

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590480

研究課題名（和文）イノシトールリン酸による HIV 複製の制御

研究課題名（英文）Regulation of HIV replication by inositol phosphates

研究代表者

藤田 美歌子 (FUJITA MIKAKO)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号：00322256

研究成果の概要：エイズウイルス (HIV) が細胞から出芽する際に、HIV の持つ Gag 蛋白質が細胞膜に結合する。この際、細胞膜に存在する低分子有機化合物であるイノシトールリン酸と Gag との相互作用が重要であることが知られるが、その詳細は明らかでなかった。本研究では、イノシトールリン酸類と様々な蛋白質の弱い相互作用を高感度で観察する実験系を構築し、HIV 蛋白質とイノシトールリン酸類との結合の強さを定量した。その結果、Gag やその他の膜結合性 HIV 蛋白質などに関していくつかの新しい知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：エイズ・HIV・イノシトールリン酸・Gag・MA・NC・Vpu・Biacore

1. 研究開始当初の背景

エイズは患者数が増加しているにもかかわらず、未だに人類が克服できていない重篤な疾患である。そのため、優れた治療法の開発が望まれている。エイズの主要な原因ウイルスは、ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (Human Immunodeficiency Virus type 1; HIV-1) である。HIV-1 は、構造蛋白質 (Gag, Pol, Env)、

調節蛋白質 (Tat, Rev)、およびアクセサリ蛋白質 (Vif, Vpr, Vpu, Nef) を持つ。1980 年代前半に HIV-1 が発見されて以来、ヒトの様々な生体システムを巧みに利用した複製様式が次第に明らかにされてきた。そのうちいくつかの知見は、決定的なものではないがエイズ治療法の開発にもつながった。

一方イノシトールリン酸は、ヘキサヒドロキシシクロヘキサン環 (イノシトール環) に

リン酸基が結合した単純な構造を持つ低分子の有機化合物である。生体内ではホスファチジル誘導体として細胞膜に存在するが、その誘導体はホスホリパーゼCによって加水分解を受け、生じたイノシトールリン酸は細胞質に放出される。いずれの場合においてもイノシトールリン酸はセカンドメッセンジャーとして働き、エンドサイトーシス、細胞骨格制御、細胞内輸送、カルシウム放出などを始めとした多様な細胞機能の調節に関わることが知られる。

近年、細胞からの HIV-1 ビリオン放出に宿主が持つイノシトールリン酸が必須であることが、その代謝に関わる酵素の強制発現などの実験により示唆された(Ono, A. et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101: 14889-14894.)。また、実際に HIV-1 Gag の MA 蛋白質とイノシトールリン酸が直接に相互作用することが、mass spectrometric protein footprinting や NMR を用いた実験により示された(Shkriabai, N. et al. Biochemistry, 2006, 45: 4077-4083; Saad, J.S. et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103: 11364-11369.)。この NMR 実験からは、ミリスチル化された MA 蛋白質が、細胞膜に挿入したホスファチジルイノシトールリン酸とどのように結合するかを示した興味深いモデルも提唱された。このように、それぞれ精力的に展開されてきた HIV 研究とイノシトールリン酸研究につながりがあることが示されつつある。しかしながらこの境界領域は、ほとんど未開拓であったと言える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、イノシトールリン酸がどのように HIV-1 複製を制御しているのかについて明らかにするとともに、最終的にはその知見に基づいて HIV-1 阻害剤を創製することである。具体的には、HIV-1 Gag MA 蛋白質が細胞膜に存在するイノシトールリン酸と結合することを介してウイルス放出がおこることが既に示唆されているが、その詳細を明らかにする。また、MA 蛋白質とイノシトールリン酸の結合を阻害することで HIV-1 複製を抑制する阻害剤を創る。さらに、イノシトールリン酸が MA 蛋白質以外の HIV-1 蛋白質に作用して HIV-1 複製に関わるかどうかについて明らかにする。このことが明らかになれば、その関与の詳細についても調べる。さらに、その蛋白質とイノシトールリン酸の結合を阻害することで HIV-1 複製を抑制する阻害剤を創る。

3. 研究の方法

pSG5 および pEF1/*Myc*-His A に、C 末端に FLAG タグを持つ様々な HIV 蛋白質をコードする遺伝子配列を挿入し、発現ベクターを構築した。これらのベクターをリン酸カルシウム法により 293T 細胞に導入した。2 日後に細胞抽出液を抽出し、FLAG 抗体を用いた Western blot 解析を行った。これにより、pSG5 および pEF1/*Myc*-His A のどちらのベクターを使った方が発現量が高くなるかを各蛋白質について調べ、発現量の高いベクターを以後の解析に用いることにした。ベクター導入 293T 細胞の抽出液から FLAG 抗体アガロースを用いて蛋白質を精製し、SDS-PAGE を行った。ゲルを CBB 染色し、バンド強度から蛋白質濃度を算出した。

このようにして調整した蛋白質とイノシトールリン酸類との結合を、Biacore により解析した。Biacore においてはセンサーチップストレプトアビジンを用い、合成したピオチン化イノシトールリン酸 (Anraku, K. et al. Organic & Biomolecular Chemistry, 2008, 6: 1822-1830.) を固定化して蛋白質を流した。競合阻害実験の場合には、蛋白質を流す際に濃度の異なるイノシトールリン酸類を加えた。測定は、流速 20 μ l/min、結合/解離 = 180 秒/60 秒の条件において行い、150-170 秒後の平均結合量を算出した。

4. 研究成果

(1) pSG5 および pEF1/*Myc*-His A のどちらのベクターに導入した方が 293T 細胞内での発現量が高くなるかを、それぞれの HIV-1 蛋白質について調べた。その結果、Gag、Vpr では pSG5 に導入した方が発現量が高く、MA、CA、Vpu、Nef では pEF1/*Myc*-His A に導入した方が発現量が高かった。p1-p6 (Gag の p1 から p6 までの領域)、NC では 2 つのベクター間で発現量に差が見られなかった。また、p6 については、どちらのベクターを用いても蛋白質は発現しなかった。発現量が多い方のベクターを用いて、以後の解析を行った。

(2) mock サンプル (pSG5 または pEF1/*Myc*-His A の空ベクターを導入した 293T 細胞の抽出液を FLAG 抗体アガロースで処理したものを) を Biacore に流した場合においても、固定化したピオチン化イノシトールリン酸との弱い相互作用が観察された。この非特異結合を消失させるために種々検討した結果、FLAG 抗体アガロースを用いた蛋白質精製時に、低用量 (0.5 μ M) の FLAG ペプチドを存在させると非特異結合が完全に消失することがわかった。これは、抗体の FLAG 認識部位が細胞抽出液中の夾雑物 (イノシト

ールリン酸と弱い相互作用を持つ)と結合するが、それが FLAG ペプチドによりブロックされるためと考えられる。この精製条件を用いて以後の解析を行うことにした。

(3) MA および Gag はイノシトールリン酸類と結合することがわかった。解離定数(μM)を競合阻害実験により求めた。結果を以下に示す。

MA-1,4,5-IP3	626 ± 20
MA-1,4,5-PIP2	24 ± 3.9
Gag-1,4,5-IP3	749 ± 146
Gag-1,4,5-PIP2	30 ± 4.0
Gag-1,3,4-IP3	385 ± 38
Gag-1,3,4,5-IP4	564 ± 80
Gag-1,3,4,5-PIP3	11 ± 3.0
Gag-PPP	1180 ± 271

なお、PIP2 および PIP3 は炭素数 6 の脂肪鎖を持つ。また、PPP は sodium triphosphate を示す。これらの結果から以下のことが言える。

イノシトールリン酸が脂質部位を持つと、持たない場合に比べて結合の強さが 25 倍程度上昇する。Gag が細胞膜に結合する際においても脂質部位が重要な役割を果たしていることが予想される。

全長の Gag とその一部である MA との間では、イノシトールリン酸類に対する結合の強さにほとんど差がない。

イノシトールのリン酸類のリン酸基が 1,4,5 位にある場合、1,3,4 位にある場合、1,3,4,5 位にある場合では、全長の Gag に対する結合の強さにほとんど差がなく、リン酸基の位置は結合に重要でないことがわかった。

PPP においても弱い結合が見られたことからイノシトール環が結合に必須でないことが示された。

(4) Gag の一部である CA はイノシトールリン酸との結合を持たないことがわかった。

(5) Gag の一部である p1-p6 (Gag の p1 から p6 までの領域、NC を含む)および NC がイノシトールリン酸との結合を示した。NC が多く持つ塩基性アミノ酸が、イノシトールリン酸との結合に関与していると予測できる。この結合のウイルス学的意義を明らかにするとともに、結合の強さを競合阻害実験により求める予定である。

(6) Gag が細胞膜に結合する際、イノシトールリン酸との結合の他に、Gag がミリスチル化を受けミリスチル基が細胞膜との相互作用を持つことも関わることが知られる。一方

アクセサリー蛋白質の Nef も Gag と同様ミリスチル化を受ける膜蛋白質であることが明らかにされている。そこで、Nef はイノシトールリン酸と結合するのかがどうかについて調べたところ、脂質部位を持たないイノシトールリン酸とは結合しないことがわかった。現在、脂質部位を持つとどうなるかについて調べているところであるが、同じミリスチル化を受ける蛋白質である Nef と Gag との間で細胞膜との結合の様式が異なることが示された。

(7) 細胞膜に結合することが知られる別のアクセサリー蛋白質 Vpu はイノシトールリン酸との結合を持つことが示唆された。明確なデータを得るためには Vpu の発現を上昇させる必要があり、そのためコドンの最適化を行った *vpu* 遺伝子配列を持つ発現ベクターの構築を現在行っている。

(8) アクセサリー蛋白質 Vpr はイノシトールリン酸との結合を持たないことが示された。

以上のように、世界に先駆けてイノシトールリン酸類と様々な蛋白質の弱い相互作用を高感度で観察する実験系を構築し、HIV 蛋白質とイノシトールリン酸類との結合の強さを定量した。その結果、Gag やその他の HIV 蛋白質に関していくつかの新しい知見を得た。これらの知見に基づいて、新規抗 HIV 薬の設計が可能であると考えられる。

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)

[学会発表](計 2 件)

藤田美歌子、HIV-1 蛋白質とイノシトールリン酸との結合解析、第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年 11 月 26 日、大阪国際交流センター

安楽健作、HIV-1 複製に關与するイノシトールリン酸と Gag 関連蛋白質との結合解析、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26 日、岡山コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 美歌子 (FUJITA MIKAKO)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授
研究者番号：00322256

(2) 研究分担者

大塚 雅巳 (OTSUKA MASAMI)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号：40126008

岡本 良成 (OKAMOTO YOSHINARI)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教
研究者番号：20194409