

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07594

研究課題名(和文) HIV構造蛋白質Gagの機能制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the functional regulation of HIV structural protein Gag

研究代表者

宮川 敬 (MIYAKAWA, Kei)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：20580046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：HIV構造タンパク質Gagは、ウイルス複製に関わる重要因子であるにも関わらず、宿主免疫による制御機構は不明である。本研究では、自然免疫関連因子のうちGagの機能制御に関わる因子を包括的に探索、解析した。その結果、膜貫通型タンパク質MALがGagと強く相互作用する宿主タンパク質として同定された。MAL発現細胞では、HIV粒子産生が顕著に抑制され、その細胞内のエンドソームにGagが蓄積していた。しかし、MALの抗ウイルス活性は、HIVアクセサリタンパク質Nefによって阻害された。これらの結果から、ヒトが本来有する抗ウイルス活性がウイルスによって不活化される新たな機構が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、タンパク質間相互作用を生細胞でリアルタイムに検出可能な実験系を用いて、ヒト免疫不全ウイルスを顕著に抑制する機能をもつヒトタンパク質を多数同定し、宿主の自然免疫応答機構、およびウイルスがそれを克服する作用機序を明らかにした。これまで知られていなかったウイルスタンパク質の新たな機能が明らかとなり、ヒトが本来有する抗ウイルス活性を利用したHIV-1感染症の新規治療法開発に将来的に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The type I interferon (IFN) response is a robust anti-viral response that induces the transcription of several IFN-stimulated genes (ISGs). However, the effects of ISGs, particularly on the HIV-1 Gag protein, remain largely unknown. In this study, we screened ISG-encoded proteins by bioluminescence resonance energy transfer to identify the host effectors that suppressed Gag function. Consequently, we identified the transmembrane protein MAL as a Gag-interacting ISG product. Expression of MAL substantially inhibited the production of HIV-1 particles, leading to the translocation, accumulation, and eventual lysosomal degradation of Gag in the host endosomal compartments. Notably, the antiviral activity of MAL was partially antagonized by the viral accessory protein Nef, as it interfered with the interaction between MAL and Gag. Therefore, this study reveals a previously unidentified antiviral function of MAL and its viral counteraction.

研究分野：ウイルス学

キーワード：宿主-ウイルス相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)複製におけるウイルス構造タンパク質 Gag の役割は多岐にわたるが、なかでも最も重要な機能は、子孫ウイルス産生時に多量体化することでウイルスコアを形成し、コア内部に取り込んだウイルスゲノムを非感染細胞へ運搬し感染伝播することである。したがって、Gag はウイルス複製環全体に関わるタンパク質であり、Gag タンパク質を機能不全にすることができれば、HIV 感染拡大を完全に阻止することができる。しかし、Gag の細胞内挙動が複雑なため、宿主による詳細な機能制御機構は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、複雑な Gag タンパク質の挙動を反映した独自の生細胞アッセイ系を用い、Gag の機能に関わる宿主因子を探索し、宿主による Gag 機能制御機構を包括的に解明する。代表者はこれまでに Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) 技術を応用したウイルスタンパク質結合因子スクリーニング系と、Gag の機能を生細胞でリアルタイムに解析可能な発光システムを構築した。本研究では、これらの生細胞アッセイ系を駆使し、宿主による Gag 機能制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) Gag の機能に関わる宿主因子の探索法として、タンパク質間相互作用を生細胞でリアルタイムに検出可能な BRET 技術を用いて、まずは Gag と結合活性を有する因子をスクリーニングする。具体的には、インターフェロン(IFN)誘導性タンパク質(ISG)、翻訳後修飾タンパク質(ユビキチンリガーゼ、キナーゼ・ホスファターゼ)など約 1600 種類の宿主因子について、生細胞を用いて Gag との結合活性を網羅的に調べる。

(2) 前項で明らかにした新規 Gag 相互作用因子について、レポーター遺伝子をコードした HIV 1 型(HIV-1)分子クローンをを用いた分子生物学的およびウイルス学的手法により、HIV-1 産生・感染に及ぼす影響を定量的に測定する。機能不全に導く因子を同定することで、宿主による Gag 機能制御機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) HIV 産生を抑制する Gag 結合タンパク質の同定

IFN 誘導性タンパク質、翻訳後修飾タンパク質のうち、前者は公共データベースをもとに、723 の ISG 産物をコードする cDNA ライブラリーを作成した。後者はライブラリーを作成し、現在解析中である。このライブラリーは、I 型または III 型 IFN により発現が 1.5 倍以上誘導される ISG 産物のみを選別して作成した。Gag と相互作用する ISG 産物を同定するために、HEK293 細胞に発光タンパク質 NanoLuc を付加した HIV-1 Gag と HaloTag を付加した各 ISG 産物を共発現させ、BRET 法によるタンパク質間相互作用スクリーニングを行った。その結果、Gag タンパク質との結合親和性の高い候補として 62 個の ISG が抽出された(図 1A)。次に HIV-1 分子クローンをを用いてこれらの候補 ISG がウイルス粒子産生を阻害するかを検討した。候補 ISG 産物と HIV 分子クローン pNL4-3 を HEK293 細胞に遺伝子導入し、2 日後の培養上清中の Gag p24 抗原量を ELISA 法で測定した。その結果、5 つのタンパク質(MAL、ZNF36L2、ZNF36、TCIRG1、BCMP1)は明らかな細胞毒性を引き起こすことなく、HIV-1 粒子産生を有意に阻害することを見出した(図 1B)。さらに、VSVg シールド型レポーターウイルスを用いた感染実験では、これらのタンパク質は HIV 複製における初期過程(細胞侵入からレポーター遺伝子発現まで)は阻害しなかった。そこで、これら 5 つの候補タンパク質が HIV 複製後期過程(ウイルス粒子産生)へ与える影響について詳細な機能解析を行うことにした。

(2) 宿主因子 MAL による Gag の機能阻害機構の解明

前項で新たに同定したこれらの 5 つの候補タンパク質は、用量依存的にウイルス粒子の産生を減少

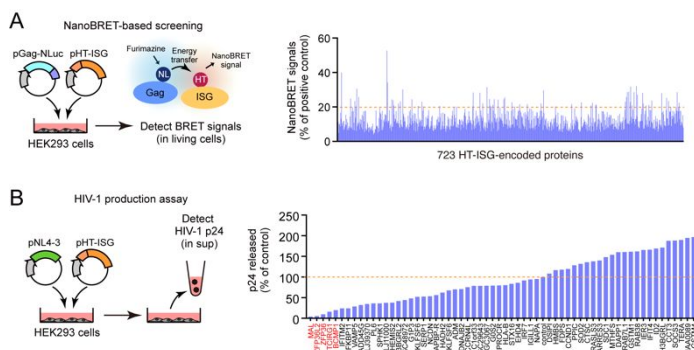


図1 HIV-1 産生を抑制する Gag 結合タンパク質の同定

させることがわかったが、同時に細胞内の Gag レベルの大幅な減少を伴っていた。5つの候補タンパク質を Gag-GFP で過剰発現させた細胞の局在を調べたところ、ZNF36、TCIRG1、BCMP1、ZNF36L2 を過剰発現させた細胞では、Gag は通常と同様に細胞膜上に局在していた。しかし、MAL を過剰発現させた細胞では、Gag は細胞質内に点状に局在し、細胞膜にはほとんど局在しなかった(図 2A)。このとき Gag はオートファゴソームマーカーではなく、エンドソームマーカーと共局在していた(図 2B)。さらに、リソソーム阻害剤であるクロロキンの投与により、MAL による Gag の分解は阻害された(図 2C)。このことから、HIV-1 感染細胞において、MAL は Gag をエンドソーム画分に隔離することで、ウイルス粒子産生の際である細胞膜への移動を阻害し、最終的にリソソームにおける細胞内分解を引き起こすと推定された。

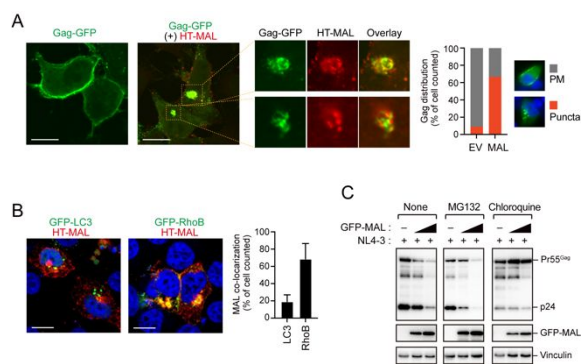


図 2 MAL による Gag タンパク質の分解と局在変移

次に、MAL が高発現することが知られている PC3 細胞を用い、HIV-1 産生における内在性 MAL の影響を調べた。2種類の siRNA で内在性 MAL をノックダウンした後、pNL4-3 を遺伝子導入したところ、コントロール細胞と比較して MAL ノックダウン細胞では HIV-1 産生が顕著に増加した。MAL をあらかじめノックダウンした CD4 陽性 T 細胞に HIV-1 を感染させ、経時的に細胞上清におけるウイルス Gag p24 抗原を定量したところ、コントロール細胞に比べて MAL をノックダウンした CD4 陽性 T 細胞では、細胞内 Gag の増加が見られ、ウイルス複製が有意に促進された。これらの結果は、内在性 MAL が Gag を分解することにより、HIV-1 の複製を負に制御していることを示唆する。

(3) ウイルスタンパク質 Nef による MAL の抗ウイルス作用の不活化機構の解明

MAL を発現している T 細胞でも HIV-1 が複製できることから、HIV-1 は内在性 MAL の抗ウイルス活性を打ち消すことができるのではないかと考えた。そこで、MAL と結合する可能性のある Nef、Vpu、Env タンパク質を欠損した HIV-1 を用いて、Nef が MAL の抗ウイルス効果を不活化できるかどうかを検討した。その結果、Vpu および Env 欠損型 HIV-1 では野生型 HIV-1 と同等に MAL の抗ウイルス活性が見られたのに対し、Nef 欠損型 HIV-1 では MAL の抗ウイルス活性が増強された(図 3A)。MAL の発現に伴い、Nef 欠損型 HIV-1 の細胞内 Gag 発現量は野生型ウイルスと比較して減少した(図 3B)。コントロール細胞では、Nef 欠損型ウイルスの産生量は野生型ウイルスよりも減少したが、MAL をノックダウンした細胞ではこの減少は観察されなかった。また、Nef 欠損型ウイルスの細胞内 Gag 発現量は、MAL ノックダウンにより増加した。MAL ノックダウンした CD4 陽性 T 細胞を用いた HIV-1 複製実験でも同様の傾向を示した。これらの結果から、Nef は MAL を介した Gag 分解機能を不活化し、HIV 産生を促進する可能性が示唆された。

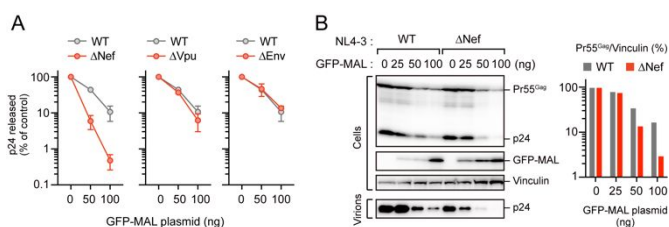


図 3 Nef による MAL の抗ウイルス作用の不活化

Nef による MAL の抗ウイルス活性の不活化機構を明らかにするため、BRET 解析を行ったところ、Nef と MAL は生細胞内で近接していることが示唆された。興味深いことに、Src キナーゼの結合に重要な PxxP モチーフを欠く Nef 変異体は、依然として MAL と結合した一方、細胞膜結合能を欠損した Nef 変異体は、MAL との結合活性が減少していることが分かった。これらの結果は、Nef が宿主細胞膜で MAL と相互作用する可能性を示唆した。またこの結合は、MAL と Gag との相互作用を弱めることが分かった。これらの結果から、Nef は MAL と Gag の結合を阻害することで、MAL の Gag に対する抗ウイルス活性を中和している可能性が示唆された。さらに、免疫蛍光分析により、Nef 非存在下において MAL は細胞膜とエンドソームの両方に局在するのに対し、Nef の存在下では、MAL はエンドソームに局在することなく、主に細胞膜に局在することが分かった。これらの結果は、Nef が MAL の細胞膜およびエンドソームへの局在を阻害することにより、エンドソーム画分への Gag の蓄積を阻害し、MAL の抗ウイルス活性を減衰させる作用機構を示唆する。

本研究により、Gag の機能を負に制御する宿主機構およびウイルスがそれを克服するメカニズムが明らかとなった。本成果はヒトが本来有する抗ウイルス活性を利用した HIV-1 感染症の治療法開発に寄与するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Miyakawa K, Nishi M, Jeremiah SS, Morikawa Y, Ryo A	4. 巻 2
2. 論文標題 MAL inhibits the production of HIV-1 particles by sequestering Gag to intracellular endosomal compartments.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in virology	6. 最初と最後の頁 836125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fviro.2022.836125	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Jeremiah SS, Miyakawa K, Matsunaga S, Nishi M, Kudoh A, Takaoka A, Sawasaki T, Ryo A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Cleavage of TANK-Binding Kinase 1 by HIV-1 Protease Triggers Viral Innate Immune Evasion.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Microbiol.	6. 最初と最後の頁 643407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.643407	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Miyakawa K, Matsunaga S, Yokoyama M, Nomaguchi M, Kimura Y, Nishi M, Kimura H, Sato H, Hirano H, Tamura T, Akari H, Miura T, Adachi A, Sawasaki T, Yamamoto N, Ryo A	4. 巻 10 (1)
2. 論文標題 PIM kinases facilitate lentiviral evasion from SAMHD1 restriction via Vpx phosphorylation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09867-7	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Koma T, Kotani O, Miyakawa K, Ryo A, Yokoyama M, Doi N, Adachi A, Sato H, Nomaguchi M	4. 巻 93 (17)
2. 論文標題 Allosteric Regulation of HIV-1 Capsid Structure for Gag Assembly, Virion Production, and Viral Infectivity by a Disordered Interdomain Linker.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 ee00381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00381-19	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮川 敬, 梁 明秀
2. 発表標題 ウイルス-宿主タンパク質相互作用解析とその応用
3. 学会等名 第35回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyakawa K, Ryo A
2. 発表標題 Identification of kinases that facilitate lentiviral evasion from the host antiviral system.
3. 学会等名 The 20th Kumamoto AIDS Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小谷治, 駒貴明, 宮川敬, 梁明秀, 横山勝, 土肥直哉, 足立昭夫, 野間口雅子, 佐藤裕徳
2. 発表標題 HIV-1カプシド “disorder” 領域の構造機能解析
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------