果が相対的に低くなることも知られている。しかしながら、HIV 感染細胞では自然免疫応答が十分に活性化されてないことから、Cloaking 機構以外にも自然免疫応答を抑制する手段を有することが強く示唆される。そこで本研究では、HIV プロテアーゼ (HIV-PR) が自然免疫応答に関連する宿主因子を切断することで自然免疫応答を回避しているのではないかという仮説に基づき研究を実施した。

2. 研究の目的

HIV-PR は、HIV 粒子内で HIV 前駆体タンパク質を切断することで構造タンパク質や酵素タンパク質を生成し、ウイルスの成熟化と感染性ウイルスを産生に重要な役割を果たす。近年、HIV-PR が感染細胞内でリン酸化酵素や翻訳開始因子などの宿主因子を切断し、細胞内環境を変化させることで、ウイルス複製を促進することが報告されている。そこで、本研究では、HIV-PR が宿主自然免疫関連因子を切断し不活化することにより、自然免疫シグナルの活性化を阻止しているのではないかという仮説のもと研究を進めた。すなわち、HIV-PR による新たな自然免疫回避機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて、活性型 HIV-PR と 19 種類の宿主自然免疫関連因子のリコンビナントタンパク質を作製し、in vitro 基質切断アッセイを行なった。基質切断には、図 1 に示すアルファスクリーンを用いた近接ホモジニアスアッセイと 2 色イムノプロット法を用いて切断を確認した。切断が確認された基質候補因子に関して、培養細胞でも同様に HIV-PR によって切断されるかどうか、また不活性型 HIV-PR や HIV-PR 阻害剤によって切断が阻害されるかどうか確かめた。また、候補因子の本来の機能が HIV-PR の切断により影響を受けるかどうか in vitro、in vivo 両面から解析を行なった。

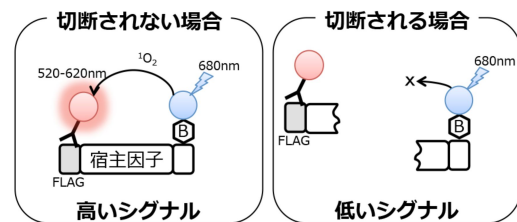


図 1. AlphaScreen 法を用いた HIV-PR による基質切断アッセイ

4. 研究成果

(1) リコンビナントタンパク質を用いた HIV-PR に切断される宿主因子の探索

HIV プロテアーゼの基質となりうる新たな宿主因子を探索するため、19 種類の宿主自然免疫関連因子を選出し、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて N 末端に FLAG タグ、C 末端に Biotin 化したリコンビナントタンパク質を合成した。これらリコンビナントタンパク質とコムギ無細胞系を用いて作製した活性型 HIV-PR または不活性型 HIV-PR D25N を用いて in vitro 基質切断アッセイ系を行なった。AlphaScreen 法の結果とイムノプロットでの結果、4 種類の宿主因子が切断されることがわかった (図 2)。

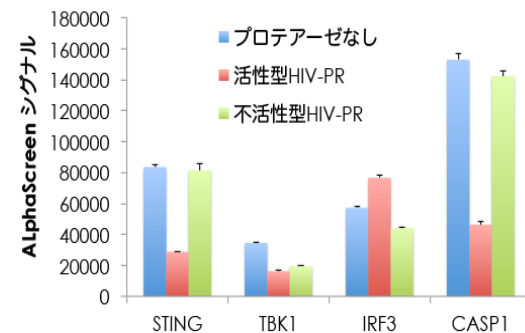


図 2. AlphaScreen 法を用いた基質切断アッセイの結果。各宿主因子が HIV-PR によって切断される場合、AlphaScreen シグナルが低くなるため、STING や CASP1 は HIV-PR の基質となる可能性が示唆された。

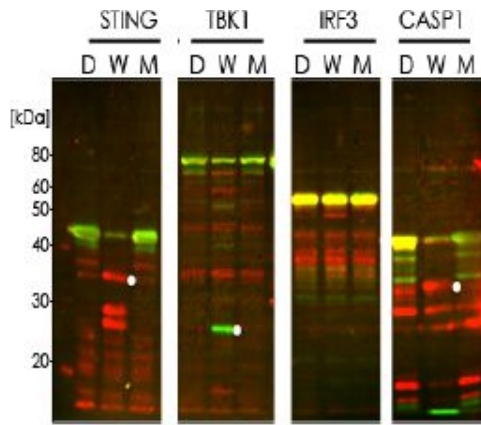


図3. 2色イムノブロット法を用いた HIV-PR によって切断される宿主因子。N 末端フラグメントが緑、C 末端フラグメントが赤、切断されてないと黄に見える。D: プロテアーゼなし、W: 活性型 HIV-PR、M: 不活性型 PR。

(2) 培養細胞を用いた候補因子の切断確認

(1)で切断が確認された候補因子が培養細胞でも切断されるかどうか確かめるため、HIV-PR と候補因子を共発現させ、イムノブロット法を用いて切断を確認した。その結果、4つのうち3つの宿主因子が HIV-PR 量依存的に切断されることが明らかとなった。これらの中から、インフラマソームに引き続き炎症性サイトカインの産生やプログラム細胞死の一つであるピロトーシスに関するカスパーゼ1 (CASP1) についてより詳細な解析を行なうこととした(図4)。

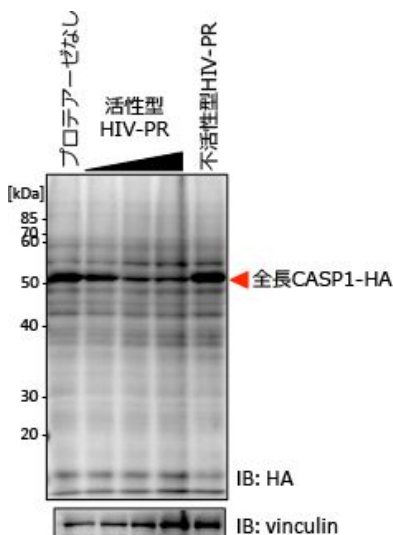


図4. 293A 細胞に HIV-PR と CASP1 を共発現させると、HIV-PR 量依存的に全長 CASP1 のバンドは減少する。

(3) HIV-PR と CASP1 の共発現における細胞傷害性への影響

次に細胞内における HIV-PR と CASP1 の

相互作用を調べるため、活性型 HIV-PR と CASP1 を共発現させた後、細胞ライセートにおける CASP1 の切断および培養上清に遊離される細胞障害マーカーである乳酸脱水素酵素 (LDH) を測定した。その結果、HIV-PR 単独発現細胞と比較して HIV-PR と CASP1 との共発現細胞において特異的に CASP1 の切断が認められ (図4) LDH の細胞外への遊離が増加していた (図5)。これら現象は、HIV-PR の阻害剤であるダルナビル (DRV) を加えることで抑制されることから、HIV-PR が CASP1 を切断することで、細胞傷害を誘発することが示唆された。

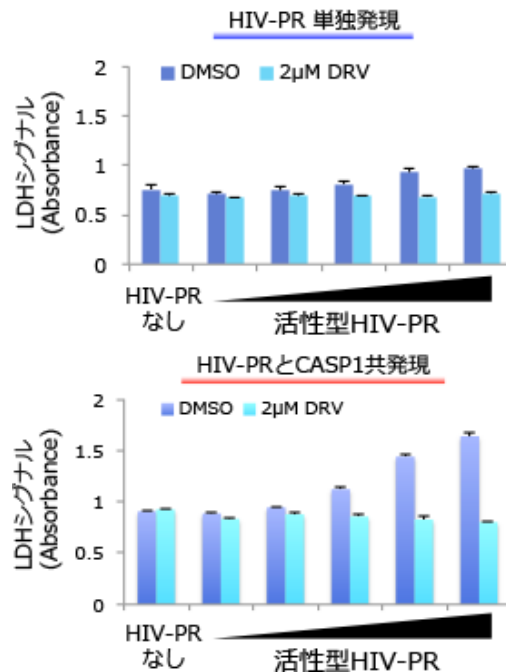


図5. HIV-PR 単独発現 (上) および CASP1 との共発現 (下) における細胞障害性への影響。細胞上清中に分泌される LDH の量を指標として測定した。

(4) HIV-1 の切断による CASP1 の機能への影響

CASP1 はシステインプロテアーゼであり、細胞内では刺激を受けた後、自己切断により活性化し、炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 やピロトーシスの重要因子であるガスダーミン D (GSDMD) などの宿主タンパク質を切断することが知られている。そこで、HIV-PR に切断された CASP1 が本来の機能を持つかどうか調べるため、コムギ無細胞系を用いて確かめた。活性型 CASP1 は、コムギ無細胞合成系での透析法を用いて合成することで、合成中に自己切断し活性を保持することがわかった。まず、活性型 CASP1 と HIV-PR または HIV-PR D25N を合成後に混合し反応を行なった後に、CASP1 の本来の基質である GSDMD を加え、GSDMD が切断されるかどうか確認した。その結果、GSDMD の切断が確認できたことが

ら、活性型 CASP1 の存在下では HIV-PR の切断に関わらず CASP1 の活性に影響しないことが示唆された。次に、共発現における CASP1 の切断機能の保持を確認するため、HIV-PR または HIV-PR D25N と全長 CASP1 を透析法にて共発現させた。これらタンパク質と GSDMD を用いて切断反応を行なった結果、合成中に CASP1 は HIV-PR によって切断されるためバンドが確認できず、また本来の基質である GSDMD の切断が確認できなかった。

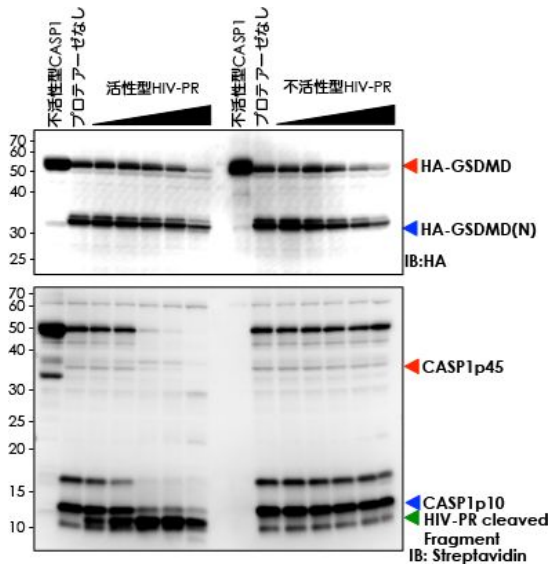


図 6. 個別に合成した活性型 CASP1 と HIV-PR を混合し、切断反応を行なった後、切断された CASP1 による GSDMD の切断。

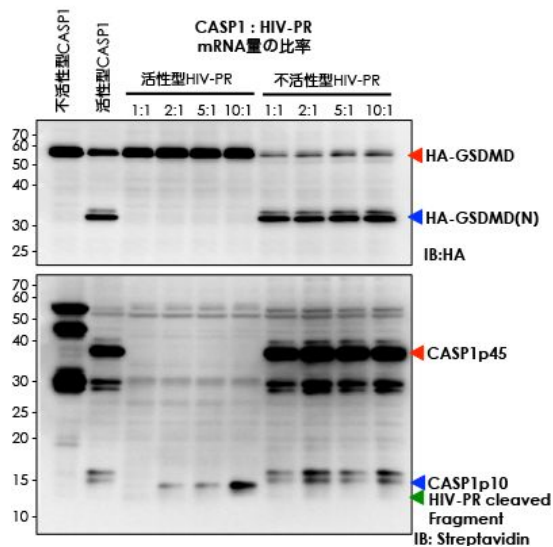


図 7. HIV-PR と共発現系した CASP1 による GSDMD の切断。

(5) 総括

リコンビナントタンパク質を用いた基質切断アッセイ系を用いて、HIV-PR の基質なる宿主因子 CASP1 を新たに同定した。HIV-PR による CASP1 の切断は、CASP1 の活性化を導き、CASP1 による GSDMD の切

断を誘導した。今後は、生化学的解析を進めると共に、HIV 感染細胞において本現象を検証し、HIV 感染に伴う細胞死や自然免疫回避機構の解明を目指したい。

5. 主な発表論文等 なし

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 松永智子、松島勇紀、森下了、黒田誠、梁明秀、Protein Active Array を用いたヒト血清中に含まれる抗ウイルス抗体の検出、第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017 年 10 月 24 日～26 日、大阪国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者
松永 智子 (MATSUNAGA, Satoko)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：20779342

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし