

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590511

研究課題名（和文）マクロファージにおける抗 HIV 宿主因子の同定と解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of anti-HIV host factor in macrophages

研究代表者

藤田 美歌子 (FUJITA MIKAKO)

熊本大学・薬学部・准教授

研究者番号：00322256

研究成果の概要（和文）：近年、HIV-2 のもつ蛋白質 Vpx の標的因子として、ウイルスゲノム逆転写反応をマクロファージ特異的に阻害する抗 HIV 宿主因子の存在が示された。本研究では、この宿主因子の同定の準備を行ってきた。ところが 2011 年に、この宿主因子として SAMHD1 や APOBEC3A が同定され、その後にはこれらの機能がほぼ全て明らかにされた。そこで、Vpx の機能発現に関わる、Vpx 蛋白質 C 末端の富プロリン領域の役割を調べ、この領域が Vpx 蛋白質のリソソーム分解やプロテアソーム分解を抑制していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Recently, it has been reported that there are an anti-HIV host factors which inhibit reverse transcription of the viral genome macrophages-specifically, as a target factors of HIV-2 Vpx protein. In this study, preparation for identification of these host factors had been performed. However, in 2011, SAMHD1 and APOBEC3A were identified as these factors, and almost all functional details of these proteins have been revealed. Thus, in this study, roles of C-terminal polyproline motif (PPM) have been examined. As a result, we suggested that PPM suppresses lysosomal degradation and proteasome degradation of Vpx protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：Vpx・HIV-2・アクセサリー蛋白質・マクロファージ・逆転写反応・抗 HIV 宿主因子・PMA・THP-1

1. 研究開始当初の背景

2002 年、HIV のもつアクセサリー蛋白質 Vif の標的分子が、宿主のもつ抗ウイルス蛋白質 APOBEC3 であることが報告された。すなわち Vif がなければ APOBEC3 は HIV 粒子に取り込まれ、その APOBEC3 は合成され

た cDNA に変異を導入したり逆転写反応を阻害したりしてウイルス感染性をなくす。これに対して、Vif はプロテアソーム分解などにより APOBEC3 を分解する。さらに 2008 年には、HIV-1 に特異的なアクセサリー蛋白質 Vpu の標的分子として、宿主のもつ抗ウイ

ルス蛋白質 Tetherin が発見された。Tetherin はウイルス粒子の細胞膜からの遊離を阻害する機能をもつが、Vpu は Tetherin を分解するなどして細胞表面に存在しなくなるように働く。このような、アクセサリ蛋白質と、抗ウイルス宿主因子の闘いは、近年の HIV 研究のトピックとなった。

一方、HIV-2 は HIV-1 と異なるアクセサリ蛋白質のセットをもつ。すなわち、Vpu をもたず、Vpr の類似蛋白質 Vpx を特異的にもつ。従って、Vpx 蛋白質の機能はウイルス学的にも興味深い。研究代表者らは、以前から Vpx の機能解析を続けてきた。その結果、2008 年には、それまでのコンセンサスを覆し、Vpx がマクロファージ中で逆転写反応を進行させることを見出し、報告した。これと同時に、この Vpx の機能も Vif や Vpu と類似して、Vpx が未知の抗ウイルス宿主因子をプロテアソーム分解することにより発現することを示唆するデータが報告された。なお、この宿主因子は HIV-2 のみならず、HIV-1 の増殖も抑えることが示された。そこで、次はこの抗ウイルス宿主因子を同定し、その機能を解析することが多くの研究者の目標となった。

2. 研究の目的

当初は、逆転写反応をマクロファージ特異的に阻害する抗 HIV 宿主因子を単離、同定し、その機能に関して明らかにすることを目指した。すなわち、因子の同定後、どのような機構で逆転写反応を阻害するのか調べようと考えた。また、Vpx がどのようにその因子の機能を抑制するのか、HIV-1 はその因子の阻害能からある程度のがれるしくみを持っているわけだがそのしくみはどのようなものなのか、解明しようと考えた。

ところが 2011 年に、この抗 HIV 宿主因子として SAMHD1 や APOBEC3A が海外の研究者によって同定され、その後にはこれらの機能がほぼ全て明らかにされた。すなわち SAMHD1 は、細胞内に存在する dNTP (DNA の合成原料) を分解し、逆転写反応の進行を妨げるというものである。

さて、Vpx 蛋白質の C 末端には、連続した 7 つのプロリンが連なる富プロリン領域が存在する。研究代表者らは、この領域が蛋白質の安定的発現に関わることを既に報告した。おそらくこの領域には何らかの宿主因子が結合することで、蛋白質を安定化させていると考えられる。そこで、この領域による安定化のメカニズムを明らかにすることを次に目指した。

3. 研究の方法

マクロファージにおける Vpx の標的である抗 HIV 宿主因子の単離は、pull-down 法に

より行うことにした。初代培養モノサイト由来マクロファージは扱いづらいため、それに代わる細胞として、PMA 分化 THP-1 細胞を用いることにした。

Vpx の富プロリン領域による蛋白質安定化のメカニズムは、阻害剤を用いた実験により調べることにした。

4. 研究成果

(1) 本研究においては、哺乳細胞において Vpx を大量に発現するプラスミドベクターが必要となる。これまで、Vpx の発現ベクターとして pME18Neo ベクターに組み込まれた pME18Neo-Fvpx を用いてきたが、発現量が非常に低かった。そこで、FLAG タグを N 末端にもつ vpx 遺伝子を pEF1/Myc-HisA に組み込んだ pEF-Fvpx を構築し、293T 細胞にトランスフェクションしたところ、十分な量の Vpx が発現した。

(2) 同定すべき宿主因子と Vpx との結合には、Vpx の 15 番目のグルタミン酸(E¹⁵)が関わるという報告がなされた。そこで、pEF1/Myc-HisA をベースにした Vpx E¹⁵変異体の発現ベクター pEF-FxE15G を構築した。293T 細胞にトランスフェクションしたところ、野生株 Vpx と同様に十分量の発現が見られた。

(3) THP-1 細胞の PMA 分化を検討した。PMA を DMSO に溶かし、100 分の 1 量の PMA を加えた (最終濃度 100 nM) が、分化は見られなかった。そこで、PMA の DMSO 溶液を 1000 分の 1 量加えたところ (最終濃度 12.5、50、100 nM) THP-1 細胞の分化が見られた。

(4) pEF1/Myc-HisA をベースにした富プロリン領域の変異体の発現ベクター pEF-Fx103/4A (前半 4 つのプロリンをアラニンに変えた Vpx 変異体を発現)、pEF-Fx106/4A (後半 4 つのプロリンをアラニンに変えた Vpx 変異体を発現)、pEF-Fxd7P (7 つのプロリンを欠いた Vpx 変異体を発現) を構築し、293T 細胞にトランスフェクションした。その結果 103/4A 変異体の発現量は野生株の 20%程度に、106/4A 変異体の発現量は野生株の 10%程度に減った。このことは、Vpx に 103/4A 変異をもつ GL-AN ウイルスがマクロファージや HSC-F 細胞で中間型の増殖性を示すのに対し、106/4A 変異をもつウイルスはこれらの細胞で Vpx 欠損型の増殖性を示すことと一致する。また、d7P 変異体の発現量は、野生株の 40%程度に減った。

(5) プロテアソーム阻害剤 MG-132 (5 μM) や

リソソーム阻害剤 Bafilomycin A1 (100 nM) 存在下で、(4)で構築した変異体の発現量を調べた。そうしたところ、103/4A 変異体や 106/4A 変異体は MG-132 存在下で発現量が野生株と同様に回復し、Bafilomycin A1 存在下における回復量は少なかった。これに対し、d7P 変異体は MG-132 存在下で回復が見られず、Bafilomycin A1 存在下で野生株の 80% 程度に回復した。このことは、富プロリン領域が Vpx 蛋白質のプロテアソーム分解やリソソーム分解を抑制していることが示唆された。

(6) 野生株の Vpx や(4)で構築した富プロリン領域の変異体には、Western blotting においてバンドが 2 本検出された。特に MG-132 や Bafilomycin A1 存在下で上のバンドがより強くなった。この上のバンドは Lamda Protein Phosphatase で消失したことから、Vpx のリン酸化体であることがわかった。

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 10 件)

- ① Yasuyuki Miyazaki, Mikako Fujita, Masako Nomaguchi, Akio Adachi, Structural biology for virus research, *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 2012, 3:91.
- ② Yasuyuki Miyazaki, Mikako Fujita, Commentary on aptamers for virus research, *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 2012, 3:52.
- ③ Yosuke Kanemaru, Yumi Momiki, Saori Matsuura, Tatsufumi Horikawa, Jin Gohda, Jun-ichiro Inoue, Yoshinari Okamoto, Mikako Fujita, Masami Otsuka, An artificial copper complex incorporating a cell-penetrating peptide inhibits NF- κ B activation, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 査読有, 2011, 59:1555-1558.
- ④ Tomohiko Ejima, Mayuko Hirota, Tamio Mizukami, Masami Otsuka, Mikako Fujita, An anti-HIV-1 compound that increases steady-state expression of apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G, *International Journal of Molecular Medicine*, 査読有, 2011, 28: 613-616.
- ⑤ Hideki Fujii, Manabu Ato, Yoshimasa Takahashi, Kaori Otake, Shu-ichi Hashimoto, Tomohiro Kaji, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Mikako Fujita, Akio Adachi, Toshinori Nakamura,

Masaru Taniguchi, Shigeo Koyasu, Toshiitada Takemori, HIV-1 Nef impairs multiple T-cell functions in antigen-specific immune response in mice, *International Immunology*, 査読有, 2011, 23: 433-441.

- ⑥ Masako Nomaguchi, Mikako Fujita, Akio Adachi, The fourth major restriction factor against HIV/SIV, *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 2011, 2:132.
- ⑦ Masako Nomaguchi, Naoya Doi, Sachi Fujiwara, Mikako Fujita, Akio Adachi, Site-directed mutagenesis of HIV-1 *vpu* gene demonstrates two clusters of replication-defective mutants with distinct ability to down-regulate cell surface CD4 and tetherin, *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 2010, 1:116.
- ⑧ Kensaku Anraku, Ryota Fukuda, Nobutoki Takamune, Shogo Misumi, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, Mikako Fujita, Highly sensitive analysis of the interaction between HIV-1 Gag and phosphoinositide derivatives based on surface plasmon resonance, *Biochemistry*, 査読有, 2010, 49: 5109-5116.
- ⑨ Mikako Fujita, Masami Otsuka, Masako Nomaguchi, Akio Adachi, Multifaced activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions, *Reviews in Medical Virology*, 査読有, 2010, 20:68-76.
- ⑩ Abhay Jere, Mikako Fujita, Akio Adachi, Masako Nomaguchi, Role of HIV-1 Nef protein for virus replication *in vitro*, *Microbes and Infection*, 査読有, 2010, 12: 65-70.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 安楽 健作、立石 大、藤田 美歌子、大塚雅巳、抗エイズ活性をもつイノシトールリン脂質誘導体の合成、日本薬学会第 132 年会、2012. 3. 31、北海道大学 (札幌)
- ② 安楽 健作、大塚 雅巳、藤田 美歌子、酸性脂質類による HIV-1 増殖の抑制、第 25 回日本エイズ学会学術集会、2011. 12. 2、ハイアット リージェンシー東京 (東京)
- ③ 藤田 美歌子、安楽 健作、大塚 雅巳、PH ドメイン分子による HIV-1 放出の抑制、第 25 回日本エイズ学会学術集会、2011. 11. 30、ハイアット リージェンシー東京 (東京)
- ④ 藤田 美歌子、大塚 雅巳、高橋 恭子、

中村 成夫、増野 匡彦、HIV-1 増殖を制御するフラレン化合物の開発、第24回日本エイズ学会学術集会、2010. 11. 25、グランドプリンスホテル高輪/ザ・プリンスさくらタワー東京（東京）

- ⑤ 福田 亮太、安楽 健作、大塚 雅巳、藤田 美歌子、HIV MA および Nef 蛋白質と脂質類との結合解析、第24回日本エイズ学会学術集会、2010. 11. 24、グランドプリンスホテル高輪/ザ・プリンスさくらタワー東京（東京）
- ⑥ 藤田 美歌子、HIV Vpr/Vpx 蛋白質の役割、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010. 11. 8、あわぎんホール（徳島）
- ⑦ 福田 亮太、安楽 健作、大塚 雅巳、藤田 美歌子、HIV-1 Gag 関連蛋白質および Nef とイノシトールリン酸類との結合解析、第23回日本エイズ学会学術集会、2009. 11. 26、名古屋国際会議場（名古屋）
- ⑧ 藤田 美歌子、安楽 健作、大塚 雅巳、HIV-1 複製に関するイノシトールリン脂質類と Gag 関連蛋白質との結合の定量的解析、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009. 10. 26、都市センターホテル（東京）

〔産業財産権〕（計1件）

○出願状況（計1件）

- ①名称：APOBEC 発現向上剤及び抗 HIV 剤
発明者：藤田 美歌子、大塚 雅巳、江島智彦
権利者：熊本大学
種類：特許
番号：特願 2010-103182
出願年月日：平成 22 年 4 月 28 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 美歌子 (FUJITA MIKAKO)
熊本大学・薬学部・准教授
研究者番号：00322256