

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460570

研究課題名(和文) HIV/SIV Vpx蛋白質のSAMHD1非依存的機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of SAMHD1-independent function of HIV/SIV Vpx

研究代表者

藤田 美歌子 (Fujita, Mikako)

熊本大学・薬学部・准教授

研究者番号：00322256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：HIV-2 Vpxは、マクロファージなどで抗ウイルス宿主因子SAMHD1を分解する。本研究は、VpxのSAMHD1分解非依存的機能の解明を目的に開始した。まずC87AとP109A変異体においてマクロファージでのこの機能が低下していると考えられたため検討を行い、(1) C87などは亜鉛フィンガーを形成して蛋白質を安定化させる (2) P109が含まれるポリプロリンモチーフは蛋白質を多量化しSAMHD1分解を負に制御する、マクロファージ特異的なSAMHD1分解に関わる、など多様な役割を持つ (3) VpxはマクロファージでSAMHD1分解非依存的機能を持つ証拠はない、という結果を得た。

研究成果の概要(英文)：HIV-2 Vpx has a function to degrade host anti-viral factor SAMHD1 in macrophages. We already showed SAMHD1 degradation-independent function in activated T cells, however the details remain elusive. This study was started to aim at elucidation of this function of Vpx. We first performed mutational analysis. As results, we found two mutants, C87A and P109A as candidates to have decreased SAMHD1 degradation-independent function, thus their details were examined. Finally, we got the following results: (1) C87 and the other three amino acids form zinc finger to stabilize protein. (2) poly-proline motif including P109 has various functions, e.g., to multimerize Vpx and regulate SAMHD1 degradation negatively, and to facilitate the specific degradation of SAMHD1 in macrophages. (3) There are no evidences that Vpx carries SAMHD1 degradation-independent function in macrophages. It can be considered that Vpx has this function in activated T cells, thus the detail is under the progress.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-2 Vpx SAMHD1 抗ウイルス宿主因子 変異体解析 ポリプロリンモチーフ 亜鉛フィンガー マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

HIV-2 は HIV-1 が持たない Vpx 蛋白質を持つ。Vpx はマクロファージなどでウイルス増殖に必須であること、また活性化 T 細胞ではウイルス増殖に重要であることが知られていたが、機能の詳細は長い間全く知られていなかった。そうしたところ、2011 年に Vpx の標的因子として SAMHD1 が発見されトピックとなった^{1,2)}。すなわち SAMHD1 は宿主が持つ抗ウイルス因子であるが、Vpx は E3 ユビキチンリガーゼ錯体のアダプターとなって SAMHD1 をプロテアソーム分解し、その結果 HIV-2 は増殖することができる。この Vpx の機能がマクロファージや静止期 T 細胞で発現することは既に明らかにされた。

しかし研究代表者らは、活性化 T 細胞では Vpx が SAMHD1 分解非依存的機能を持つことを示唆するデータを得ていた³⁾。すなわち、サル T 細胞株 HSC-F では SAMHD1 の発現がほとんど認められないのにも関わらず、Vpx が機能を示していた。さらに、Vpx の SAMHD1 結合に関わると考えられるアミノ酸に変異を導入しても、機能は失われなかった。また、健康人由来 PBL (活性化 T 細胞) でも、Vpx のこのアミノ酸変異体は Vpx 欠損型よりも高い増殖性を示した。

2. 研究の目的

マクロファージで Vpx は SAMHD1 分解非依存的機能を持つのか、持つとしたらどのような機能であるのか、また活性化 T 細胞で示されるこれらの機能はどのようなものなのか、明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

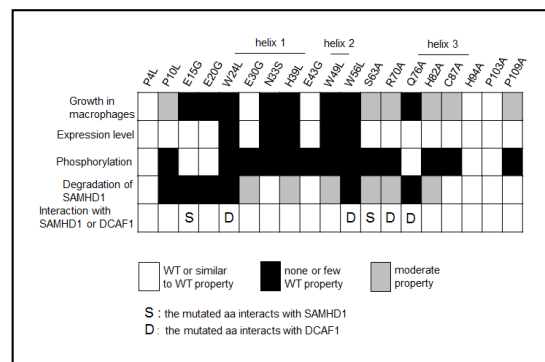
まず変異体解析を行い、SAMHD1 分解非依存的機能がない変異体を見つけ、次にこの変異体を用いてその機能の実態を探ろうと考えた。

4. 研究成果

- (1) 既に研究代表者らは、HIV-2 の感染性クローン pGL-AN の vpx 領域の全長にわたって点変異を持つ変異体 19 種類のシリーズを構築し、マクロファージにおける増殖性を調べた⁴⁾。そこで、pEF1/myc-HisA をベースとする FLAG タグを N 末端に持つ Vpx の発現ベクター pEF-Fvpx に同じ変異を持つもの 19 種類を構築した。
- (2) これらを 293T 細胞に導入し、その発現をウエスタンブロット法により調べた。そうしたところ、野生型 Vpx と比べて強い発現を示したものや、弱い発現を示したものがあつた。さらに変異体によっては 2 本のバンドが見られた。上のバンドはリン酸化体と考え、フォスタグゲルを用いた電気泳動やフォスファターゼ処理および電気泳動を行った。その結果、下のバンドはリン酸化を受けていないもの、

上のバンドはリン酸化体であることが証明された。

- (3) 発現ベクター pEF-Fvpx 1.9 μg から Vpx 蛋白質を発現させ 293T 細胞内での SAMHD1 分解をウエスタンブロット法により調べたが、意外なことに SAMHD1 の分解は見られなかった。発現した Vpx の量が多すぎるためと考え、pEF-Fvpx のベクター量を 1.9 μg から 0.0075 μg まで順次減らして SAMHD1 分解を調べた。その結果、0.060 μg と 0.030 μg で SAMHD1 の分解が見られた。
- (4) (1)で構築した変異 Vpx の発現ベクター 0.060 μg を用いて SAMHD1 を分解するかどうか調べた。ここで分解した変異体は野生型と分類した。
- (5) (4)で分解しなかったものについて、それぞれベクター量を 1.9 μg から 0.0075 μg まで変えて、SAMHD1 を分解するかどうか調べた。ここで分解が見られた変異体は中間型、分解が見られなかった変異体は欠損型と分類した。これらの性質を、マクロファージにおける増殖性⁴⁾と比較した。結果を以下に示す⁵⁾。



- なお、この図における SAMHD1 と DCAF1 との相互作用を示すアミノ酸は、最近明らかにされた X 線結晶解析に基づく⁶⁾。ここで、蛋白発現量の低い 5 つの変異体 W24L、N33S、H39L、W49L、W56L についてはマクロファージの増殖性も欠損型であった。これらを除いて SAMHD1 分解能とマクロファージにおける増殖性を比較した時、わりと良い相関が見られた。例外は、P10L、E30G、C87A、P109A であつた。このうち、SAMHD1 分解能を十分に持つのにも関わらず中間型の増殖性を示した C87A、と P109A に着目した。これらは、SAMHD1 分解非依存的機能が十分でない変異体の候補となつた。
- (6) C87A 変異体と P109A 変異体の SAMHD1 分解能を再確認するために、発現ベクターの量を 1.9 μg から 0.0075 μg まで順次減らして SAMHD1 分解を調べた。そうしたところ意外なことに、P109A 変異体では 1.9 μg とベクター量が多くても SAMHD1 を分解することができた。SAMHD1 分解能が高く蛋白発現量も十分である(5)で示した他の変異体を用いて実験したが、

このような性質は P109A に特有であった。P¹⁰⁹ は Vpx 蛋白質の C 末端に存在する 7 個プロリンが繋がったポリプロリンモチーフ (PPM) の最も C 末端側に位置するアミノ酸である。そこで P¹⁰⁴ から P¹⁰⁸ までの 5 つのプロリンをそれぞれアラニンに変えた変異体の発現ベクターも構築し、ベクター量が 1.9 μg である場合に SAMHD1 を分解するかどうか調べた。そうしたところ、P104A と P109A のみが SAMHD1 を分解した。

- (7) P104A と P109A が、蛋白量が多くても SAMHD1 を分解する理由は、野生型 Vpx は多量体を形成するのに対し、これらの変異体は多量体を形成しないためと考えた。すなわち、Vpx が SAMHD1 を分解するために E3 コピキチンリガーゼ錯体を形成する際には Vpx は単量体として働く。多量化が優先して進行したら、錯体は形成されないと予想される。そこで、19 種類の変異体と PPM 変異体が多量化を形成するかどうか、沈降実験により調べた。すなわち HA タグを持つ変異 Vpx と FLAG タグを持つ変異 Vpx の発現ベクターを 293T 細胞に共導入し、FLAG 抗体で免疫沈降し、HA 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。そうしたところ、P106A と P109A のみが弱い相互作用を示した。さらに P109A の多量化能が弱いことは、クサビラグリーン蛋白質の再構築系 (biomolecular fluorescence complementation assay) も用いて確認した。Vpx の多量化の詳細を調べるため、大腸菌を用いた大量発現および精製を現在検討しており、His タグを持つ Vpx 蛋白質は発現するが不溶化画分に行きやすい性質を持つことまで確認している。
- (8) C87A 変異体は 293T 細胞内で pEF1/myc-HisA をベースとした発現ベクターから十分量発現したが、感染性クロン pGL-AN の系でも発現するかどうか調べた。そうしたところ、予想外に弱い発現量であった。これは FLAG タグを持たないことによるのか、それとも発現量が少ないことによるのか、発現ベクターを用いて調べた。その結果、タグを持たなくても発現量が高いと野生株と同様の蛋白質量が観察されたが、発現量を下げると野生株と比べてかなり蛋白質量が下がった。分画実験により、高い発現量では C87A 変異体は不溶画分に多くが移行していることがわかった。C⁸⁷ は亜鉛フィンガー形成に関わる 4 つのアミノ酸のうちの一つである。そこで他の 3 つのアミノ酸の変異体 W24L、H82A、C89A についてもタグの持たない発現ベクターを構築して、発現量を調べた。そうしたところ、発現量を下げると野生株と比べてかなり蛋白質量が下がった。すなわち、Vpx は亜鉛フィンガーを形成することで蛋白

質を可溶画分で安定化させていると言える。変異体が不安定であるメカニズムについては現在、プロテアソーム阻害剤やリソソーム阻害剤を用いた実験などを検討中である。

- (9) P109A 変異体は感染性クロン pGL-AN の系でも発現が見られ、ウイルス粒子中にも取り込まれることを確認した。そこで、P109A 変異ウイルスの欠損部位を調べた。P109A 変異 GL-AN の VSV-G シュード体をマクロファージのモデル細胞である PMA 分化 THP-1 細胞に感染し、ゲノム抽出後にリアルタイム PCR 解析を行った。その結果、逆転写過程に欠損が見られた。一方、後期課程を調べるため、PMA 分化 THP-1 への pGL-AN の導入法を検討した。その結果、PMA の量を 300 nM に増やし Lipofectamine3000 をトランスフェクション試薬として用いることで、細胞導入が可能になった。P109A 変異体は後期課程には欠損を持たなかった。次に P109A 変異 GL-AN の VSV-G シュード体を PMA 分化 THP-1 細胞に感染させ、細胞内での内在性 SAMHD1 の量を調べた。そうしたところ、予想に反して P109A 変異体は野生型 Vpx ほど強い SAMHD1 分解能を示していなかった。同様の結果は、モノサイト由来マクロファージを用いた時にも得られた。P109A 以外の PPM 変異体についても、PMA 分化 THP-1 細胞に感染させて同様の実験を行った。P103A は野生型 Vpx と同じ SAMHD1 分解能を示し、P106A は SAMHD1 分解能を示さなかった。他の変異体は P109A と同様に中間型の分解活性を示した。なお P106A はウイルス粒子内にほとんど取り込まれていないことがわかり、そのために分解活性を示さなかったと考えられる。このように、PPM はマクロファージでの特異的な SAMHD1 分解に関わることがわかった。PPM は多量化に関わり SAMHD1 分解を負に制御することを明らかとしたことは既に述べた。この他、研究代表者らは PPM が Vpx 蛋白質の翻訳に関わることも既に報告しており⁷⁾、PPM は多彩な役割を持つことを明らかにすることができた。
- (10) 発現量を下げた PPM 変異体と野生型 Vpx の 293T 細胞内での発現を比較した。そうしたところ、PPM 変異体の蛋白質量は下がっていたが、HIV-2 Gag 存在下では野生型と同じ蛋白質量を示した。このことから、Gag が存在する放出細胞では PPM 変異体の発現は下がらずウイルス粒子に取り込まれるが、感染細胞内では PPM 変異体が分解を受け SAMHD1 をプロテアソーム分解しづらくなることが予想される。このことと、PPM がマクロファージでの特異的な SAMHD1 分解に関わることとの関連を調べている。

- (11) これまでの実験で、C87A と P109A は SAMHD1 分解非依存的機能が欠損した変異体ではないことがわかった。一方(5)で述べたように P10L 変異体は 293T 細胞内で全く SAMHD1 分解活性を示さなかったが、マクロファージにおいて中間型の増殖性を示した。P10L 変異 GL-AN の VSV-G シールド体を PMA 分化 THP-1 細胞に感染させ、細胞内での内在性 SAMHD1 の量を調べた。そうしたところ、この系では SAMHD1 を分解していた。これらの結果を総合すると、Vpx がマクロファージで SAMHD1 分解非依存的機能を持つ証拠は見つからなかった。
- (12) P103A と P109A 変異 GL-AN ウイルスのモノサイト由来マクロファージにおける増殖性は既に調べたが、P104A、P105A、P106A、P107A、P108A について新たに増殖実験を行った。その結果 P106A および P019A < P104A および P108A < P107A < P105A < 野生型の順序で強い増殖性を示した。これらと、変異体の感染細胞内での発現量や SAMHD1 分解能との関わりを現在検討している。
- (13) (5)で示した Vpx 変異体の SAMHD1 分解能と、既に調べた PBL (活性化 T 細胞) におけるウイルス増殖性付与能を比較すると、活性化 T 細胞では SAMHD1 分解依存的機能と非依存的機能の両方を持つことが推定される。一方、カニクイサル由来 T 細胞株 HSC-F では SAMHD1 分解非依存的機能のみを持つと考えられる。PBL と HSC-F が持つ SAMHD1 分解非依存的機能は同じであるという仮説を立て、詳細を検討中である。

以上のように、本研究により Vpx PPM の多彩な役割や、亜鉛フィンガーの役割について明らかにした。これらの結果は、ウイルス学のみならず蛋白質化学においても重要な知見であると考えている。今後、さらに発展させたい。

<引用文献>

- 1) Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, Swanson SK, Kesik-Brodacka M, Srivastava S, Florens L, Washburn MP, Skowronski J (2011) Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 474, 658-U137.
- 2) Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M, Chable-Bessia C, Segéral E, Yatim A, Emiliani S, Schwartz O, Benkirane M (2011) SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474, 654-U132.
- 3) Fujita M, Otsuka M, Nomaguchi M, Adachi A (2012) SAMHD1-dependent and -independent functions of HIV-2/SIV Vpx

- protein. *Frontiers in Microbiology* 3, 297.
- 4) Fujita M, Otsuka M, Miyoshi M, Khamsri B, Nomaguchi M, Adachi A (2008) Vpx is critical for reverse transcription of the human immunodeficiency virus type 2 genome in macrophages. *Journal of Virology* 82, 7752-7756.
 - 5) Ciftci HI, Fujino H, Koga R, Yamamoto M, Kawamura S, Tateishi H, Iwatani Y, Otsuka M, Fujita M (2015) Mutational analysis of HIV-2 Vpx shows that proline residue 109 in the poly-proline motif regulates degradation of SAMHD1. *FEBS Letters* 589, 1505-1514.
 - 6) Schwefel D, Groom HCT, Boucherit VC, Christodoulou E, Walker PA, Stoye JP, Bishop KN, Taylor IA (2014) Structural basis of lentiviral subversion of a cellular protein degradation pathway. *Nature* 505, 234.
 - 7) Miyake A, Fujita M, Fujino H, Koga R, Kawamura S, Otsuka M, Ode H, Iwatani Y, Sakai Y, Doi N, Nomaguchi M, Adachi A, Miyazaki Y (2014) Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. *Journal of General Virology* 95, 179-189.

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5件)

- 1) 藤田美歌子. 2013. エイズウイルスタンパク質の分子機能に関する研究. *薬学雑誌* 133: 1103-1111. 査読有 https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/133/10/133_13-00200/_article/-char/ja/
- 2) 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. 査読有 doi: 10.1099/vir.0.057364-0. (#equal contribution)
- 3) 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. 査読有 doi: 10.3389/fmicb.
- 4) Ciftci, H. I., Fujino, H., Koga, R., Yamamoto, M., Kawamura, S., Tateishi, H., Iwatani, Y., Otsuka, M., and Fujita, M. 2015. Mutational analysis of HIV-2 Vpx shows that proline residue 109 in the poly-proline motif regulates degradation of SAMHD1. *FEBS Letters* 589: 1505-1514. 査読有 doi: 10.1016/j.febslet.
- 5) Fujita, M. 2016. Commentary: March8 inhibits HIV-1 infection by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins. *Frontiers in Microbiology* 7: 254. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1) 藤野悠那、古賀涼子、大塚雅巳、藤田美歌子、HIV-2 Vpx 蛋白質の多量化の解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013.11.10、神戸国際会議場(神戸市)
- 2) 山本充奈美、野間口雅子、古賀涼子、岩谷靖雅、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学術集会 2013.11.11、神戸国際会議場(神戸市)
- 3) チッフチ ハリル イブラヒム、古賀涼子、岩谷靖雅、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 回日本エイズ学会学術集会 2013.11.20、熊本国際交流会館(熊本市)
- 4) Mikako Fujita, Halil I Ciftci, Minami Yamamoto, Haruna Fujino, Ryoko Koga, Sogo Kawamura, Yasumasa Iwatani, Masami Otsuka, SAMHD1-independent functions of HIV-1 Vpx protein. Cold Spring Harbor Meeting, Retroviruses, 2014. 5. 20, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (USA)
- 5) 藤野悠那、山本充奈美、Halil Ibrahim Ciftci、島垣和功、古賀涼子、大塚雅巳、藤田美歌子、HIV-2 Vpx における亜鉛フィンガーおよび C 末端ポリプロリンモチーフの役割、第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10、パシフィコ横浜(横浜市)
- 6) 山本充奈美、藤野悠那、古賀涼子、チッフチハリルイブラヒム、三隅将吾、大塚雅巳、藤田美歌子、HIV-2 Vpx における亜鉛フィンガー、ポリプロリンモチーフの役割と翻訳後修飾の意義、第 37 回日本分子生物学会年会 2014.11.26、パシフィコ横浜(横浜市)
- 7) Ciftci Halil Ibrahim、藤野悠那、古賀涼子、山本充奈美、川村宗吾、岩谷靖雅、大塚雅巳、藤田美歌子、Mutational Analysis of HIV-2 Vpx concerning on ability to degrade SAMHD1、第 28 回日本エイズ学会学術集会 2014.12.4、大阪国際会議場(大阪市)
- 8) Halil Ibrahim Ciftci, Haruna Fujino, Ryoko Koga, Minami Yamamoto, Masami Otsuka, Mikako Fujita, Roles of the zinc finger and poly-proline motifs in HIV-2 Vpx protein, Cold Spring Harbor Meeting, Retroviruses, 2015. 5. 19, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (USA)
- 9) Minami Yamamoto, Haruna Fujino, Kazunori Shimagaki, Ryoko Koga, Ciftci Halil Ibrahim, Masami Otsuka, Mikako Fujita, Roles of zinc-finger motif of HIV-2 vpx protein, 第63回日本ウイルス学会学

術集会 2015.11.22、福岡国際会議場(福岡市)

- 10) Ciftci Halil Ibrahim, Demirci Hasan, Haruna Fujino, Ryoko Koga, Minami Yamamoto, Masami Otsuka, Mikako Fujita, Roles of poly-proline motif of HIV-2 Vpx protein. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015.11.22、福岡国際会議場(福岡市)
- 11) 藤田美歌子、Halil Ibrahim Ciftci、藤野悠那、古賀涼子、山本充奈美、大塚雅巳、SAMHD1 分解における HIV-2 Vpx C 末端ポリプロリンモチーフの役割、第 29 回日本エイズ学会学術集会 2015.11.30、東京ドームホテル(東京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/bunsi_gouseiHP/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 美歌子 (Fujita Mikako)
熊本大学・薬学部・准教授
研究者番号：00322256