

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790447

研究課題名(和文) ヒト免疫不全ウイルス蛋白質 Vpx によるウイルス感染制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification and characterization of Vpx-interacting host factors

研究代表者

宮川 敬 (MIYAKAWA, Kei)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20580046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000 円、(間接経費) 1,050,000 円

研究成果の概要(和文)：宿主防御因子SAMHD1は骨髄系細胞や休止期CD4陽性T細胞においてHIV複製を抑制するが、アクセサリー蛋白質Vpxの働きによって細胞内分解される。細胞内でSAMHD1のリン酸化は抗HIV活性の制御に關与することは近年明らかになったが、一方でVpxが宿主側因子によりどのような機能的制御を受けているかは不明であった。本研究では、Vpxと相互作用する新規宿主因子を複数同定し、その機能解析を行った。その結果、Vpxは宿主細胞内の特定のリン酸化酵素によってリン酸化され、この修飾がSAMHD1の分解を促進することでウイルスの効率的な複製を可能にしていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：HIV-2/SIVsm Vpx promotes the viral replication through the degradation of a host antiviral factor, SAMHD1, in myeloid cells. Although it has been reported that phosphorylation status of SAMHD1 was important for its antiviral activity, it is still unknown whether the phosphorylation of Vpx contributes its anti-SAMHD1 activity. In this study we identified several human kinases as potential host factors to interact with Vpx. Further biochemical analysis uncovered that one kinase directly interacted with Vpx and promoted its phosphorylation. This phosphorylation is found to be important on the degradation of SAMHD1 as well as efficient viral infection. Our results together suggest that a kinase we identified could regulate the Vpx-dependent viral replication.

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

エイズの病因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染者数は、全世界で現在 3300 万人に達し、依然増加傾向にある。有力なワクチンや根治的療法は存在しないものの、逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤を複数処方する多剤併用療法が成功し、HIV 感染者の予後は改善された。しかし一方で、薬剤の半永久的な服用が原因による耐性ウイルスの出現が問題視されている。ほとんどの薬剤標的が、耐性変異が入りやすいウイルス側の蛋白質であるためである。実際に、現在使用可能なすべての薬剤に対して耐性をもつウイルスも存在する。そのため、薬剤選択の幅を広げるための基礎研究が常に求められている。

HIV 感染細胞内でのウイルス蛋白質-宿主因子間の相互作用はウイルスの効率的な産生と感染伝播に不可欠であるが、宿主細胞には元来、ウイルス感染に対して防御的に働く「抵抗性宿主因子」が存在する。しかし HIV は自身のアクセサリー蛋白質で、これを分解したり局在を変えたりしている。例えば、SAMHD1 と呼ばれる dNTP 分解酵素は、強い抗 HIV 活性を示すが、HIV がもつ Vpx 蛋白質によって E3 コピキチンリガーゼ複合体がリクルートされ、SAMHD1 が分解される。結果としてウイルスは SAMHD1 の抗 HIV 活性から回避して、効率的に複製できる。

しかし、Vpx の SAMHD1 回避機構においては、未解明な点が多い。そもそも SAMHD1 がウイルス複製サイクルのどの過程を抑制するかが不明である。したがって Vpx の機能や SAMHD1 との相互作用に関わる宿主因子が解明されれば、ウイルス学的に重要な知見となるだけでなく、比較的変異の入りづらい抵抗性宿主因子を標的とした、耐性ウイルスが出現しづらい新薬開発の基盤となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究ではウイルス学的知見の少ない Vpx に焦点を当て、Vpx を中心とした宿主因子ネットワークを解明する。また、SAMHD1 の抗ウイルス活性は、マクロファージや樹状細胞のみに限られることから、この機構に関わる細胞種特異的な調節因子、もしくは Vpx によって拮抗される抵抗性宿主因子が他にも存在する可能性が高い。そこで具体的には、Vpx の機能調節に関わる因子、SAMHD1 との機能的相互作用に関わる因子、Vpx によって拮抗される抵抗性宿主因子を探索・同定し、Vpx による HIV 感染制御機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

ウイルス蛋白質 Vpx と相互作用しうる宿主因子のうち、まずはとくに関与が疑われる翻訳後修飾関連酵素 (キナーゼ・コピキチンリガーゼ) を探索・同定する。立体構造や活性を維持したまま精製可能な無細胞蛋白質

合成系により蛋白質ライブラリーを作成し、Vpx との結合親和性を定量的に検出する。次に、Vpx との親和性の高い候補因子について、分子生物学的およびウイルス学的手法を用いて、機能解析および HIV 感染への影響について調べる。最終的に、候補因子と Vpx による HIV 感染制御機構を明らかにし、その薬剤標的としての有効性を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞内における Vpx の翻訳後修飾

Vpx が感染細胞内でリン酸化・コピキチン化しているか否かを検討した。HIV および SIV 由来の Vpx 配列を翻訳後修飾予測データベース ExPASy および BDM-PUB で解析した。その結果、Ser13 のリン酸化、Lys68, Lys84 のコピキチン化が予測された。次に、Ser13 のリン酸化を認識する抗体を作製してウエスタンブロット法で解析したところ、確かに Ser13 が細胞内でリン酸化することが判明した。S13A 変異体は野生型に比べ SAMHD1 分解能が低下することから、このリン酸化は Vpx の機能に重要であると考えられた。In vitro コピキチンアッセイの結果、確かに Vpx は細胞内でコピキチン化していた。K68R, K84R 変異は SAMHD1 分解能には直接関与しなかったが、これらの変異体は野生型に比べて細胞内での発現量が有意に高く、Vpx 自身の安定化に寄与すると推測された。

### (2) ウイルス蛋白質 Vpx の翻訳後修飾に関与する宿主因子のスクリーニング

細胞内での Vpx のリン酸化・コピキチン化が検出できたため、次にこれらの翻訳後修飾に関与する宿主因子の探索を行った。そのスクリーニングについては、先行研究において本研究室で確立された手法を改変して適用した。具体的には、リコンビナント Vpx 蛋白質とキナーゼ (約 400 種)・コピキチンリガーゼ蛋白質 (約 200 種) ライブラリーを用いたアルファスクリーン法と免疫沈降法を用いて網羅的に行った。リコンビナント蛋白質は、小麦胚芽を用いた無細胞蛋白質合成法によって精製した。本手法では、蛋白質合成阻害物質をあらかじめ除去した小麦胚芽抽出液に、アミノ酸と mRNA を加えることによって、翻訳後修飾を受けづらく、また天然の立体構造を保持したまま効率的に蛋白質合成を行うことが可能である。アルファスクリーン法では、Vpx にドナービーズを、宿主因子にそれぞれアクセプタービーズを付加し、これらの物理的距離が近いほど、レーザー光によって励起された強い蛍光シグナルが観察されるため、シグナル強度の上位のものを選択した。免疫沈降法では、細胞に FLAG タグのついた Vpx と Halo タグのついた宿主因子を共発現させ、FLAG タグで免疫沈降したあと、ウエスタンブロット法で結合因子を探索した。その結果、Vpx と特異的に相互作用するキナーゼ蛋白質として 10 因子、コピキ

チンリガーゼ蛋白質として3因子を同定した。

### (3) 候補因子の分子生物学的機能解析

スクリーニングにより得られた候補因子13種類(キナーゼ10種、ユビキチンリガーゼ3種)について、①Vpxの翻訳後修飾と機能調節に直接関わる可能性、②SAMHD1との機能的相互作用に関わる可能性、③Vpxによって拮抗される抵抗性宿主因子の可能性について、分子生物学・生化学的手法を用いて検討した。

①Vpxのリン酸化に直接関わる可能性については、Phostag-PAGE法および放射性同位体元素を用いたin vitroリン酸化アッセイによって判定した。その結果、キナーゼ10種のうち1因子のみが実際にVpxをリン酸化することが分かった。またリン酸化特異的抗体とS13A変異体を用いた検討の結果、このキナーゼはSer13を主な標的としてリン酸化することが示唆された。一方、Vpxのユビキチン化に関与する可能性については、in vitroユビキチン化アッセイによって判定した。その結果、ユビキチンリガーゼ3種すべてがVpxをユビキチン化することが分かった。また、うち1因子についてはVpxをユビキチン・プロテアソーム依存的経路で著しく分解する活性をもつことが分かった。

②SAMHD1との機能的相互作用に関わる可能性については、候補因子を過剰発現した細胞、もしくは標的siRNAを導入した細胞を用いて、免疫沈降法により判定した。またin vitroでVpx、SAMHD1、候補因子を合成し、アルファスクリーン法にてVpx-SAMHD1の親和性を定量的に測定した。その結果、候補因子のうちキナーゼ1因子が、Vpxと強く結合することによってSAMHD1との結合を競合的に阻害する可能性が示唆された。実際、この因子を過剰発現した細胞では、VpxによるSAMHD1分解が見られなくなった。しかしながらこのキナーゼは、分子シャペロンとしての性質をもつことから、現在、VpxによるSAMHD1分解系に関与する可能性についても検討しているところである。

③Vpxによって拮抗される抵抗性宿主因子については、Vpxによってその量や機能がダウンレギュレーションされるかの検討を行った。しかしながら本スクリーニングでは該当する候補因子は見いだせなかったため、現在は質量分析装置を使ってVpx結合蛋白質を再探索しているところである。

### (4) 候補因子のウイルス学的機能解析

前項の①～③に該当した因子、すなわちVpxもしくはVpx-SAMHD1相互作用に何らかの機能をもつと思われる5因子について、候補因子を発現またはノックダウンさせた細胞にHIVを感染させ、ウイルス複製効率、感染効率を評価した。細胞は、感染にVpxが必須とされるヒト白血病由来単球THP-1細胞やヒト末梢血由来リンパ球を分化させる

ことにより得られるマクロファージまたは樹状細胞を用いた。THP-1細胞はPMA刺激を72時間行い、マクロファージ様細胞へ分化させた後に感染実験を行った。感染実験は、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子としてもつHIV-2 GH-1株を感染させ、さらに48時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、感染価を求めた。まず、野生型ウイルスに比べ、S13A変異ウイルスの感染価は有意に低く、細胞内SAMHD1の分解も起こらなかった。すなわち、Ser13はHIVのマクロファージへの感染においても重要な役割を果たすことが分かった。次にSer13をリン酸化するキナーゼに対する阻害剤を細胞に処理したところ、マクロファージへのHIV感染が減衰し、同時に細胞内のSAMHD1分解も阻害されていた。このことからVpx Ser13を特異的にリン酸化するキナーゼは、SAMHD1分解を促進することでウイルス感染を促進することが示唆された。

一方、Vpxと強い結合活性が見られた1因子については、内在の発現量が低く、過剰発現した場合のみHIVの感染抑制効果が見られた。またシャペロン活性を失活した変異体ではHIV感染抑制効果が見られなかったことから、シャペロン活性がウイルス感染に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。現在までに、以上2因子については再現性のある結果が得られている。残りの6因子については引き続き解析を行っているところである。

### 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3件)

- 1) Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno S, Yamamoto N, Ryo A: The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology*. 11: 9, 2014, 査読有  
DOI: 10.1186/1742-4690-11-9
- 2) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A: Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *Journal of Virology*. 87(21), 11447-61, 2013, 査読有  
DOI: 10.1128/JVI.01549-13
- 3) Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Tokarev A, Quinn G, Kimura H, Nomaguchi M, Adachi A, Yamamoto N, Guatelli J, Ryo

A: Interferon-induced SCYL2 limits release of HIV-1 by triggering PP2A-mediated dephosphorylation of the viral protein Vpu. *Science Signaling*. 5(245): ra73, 2012, 査読有  
DOI: 10.1126/scisignal.2003212

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) Miyakawa K, Matsunaga S, Kudoh A, Ryo A: Identification and characterization of Vpx-interacting host protein kinases, CSHL Retrovirus, 2013年5月20日～25日, ニューヨーク
- 2) 宮川 敬, 松永智子, 工藤あゆみ, 梁 明秀: Vpx のリン酸化は HIV 感染を制御する. 第 27 回日本エイズ学会学術総会, 2013年11月20日～22日, 熊本
- 3) 宮川 敬, 森下 了, 道場生基, 松永智子, 工藤あゆみ, 高折晃史, 梁 明秀: HIV-1 Vif-APOBEC3G の相互作用を調節する新規宿主因子の同定. 第 26 回日本エイズ学会学術総会, 2013年11月24日～26日, 横浜

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 敬 (MIYAKAWA, Kei )  
横浜市立大学・医学部・助教  
研究者番号 : 2 0 5 8 0 0 4 6

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし