

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659208

研究課題名(和文) Vpx感受性を示す新規抗HIV/SIV細胞因子の探索と同定

研究課題名(英文) New anti-HIV/SIV cellular-factors counteracted by Vpx: their search and identification

研究代表者

足立 昭夫 (ADACHI, Akio)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：90127043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに我々が得ている種々のミエロイドあるいはリンパ系細胞株を用いたHIV-2の分子遺伝学的解析結果に基づき、新たに探索システムを構築し、SAMHD1以外の新しいVpx標的細胞因子の同定を目指した研究を行なった。SAMHD1が全く発現していないリンパ球でも効率的なHIV-2複製にはVpxが必要であることの遺伝学的、生化学的証明など、重要なウイルス学的知見が得られた。さらに、本研究では、Vpxの効率的翻訳に必須のPPM(Poly-Proline Motif)配列をVpx内に同定した。

研究成果の概要(英文)：On the basis of our previous results on molecular genetic analyses of HIV-2 in various myeloid and lymphoid cell lines, we newly developed systems to search and identify new cellular factors that are counteracted by Vpx, other than SAMHD1. We have obtained important virological results to show this concept: genetic and biochemical evidences demonstrating that Vpx is required for efficient virus replication in actively proliferating lymphocytes without SAMHD1 expression. Furthermore, in this study, we have identified the PPM (Poly-Proline Motif) sequence in Vpx that is critical for efficient translation of Vpx.

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：ウイルス HIV Vpx 拮抗因子 細胞因子 蛋白質翻訳

## 1. 研究開始当初の背景

霊長類免疫不全ウイルスに属するヒト免疫不全ウイルスはゲノム構造上1型(HIV-1)と2型(HIV-2)とに分類される。HIV-1は世界中に蔓延しエイズの主要原因ウイルスとなっているが、SIVmac(アカゲザル由来免疫不全ウイルス)に近縁のHIV-2は一部地域に存在するのみで病原性も弱いとされている。遺伝子レベルで特徴的なのは *vpx* (HIV-2に特異的) および *vpu* (HIV-1に特異的) であるが、*Vpu* の持つ抗 Tetherin/BST-2 活性は SIVmac ウイルス群では Nef が担っていることから (Cell Host & Microbe 6:409, 2009)、*Vpx* が HIV-1 と HIV-2 のウイルス学的特性の差を決定している主な要因であると考えられる。*Vpx* がマクロファージでの HIV-2 複製に必須であることは研究初期の段階からわかっていたが、その機能はウイルスゲノムの核移行であるとされていた(EMBO J. 15:6155, 1996)。最近になり、*Vpx* はマクロファージを含む感染ミエロイド細胞において抗ウイルス因子のアンタゴニストとして働き、逆転写過程に効果を示すという実験結果が我々を含む複数の研究グループにより次々報告された (Gene Ther. 13:991, 2006; Retrovirology 4:2, 2007; PLoS Pathog. 4:e1000057, 2008; PLoS Pathog. 4:e1000059, 2008; J. Virol. 82:7752, 2008)。さらに、細胞内で *Vpx* を単独発現させ免疫沈降した時の結合性から、SAMHD1 あるいは APOBEC3A が *Vpx* の標的分子であると主張する論文が発表された (Nature 474:654, 2011; Nature 474:658, 2011; PLoS Pathog. 7:e1002221, 2011)。しかし、SAMHD1 は細胞核に存在し、*Vpx* 依存性のない未分化 THP-1 細胞や株化単層細胞で恒常的に発現していること、また、*Vpx* 依存性のある株化 T 細胞で発現していないことがわかっており (未発表データ)、*Vpx* をコードする HIV-2/SIVmac を用いたウイルス学的検証が実質的に行われ

ていないこととあわせ、細胞種特異的抗ウイルス抑制因子としての基準を完全に満たしているとは思われない。したがって、現在も *Vpx* に感受性 (*Vpx* による分解) の新規抗ウイルス細胞因子の探索は活発に行なわれている。

## 2. 研究の目的

霊長類免疫不全ウイルスには全て数種類のアクセサリー蛋白質があり、ウイルス複製を最適化することによりその存続・伝播・病原性発現に寄与している。アクセサリー蛋白質の一つである *Vpx* はミエロイド細胞系(樹状細胞やマクロファージなど)におけるウイルス複製に必須であるが、その詳細は全く不明であった。ごく最近、欧米のグループが *Vpx* の標的細胞因子を同定したと報告した (Nature 474:654, 2011; Nature 474:658, 2011; PLoS Pathog. 7:e1002221, 2011)。しかし、これら二つの因子は通常考えられるウイルス抑制因子としての基準を満たしていない。本研究課題では、*Vpx* に関して蓄積された多くのウイルス学的知見に基づき系統的に構築したシステム群を用い、全く新しい内在性抗ウイルス因子の同定を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究課題の目的は、*Vpx* の真の拮抗因子を同定することである。拮抗因子の探索にあたっては、われわれがウイルス学的解析により得た知見を活用し、THP-1 細胞(未処理および PMA/IFN 処理)、HSC-F 細胞、M1.3S 細胞等を用いる。遺伝子工学的アプローチ(マイクロアレイ解析あるいは cDNA サブトラクションライブラリーを用いた発現スクリーニング)および生化学的アプローチ(蛋白質相互作用解析)を駆使し、候補因子を捕捉する。本研究では、想定される拮抗因子の生物学的基準を明確に設定し(本因子発現量と

Vpx 欠損ウイルス複製との逆相関、本因子と Vpx の細胞内共局在、本因子発現の細胞種特異性など) HIV-2 を用いたウイルス学的/分子ウイルス学的アッセイシステムにより Vpx の natural target の同定を試みる。

#### 4. 研究成果

すべてのヒト免疫不全ウイルス/サル免疫不全ウイルス (HIV/SIV) はアクセサリー蛋白質 (Vif、Vpx、Vpr、Vpu 及び Nef) を持つ。アクセサリー蛋白質は宿主細胞に存在する様々な因子と相互作用することによりウイルスの複製・持続感染・伝播の最適化をもたらすと考えられている。ごく最近、Vpx とある種の SIV 由来 Vpr はミエロイド細胞 (樹状細胞やマクロファージなど) 中の SAMHD1 や APOBEC3A を標的としこれを分解することが報告された。しかし、これらの細胞因子はミエロイド細胞に特異的に存在するわけではなく、リンパ球ではほとんど存在しない。Vpx はミエロイド細胞とリンパ球における HIV-2/SIVmac の複製に重要であることが遺伝学的解析から明らかにされているので、Vpx の標的細胞因子はほかにも存在する可能性が高い。

初年度に選択した 15 個の細胞因子について、その恒常発現細胞 (ネコ CRFK 細胞) を樹立して検討した。しかし、Vpx 欠損ウイルスに対して特異的な抗ウイルス活性を示す因子の同定には至らなかった。最終年度の特筆すべき成果は、Vpx の翻訳に関わる Vpx 内領域の同定である (J. Gen. Virol. 95:179, 2014)。プロリン残基が連続する配列 (poly-proline motif; PPM) を欠損させると顕著に Vpx 翻訳量が減少する。原核細胞と真核細胞で同じ成績が得られることから、同等の細胞因子が関与していると推測される。現在、新しい抗 HIV 薬の開発を視野に、Vpx の翻訳に関与する細胞因子の探索と上記 Vpx 標的因子の探索とを並行して進めている。

#### 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 11 件)

- 1) Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yokoyama, M., Sato, H., Masuda, T., and Adachi, A. 2014. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. *Journal of Virology* 88: 4145-4160. doi:10.1128/JVI.01859-13. 査読有
- 2) Miyake, A., Miyazaki, Y., Fujita, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2014. Role of poly-proline motif in HIV-2 Vpx expression. *Frontiers in Microbiology* 5: 24. doi:10.3389/fmicb.2014.00024. 査読有
- 3) Miyake, A., Fujita, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Otsuka, M., Ode, H., Iwatani, Y., Sakai, Y., Doi, N., Nomaguchi, M., Adachi, A., and Miyazaki, Y. 2014. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. *Journal of General Virology* 95:179-189. doi: 10.1099/vir.0.057364-0. 査読有
- 4) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Miyakawa, K., Ryo, A., Ode, H., Iwatani, Y., Miura, T., Igarashi, T., Sato, H., and Adachi, A. 2013. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors.

- Journal of Virology 87: 11447-11461. doi:10.1128/JVI.01549-13. 査読有
- 5) Doi, N., Okubo, A., Yamane, M., Sakai, Y., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2013. Growth potentials of CCR5-tropic HIV-1mt clones in macaque cells. *Frontiers in Microbiology* 4: 218. doi: 10.3389/fmicb.2013.00218. 査読有
  - 6) Saito, A., Nomaguchi, M., Kono, K., Iwatani, Y., Yokoyama, M., Yasutomi, Y., Sato, H., Shioda, T., Sugiura, W., Matano, T., Adachi, A., Nakayama, E.E., and Akari, H. 2013. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* 94: 1318-1324. doi:10.1099/vir.0.050252-0. 査読有
  - 7) Nomaguchi, M., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Nakayama, E.E., Shioda, T., Yokoyama, M., Sato, H., and Adachi, A. 2013. Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15: 319-328. doi:10.1016/j.micinf.2013.01.005. 査読有
  - 8) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Saito, A., Doi, N., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., and Adachi, A. 2013. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15: 56-65. doi: 10.1016/j.micinf.2012.10.013. 査読有
  - 9) Miyakawa, K., Sawasaki, T., Matsunaga, S., Tokarev, A., Quinn, G., Kimura, H., Nomaguchi, M., Adachi, A., Yamamoto, N., Guatelli, J., and Ryo, A. 2012. Interferon-induced SCYL2 limits release of HIV-1 by triggering PP2A-mediated dephosphorylation of the viral protein Vpu. *Science Signaling* 5: ra73. doi:10.1126/scisignal.2003212. 査読有
  - 10) Fujita, M., Nomaguchi, M., Adachi, A., and Otsuka, M. 2012. SAMHD1-dependent and -independent functions of HIV-2/SIV Vpx protein. *Frontiers in Microbiology* 3: 297. doi:10.3389/fmicb.2012.00297. 査読有
  - 11) Nomaguchi, M., Doi, N., Matsumoto, Y., Sakai, Y., Fujiwara, S., and Adachi, A. 2012. Species tropism of HIV-1 modulated by viral accessory proteins. *Frontiers in Microbiology* 3: 267. doi: 10.3389/fmicb.2012.00267. 査読有
- 〔学会発表〕(計 15 件)
- 1) 齋藤暁、大附寛幸、東濃篤徳、鈴木紗織、松田健太、高橋尚史、松岡佐織、岩谷泰雅、杉浦瓦、野間口雅子、足立昭夫、安富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：CCR5 指向性を示す新規サル指向性 HIV-1 はサル個体に持続感染する。第 27 回日本エイズ学会、2013 年 11 月 20 日、市民会館崇城大学ホール（熊本県）
  - 2) チッフチ ハリルイブラヒム、古賀涼子、岩谷泰雅、野間口雅子、足立昭夫、大塚雅巳、藤田美歌子：SAMHD1-independent function of HIV-2 Vpx protein。第 27 回日本エイズ学会、2013 年 11 月 20 日、市民会館崇城大学ホール（熊本県）
  - 3) 足立昭夫、土肥直哉、藤原佐知、野間口雅子：アカゲザル PBMC で効率よく増殖

- する HIV-1mt の構築. 第 61 回日本ウイルス学会、2013 年 11 月 11 日、神戸国際会議場（兵庫県）
- 4) 齋藤暁、大附寛幸、東濃篤徳、鈴木紗織、松田健太、高橋尚史、松岡佐織、岩谷泰雅、杉浦瓦、野間口雅子、足立昭夫、安富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：CCR5 指向性を示す新規サル指向性 HIV-1 はサル個体に持続感染する. 第 61 回日本ウイルス学会、2013 年 11 月 11 日、神戸国際会議場（兵庫県）
  - 5) 三宅在子、宮崎恭行、野間口雅子、足立昭夫：Vpx 発現における C 末端ポリプロリンモチーフの機能の解析. 第 61 回日本ウイルス学会、2013 年 11 月 11 日、神戸国際会議場（兵庫県）
  - 6) 山本充奈美、野間口雅子、古賀涼子、岩谷泰雅、高宗暢暁、三隅将吾、大塚雅巳、足立昭夫、藤田美歌子：マクロファージにおける SAMHD1 非依存的な HIV-2 Vpx の機能. 第 61 回日本ウイルス学会、2013 年 11 月 11 日、神戸国際会議場（兵庫県）
  - 7) 土肥直哉、藤原佐知、酒井遥介、大久保綾香、山根瑞萌、足立昭夫、野間口雅子：R5-tropic HIV-1mt Env 適応変異の宿主細胞依存性増殖促進機構の解析. 第 61 回日本ウイルス学会、2013 年 11 月 11 日、神戸国際会議場（兵庫県）
  - 8) 野間口雅子、三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、宮崎恭行、横田恭子、横山勝、佐藤裕徳、増田貴夫、足立昭夫：HIV-1 pol (4895-4933) の 1 塩基置換によるウイルス複製制御機構の解析. 第 61 回日本ウイルス学会、2013 年 11 月 10 日、神戸国際会議場（兵庫県）
  - 9) 宮崎恭行、三宅在子、野間口雅子、内山恒夫、足立昭夫：in vitro 再構築系を用いた HIV-1/HIV-2 CA アセンブリーの安定性に関する解析. 第 61 回日本ウイルス学会、2013 年 11 月 10 日、神戸国際会議場（兵庫県）
  - 10) 藤野悠那、三宅在子、古賀涼子、川村宗吾、大出裕高、岩谷泰雅、野間口雅子、足立昭夫、大塚雅巳、宮崎恭行、藤田美歌子：HIV-2 Vpx 富プロリン領域の機能. 第 26 回日本エイズ学会、平成 2012 年 11 月 24 日、慶應義塾大学日吉キャンパス（神奈川県）
  - 11) 野間口雅子、三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、宮崎恭行、足立昭夫：HIV-1 インテグラーゼ C 末端領域の 1 塩基置換によるウイルス複製制御機構の解析. 第 60 回日本ウイルス学会、2012 年 11 月 14 日、大阪国際会議場（大阪府）
  - 12) 藤田美歌子、野間口雅子、古賀涼子、藤野悠那、大塚雅巳、足立昭夫：SAMHD1 非依存的な HIV-2 Vpx の機能. 第 60 回日本ウイルス学会、2012 年 11 月 14 日、大阪国際会議場（大阪府）
  - 13) 三宅在子、藤野悠那、古賀涼子、川村宗吾、大出裕高、岩谷泰雅、野間口雅子、足立昭夫、大塚雅巳、藤田美歌子、宮崎恭行：Vpx 発現における C 末端ポリプロリンモチーフの機能の解析. 第 60 回日本ウイルス学会、2012 年 11 月 14 日、大阪国際会議場（大阪府）
  - 14) 土肥直哉、藤原佐知、酒井遥介、松本 唯、足立昭夫、野間口雅子：R5-tropic HIV-1mt NL-DT562 の Env 適応変異による増殖促進機構の解析. 第 60 回日本ウイルス学会、2012 年 11 月 13 日、大阪国際会議場（大阪府）
  - 15) 宮崎恭行、三宅在子、野間口雅子、内山恒夫、足立昭夫：in vitro 再構築系を用いた HIV-2 CA アセンブリーの安定性に関する解析. 第 60 回日本ウイルス学会、2012 年 11 月 13 日、大阪国際会議場（大阪府）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

足立 昭夫 (ADACHI, Akio)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号： 9 0 1 2 7 0 4 3

### (2) 研究分担者

野間口 雅子 (NOMAGUCHI, Masako)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・准教授  
研究者番号： 8 0 4 5 2 6 4 7

### (3) 研究分担者

宮崎 恭行 (MIYAZAKI, Yasuyuki)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号： 7 0 6 0 7 2 3 3

### (4) 研究分担者

三宅 在子 (MIYAKE, Ariko)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号： 2 0 5 4 8 6 2 2