

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 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790130

研究課題名（和文）薬剤耐性 HIV-1 出現を回避する NMT1 を介した新しい HIV/エイズ制御法

研究課題名（英文）New strategy for inhibition of HIV replication by targeting to NMT1 without appearance of drug resistant 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-ミリストイルトランスフェラーゼは、エイズの原因ウイルスである HIV が複製するために必須となる宿主因子である。HIV の構造タンパク質 Gag とアクセサリタンパク質 Nef は NMT によって N-ミリストイル化され機能を獲得する。NMT には NMT1 と NMT2 の 2 つのアイソザイムが知られているが、HIV の複製に重要な NMT アイソザイムを阻害することは HIV 複製阻害に重要であると考えられる。本研究で、NMT のアミノ末端領域には NMT をリボソームに局在させる働きがあることが明らかになった。また、リボソームに局在する NMT1 および NMT2 が、それぞれ主に Gag および Nef と関連していることが示唆された。以上の結果から、NMT のリボソーム局在に重要なアミノ末端領域は HIV 複製阻害のための標的部位になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：N-Myristoyltransferase (NMT) isozymes, i. e., NMT1 and NMT2, are essential host factors for the AIDS-causing human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1), by which the viral proteins Pr55(gag) and Nef are N-myristoylated. N-Myristoylation is important for the membrane targeting of modified proteins. Since it is predicted that approximately 0.5% of all proteins in the human genome are N-myristoylated, selective inhibition of closely HIV-1-associated NMT isozymes is thought to be important for the improvement of specificity in the anti-HIV-1 strategy with the inhibition of NMT function. NMT isozymes contain two characteristic structures, the N-terminal region and the catalytic region. Here, it was shown that the N-terminal region of each NMT isozyme is required for isozyme-specific binding to the ribosome. The specific binding of each isozyme to the ribosome was associated with HIV-1 production, in which NMT1 and NMT2 in the ribosome were suggested to be mainly related to Pr55(gag) and Nef, respectively. These results indicate that the N-terminal region that mediates binding to the ribosome can become a target for NMT-isozyme-specific inhibition, which could block HIV-1 production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

1. 研究開始当初の背景

今日、世界で約 3300 万人の human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) 感染者が存在すると推定され (<http://www.unaids.org/>)、日本においては、新規 HIV 感染症/エイズ患者報告数が年間 1300 人を超える時代である。HIV 感染症/エイズに対する治療法は、主としてウイルス性酵素(逆転写酵素 (RT)、HIV-1 プロテアーゼ、インテグラーゼ)を標的する抗 HIV 薬を組み合わせた抗レトロウイルス療法 (ART) である。ART により、体内のウイルス複製を効果的に抑制することは可能である。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。HIV-1 は宿主細胞に侵入後、RT により自身の RNA ゲノムを DNA に逆転写し宿主染色体に HIV-1 ゲノムを組み込む。RT は校正機能を有さないこと、HIV-1 の複製速度が著しく速いこと、そして服薬コンプライアンスが悪いこと等が HIV-1 自身のゲノムへの変異導入を早め、現行の抗 HIV 薬に対する薬剤耐性 HIV-1 の出現を許す主な原因と考えられている。いかにして薬剤耐性ウイルス出現を抑制・遅延させるかが今後の ART の課題であると考えられる。

そのような背景のもと、研究代表者は、「薬剤耐性 HIV-1 出現を回避する抗 HIV 薬の開発」を長期的な究極の目標としている。そしてその達成には、HIV-1 制御のための標的因子は以下の 2 条件を満たすことが重要であると考えた。

条件 1 : 標的はウイルス複製に必須の宿主因子であること (宿主因子であることから、基本的には薬剤耐性変異がおこらない)

条件 2 : 標的とする宿主因子と関連するウイルス性因子は、多様性に富む HIV-1 ゲノムにおいて完全 OR 高度に保存された因子(領域)であり、かつウイルス複製に必須の因子(領域)あること (つまり、条件 1 の宿主因子の阻害はウイルス複製阻害につながる。さらに、その宿主因子以外の機能を代替する類似の宿主因子を利用する可能性が低くなる)。

研究代表者はこれまで、まず条件 2 を満たすウイルス性因子として HIV-1Pr55^{gag} 及び Nef の N-ミリスチル化 (N-Myr 化)に着目してきた。Pr55^{gag} はウイルス構造タンパク質の前駆体であり、N-Myr 化を受けないと Pr55^{gag} の正常な膜移行能が消失し感染性ウイルス産生ができない。一方、Nef は HIV-1 の重要な病原性因子であり、HIV-1 感染細胞における CD4 及び MHC-I の downregulation の誘導など多様な活性を持ち、結果的としてウイルス複製能増大と免疫機構の攪乱を誘導しエイズ進行を促進させると考えられている。こ

のような Nef 活性には、その N-Myr 化が必須である。HIV Databases (<http://www.hiv.lanl.gov>)によると、同じレンチウイルスである HIV-2 及び SIV も含め全ての Pr55^{gag} 及び Nef のアミノ末端配列は N-Myr 化モチーフを含む。多様性に富むゲノム集団である HIV-1 の中で、高度に保存されたウイルス複製阻害につながる領域は少ない (HIV-1 ゲノム内に、タンパク質の構造上保存されなければならない領域は多く存在するが、ウイルス複製阻害戦略にはつながりにくい場合がほとんどである。N-Myr 化モチーフにおいては、その N-Myr 化阻害がウイルス複製阻害につながる)。

上述の条件 2 のウイルス性因子と関連する宿主因子 (条件 1) は N-myristoyltransferase (NMT) である。NMT の阻害は Pr55^{gag} と Nef の機能を阻害し、その結果ウイルス産生量が低下し弱毒ウイルスとしての表現型を呈しうる。

しかしながら、このアプローチは宿主因子を標的とするため、非特異的作用 (副作用) が重大な問題となることが予想される。この高いハードルを乗り越えるために、研究代表者は複数の NMT isozymes の存在に着目してきた。

ヒトにおいて 2 つの NMT 遺伝子 (NMT1, NMT2) の存在が知られ、遺伝子産物として NMT1 long form (NMT1L), NMT1 medium form (NMT1M), NMT2 short form (NMT1S), 及び NMT2 が知られている。これまでの研究代表者らの研究で、siRNA 及び dominant negative 変異体を用いて、NMT1L が HIV-1 産生と密接に関連していることを明らかにした (Takamune et al. *Microbe and Infection* 2008)。

そのような NMT isozyme 間で機能の違いがどのような機構で起こるのかを解明するために、研究代表者らはこれまで、主として細胞内局在の観点から各 NMT isozyme の特徴付けを行ってきた。

2. 研究の目的

リボゾームに局在する NMT isozyme に注目し、NMT 分子の中でリボゾーム局在に重要な領域を特定し、さらにリボゾームに局在する NMT が HIV 複製と関連するかどうかを調べる。

3. 研究の方法

各種 NMT 変異体の発現系を構築し、それぞれの変異体のリボゾーム局在能を調べる。内在性 NMT のリボゾーム局在に影響するドミナントネガティブ NMT 変異体を作製する。この変異体の発現が HIV 複製に与える影響を調べ

る。

4. 研究成果

N-ミリスチ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-ミリスチ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は翻訳時のN-ミリスチル化に関与し、細胞質局在型NMTは翻訳後N-ミリスチル化に関連しているという作業仮説を立てている。

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。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。そこで本研究では、NMT1とNMT2のリボゾーム局在に関する特徴付けを行った。

本研究でこれまでに明らかにしたNMTの細胞内局在に関する知見は以下の通りである。内在性NMT1とNMT2の両方のisozymeは、細胞質とリボゾームの両方に局在する。NMT1とNMT2がリボゾームへ局在するにはアミノ末端領域のみで十分である。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)が存在するが、このK boxはリボゾーム局在に必須の領域である。

このことを踏まえ、NMTの触媒領域を含まない変異体であるNMT1 Δ C及びNMT2 Δ Cの細胞内における発現が、内在性NMT1及びNMT2のリボゾーム局在に与える影響を検討した。NMT1 Δ CまたはNMT2 Δ Cを発現したHEK293細胞をダウンズホモジネーターでホモジネート後、連続的な遠心分離法を行うことで、細胞質フラクション(Cyto)とリボゾームフラクション(Ribo)を分離し、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、28SリボゾームRNAをリボゾームマーカとした。その結果、コントロール細胞(Mock)ではRiboのNMT1がCytoのNMT1よりも相対的に多く存在した。この様式はNMT2においても同様であった。一方NMT1 Δ Cを発現した細胞では、RiboのNMT1がCytoのNMT1より相対的に少なかった。またこの細胞においてRiboのNMT2はCytoのNMT2より相対的に多くコントロールと同様であった。NMT2 Δ Cを発現した細胞においては、RiboのNMT1とCytoのNMT1は同程度検出され、RiboのNMT2はCytoのNMT2より相対的に少なかった。リボゾームに局在しな

いNMT1 Δ C Δ KまたはNMT2 Δ C Δ Kの発現した細胞においては、内在性NMT1及びNMT2のRiboおよびCytoへの局在様式はコントロール細胞と同様であった。以上の結果をまとめると、NMT1 Δ Cは内在性NMT1のRiboへの局在に影響し内在性NMT2のRiboへの局在には影響しなかった。NMT2 Δ Cは内在性NMT1のRiboへの局在に部分的に影響し、内在性NMT2のRiboへの局在に影響した。NMT1 Δ C Δ KまたはNMT2 Δ C Δ Kでは内在性NMTへの影響は認められなかったことからNMT1 Δ CとNMT2 Δ Cはドミナントネガティブな様式で内在性NMT1とNMT2のRibo局在に影響したと考えられた。

HIV-1NL4-3の野生型、GagのN-ミリスチル化を受けないgag G2A変異体ウイルス、NefのN-ミリスチル化を受けないNef G2A変異体ウイルス、及びGagとNefの両方のN-ミリスチル化を受けないGagG2A/NefG2A変異体ウイルスの産生量の比較を示した。それぞれ野生型ウイルスの産生量のおよそ15%、40%、及び15%程度であった。このことから、完全にGagやNefがN-ミリスチル化されないウイルスでこのレベルのウイルス抗原が培養上清中に検出されることが明らかになった。

NMT1 Δ CとNMT2 Δ Cが内在性NMTのリボゾームへの細胞内局在に影響することから、これら変異体の発現がN-ミリスチル化を必要とするHIV-1産生に影響すると考えられた。またsiRNA等を用いた過去の研究で、NMT1は主にGagのN-ミリスチル化と関連し、NMT2は主にNefのN-ミリスチル化と関連することが報告されている。このことから、野生型HIV-1はNMT1及びNMT2依存性であり、NefG2A変異ウイルスはNMT1依存性ウイルスと考えられる。このことを踏まえ、NMT1 Δ CまたはNMT2 Δ C発現細胞からの野生型HIV-1NL4-3とNefG2A変異ウイルスの産生量を比較した。その結果、野生型HIV-1NL4-3の産生は、NMT1 Δ Cの発現によってコントロール細胞から産生されるウイルス量のおよそ30%程度まで有意に減少した。一方NMT2 Δ Cの発現によってコントロール細胞から産生されるウイルス量のおよそ50%程度まで有意に減少した。このことから野生型HIV-1はNMT1及びNMT2依存性のウイルスであり以前の報告と一致した。GagのN-ミリスチル化はウイルス複製に必須であることからNMT1 Δ Cの野生型HIV-1に対する影響がNMT2 Δ Cよりも大きい結果となったと考えられた。この結果は、GagG2A変異体ウイルスの産生量がNefG2A変異体ウイルスの産生量より低い結果とも一致する。NefG2A変異ウイルスの産生は、NMT1 Δ Cの発現によってコントロール細胞から産生されるウイルス量のおよそ30%程度まで有意に減少した。一方NMT2 Δ Cの発現によってコントロール細胞から産生されるウイル

ス量と比較して有意な減少は認められなかった。この結果は、NefG2A 変異体ウイルスは NMT1 依存性ウイルスであるという過去の知見と一致した。またウイルス産生量が著しく低い NMT 非依存性のウイルスである GagG2A 変異体ウイルスと GagG2A/NefG2A 変異体ウイルスの産生に対して、NMT1 Δ C と NMT2 Δ C はほとんど影響しなかった。以上の結果から考察すると、NMT1 Δ C または NMT2 Δ C の発現によって、内在性 NMT のリボゾームへの局在が阻害され、翻訳時に起こると考えられる HIV-1 の Gag 及び Nef の N-ミリスチル化が効率的に行われなくなり、その結果としてウイルス産生が低下したと考えられた。このことから、内在性 NMT のリボゾームへの局在を阻害することが HIV-1 産生抑制につながると考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Takamune N, Irisaka Y, Yamamoto M, Harada K, Shoji S, and Misumi S. Induction of extremely low protein expression level by fusion of C-terminal region of Nef. *Biotechnol. Appl. Biochem* in press、査読有
- ② Ohtsuka K, Sato S, Sato Y, Sota K, Ohzawa S, Matsuda T, Takemoto K, Takamune N, Juskowiak B, Nagai T, Takenaka S. Fluorescence imaging of potassium ions in living cells using a fluorescent probe based on a thrombin binding aptamer-peptide conjugate. *Chem. Commun.*, (2012), in press、査読有
- ③ Endo M, Gejima S, Endo A, Takamune N, Shoji S, and Misumi S. Treatment of breast cancer cells with proteasome inhibitor lactacystin increases the level of sensitivity to cell death induced by Human immunodeficiency virus type 1, *Biol. Pharm. Bull*, 33:1903-1906, 2010. 査読有
- ④ Anraku K, Fukuda R, Takamune N, Misumi S, Okamoto Y, Otsuka M, Fujita M. Highly sensitive analysis of the interaction

between HIV-1 Gag and phosphoinositide derivatives based on surface plasmon resonance. *Biochemistry* 49: 5109-5115, 2010. 査読有

- ⑤ Misumi S, Inoue M, Dochi T, Kishimoto N, Hasegawa N, Takamune N, Shoji S. Uncoating of human immunodeficiency virus type 1 requires prolyl isomerase PIN1. *J Biol Chem.* 285: 25185-25195, 2010. 査読有
- ⑥ Takamune N, Kuroe T, Tanada N, Shoji S, and Misumi S. Suppression of human immunodeficiency virus type-1 production by coexpression of catalytic-region-deleted N-myristoyltransferase mutants. *Biol. Pharm. Bull*, 33: 2018-2023, 2010. 査読有

[学会発表] (計 17 件)

- ① 岸本直樹、鬼塚彩乃、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV 粒子プロテオーム解析に基づいた感染初期過程を制御する因子の探索、平成 23 年度日本薬学会九州支部大会、2011. 12. 10. 福岡大学 (福岡)
- ② 堂地尅生、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV 脱殻制御機構に関する解析、平成 23 年度日本薬学会九州支部大会、2011. 12. 10. 福岡大学 (福岡)
- ③ 山本充奈美、原田圭輔、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV-1 アクセサリータンパク質 Nef の発現特性、平成 23 年度日本薬学会九州支部大会、2011. 12. 10. 福岡大学 (福岡)
- ④ 原田圭輔、高宗暢暁、山本充奈美、入坂由香梨、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV-1 及び SIV Nef の発現量がウイルス感染性増強作用に与える影響、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)
- ⑤ 堂地尅生、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV キャプシドの Ser16 リン酸化による脱殻制御機構に関する解析、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)
- ⑥ 岸本直樹、鬼塚彩乃、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV 粒子プロテオーム解析に基づいた感染初期過程を制御する宿主因子の探索と Integrase の翻訳

後修飾、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)

- ⑦ 三隅 将吾、井上 睦美、堂地 赳生、岸本直樹、高宗 暢暁、杉本 幸彦、庄司 省三、宿主因子による HIV-1 脱殻過程の制御、第84回日本生化学会大会、2011.9.24. 京都国際会議場 (京都)
- ⑧ 高宗 暢暁、黒江 徹也、棚田 訓彰、杉本 幸彦、庄司 省三、三隅 将吾、N-myristoyltransferase 触媒領域欠損変異体による HIV 産生の抑制、第84回日本生化学会大会、2011.9.24. 京都国際会議場 (京都)
- ⑨ 三隅将吾、井上睦美、堂地赳生、岸本直樹、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、HIV-1 脱殻プロセスに関する研究、平成23年度日本生化学会九州支部例会、2011.5.21. 久留米大学 (福岡)
- ⑩ 高宗暢暁、原田圭輔、山本充奈美、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV-1 Nef の低発現性の特徴とその機能との関連、平成23年度日本生化学会九州支部例会、2011.5.21. 久留米大学 (福岡)
- ⑪ 原田 圭輔、入坂 由香梨、山本 充奈美、三隅 将吾、杉本 幸彦、庄司 省三、高宗 暢暁、HIV/SIV アクセサリータンパク質 Nef の低発現性と機能発現に関する基礎研究、日本薬学会九州支部大会、2010.12.11. 長崎大学 (長崎)
- ⑫ 小川 実菜子、高宗 暢暁、杉本 幸彦、庄司 省三、三隅 将吾、HIV-1 p2 peptide のポストエントリー過程における役割に関する基礎研究、日本薬学会九州支部大会、2010.12.11. 長崎大学 (長崎)
- ⑬ 原田圭輔、入坂由香梨、山本充奈美、三隅将吾、杉本幸彦、庄司省三、高宗暢暁、HIV/SIV アクセサリータンパク質 Nef の低発現性と機能発現の関連性に関する解析 BMB2010、2010.12.7. 神戸国際会議場 (兵庫)
- ⑭ 原田圭輔、入坂由香梨、山本充奈美、三隅将吾、杉本幸彦、庄司省三、高宗暢暁、HIV-1 及び SIV Nef の低発現性がウイルスの感染性増強に与える影響、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010.11.7. 徳島県郷土文化会館 (徳島)
- ⑮ 岸本直樹、井上睦美、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV-1 preintegration complex 構成因子である integrase を標的としたプロテオーム解析、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010.11.7. 徳島県郷土文化会館 (徳島)
- ⑯ 堂地赳生、井上睦美、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV カプシドタンパク質の Ser16 のウイルス粒子内のリン酸化に関する研究 第58回日本ウイルス

学会学術集会、2010.11.7. 徳島県郷土文化会館 (徳島)

- ⑰ 井上睦美、岸本直樹、堂地赳生、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV カプシドタンパク質の Ser16 のウイルス粒子内のリン酸化に関する研究 SIV 感染におけるプロリリンメラーゼ Pin1 依存性脱殻機構の寄与 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010.11.7. 徳島県郷土文化会館 (徳島)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

- ①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 (優先権主張出願)
番号: 特願 2009-239220
出願年月日: 平成22年10月15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所・助教
研究者番号: 60322749