

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790445

研究課題名(和文) HIV-1の増殖抑制に関わる内在性レトロウイルスの解析

研究課題名(英文) Analysis of the endogenous retrovirus involved in suppression of HIV-1 replication.

研究代表者

門出 和精 (MONDE, Kazuaki)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：70516137

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)：生来ヒトゲノムに組み込まれているヒト内在性レトロウイルスは、化石レトロウイルスとも呼ばれるが、HIV-1感染により活性化すると報告されている。そこで我々は、ヒト内在性レトロウイルスがHIV-1のような外来性レトロウイルスに対して排他的に働くか検証した。本研究により、ヒト内在性レトロウイルスは、HIV-1と細胞内で共発現した場合、細胞内で干渉し、HIV-1の粒子形成を阻害するだけでなく、放出したHIV-1の粒子形態に影響し、感染性を著しく低下させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Human endogenous retroviruses, which are remnants of ancestral retroviruses integrated into the human genome, are generally defective in viral replication. During HIV-1 infection, activation of human endogenous retroviruses have been observed in some groups. We investigated whether human endogenous retroviruses could suppress the replication of human exogenous retroviruses as HIV-1. In this study, we found that human endogenous retroviruses reduces release efficiency of HIV-1 through the coassembly between HIV-1 Gag and human endogenous retrovirus Gag. Furthermore, human endogenous retroviruses are copackaged into HIV-1 particles, and the infectivity of HIV-1 is drastically reduced by changing the morphology of HIV-1 particles.

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粒子放出、感染性低下 HERV-K Gag 国際研究者交流 アメリカ ミシガン州

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトゲノムの中で、ヒト内在性レトロウイルス(HERVs)は約 8%を占めている。そのうち HERV-K は、現代のヒトの中でも、転写活性を保ち、増殖に必要な全てのウイルスタンパク質を発現し得る。HIV-1 感染者では、HERV-K に対する抗体量が上昇し(Vogetseder et al. AIDS Res Hum Retroviruses 1993)、CD8+T 細胞の応答が活性化することが報告され(Keith et al. PLoS pathogen 2007)、HIV-1 感染者に HERV-K が発現している可能性が考えられている。末梢血単核球細胞を用いた *in vitro* の実験では、HIV-1 の感染により HERV-K mRNA の転写が促進され、HERV-K Gag タンパク質の発現が増幅することが近年報告された(Contreras-Galindo et al. AIDS Res Hum Retroviruses 2007)。技術的には、キメラ化 HERV-K 発現ベクターの開発により感染性を保持したウイルスの産生が可能になり、HERV-K の基礎研究が比較的容易に行えるようになった(Lee et al. PLoS pathogen 2007)。

(2) 申請者のこれまでの研究

HIV-1 Gag タンパク質は T 細胞膜上のリン脂質に結合(Monde et al. J. Virol 2011)、重合を経て、HIV-1 粒子を形成する(図 1、左)。その際、HIV-1 粒子に、エンベロープ糖タンパク質だけでなく、コレセプター等の細胞膜タンパク質も取り込まれ、感染性が変化する(Monde et al. JBC 2008)。

一方、HERV-K Gag タンパク質も同様に細胞膜に結合し、ウイルス粒子を形成する(図 1、右)。最近の申請者の研究により、同じ細胞内にこの 2 種類のタンパク質を共発現させた場合、HERV-K Gag タンパク質は HIV-1 Gag タンパク質と結合し、HIV-1 粒子内に取り込まれることがわかった(図 1、中央)。さらに特筆すべきことに、HERV-K Gag タンパク質と HIV-1 Gag タンパク質の結合により、HIV-1 の産生が顕著に低下するだけでなく、放出された HIV-1 の感染性も低下することが明らかとなった(申請者投稿中)。

2. 研究の目的

マウス内在性レトロエレメント *Fv1* は、MLV (Murine leukemia virus) のような外来性レトロウイルスの侵入から宿主細胞を保護する働きを持つ。生来ヒトゲノムに組み込まれているヒト内在性レトロウイルスも同様に、HIV-1 のような外来性レトロウイルスの増殖を抑制する可能性が考えられる。そこで申請者は、ヒト内在性レトロウイルスが HIV-1 に対して排他的もしくは相乗的に働くかを検証する。本研究は、ヒト内在性レトロウイルスを利用し、外来性レトロウイルスを排除する新たな治療戦略の確立を目的としている。更には内在性レトロウイルスが、長い歴史を経てヒトとどのように共存してきたか

考案する手がかりとなる可能性がある。そこで本研究では、HIV-1 感染 T 細胞で HERV-K Gag タンパク質の発現が誘導される仕組みを同定し、更に HERV-K Gag タンパク質が HIV-1 Gag タンパク質とどのように結合、競合し、HIV-1 の増殖を抑制するか解析する。

(1) HIV-1 感染 T 細胞内で HERV-K タンパク質が発現する仕組みを解明する。

(2) HERV-K Gag タンパク質が HIV-1 Gag タンパク質にどのように影響するか解析する。

(3) HERV-K gRNA が、HIV-1 粒子へ取り込まれ感染性に影響するか検討する。

3. 研究の方法

(1) HIV-1 感染 T 細胞内で HERV-K タンパク質が発現する仕組みを解明する。

T 細胞株として、Jurkat 細胞、SupT1 細胞を用いた。これらの細胞に HIV-1_{NL4-3} を感染させ、感染 2-4 日後に解析を行った。感染細胞から RNA を抽出後、mRNA に相補的な cDNA を合成し、それを鋳型に HERV-K Gag の定量 PCR を行った。感染細胞内の HERV-K Gag タンパク質は、抗 HERV-K Gag 抗体 (HERM1831-5; Austral Biologicals) を用いて、SDS-PAGE によって定量を行った。細胞上清中に存在する微量のタンパク質を同定するために、感染 T 細胞をアイソトープ (S^{35} -Met, Cys) で 12 時間標識し、その間に合成され上清中に放出された標識タンパク質を SDS-PAGE で解析した。細胞にプロテアソーム阻害剤として MG132 を処理し、HERV-K Gag タンパク質の発現を同様に抗 HERV-K Gag 抗体を用いて解析した。

(2) HERV-K Gag タンパク質が HIV-1 Gag タンパク質にどのように影響するか解析する。

HIV-1 Gag タンパク質と HERV-K Gag タンパク質の相互作用を解析する為に、Gag タンパク質に変異を導入し、HeLa 細胞にトランスフェクションし、16 時間後に Gag タンパク質の局在を共焦点顕微鏡で観察し、HIV-1 の放出量を p24 ELISA かつ SDS-PAGE によって定量した。放出された粒子に取り込まれた GFP もしくは mRFP 融合 Gag タンパク質は、コラーゲンコートしたスライドガラスに粒子を定着させた後、共焦点顕微鏡で観察した。粒子形態は、電子顕微鏡で観察した。放出された粒子は、濃縮後、10-30% のショ糖密度勾配を利用した速度勾配法 (26,000 rpm、30 分) により、大きさの異なる粒子に分画した。分画したそれぞれの粒子を TZM-bl 細胞に感染させ、Luciferase の量によってそれぞれの感染性を検討した。TZM-bl 細胞は、HIV-1 Tat によって luciferase を発現する。Gag MA ドメインの解析のために、N 末端にバルミトイル基 (Fyn(10)) を付加し、Gag タンパク質の細胞膜

への結合を補強した。Fyn(10) Gag タンパク質の、MA 欠損変異体、MA HBR 変異体等を作製し、MA ドメインの重要性を解析した。CA ドメインの解析のために、HIV-1 と共重合する HERV-K Gag と共重合しない MLV Gag の間でキメラ Gag タンパク質を作製し、責任領域を同定した。NC ドメインの解析のために、RNA との結合に重要な2つのジンクフィンガードメインを欠損させた NC 欠損体を用いた。

(3) HERV-K gRNA が、HIV-1 粒子へ取り込まれ感染性に影響するか検討する。HIV-1 粒子に取り込まれた HERV-K gRNA を同定するために、感染 T 細胞の上清中のウイルスを回収し、1% TritonX-100 で処理したタンパク質を、HIV-Ig(NIH reagent program) で免疫沈降した。HIV-1 Gag タンパク質と共に沈降した RNA を抽出し、逆転写によって cDNA を合成後、それを鋳型に HERV-K Gag を定量 PCR によって解析した。

4. 研究成果

(1) HIV-1 感染 T 細胞内で HERV-K タンパク質が発現する仕組みの解析を遂行した。本研究により HIV-1 感染 T 細胞で HERV-K Gag mRNA の量が HIV-1 非感染 T 細胞と比べて 10-100 倍増加することが確認できた。そこで抗 HERV-K Gag 抗体を用いて HERV-K Gag タンパク質を解析したが、Gag タンパク質は検出できなかった。原因として、抗体の検出感度が低い可能性が考えられたが、抗 HERV-K Gag 抗体の種類が少なく、今回使用した抗体よりも感度の高い抗体は見つからなかった。そこでタンパク質をアイソトープで標識し、少量のタンパク質も検出できる実験を行った。ところが、HIV-1 感染 T 細胞の上清中に HERV-K Gag タンパク質は検出されなかった。以上の結果から、今回使用した T 細胞株からは HERV-K 粒子は放出されない、もしくは検出感度以下である可能性が示唆された。HERV-K Gag mRNA は存在することから、HERV-K Gag タンパク質は合成されている可能性が考えられる。しかし検出できないため、HERV-K Gag タンパク質はプロテアソームで分解されている可能性が考えられた。そこで HIV-1 感染 T 細胞をプロテアソーム阻害剤で処理した後、細胞内に発現する HERV-K Gag タンパク質を抗 HERV-K Gag 抗体を用いて解析した。しかし、細胞内に HERV-K Gag タンパク質は検出できなかった。本研究では、HIV-1 感染 T 細胞株での HERV-K Gag タンパク質の発現を確認できず、これまで報告されている内容と矛盾する結果が得られた。今後は、HIV-1 感染により HERV-K mRNA は増幅するにも関わらず、タンパク質が合成されない機構を明らかにすることが重要な課題である。

(2) HERV-K Gag タンパク質が HIV-1 Gag タンパク質にどのように影響するか解析した。

我々は、HIV-1 Gag タンパク質と HERV-K Gag タンパク質は細胞膜上で共重合することで、HIV-1 の放出量が低下し、さらに放出された HIV-1 の感染性が低下することを報告した (Monde et al. J. Virol 2012)。更に、本研究により、異種の Gag タンパク質の共重合には、Gag タンパク質の3つのドメインが関与していることが示唆された。1つ目は、MA ドメインであった。このドメインは、HIV-1 Gag タンパク質が細胞膜のリン脂質 (PI(4,5)P2) に結合するために要求される。この MA ドメインに変異を導入した HIV-1 Fyn(10)Gag タンパク質は、細胞膜に結合することなく、HIV-1 粒子を形成し、放出されることがわかった。2つ目は、CA ドメインである。このドメインは、本来は相同性のある Gag タンパク質の二量体に要求される。HERV-K Gag CA ドメインは、HIV-1 Gag CA ドメインと相同性はないが、HIV-1 Gag タンパク質に干渉し、HIV-1 の放出を妨げることがわかった。特に HERV-K Gag CA ドメインの N 末側が責任領域であることがわかった。3つ目は、NC ドメインである。このドメインは、RNA との結合を介して、HIV-1 Gag の多量体化に要求される。HERV-K Gag NC ドメインは、HIV-1 Gag タンパク質との共重合に関与し、HIV-1 の放出を低下するために重要であった。このことから RNA を介して、HERV-K Gag と HIV-1 Gag は多量体を形成している可能性が考えられる。以上の3つのドメインが関与することで、細胞膜上で HERV-K Gag タンパク質と HIV-1 Gag タンパク質は共重合し、HIV-1 粒子形成、放出が妨げられることがわかった。放出した HIV-1 粒子には、HERV-K Gag タンパク質が受動的に取り込まれることが共焦点レーザー顕微鏡で観察された。この HIV-1 粒子は形態が変化し、成熟しないことが電子顕微鏡により観察された。形態の変化した HIV-1 は、感染性が著しく低下することがわかった。本研究により、内在性レトロウイルス Gag タンパク質は、HIV-1 と同細胞内で共発現する場合、HIV-1 の粒子形成を抑制する細胞内因子であることが明らかとなった。今後、(1)の研究が進展し、HIV-1 感染時のヒト内在性レトロウイルスの発現増加の機構が明らかにできれば、レトロウイルスの進化、治療に役立つ知見に発展することが期待される。

(3) HERV-K gRNA が、HIV-1 粒子へ取り込まれ感染性に影響するか解析した。HIV-1 感染 T 細胞株から放出された HIV-1 粒子内に取り込まれた RNA を抽出し解析を行ったが、その中に HERV-K gRNA は検出されなかった。原因として、(1)の結果から、本研究に用いた T 細胞株 (Jurkat 細胞、SupT1 細胞) は不適切である可能性があげられる。これらの細胞では、HERV-K Gag タンパク質の量は検出感度以下だったために、HIV-1 粒子内の HERV-K Gag の量も少ないことが推測される。そのために、

HERV-K gRNA の取り込みがみられなかった可能性が考えられる。この研究は、(1)の研究が進展し、HERV-K Gag タンパク質が HIV-1 粒子に取り込まれることが証明された後、再度検討する必要がある。

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 4件)

Monde K.、Contreras-Galindo R.、Kaplan M. H.、Markovitz D. M.、Ono A.、Human Endogenous Retrovirus K Gag Coassembles with HIV-1 Gag and Reduces the Release Efficiency and Infectivity of HIV-1、*J. Virol*、査読有、86、2012、11194-11208、<http://jvi.asm.org/content/86/20/11194.long>

[学会発表](計 6件)

門出 和精、HERV-K CA ドメインを介した HERV-K Gag と HIV-1 Gag の共重合による HIV-1 の感染性抑制機構の解明、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日-2013 年 11 月 12 日、兵庫

門出 和精、HERV-K Gag coassembles with HIV-1 Gag via its CA domain and changes morphology of HIV-1 particles to reduce the infectivity、14th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium、2013 年 10 月 29 日-2013 年 10 月 31 日、熊本

門出 和精、CA ドメインを介した HERV-K Gag と HIV-1 Gag の共重合による HIV-1 の放出、感染性抑制機構の解明、Summer Retrovirus Conference、2013 年 07 月 11 日-2013 年 07 月 13 日、静岡

門出 和精、ヒト内在性レトロウイルス (HERV)Gag タンパク質の共重合による HIV-1 産生抑制、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日-2012 年 11 月 15 日、大阪

門出 和精、HERV-K Gag CA domain is required for reduction of HIV-1 release efficiency、13th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium、2012 年 10 月 24 日-2012 年 10 月 26 日、熊本

門出 和精、HERV-K Gag coassembles with HIV-1 Gag and reduces the release efficiency and infectivity of HIV-1、Cold Spring Harbor Laboratory、Retroviruses、2012 年 05 月 21 日-2012 年 05 月 26 日、Cold Spring Harbor、New York、USA

6. 研究組織

(1)研究代表者

門出 和精 (MONDE, Kazuaki)
熊本大学、大学院生命科学研究部、助教
研究者番号：70516137

(2)研究協力者

小野 陽 (ONO, Akira)
ミシガン大学、医学部、准教授

原田 信志 (HARADA, Shinji)
熊本大学、大学院生命科学研究部、教授
研究者番号：60173085

前田 洋助 (Maeda, Yosuke)
熊本大学、大学院生命科学研究部、准教授
研究者番号：30284764