

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07593

研究課題名(和文) 海産下等動物を利用したHIV増殖を抑制する新規宿主防御因子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel host anti-HIV-1 factors using sea lower animals

研究代表者

久保 嘉直 (Kubo, Yoshinao)

長崎大学・熱帯医学研究所・准教授

研究者番号：30273527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前に海産下等動物ホヤに存在する化合物lamellarin alpha 20-sulfateがHIV-1増殖を抑制することを報告した。この化合物は新型コロナウイルスとエボラウイルスによる感染も抑制することを突き止めた。また、我々は以前にヒトgamma-interferon inducible lysosomal thiol reductase (GILT)が、S-S結合切断活性により様々なウイルス感染を抑制することを示した。一方、下等動物GILTはS-S結合切断活性を持っていないが、抗ウイルス活性を持っており、GILTの本来の機能が抗ウイルスであることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既に様々なウイルス感染症治療薬が開発されたが、変異率の高いウイルスは容易に耐性ウイルスに進化する。この問題を解決するためには、作用機序の異なる様々な抗ウイルス薬の開発が重要である。本研究は、この問題を解決する一助となる。またGILTは、これまで獲得免疫において機能する宿主因子と考えられていた。しかし、獲得免疫のない下等動物にも存在し、下等動物におけるGILTの機能は不明であった。この研究は、GILTの本来の機能は抗ウイルスであり、高等動物に進化する過程で、獲得免疫にも関与するようになったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported the inhibition of HIV-1 replication by lamellarin alpha 20-sulfate that is present in sea squirt. This study found that the chemical also inhibits infection by SARS-CoV-2 and Ebola virus. We have previously reported the inhibition of various viral infections by human gamma-interferon inducible lysosomal thiol reductase (GILT) via its disulfide bond digestion activity. However, GILT homologues of lower animals have antiviral activity but not disulfide bond digestion activity. This finding indicates that the original function of GILT is antiviral activity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：GILT 獲得免疫 下等動物 lamellarin alpha

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

HIV-1 感染症に対する治療薬は既に幾つか開発された。しかし、耐性ウイルスが出現する問題が存在し、作用機序の異なる新規治療薬の開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

我々は宿主防御因子を同定し、その作用機序を真似た新規治療薬の開発を目指している。ヒトにも防御因子が存在する。しかしヒトウイルスはヒトにおいて効率よく増殖する。これはヒトウイルスがヒト防御因子を回避する能力を持っていることを示している。そのため、ヒトウイルスがこれまで出会ったことがなく、回避することのできない防御因子を利用することが重要である。

下等動物は獲得免疫がなく、防御因子のみでウイルスから身を守っている。よって下等動物は多くの防御因子を持ち、その中にはヒトウイルス感染を抑制する因子が含まれている可能性がある。そこで、海産下等動物から HIV-1 感染を抑制する防御因子を同定し、その作用機序の同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

- これまでに我々が同定した防御因子 GILT と lamellarin alpha 20-sulfate に関する研究
- クルマエビから HIV-1 感染を抑制する新規防御因子を単離する研究

### 4. 研究成果

エビ GILT は抗ウイルス活性を持っているが S-S 結合切断活性を持っていない

高等動物が持つ gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT) はマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞において恒常的に発現する。GILT はその thiol reductase 酵素活性により蛋白質の S-S 結合を切断する。抗原提示細胞に貪食された抗原蛋白質の S-S 結合はリソソームにおいて切断され、その後リソソーム・プロテアーゼによる切断に対する感受性が増加する。最終的に生じたペプチドは MHC に提示され、T 細胞を活性化する。すなわち GILT は獲得免疫の開始に重要な宿主因子であると考えられていた。しかし、GILT は獲得免疫のない下等動物にも保存されており、獲得免疫の開始以外の機能を持っているが、それは不明であった。

エンベロープ膜を持つ多くのウイルスのエンベロープ蛋白質の機能は S-S 結合を必要とすることが既に示されていたので、我々は、GILT が獲得免疫因子として、ウイルス感染を抑制する機能を持っているのではないかと考えた。予想した通り、GILT はウイルス・エンベロープ蛋白質の S-S 結合を切断することにより様々なウイルス感染を抑制する防御因子として機能することを発見した。

前述したように GILT は獲得免疫のない下等動物にも保存されている。更に興味あることに、高等動物 GILT の S-S 結合を切断する酵素活性中心は CXXC であるが、節足動物 GILT は相当するモチーフが CXXS となっており、S-S 結合切断活性は消失していると考えられた。そこでブラックタイガーエビ GILT の抗ウイルス活性と S-S 結合切断活性を解析した。その結果、エビ GILT は抗ウイルス活性を持っているが、S-S 結合切断活性は検出されなかった。

これらの研究成果は、GILT の元々の機能は抗ウイルス活性であり、その後進化の過程で S-S 結合切断活性を獲得し、獲得免疫の開始にも貢献するようになったことを示唆する。

(Izumida M, Hayashi H, Smith C, Ishibashi F, Suga K, Kubo Y. Antiviral activity, but not thiol reductase activity, is conserved in interferon-gamma-inducible GILT protein in arthropod. *Mol.Immunol.* 140 (2021) 240-249)

## ラメラリン 20 硫酸と硫酸化ポリマーによるエボラウイルスと新型コロナウイルスの感染抑制

我々は以前に海産下等動物ホヤに存在し、多くの環状構造を持つラメラリン 20 硫酸が、HIV 増殖を抑制することを発見した。また硫酸基のないラメラリン には抗ウイルス活性がなかったので、硫酸基が抗ウイルス活性に重要であることを突き止めた。そこで、ラメラリン 20 硫酸とその構造類自体であるヘパリン、フコイダン、コンドロイチン硫酸、硫酸デキストランのエボラウイルスと新型コロナウイルスの感染に及ぼす影響を観察した。その結果、全ての化合物がこれらのウイルス感染を抑制することを突き止めた。その中でヘパリン、フコイダン、硫酸デキストランはウイルス粒子と標的細胞の吸着を阻害することによって感染を抑制した。またエボラウイルスの糖蛋白質とラメラリン 20 硫酸の *in silico* 解析により、ラメラリン 20 硫酸がエボラウイルス糖蛋白質の感染受容体 NPC1 結合部位近傍に結合し、それらの相互作用を阻害することにより感染を抑制することを示唆した。(Izumida M, Kotani O, Hayashi H, Smith C, Fukuda T, Suga K, Iwao M, Ishibashi F, Sato H, Kubo Y. Unique mode of antiviral action of a marine alkaloid against Ebola virus and SARS-CoV-2. *Viruses* 14 (2022) 816)

## Legmain による HIV 感染抑制

我々は宿主防御因子を同定し、その作用機序を応用した新規治療薬の開発を目指している。ヒトモウイルス感染を抑制する防御因子を持つが、ヒトウイルスはヒトにおいて効率よく増殖し病気を誘導する。これはヒトウイルスがヒト防御因子を回避する能力を持っていることを示している。よって宿主防御因子を応用した治療薬開発の研究では、ヒトウイルスが出会ったことがなく、回避することのできない宿主因子を同定しなければならない。

一方、獲得免疫のない下等動物は防御因子のみウイルスから身を守っている。よって下等動物は高等動物よりも多くの防御因子を持ち、その中にはヒトウイルスも抑制する防御因子が存在するかもしれない。そこで、我々は下等動物から HIV 増殖を抑制する防御因子を同定する研究を開始した。

一般的に宿主防御因子はウイルス感染によって発現が誘導される。白斑病ウイルスが感染したクルマエビにおいて発現が誘導される遺伝子が RNA-seq によって既に同定されていたので、その中で 100 倍以上発現が上昇し、機能が未知の因子 14 種類の発現プラスミドを構築した。それらを CD4 を発現するヒト HeLa 細胞に導入し、HIV 増殖に及ぼす影響を網羅的に観察した。その結果、legmain が HIV 増殖を抑制した。Legmain にはヒト相同体が存在するのでヒト legmain 発現プラスミドを構築した。ヒト legmain も HIV 増殖を抑制した。ヒト Jurkat T 細胞は legmain を恒常的に発現したいいたので、shRNA を用いて legmain をノックダウンした細胞を構築した。その細胞では HIV 増殖が著しく増加した。これらの研究成果は、legmain がヒト防御因子として機能していることを示している。

(投稿準備中)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Izumida Mai, Kakoki Katsura, Hayashi Hideki, Matsuyama Toshifumi, Kubo Yoshinao  | 4. 巻<br>13              |
| 2. 論文標題<br>Rab3a, a small GTP-binding protein, is required for the stabilization of the murine leukaemia virus Gag protein   | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Small GTPases  | 6. 最初と最後の頁<br>162 ~ 182 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1080/21541248.2021.1939631  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Kubo Yoshinao, Yasui Kiyoshi, Izumida Mai, Hayashi Hideki, Matsuyama Toshifumi   | 4. 巻<br>11              |
| 2. 論文標題<br>ID01, FAT10, IFI6, and GILT Are Involved in the Antiretroviral Activity of -Interferon and ID01 Restricts Retrovirus Infection by Autophagy Enhancement | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Cells  | 6. 最初と最後の頁<br>2240 ~ -  |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/cells11142240  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Izumida Mai, Kotani Osamu, Hayashi Hideki, Smith Chris, Fukuda Tsutomu, Suga Koushirou, Iwao Masatomo, Ishibashi Fumito, Sato Hironori, Kubo Yoshinao    | 4. 巻<br>14              |
| 2. 論文標題<br>Unique Mode of Antiviral Action of a Marine Alkaloid against Ebola Virus and SARS-CoV-2   | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Viruses  | 6. 最初と最後の頁<br>816 ~ -   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/v14040816  | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Izumida Mai, Hayashi Hideki, Smith Chris, Ishibashi Fumito, Suga Koushirou, Kubo Yoshinao  | 4. 巻<br>140             |
| 2. 論文標題<br>Antivirus activity, but not thiolreductase activity, is conserved in interferon-gamma-inducible GILT protein in arthropod                               | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Molecular Immunology   | 6. 最初と最後の頁<br>240 ~ 249 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.molimm.2021.10.018   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>該当する            |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Hayashi Hideki, Kubo Yoshinao, Izumida Mai, Matsuyama Toshifumi | 4. 巻<br>10            |
| 2. 論文標題<br>Efficient viral delivery of Cas9 into human safe harbor        | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>21474-- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-020-78450-8                    | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)                                    | 国際共著<br>-             |

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Yamanashi Hiroto, Nobusue Kenichi, Nonaka Fumiaki, Honda Yukiko, Shimizu Yuji, Kawashiri Shin-Ya, Izumida Mai, Kubo Yoshinao, Tamai Mami, Nagata Yasuhiro, Yanagihara Katsunori, Kulkarni Bharati, Kinra Sanjay, Kawakami Atsushi, Maeda Takahiro | 4. 巻<br>12                  |
| 2. 論文標題<br>Human T-cell lymphotropic virus type-1 infection associated with sarcopenia: community-based cross-sectional study in Goto, Japan  | 5. 発行年<br>2020年             |
| 3. 雑誌名<br>Aging   | 6. 最初と最後の頁<br>15504 ~ 15513 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.18632/aging.103736   | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する                |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Izumida Mai, Hayashi Hideki, Tanaka Atsushi, Kubo Yoshinao  | 4. 巻<br>12              |
| 2. 論文標題<br>Cathepsin B Protease Facilitates Chikungunya Virus Envelope Protein-Mediated Infection Via Endocytosis or Macropinocytosis | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Viruses   | 6. 最初と最後の頁<br>722 ~ 722 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/v12070722   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Izumida Mai, Togawa Kei, Hayashi Hideki, Matsuyama Toshifumi, Kubo Yoshinao   | 4. 巻<br>8           |
| 2. 論文標題<br>Production of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein-Pseudotyped Lentiviral Vector Is Enhanced by Ezrin Silencing | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Bioengineering and Biotechnology   | 6. 最初と最後の頁<br>368-- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fbioe.2020.00368  | 査読の有無<br>無          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-           |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Izumida Mai, Suga Koushirou, Ishibashi Fumito, Kubo Yoshinao   | 4. 巻<br>17            |
| 2. 論文標題<br>The Spirocyclic Imine from a Marine Benthic Dinoflagellate, Portimine, Is a Potent Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Therapeutic Lead Compound | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Marine Drugs   | 6. 最初と最後の頁<br>495 ~ - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/md17090495   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-             |

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Bai Lanlan, Sato Hirotaka, Kubo Yoshinao, Wada Satoshi, Aida Yoko            | 4. 巻<br>33                  |
| 2. 論文標題<br>CAT1/SLC7A1 acts as a cellular receptor for bovine leukemia virus infection | 5. 発行年<br>2019年             |
| 3. 雑誌名<br>The FASEB Journal  | 6. 最初と最後の頁<br>14516 ~ 14527 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1096/fj.201901528R                                      | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                   |

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>久保嘉直、泉田真生                                   |
| 2. 発表標題<br>宿主防御因子GBP2によるEnv糖蛋白質切断阻害に対するマウス白血病ウイルスの回避機構 |
| 3. 学会等名<br>日本ウイルス学会学術集会                                |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kubo Yoshinao, Izumida Mai, Kotani Osamu, Hayashi Hideki, Ariyoshi Koya, Sato Hironori         |
| 2. 発表標題<br>Sulfated polysaccharides inhibit Ebola virus glycoprotein-mediated retroviral vector infection |
| 3. 学会等名<br>第62回日本熱帯医学会大会  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yoshinao Kubo, Izumida Mai, Koya Ariyosi                  |
| 2. 発表標題<br>Lamellarin alpha 20-sulfate inhibits SARS-CoV-2 infection |
| 3. 学会等名<br>日本熱帯医学会   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kubo Y, Izumida M, Hayashi H, Matsuyama T                                |
| 2. 発表標題<br>Identification of gamma-interferon inducible antiretroviral host factors |
| 3. 学会等名<br>International Workshop on Retroviral Pathogenesis (国際学会)                 |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>久保嘉直、泉田真生、林日出喜、松山敬文                               |
| 2. 発表標題<br>マウス白血病ウイルスエンベロープ蛋白質のC末端Rペプチドは細胞表面受容体との相互作用を負に制御する |
| 3. 学会等名<br>日本ウイルス学会学術集会                                      |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|  |
|--|
| <p>長崎大学熱帯医学研究所臨床感染症学分野<br/> <a href="https://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/internal/">https://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/internal/</a><br/>         長崎大学熱帯医学研究所臨床感染症学分野<br/> <a href="http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/internal/">http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/internal/</a><br/> <a href="http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/internal/">http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/internal/</a></p> |
|--|

6. 研究組織

|  |                           |                       |    |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|