

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6月7日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890149

研究課題名（和文） ヒト免疫不全ウイルス蛋白質の翻訳後修飾機構の解明

研究課題名（英文） The Post-translational modifications of HIV proteins

研究代表者

宮川 敬 (MIYAKAWA KEI)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：20580046

研究成果の概要（和文）：HIV 感染を防ぐための一つ的手段として、ヒトの細胞は BST2 などの抵抗性宿主因子 BST2 を保持している。しかし HIV は自身がコードする Vpu 蛋白質の働きによって BST2 を不活化する。この活性には Vpu のリン酸化が必須であるが、その詳細な分子機構は不明である。本研究では迅速スクリーニング技術を用いて、膜輸送関連蛋白質 SCYL2 が Vpu のリン酸化を阻害し、BST2 の抗 HIV 活性を高めるという新たな分子モデルを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Human cells defend against retroviral infection through the actions of intrinsic restriction factors such as BST2. BST2 restricts the release of progeny virions from infected cells, while the HIV-1 protein Vpu antagonizes this restriction. Although the activity of Vpu is regulated by the phosphorylation, the precise regulatory mechanism for the phosphorylation-dependent Vpu function remains elusive. We here report that SCYL2 facilitates BST2-dependent restriction of viral release by inducing dephosphorylation of Vpu. The molecular machinery regulating the post-translational modifications of HIV proteins may be an alternative therapeutic target for HIV/AIDS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

現在 3,300 万人のヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染者がおり、日本を含む全世界で感染者の増加傾向が続いている。近年、逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤を複数選択して処方する多剤併用療法が成功し、エイズによる死亡率は低下し、HIV 感染者の予後は改善された。しかし一方で、薬剤の長期服用が強いられるため、耐性ウイルスの出現

の可能性が常に危惧されている。そのため、薬剤選択の幅を広げるための基礎研究が強く求められている。例えば、現在の主なエイズ治療薬はウイルス蛋白質を標的としているため、従来とは異なる薬剤標的をもつエイズ治療薬、例えばウイルス複製を強力に抑制する宿主因子を標的とした新しい治療薬の開発が必要である。

2. 研究の目的

HIV は、感染細胞内でウイルス蛋白質と宿主因子とが複雑に相互作用し、効率的に子孫ウイルスを産生する。とくに、宿主因子によるウイルス蛋白質の翻訳後修飾過程は、ウイルスの複製効率において重要性が指摘されているにも関わらず、詳細な機構は未だ不明である。そこで本研究では、蛋白質間相互作用をその立体構造を保ったまま検出可能なスクリーニング系を新たに確立し、従来の方法では見いだせなかったウイルス蛋白質の翻訳後修飾に関与する宿主因子群を同定する。また、翻訳後修飾の観点から HIV の複製機構や病原性を明らかにし、薬剤開発に向けたエビデンスを提示する。

3. 研究の方法

ヒト全長 cDNA ライブラリー-MGC クローン由来の約 420 種類の完全長プロテインキナーゼ遺伝子をもつ大腸菌からスプリット PCR 法によって鋳型 DNA の構築を行った。ENDEXT 技術を用いた無細胞蛋白質合成系によりプロテインキナーゼ蛋白質ライブラリーの構築を行った。次にウイルス蛋白質を無細胞蛋白質合成系にて作成し、プロテインキナーゼとの相互作用の有無について、図 1 に示すアルファスクリーン法を用いた近接ホモジニアスアッセイを行った（一次スクリーニング）。その後、これらの因子の細胞内局在や発現プロファイルなどの情報を補完した二次スクリーニングを行った。具体的には、PSORT データベースや GNF SymAtlas データベースおよび遺伝子オントロジーを用いて、蛋白質の細胞内局在や発現プロファイルを解析した。さらに、siRNA によりこれらの候補因子をノックダウンした細胞を作成し、これらの細胞に HIV を感染させた場合のウイルス複製効率を調べ、候補因子がウイルス複製に関与しうるか否かを判定した。

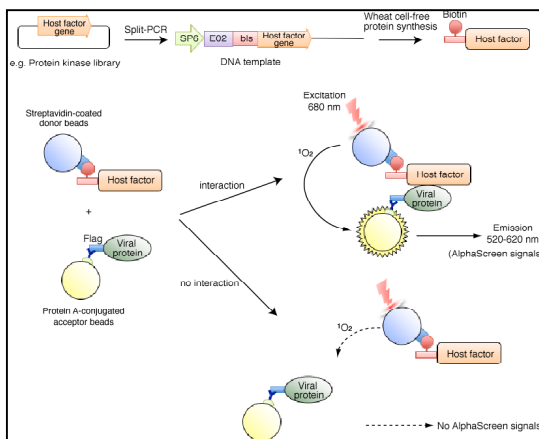


図 1 一次スクリーニング概略図

これらのスクリーニングによって得られた候補蛋白質については、免疫染色法および免疫沈降法により、細胞内での共局在および機能を確認した。次に同定した宿主因子がウイルス蛋白質のリン酸化状態や機能に与える影響について、ウイルス学および生化学的手法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) ウイルス蛋白質と相互作用する宿主キナーゼの探索

HIV 蛋白質のうち、とくにそのリン酸化がウイルス粒子の効率的な産生と伝播に重要だとされる Vpu および Vif 蛋白質に着目し、本研究において新たに確立した次世代迅速スクリーニング系を用いて、相互作用しうる宿主キナーゼの探索を行った。約 420 種の宿主キナーゼ関連蛋白質のうち、13 種類が Vpu と、36 種類が Vif と相互作用しうることを新たに見いだした。次に、siRNA によりこれらの候補因子をノックダウンした感染細胞を用いて HIV-1 粒子産生効率を調べた結果、SCYL2 と呼ばれる膜輸送関連蛋白質が HIV-1 の複製に関与する Vpu 結合因子であることが判明した。

(2) SCYL2 によるウイルス蛋白質のリン酸化調節機構の解明

免疫染色法および免疫沈降法を用いた結果、SCYL2 は、Vpu と細胞内の核近傍で共局在し、Vpu と直接的に結合することを確認した。リン酸化抗体を用いた生化学的アッセイの結果、興味深いことに、SCYL2 はキナーゼ様ドメインをもつにも関わらず、Vpu の機能に必須である 2 つのセリン残基 (Ser52,56) のリン酸化に対してはむしろ抑制的に作用した。このことから、SCYL2 は Vpu のリン酸化を負に制御する（脱リン酸化を促進する）因子である可能性が考えられた。各種脱リン酸化阻害剤を用いた阻害実験の結果、脱リン酸化酵素 PP2A を特異的に阻害するオカダ酸 (Okadaic acid) の存在下では SCYL2 による Vpu の脱リン酸化活性が消失したことから、SCYL2 が PP2A による Vpu の脱リン酸化を促進することが推測された。実際に、細胞に SCYL2 を強制発現させると、PP2A と Vpu の共局在が認められ、SCYL2 は PP2A を Vpu にリクルートすることで Vpu の脱リン酸化を誘導する可能性が示唆された。

(3) SCYL2 による HIV-1 粒子産生抑制機構の解明

Ser52,56 がリン酸化された Vpu は、F-box

ユビキチンリガーゼである β -TrCP と結合し、BST2 と呼ばれる抵抗性宿主因子をユビキチン化することで分解に導くことが知られている。BST2 は感染細胞膜上にウイルス粒子を繫留することでウイルスの出芽・放出を阻止する因子である。SCYL2 が Vpu による BST2 の抑制にどのような影響を与えるかをウエスタンブロット法および ELISA 法を用いて調べた結果、SCYL2 過剰発現下では、Vpu が BST2 を抑制・分解できず、その結果として感染細胞からのウイルス放出量が顕著に減少することが示された。このことから、SCYL2 は Vpu を不活化し、BST2 がもつ抗 HIV 活性を亢進させることでウイルス産生を負に制御していることが示唆された。

(4) I 型インターフェロン (IFN) による SCYL2 発現調節と HIV 複製制御の関連性

T 細胞を含むさまざまな細胞株に I 型 IFN 処理したところ、その 2 時間後から 6 時間後にかけて SCYL2 mRNA の発現が上昇することが分かった。種々のヒト T 細胞株に IFN α 、IFN β 、IFN γ 、TNF α を投与後、各時間で細胞を回収し、SCYL2 mRNA の発現を RT-PCR 法にて解析した。結果、I 型 IFN 処理後 6 時間後の細胞において、SCYL2 mRNA はコントロール mRNA に比べて約 3.5 倍の亢進が見られた。また蛋白質レベルでは約 3 倍の上昇が見られた。SCYL2 の 5'-UTR を用いたジーンレポーターアッセイの結果、SCYL2 のプロモーター活性は I 型 IFN によって約 4 倍の上昇することが確認された。これらの結果から、SCYL2 は I 型 IFN 誘導性蛋白質の 1 つであることが示唆された。次に、I 型 IFN がもつ抗 HIV 作用における SCYL2 の機能について考察した。HIV-1 を感染させた T 細胞に I 型 IFN 処理を行い、細胞内での SCYL2 量と Vpu のリン酸化状態を調べたところ、IFN 処理後では、細胞内の SCYL2 量が有意に増加しており、Vpu の脱リン酸化が促進されていた。SCYL2 特異的 siRNA を導入した T 細胞を用いて上記と同様の実験を行った結果、SCYL2 をノックダウンした T 細胞では、IFN 処理後でも Vpu の脱リン酸化が起こらなかった。また、IFN 処理によって BST2 が誘導されたにも関わらず、その抗 HIV 活性は SCYL2 のノックダウンによって有意に低下することが分かった。これらの結果より、SCYL2 は I 型 IFN による抗 HIV 活性の一端を担っていることが示唆された (図 2)。

(5) Vif 結合蛋白質 VBP1 の同定とウイルス複製阻害機能の解明

APOBEC3G (A3G) は、ウイルス粒子内に取り込まれることで感染細胞におけるウ

ルスゲノム複製を阻害する抵抗性宿主因子である。一方で Vif は A3G を分解することで HIV の増殖を促進することが知られているが、この Vif の機能を濃度依存的に阻害する新規宿主因子 VIK1 (Vif-interacting kinase 1) を新たに見いだした。VIK1 は Vif による A3G の細胞内分解を他の宿主因子を介さずに直接阻害することでウイルス粒子中へ A3G を取り込ませ、結果としてウイルスの複製を顕著に抑制している可能性が示唆された。現在その詳細な分子機構について解析中である。

(6) 総括

本研究の革新的かつ網羅的な次世代解析技術によって、当該分野ではこれまであまり着目されてこなかった翻訳後修飾の観点から HIV 複製機構およびその病原性を部分的に明らかにすることができた。今後はさらに当該分野における研究を加速させ、ウイルス蛋白質の翻訳後修飾を標的とした抗 HIV 薬の開発を期待したい。

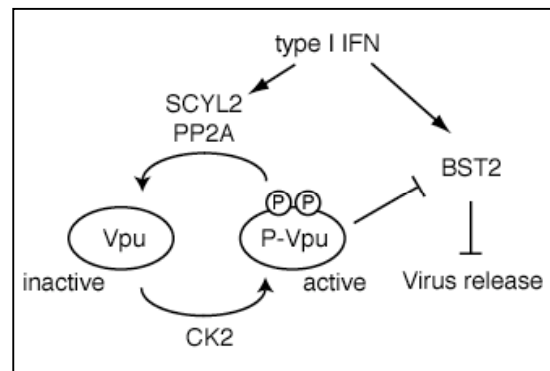


図 2 本研究によって同定された SCYL2 は、I 型 IFN による抗 HIV 活性経路の一員である

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 2 件)

(1) 宮川 敬, 梁 明秀: 宿主防御因子 Tetherin とウイルスの攻防. The journal of AIDS Research 14(1),17-24, 2012. 査読有

(2) 梁 明秀, 宮川 敬: HIV 感染と宿主因子～エイズ制圧にむけて. Yokohama Medical Journal 62: 35-41, 2011. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

(1) K Miyakawa, T Sawasaki, S Matsunaga, H Kimura, N Yamamoto, J Guatelli and A Ryo: Identification of SCYL2 as an interferon-inducible antagonist of HIV-1 Vpu.

6th German-Japanese HIV Symposium, Ruhr-Universität Bochum, German, Nov 19-24, 2011.

(2) K Miyakawa, T Sawasaki, S Matsunaga, N Yamamoto, A Ryo: Identification of a Host Factor Antagonizing Vpu-Mediated Tetherin Down-Regulation. The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA, Dec 11-15, 2010.

(3) 宮川 敬, 澤崎達也, 松永智子, 山本直樹, 梁 明秀: Posttranslational modification of HIV-1 Vpu in an innate antiviral response. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会, 2011年11月30日~12月1日, 東京.

(4) 宮川 敬: Tetherin 研究の新展開. 日本レトロウイルス研究会夏季セミナー, 2011年7月28日~30日, 山梨.

(5) 宮川 敬, 澤崎達也, 松永智子, 山下暁朗, 山本直樹, 梁 明秀: 包括的キノーム解析による HIV-1 Vpu のリン酸化調節機構の解明. 第58回ウイルス学会学術集会, 2010年11月7日~9日, 徳島.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 敬 (MIYAKAWA KEI)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号: 20580046

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし