

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790112

研究課題名（和文）薬剤耐性ウイルス出現回避及びウイルス弱毒化を指向した HIV-1 複製制御へ

研究課題名（英文） Strategy for inhibition of HIV-1 replication without appearance of drug resistant virus and attenuation of the virus

研究代表者

高宗 暢暁 (TAKAMUNE NOBUTOKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：60322749

研究成果の概要（和文）：

N-ミリスチル化の触媒酵素である N-ミリスチルトランスフェラーゼ (NMT) は、ヒトにおいて NMT1 と NMT2 の isozyme が存在し、これはエイズの原因ウイルスである HIV-1 複製に必須の宿主因子となる。HIV-1 の構造タンパク質である Pr55^{gag} 及びアクセサリタンパク質 Nef は NMT によって N-ミリスチル化される。本研究で、NMT のアミノ末端領域はリボソームへの局在・結合に必要とされることが明らかになった。また、NMT1 と NMT2 のリボソームへの結合が、それぞれ特異的に Pr55^{gag} と Nef の N-ミリスチル化と関連している可能性が示唆された。この結果から、HIV-1 産生阻害を達成するために、NMT のアミノ末端を介したリボソームへの結合の阻害が有用となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

N-Myristoyltransferase (NMT) isozymes, NMT1 and NMT2, are essential host factors for human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1), by which the viral proteins Pr55^{gag} and Nef are *N*-myristoylated. The study demonstrated that the *N*-terminal region of each NMT isozyme was required for the isozyme-specific binding to ribosome. The each isozyme specific binding to ribosome was associated with HIV-1 release, in which NMT1 and NMT2 in ribosome were respectively related to Pr55^{gag} and Nef. These results implicate that the *N*-terminal region mediated binding to ribosome could become target for NMT isozyme-specific inhibition, which could block HIV-1 release.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：HIV-1 N-ミリスティル化、NMT、薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

現在、HIV 感染症/エイズに対する治療法は、ウイルス性酵素を標的とする逆転写酵素 (RT) 阻害剤や HIV-1 protease 阻害剤等を組み合わせた抗レトロウイルス療法 (ART) であるが、ART の導入以来、体内のウイルス複製を効果的に抑制することが可能になった。しかし残念なことに、ART は根治療法ではなく HIV-1 を完全に体内から排除することができないことから、抗 HIV 薬を生涯にわたり服用し続けなければならない。そして現行 ART で避けられない深刻な問題は、薬剤耐性 HIV-1 出現である。そこで本研究では、薬剤耐性ウイルス出現回避及びウイルス弱毒化を指向した HIV-1 複製制御法を確立することを目指している。本研究では HIV-1 複製に必須の宿主因子となる N-myristoyltransferase (NMT) に着目した。NMT はタンパク質のアミノ末端の N-ミリスティル化修飾を触媒する酵素であり、HIV-1 では構造タンパク質である Pr55^{gag} 及びアクセサリタンパク質 Nef が N-ミリスティル化される。Pr55^{gag} 及び Nef の N-ミリスティル化はこれらタンパク質機能発現に必須で、この阻害は HIV-1 複製阻害につながる事がわかっている。

2. 研究の目的

N-ミリスティル化は HIV-1 複製に必須の翻訳後修飾の一つであり、Pr55^{gag} および Nef のアミノ末端 Gly 残基でおこる。この N-ミリスティル化はタンパク質の細胞膜へのターゲティングや結合に重要な役割を担う。この N-ミリスティル化は、著しく多様性に富む HIV-1 において完全に保存されていることから、その阻害は有力な薬剤耐性ウイルス出現を回避する HIV-1 制御戦略の一つになると考えられる。そのような、N-ミリスティル化は、宿主性因子となる NMT によって行われる。ヒトにおいて NMT は 2 つの遺伝子 NMT1 及び NMT2 によりコードされており、複数の isozyme で発現することが明らかになっている。さらに、細胞内において NMT1 は、細胞質だけでなくリボゾームにも局在することが報告されていた。また未発表データであるが、研究代表者は、NMT が核内やミトコンドリアにも局在していることを明らかにしている。従って、NMT は、複数の isozyme での存在と様々な細胞内領域での機能が想定されることから、従来から提案されている触媒活性を標的とする NMT 阻害では、細胞内の全ての NMT の機能を阻害してしまうことから細胞への障害が

大きいと予想される。従って研究代表者は、NMT を標的とする抗 HIV 戦略を構築するにあたり、HIV-1 複製と密接に関連する NMT 分子種をより特異的に阻害することが重要であると考えた。

N-ミリスティル化はタンパク質がリボゾームで生合成されている時に起こる翻訳時修飾と、カスパーゼによりタンパク質が限定分解された結果、露出したペプチド基質が N-ミリスティル化される翻訳後修飾に分類される。このことから、研究代表者は、リボゾームに局在する NMT は翻訳時 N-ミリスティル化に関与し、細胞質局在型 NMT は翻訳後 N-ミリスティル化に関与しているのではないかと仮定している。

以前の NMT1 に関する研究で、NMT1 が細胞質とリボゾームに局在し、リボゾーム局在には NMT1 のアミノ末端領域が関与していることが示唆されていたが、その詳細についてはほとんど判っていなかった。本研究では NMT のリボゾーム局在に重要な領域の同定と NMT のアミノ末端領域からなる変異体の内在性 NMT の細胞内局在に与える影響を調べた。

3. 研究の方法

(1) リボゾーム画分及び細胞質画分の単離は、常法に従い、細胞ホモジネートを連続的な遠心操作に供し得た。得られた画分はウエスタンブロット法により、内在性 NMT の検出を行った。

(2) 本研究で用いた各種 DNA コンストラクト (各種 NMT 変異体および変異導入 HIV-1 proviral DNA) は、分子生物学的手法を利用して常法に従い作成した。NMT は C 末端側に V5 epitope を融合させた。

(3) 培養上清中の HIV-1 量はサンドイッチ型 ELISA にて p24 を定量することで評価した。

4. 研究成果

(1) NMT1 と NMT2 のリボゾーム局在に関する詳細な解析を行った。NMT の構造はアミノ末端領域と触媒領域に区分でき、アミノ末端領域は触媒活性に必要とされない。NMT1 と NMT2 の触媒領域の相同性は 84% であるのに対し、アミノ末端領域の相同性は 41% と低いものであった。まず、内在性 NMT1 と NMT2 のリボゾーム局在と細胞質局在について検討した。ヒト胎児腎細胞由来 HEK293 細胞をホモジネート後、連続的な遠心分離法を行うことで、細胞質フラクションとリボゾームフラクションを分離し、各フラクション由来タンパク質を SDS-PAGE に共し、NMT1 及び NMT2 に対す

る特異的抗体を用いてウエスタンイムノブロット法にて NMT の検出を行った。乳酸デヒドロゲナーゼを細胞質マーカー、28S リボソーム RNA をリボソームマーカーとした。その結果、内在性 NMT1 と NMT2 の両方の isozyme は、細胞質とリボソームの両方に局在することが明らかになった。アミノ末端領域を含まない NMT1 の isozyme である NMT1S は細胞質に局在し、リボソームには局在しなかった。このことから、NMT のアミノ末端領域がそのリボソーム局在に重要であると考えられた。

(2)そこで、NMT のアミノ末端領域からなる変異体(触媒領域を欠損させた変異体) NMT1ΔC 及び NMT2ΔC の細胞内局在について検討した。これらは C 末端側に V5epitope を融合したかたちで発現する。上述と同様に細胞分画し、各フラクションに含まれる NMT1ΔC 及び NMT2ΔC をウエスタンイムノブロット法により検出した。その結果、野生型 NMT1 及び NMT2 と同様に NMT1ΔC 及び NMT2ΔC が細胞質とリボソームに局在することが明らかになった。このことから、NMT1 と NMT2 のリボソーム局在にはアミノ末端領域で十分であることが明らかになった。NMT1 と NMT2 間で相同性の低いアミノ末端領域の中に 13 残基からなる塩基性アミノ酸残基に富む領域 (K box と命名) が存在し、その K box は、NMT1 と NMT2 の間で 1 残基のみ異なるだけで相同性が高い。そこで、K box のリボソーム局在における重要性を検討するため、K box を欠損させた NMT1ΔCAK 及び NMT2ΔCAK の細胞内局在を調べた。その結果、両変異体ともリボソーム局在能が消失した。以上の結果から、K box はリボソーム局在に必須の領域であることが明らかになった。

(3)触媒活性を有しない NMT1ΔC 及び NMT2ΔC の発現が、HIV-1 の産生に影響するかどうか検討した。NMT1ΔC、NMT2ΔC、またはコントロールの HEK293 細胞に、HIV-1 発現ベクターと導入し、培養上清中に産生されたウイルス量を p24ELISA で定量した。その結果、コントロールと比較して、NMT1ΔC 及び NMT2ΔC 発現細胞からの HIV-1 の産生量の有意な低下が観察された。

(4) NMT1ΔC、NMT2ΔC の発現が HIV-1 産生阻害した機構について研究代表者は、リボソームに局在する NMT は翻訳時 N-ミリスチル化に関与し、細胞質局在型 NMT は翻訳後 N-ミリスチル化に関与しているのではないかと仮定している。Pr55^{gag} や Nef の N-ミリスチル化は翻訳時修飾であると考えられ、リボソーム局在型の NMT isozyme との関連性が高いと考えている。このことを踏まえると、作用機序として、ひとつには、NMT1ΔC 及び NMT2ΔC が、リボソーム局在型の NMT isozyme に作用(たとえば、NMTΔC が内在性 NMT のリボソームへの結合を置換し)し、Pr55^{gag} や Nef の N-

ミリスチル化に影響した可能性を考えている。

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1件)

Takamune N, Gota K, Misumi S, Tanaka K, Okinaka S, and Shoji S.

HIV-1 production is specifically associated with human NMT1 long form in human NMT isozymes. *Microbes and Infection*, 10 (2) 143-150 (2008) 査読あり

[学会発表](計7件)

高宗暢暁, HIV-1 病原性因子 Nef のタンパク質安定性に関する解析、第 26 回日本薬学会九州支部大会、平成 21 年 12 月 12 日 福岡 九州大学

高宗暢暁, N-ミリスチルトランスフェラーゼを介した HIV-1 複製制御に関する研究、第 33 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、平成 21 年 9 月 11 日 佐賀 唐津シーサイドホテル

高宗暢暁, N-ミリスチルトランスフェラーゼ変異体による HIV-1 複製制御に関する解析、第 82 回日本生化学会大会、平成 21 年 10 月 24 日 兵庫 神戸国際会議場

高宗暢暁, 細胞内局在に関する N-myristoyltransferase (NMT) 各 isozyme 間の特異的差異、第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同大会、平成 20 年 12 月 12 日 兵庫 神戸国際会議場

高宗暢暁, HIV-1 産生に関与する N-myristoyltransferase isozyme の細胞内局在に関する検討、第 61 回日本細菌学会九州支部総会、第 45 回日本ウイルス学会九州支部総会、平成 20 年 10 月 3 日 熊本 熊本大学

高宗暢暁, HIV-1 ゲノム産物の翻訳後修飾解析システムの構築—Nef 翻訳後修飾の非破壊的プロファイリング—、第 61 回日本細菌学会九州支部総会、第 45 回日本ウイルス学会九州支部総会、平成 20 年 10 月 3 日 熊本 熊本大学

高宗暢暁, HIV-1 産生に関与する N-myristoyltransferase isozyme に関する解析、平成 20 年度日本生化学会九州支部例会、平成 20 年 5 月 17 日 福岡 九州大学

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称：タンパク質低発現化ペプチドをコードする遺伝子およびその使用方法

発明者：高宗暢暁、三隅将吾、入坂由香梨

権利者：熊本大学

種類：特許

番号：特願 2009-239220

出願年月日：平成 21 年 10 月 16 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

<http://square.umin.ac.jp/yseika/>

6．研究組織

(1)研究代表者

高宗 暢暁 (TAKAMUNE NOBUTOKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：60322749