

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25年 6月 14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：2011～2012

課題番号：23890172

研究課題名（和文） ヒト免疫不全ウイルスプロテアーゼによる自然免疫回避機構の解明

研究課題名（英文） Immune evasion by HIV-1 protease-mediated cleavage of TANK-binding kinase1

研究代表者

工藤 あゆみ (KUDOH AYUMI)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30616404

研究成果の概要（和文）：

HIV-1 のプロテアーゼにより切断される感染細胞内の蛋白質として、自然免疫応答において中心的に働く TBK1 を新たに同定した。HIV-1 プロテアーゼにより TBK1 は *in vitro*, *in vivo* において TBK1 の C 末端領域において切断されることが確認された。また、切断型の TBK1 は野生型と比較して活性が低かった。HIV-1 のコードするプロテアーゼには TBK1 を切断し宿主自然免疫機構を低く抑える機能があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Retroviruses have evolved effective strategies to evade the host immune response thereby allowing continuous and efficient viral replication. We investigated the action of the HIV-1 protease on the modification of immune signaling. Using the wheat cell-free protein synthesis system and the amplified luminescent proximity homogeneous assay (AlphaScreen), we found that TANK-binding kinase 1 (TBK1) is a substrate for HIV-1 protease. We further revealed that HIV-1 protease cleaved the C-terminal domain of TBK1 and this effect can impair the function of TBK1 for the phosphorylation of IRF-3 and the transactivation of $\text{INF } \beta$ promoter. These results together indicate that HIV-1 protease may disrupt the innate immune signaling via targeting TBK1 leading to escape from the anti-viral immune response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：HIV-1、プロテアーゼ、蛋白質リン酸化酵素、自然免疫、TBK1

1. 研究開始当初の背景

現在、HIV への新規感染者は毎年 2 百万人を数える状況にある。多剤併用療法の確立により AIDS を含む HIV-1 感染症患者の生命予後は格段に改善した。一方、既存の薬剤に対する耐性ウイルスの出現や、薬剤の持続投与による重篤な副作用など解決すべき問題は残されている。こうした中、HIV-1 の持続感染およびエイズの発症機序を詳細に理解し、治療に向けた有効な対策を立てることが必要である。そのため、HIV-1 の複製機構の知見から新たな薬剤標的を探索することが重要である。HIV-1 感染症の成立の過程では、ウイルス遺伝子由来因子が宿主側に本来備わっている機構に正あるいは負の制御を与えることで、巧みに利用し、ウイルス増殖環境の構築や病原性発現つながっている。宿主細胞内にはウイルス感染や外的ストレスに応答した防御システムが備わっているが、自然免疫に代表されるこうした防御システムにおけるシグナル伝達には、リン酸化酵素が主要な役割を担っている。しかしながら、HIV-1 を含め多くのウイルスはこうした宿主側の防御を相殺する機構を持っていることが報告されている。例えば、HIV-1 と同様に RNA ウイルスである HCV は I 型 INF (インターフェロン) 産生を促す宿主自然免疫経路の IPS-1 と TRIF を切断し、下流へのシグナルを遮断していることが分かっている (Meylan E. et al: Nature, 437:1167-1172, 2005)。このような、ウイルスプロテアーゼによる宿主自然免疫シグナルの遮断は HCV 持続感染に有利な環境構築を助けていると考えられている。一方で、HIV-1 研究では、ウイルス由来因子が宿主自然免疫システムを直接阻害するとした報告はなされていない。そこで本研究では、HIV-1 がコードするプロテアーゼが宿主シグナル伝達系を相殺すると仮定し、ウイルス-宿主相互作用の新規標的発見を目的に大規模スクリーニングを行う。

2. 研究の目的

AIDS の原因である HIV-1 の増殖は、感染細胞内における宿主細胞因子とウイルス由来産物との複雑な拮抗関係により成立している。宿主細胞が本来備えているストレス応答や自然免疫といったウイルスに不利に作用するシグナル伝達について、HIV-1 はそれを相殺できると論じられてはきたが、それを証明した報告は少ない。そこで本研究課題では、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた宿主タンパク質リン酸化酵素のライブラリー作成を行い、網羅的にウイルス蛋白質との相互作用をスクリーニングすることで HIV-1 プロテアーゼにより切断される宿主由来の新規標的タンパク質の同定を行っている。自然

免疫において主要な役割を担う宿主タンパク質の分解に焦点を当て、ウイルス感染や病態との関連について詳細に検証を行い、これまでウイルス中心であった治療薬開発に宿主が本来もつ防御作用を視野に入れた新しいアプローチを提案する。

3. 研究の方法

HIV-1 プロテアーゼにより直接切断される宿主蛋白質リン酸化酵素である TBK1 との相互作用を解明するため、*in vitro*, *in vivo* 両方向から解析を行う。*In vitro* 解析としては、コムギ無細胞系を用いた蛋白質精製標品を用い HIV-1 プロテアーゼによる TBK1 切断アッセイをもとに構築し、TBK1 の下流の IRF3 リン酸化が *in vitro* において HIV-1 プロテアーゼ処理により阻害できるか検討する。HIV-1 プロテアーゼ、TBK1 の遺伝子導入による大量発現により細胞内における TBK1 切断を検討する。さらに HIV-1 感染細胞において、ウイルス学的、分子生物学的解析を行うことで、HIV-1 プロテアーゼと TBK1 切断、および TBK1 下流の INF β 産生に与える影響を解明する。HIV-1 プロテアーゼと TBK1 の細胞内局在変化を単独発現と、共発現、ウイルス感染系を用い、細胞免疫染色により比較する。TBK1 ノックダウンを行い、TBK1 存在が HIV-1 感染に与える影響を明らかにする。

4. 研究成果

コムギ無細胞系により 444 種のヒトタンパク質リン酸化酵素の両端にタグを付けた状態で蛋白質合成を行い解析に用いた。AlphaScreen により HIV-1 プロテアーゼによる切断が認められたものは 444 種類中 28 種であった。このうち *In Vitro* による切断実験を行い、ウェスタンブロッティングで切断された産物を確認できた 19 種のヒトタンパク質リン酸化酵素を HIV-1 プロテアーゼに新規基質候補とした。19 種のタンパク質リン酸化酵素は、細胞周期制御に係るもの、MAPK ファミリー、エネルギー代謝に係るものと、細胞質において自然免疫応答などシグナル伝達経路に係るものが含まれた (図 1)。このうち本研究課題では、自然免疫応答に係る TBK1 に着目して解析を進めた。

HA-TBK1 と HIV-1 Gag-pol (HIV-1 プロテアーゼ発現ベクター) を Co-Transfection すると細胞内で TBK1 の切断が認められた。この時、HIV-1 のプロテアーゼ特異的阻害剤であるアンプレナビル (APV) を処理するとこの切断が起きなくなることから、細胞内において TBK1 は HIV-1 プロテアーゼ依存的に切断されることが明らかとなった (図 2)。

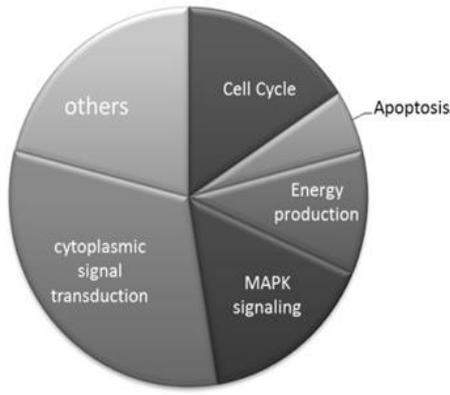


図1：HIV-1 プロテアーゼにより切断されたヒト蛋白質リン酸化酵素の分類

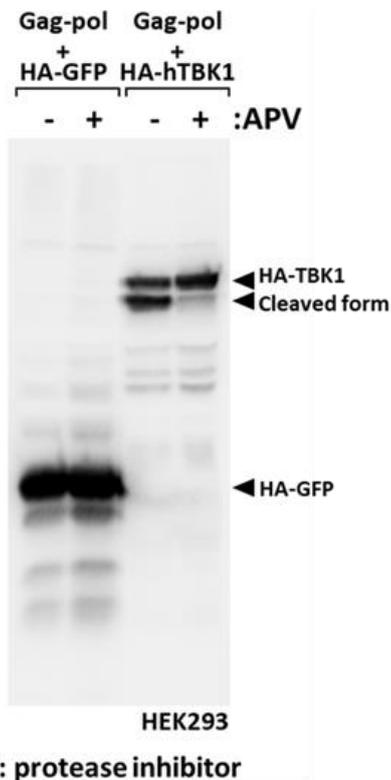


図2：HIV-1 プロテアーゼによる TBK1 の切断

HIV-1 プロテアーゼにより切断された TBK1 のアミノ酸シーケンスを行い、切断部位の同定を試みた。その結果、切断された TBK1 は 1-683 のサイズであったことから、切断部位と予測される 683 番目と 684 番目のロイシンをアラニンに置換した変異体を作成し、HIV-1 プロテアーゼによる切断活性の変化をウェスタンブロッティングにより解析した。TBK1 (LV-AA) 変異体は HIV-1 プロテアーゼによる切断を受けなかった。次に、TBK1 (1-683) 変異体と野生型 TBK1 の INFβ プロモーター活性の比較をルシフェラーゼアッセイにより行った。TBK1 (1-683) 変異体は TBK1 (1-729WT) と比較して、ルシフェラーゼ

活性が著しく低く抑えられていた。

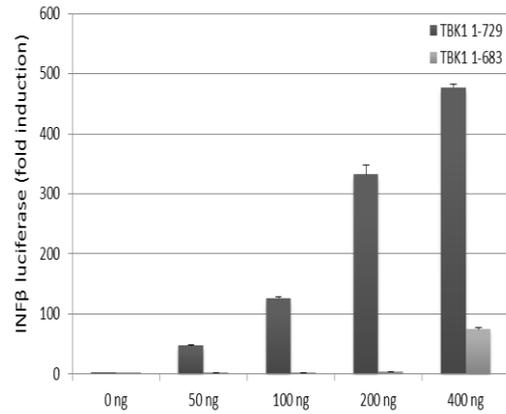


図3：野生型 TBK1 と切断型 TBK1 の活性の比較

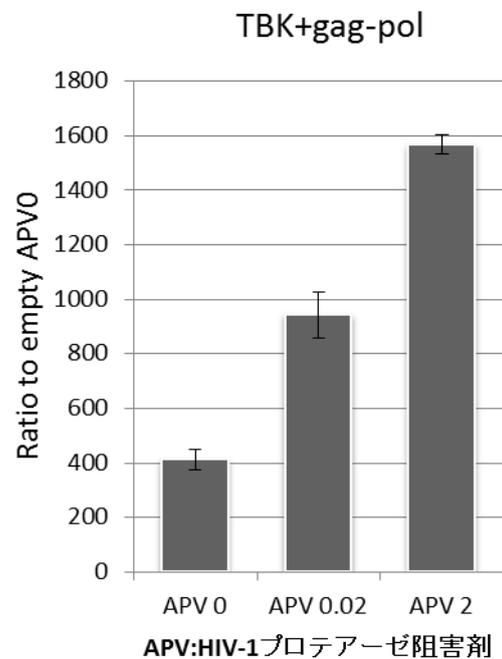


図4：プロテアーゼ阻害剤添加による TBK1 活性の増大

次に、HIV-1 Gag-pol を発現させたときの TBK1 によるインターフェロンβのプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイをもとに測定したところ、TBK1 と Gag を共発現させたときのインターフェロンβのプロモーター活性は、TBK1 のみを発現させたときとほとんど変化がなかったが、TBK1 と Gag-Pol を共発現させたときのインターフェロンβのプロモーター活性はコントロールの2倍活性が高くなっていった。この時、プロテアーゼ阻害剤を添加することにより、インターフェロンβのプロモーター活性が増大した。以上のこ

とより、TBK1 は HIV-1Gag-Pol 領域共存在下において活性化するが、HIV-1 プロテアーゼにより切断されることにより、インターフェロンベータのプロモーター活性につながるシグナル経路を不活化されていることが示された。

遺伝子導入法による刺激で自然免疫経路を活性化する可能性を排除するため、実験系に Tet システムを導入した Gag-Pol 野生型と Gag-Pol (D25N) プロテアーゼ失活型の二つの細胞株 (HeLa 細胞由来、THP1 細胞由来) を樹立し、実験に用いた。その結果、Gag-Pol (D25N) プロテアーゼ失活型の発現時では野生型の 2 倍に TBK1 の活性化が認められた。また、HIV-1 プロテアーゼ阻害剤であるダルナビルを添加した場合も 2.2 倍 TBK1 が活性化された。このことから、細胞内では Gag-Pol 存在下で TBK1 が活性化するが、HIV-1 プロテアーゼにより TBK1 を切断し自然免疫経路活性化を抑えていることが明らかとなった。

次に実際の HIV-1 感染細胞における TBK1 の機能を比較するため、臨床分離株である多剤耐性の HIV モレキュラークローンを用いて解析を行った。すると、野生型では TBK1 の切断が起きるため TBK1 の活性化が低いが多剤耐性クローン 4 種を感染させた細胞では TBK1 切断が認められず、INF β のプロモーター活性も高いことが分かった。このことは、変異の蓄積が起きた HIV1 ウイルス株では感染細胞内において自然免疫応答を強く誘発し免疫攪乱している可能性を示唆した。

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)

[学会発表] (計 3 件)

① 工藤あゆみ、宮川敬、松永智子、森下了、早川智、梁明秀、「HIV アクセサリー蛋白質 Vpx と相互作用する宿主因子の網羅的探索と機能解析」、第 26 回日本エイズ学会学術集会、慶應義塾大学 日吉キャンパス (神奈川県) 2012 年 11 月 25 日

② 工藤あゆみ、高濱正吉、澤崎達也、梁明秀、「Atypical protein kinase C による HIV-1 Gag Ser487 のリン酸化はウイルス感染性を増強する」、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪 (大阪府) 2012 年 11 月 13 日

③ Tomohiro Kanuma, Ayumi Kudoh, Nao Jounai, Fumihiko Takeshita, Tatsuya Sawasaki, Akihide Ryo
“Immune evasion by HIV-1 Protease-mediated cleavage of TANK-binding kinase 1” 第 59 回日本ウイルス学会学術集会、札幌コンベンションセ

ンター (北海道)、2011 年 11 月 13 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤あゆみ (KUDOH AYUMI)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30616404

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：