

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790443

研究課題名(和文) Vpx の C 末端領域に存在するポリプロリンモチーフの存在意義と機能解析

研究課題名(英文) Role of poly-proline motif in HIV-2 Vpx expression.

研究代表者

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：70607233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：HIV-2特有のタンパクであるVpxはC末端領域に高度に保存された7つの連続するプロリン残基からなる特徴的なモチーフ(ポリプロリンモチーフ：PPM)があり、Vpxの機能に必須であることが知られている。本研究ではVpxのPPMがVpxの機能発現のためにどのような役割を果たしているのかについて解析を行い、以下のことを明らかにしてきた。マクロファージのようなHIV-2増殖にVpxを必要とする細胞でのPPM変異体のウイルス増殖能とVpx PPM変異体の発現量はよく一致していた。また、セルフリーでの転写・翻訳系を用いた研究により、PPMは翻訳過程において、Vpxの発現を促進していることが示された。

研究成果の概要(英文)：Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) carries an accessory protein Vpx that is important for viral replication in natural target cells. In its C-terminal region, there is a highly conserved poly-proline motif (PPM) consisting of seven consecutive prolines. We have shown that PPM is critical for Vpx expression and viral infectivity. To elucidate the molecular basis underlying this observation, we analysed the expression of Vpx proteins with various PPM mutations by in vivo and in vitro systems. We found that the number and position of consecutive prolines in PPM are important for Vpx expression, and demonstrated that PPM is essential for efficient Vpx translation. Finally, we examined the Vpx of simian immunodeficiency virus from rhesus monkeys (SIVmac), which also has seven consecutive prolines, for PPM-dependent expression. A multi-substitution mutation in the PPM markedly reduced the expression level of SIVmac 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：HIV

1. 研究開始当初の背景

HIV-2 特有のタンパクであるVpx はマクロファージでの増殖に必須であり、逆転写産物の生成以前の過程で機能することが知られている。また、Vpxは、HIV-1のみならず、マウス白血病ウイルスのようなレトロウイルスに対してもウイルス増殖が促進されることが報告され、Vpx は大きな注目を集めている。Vpx のC末端領域に高度に保存された7つの連続するプロリン残基からなる特徴的なモチーフがあり、Vpx の機能に必須であることが知られているが、その機能については不明である。

2. 研究の目的

(1) 本研究ではVpx のC末端領域に存在するポリプロリンモチーフが Vpx の機能発現のためにどのような役割を果たしているのかについて解析を行う。

(2) Vpx のC末端領域に存在するポリプロリンモチーフポリプロリンモチーフの機能発現の分子機構について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) pEF1/*Myc*-HisA にN末端にFLAG タグを持つ *vpx* 遺伝子を挿入した発現ベクター、及びその PPM 変異体を作製した。それら発現ベクターを 293T 細胞に導入し、その発現量をウエスタンブロット法により比較した。

(2) PPM のプロテアソームおよびリソソーム分解への関与を検討するため、MG-132 もしくはバフィロマイシン A1 を使用した。

(3) PPM の転写過程への影響を検討するため、細胞内における *vpx* mRNA をリアルタイム PCR 法により定量した。

(4) PPM の翻訳過程への影響を検討するため、ウサギ網状赤血球抽出液を用いた *in vitro* 転写/翻訳反応を行いその発現量を比較した。

(5) 大腸菌 S30 株の抽出液を用いた *in vitro* 転写/翻訳反応計用い、ウサギ網状赤血球抽出液を用いた *in vitro* 転写/翻訳反応と同様に、Vpx PPM 変異体の発現量を比較した。

4. 研究成果

(1) これまで、pME18Neo ベクターにN末端にFLAG タグを持つ *vpx* 遺伝子を挿入した発現ベクター、及びその PPM 変異体を 293T 細胞に導入し、野生型 Vpx およびその変異体について解析を行ってきたが、本研究では、新たに、pEF1/*Myc*-HisA ベクターを用いた。このことにより、野生型 Vpx の発現と比較すると約 100 倍 Vpx の細胞内での発現の上昇がみられた (Figure 1b)。このことにより、細胞内での発現効率の低い Vpx PPM 変異体の発現効率について、より詳細な解析が可能とな

った (Figure 1a, c)。その結果、Vpx 発現ベクターを導入した 293T 細胞において PPM 変異体の発現は野生株と比べて著しく低下し、その結果から、マクロファージや HSC-F 細胞のような Vpx 要求性細胞におけるウイルスの増殖性とよく相関していることが明らかとなった。この結果から、PPM は Vpx の発現を調節していることが示された。

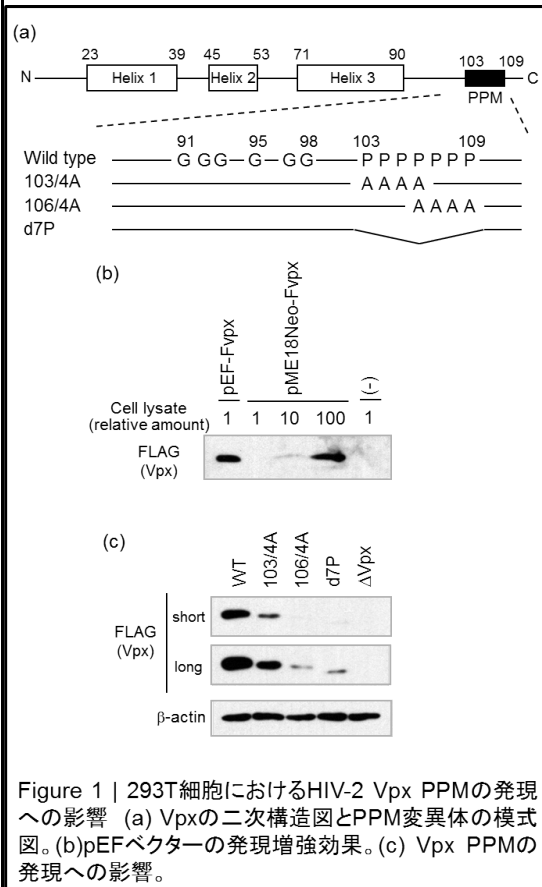
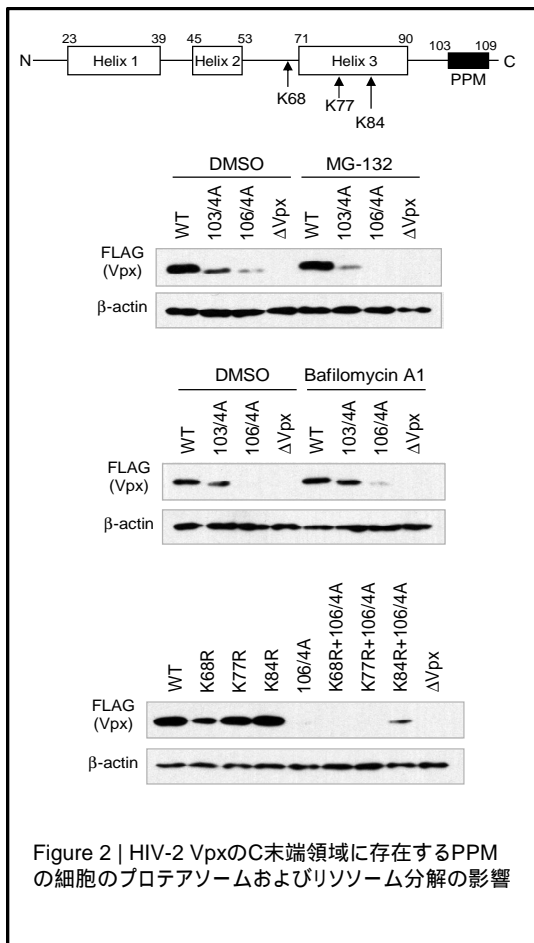
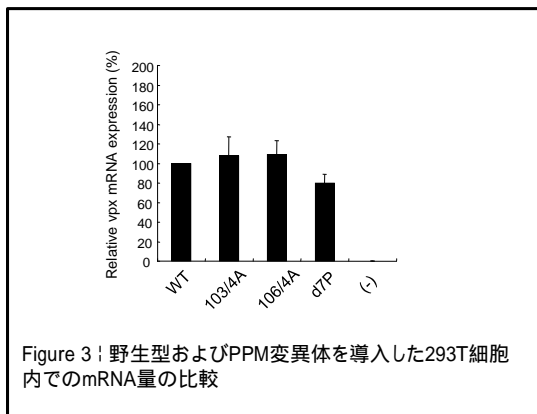


Figure 1 | 293T細胞におけるHIV-2 Vpx PPMの発現への影響 (a) Vpxの二次構造図とPPM変異体の模式図。(b)pEFベクターの発現増強効果。(c) Vpx PPMの発現への影響。

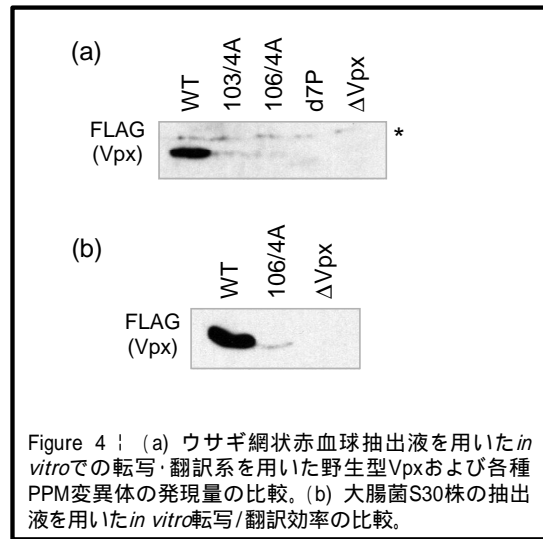
(2) 我々は当初、PPM が細胞内での Vpx の分解を阻害していると考え、PPM 変異体の発現はプロテオソーム阻害剤である MG-132 やリソソーム阻害剤であるバフィロマイシン A1 を用いた解析を行った (Figure 2)。しかし、予想に反して、MG-132 やバフィロマイシン A1 存在下においても回復せず、その発現量低下がプロテアソーム分解やリソソーム分解によるものではないことが示唆された。さらに、プロテアソーム分解はタンパク中のリシン残基にユビキチンが共有結合により結合することで起こることが示されているので、Vpx 中のリシン残基についても変異体を作成したが、Vpx および Vpx PPM 変異体の発現にほとんど影響は見られなかったことから、HIV-2 Vpx PPM は Vpx に細胞内での安定性を付与するものではないと思われる。



(3) そこで、我々は Vpx PPM が転写または翻訳過程で Vpx の発現を促進しているのではないかと考え、解析を行った。Vpx 発現ベクターを導入した 293T 細胞における vpx の mRNA 量は野生株と PPM 変異体の間で差が見られなかった (Figure 3)。



(4) さらに、細胞内での様々なタンパク分解や局在などの様々な因子を出来るだけ取り除き、タンパク翻訳効率を比較するために、ウサギ網状赤血球抽出液を用いた *in vitro* での転写・翻訳系を用い、解析を行った (Figure 4a)。その結果、各種 PPM 変異体は細胞内での Vpx 発現量と同様の発現量の低下を示した。これらのことから、PPM は vpx の mRNA 転写後、翻訳過程での効率上昇に寄与すると考えられた。加えて、大腸菌 S30 株の抽出液を用いた *in vitro* 転写/翻訳反応においても、ウサギ網状赤血球抽出液を用いた *in vitro* 転写/翻訳反応と同様に、Vpx PPM 変異体の発現量の低下がみられた (Figure 4b)。



この結果は Vpx PPM が真核生物、原核生物共通の翻訳機構によって、Vpx の発現を促進していること示している。現在、タンパク翻訳に関わる因子の中から真核生物、原核生物共通の因子について、Vpx の発現を促進する因子を探索している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)
 Miyake Ariko, Miyazaki Yasuyuki, Fujita Mikako, Nomaguchi Masako, Adachi Akio. Role of poly-proline motif in HIV-2 Vpx expression. *Frontiers in Microbiology*. 査読有, 2014 Jan 28;5:24. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00024.

Miyake Ariko, Fujita Mikako, Fujino Haruka, Koga Ryoko, Kawamura Sogo, Otsuka Masami, Ode Hiroaki, Iwatani Yasumasa, Sakai Yosuke, Doi Naoya, Nomaguchi Masako, Adachi Akio, Miyazaki Yasuyuki. Poly-proline motif in HIV-2

Vpx is critical for its efficient translation.

Journal of General Virology. 査読有、2014 Jan;95(Pt 1):179-189.

DOI: 10.1099 /vir.0.057364-0.

Nomaguchi Masako, Fujita Mikako, Miyazaki Yasuyuki, Adachi Akio. Viral tropism. Frontiers in Microbiology. 査読有、2012 Aug 3;3:281.

DOI: 10.3389/fmicb.2012.00281.

[学会発表](計7件)

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~2013年11月12日、神戸国際会議場(兵庫県)

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~2013年11月12日、神戸国際会議場(兵庫県)

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10日~2013年11月12日、神戸国際会議場(兵庫県)

藤野 悠那、三宅 在子、古賀 涼子、川村 宗吾、大出 裕高、岩谷 靖雅、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 富ポリリン領域の機能、第26回日本エイズ学会、2012年11月24日、慶応義塾大学日吉キャンパス(神奈川県)

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)

三宅 在子、藤野 悠那、古賀 涼子、川村 宗吾、大出 裕高、岩谷 靖雅、野間口 雅子、大塚 雅巳、足立 昭夫、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)

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

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：70607233