

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860055

研究課題名(和文) スフィンゴミエリン合成酵素を標的とした抗HIV剤の開発

研究課題名(英文) Sphingomyelin Synthase 2, but not Sphingomyelin Synthase 1, is Involved in HIV-1 Envelope-mediated Membrane Fusion

研究代表者

林 康広 (Hayashi, Yasuhiro)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：70582857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：HIV-1 エンベロープを介した膜融合を迅速かつ安全に測定するcell-cell fusion assayを用いて、細胞間膜融合に関わる新しい機能を持つ脂質代謝酵素を探った。すると、スフィンゴミエリン合成酵素KO マウス由来の胎児繊維芽細胞にSms2を恒常的に発現する再構成細胞は、KO 細胞やSms1再構成細胞と比較して膜融合の効率が高かった。免疫沈降および細胞内局在を調べたところ、Sms2はHIV-1 受容体と相互作用し、形質膜上で共局在することがわかった。以上の結果から、Sms2は形質膜上で HIV-1 受容体・補助受容体と相互作用することで、膜融合の効率に影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined the roles of SM synthase (SMS) in HIV-1 Env-mediated membrane fusion using a cell-cell fusion assay with HIV-1 mimetics and their target cells. We employed reconstituted cells as target cells that stably express SMS1 or SMS2 in SMS-deficient cells. Fusion susceptibility was approximately five-fold higher in SMS2-expressing cells (not in SMS1-expressing cells) than in SMS-deficient cells. The enhancement of fusion susceptibility observed in SMS2-expressing cells was reversed and reduced by SMS2 knockdown. We also found that catalytically non-active SMS2 promoted membrane fusion susceptibility. Moreover, SMS2 co-localized and was constitutively associated with the HIV receptor/co-receptor complex in the plasma membrane. Taken together, our research provides insight into a novel function of SMS2: regulation of HIV-1 Env-mediated membrane fusion via actin rearrangement.

研究分野：脂質

キーワード：脂質 ヒト免疫不全ウイルス

1. 研究開始当初の背景

多剤併用療法の導入により、先進国における HIV 感染者の死亡者数は減少したが、薬剤耐性株の出現、肝炎ウイルスとの合併感染により、人類は HIV を完全には克服できていない。そこで、既存の薬剤がターゲットとする分子 (HIV 逆転写酵素、プロテアーゼ) とは異なる新しい作用機序を持つ抗 HIV 剤の開発が望まれている。全てのウイルスは生体膜脂質二重層を介して侵入・粒子形成・出芽することから、脂質二重層の構成分子は新たな抗ウイルス剤のターゲットとして期待できる。スフィンゴ脂質は生体膜の 10% 程度しか占めないマイナーな膜脂質であるが、形質膜上でラフトと呼ばれるマイクロドメインを構成し、シグナル伝達の中継地点の役割を果たしている。スフィンゴミエリン (SM) は脂質二重層を形成するスフィンゴ脂質の大部分を占め、セラミドにホスホコリンが結合した構造をしている。これまでの研究で、HIV エンベロープの脂質二重膜は SM を多く含有することが報告されており、SM は HIV 感染に不可欠な脂質であることが示唆されている。しかしながら、HIV 感染に関わる宿主内在性の SM 代謝酵素は未解明である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染におけるスフィンゴミエリン (SM) 合成酵素の機能を解明する。

3. 研究の方法

HIV-1 Env と転写活性因子 Tat を発現する HEK293 細胞 (Effector 細胞) と、HIV-1 受容体 (CD4) と補助受容体 (CCR5/CXCR4) を発現し、HIV-1 の LTR 下流にレポーター遺伝子を付加したプラスミドを組み込む Target 細胞を混合し、膜融合効率を測定する cell-cell fusion assay を行った。その際に、グリセロ脂質、スフィンゴ脂質代謝酵素を過剰発現およびノックダウンした Target 細胞を用いることで、脂質代謝酵素の新たな機能を探った。

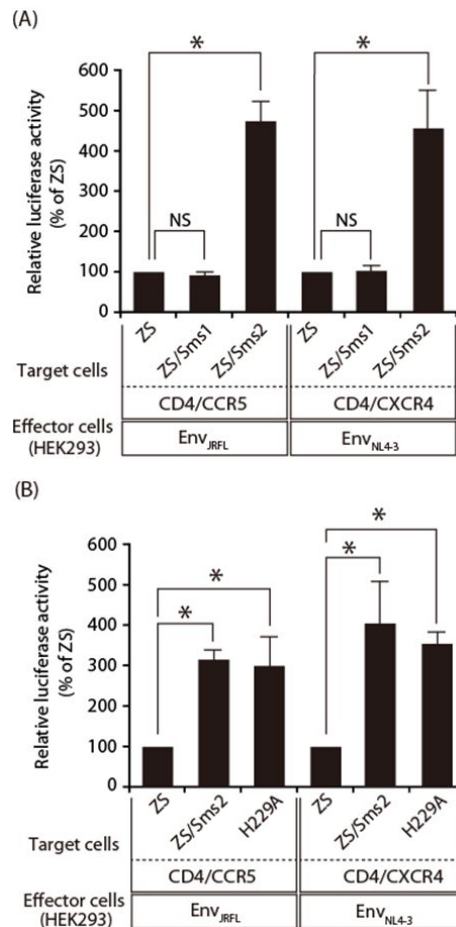
4. 研究成果

Sms2 は HIV-1 の膜融合を促進する

SM 合成酵素 Sms1, Sms2 ダブル KO マウス由来の胎児繊維芽細胞 (ZS 細胞)、Sms1 再構成細胞 (ZS/Sms1)、Sms2 再構成細胞 (ZS/Sms2) を Target 細胞とし cell-cell fusion assay を行ったところ、ZS 細胞、ZS/Sms1 細胞と比較して ZS/Sms2 細胞は HIV-1 Env を介した膜融合の効率が高かった (図 A)。また、興味深いことに、Sms2 の活性残基変異体 (H229A) を発現する ZS/Sms2-H229A 細胞においても、Sms2 と同様に膜融合効率が増加したことから (図 B)、Sms2 が産生する SM ではなく、Sms2 そのものが HIV-1 Env を介した膜融合に関わることが示唆された。

Sms2 は形質膜表面で HIV-1 受容体・補助受容体と相互作用する

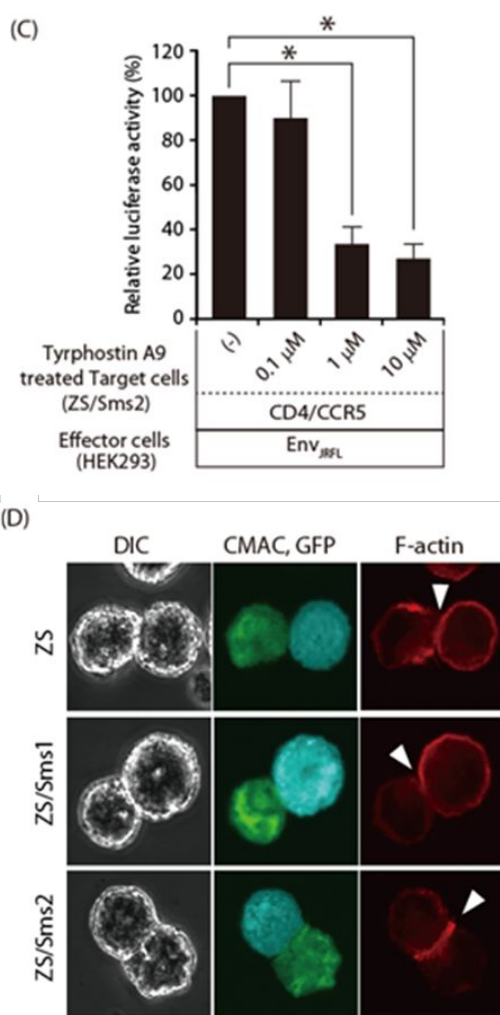
HA タグが付加した CD4、3xFLAG タグが付加した CCR5/CXCR4、および V5 タグが付加した SMS1, SMS2 を COS7 細胞に発現させ、コンフォーカル顕微鏡で細胞内局在を調べた。すると、SMS1 はゴルジ体においてのみ CD4, CCR5/CXCR4 と共局在するが、SMS2 はゴルジ体および形質膜においても共局在した。また、抗 Flag 抗体ビーズを用いて免疫沈降を行った結果、CD4, CCR5/CXCR4 の沈降とともに、SMS1, SMS2 が共沈することが分かり、SMS1, SMS2 は HIV-1 受容体・補助受容体の複合体と相互作用することが分かった。これらの事から、SMS2 は SMS1 と異なり形質膜で HIV-1 受容体・補助受容体と相互作用できる点が、ZS/Sms1 細胞と ZS/Sms2 細胞の HIV-1 Env を介した膜融合効率の違いに関わっていることが考えられた。



Sms2 は Pyk2 シグナルを介したアクチン重合を一過的に亢進する

樹状細胞は HIV-1 gp120 刺激により、チロシンキナーゼ Pyk2 シグナルを介してアクチン重合を促進し、細胞移動することが知られている。そこで、HIV-1 Env を介した膜融合における Sms2 と Pyk2 シグナルの関与を調べた。Pyk2 阻害剤 tyrphostin A9 処理した ZS/Sms2 細胞を Target 細胞とし cell-cell fusion assay を行ったところ、阻害剤の濃度依存的に HIV-1 Env を介した膜融合効率が減

少した (図 C)。また、HIV-1 Env 発現細胞で刺激した ZS/Sms2 細胞と ZS/Sms2-H229A 細胞は、ZS 細胞、ZS/Sms1 細胞と比較して Pyk2 リン酸化 (Tyr-402) が一過的に増加することが分かった。宿主細胞におけるアクチン重合は HIV-1 受容体・補助受容体のクラスタリングを誘導し、HIV-1 が効率良く感染する (文献 3)。そこで、HIV-1 Env 発現細胞との細胞間接点におけるアクチン重合を phalloidin 染色で観察したところ、ZS/Sms2 細胞は、ZS 細胞や ZS/Sms1 細胞と比較してアクチン重合の増加がみられた (図 D)。以上の結果から、Sms2 は形質膜上で HIV-1 受容体・補助受容体と相互作用することで、Pyk2 シグナルを介したアクチン重合を一過的に亢進し、HIV-1 Env を介した膜融合を促進するが示唆された。



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. Das D., Maeda K., Hayashi Y., Gavande N., Desai D. V., Chang S. B., Ghosh A. K., , and Mitsuya H.

Insights into the Mechanism of Inhibition of CXCR4: Identification of Piperidinylethanamine Analogs as Anti-HIV-1 Inhibitors

Antimicrob. Agents Chemother. (2015) **59**, 1895-1904, doi: 10.1128/AAC.04654-141.

2. Yamashita A, Hayashi Y., Matsumoto N, Nemoto-Sasaki Y, Oka S, Tanikawa T, Sugiura T. Glycerophosphate/Acylglycerophosphate Acyltransferases.

Biology (Basel). 2014 Nov 19;3(4):801-830

3. Omer WH, Narita A, Hosomichi K, Mitsunaga S, Hayashi Y., Yamashita A, Krasniqi A, Iwasaki Y, Kimura M, Inoue I.

Genome-wide linkage and exome analyses identify variants of HMCN1 for splenic epidermoid cyst.

BMC Med Genet. 2014 Oct 23;15(1):115. doi: 10.1186/s12881-014-0115-

4. Hayashi Y., Nemoto-Sasaki Y, Tanikawa T, Oka S, Tsuchiya K, Zama K, Mitsutake S, Sugiura T, Yamashita A.

Sphingomyelin synthase 2, but not sphingomyelin synthase 1, is involved in HIV-1 envelope-mediated membrane fusion.

J. Biol. Chem. (2014) 289, 30842-30856. doi: 10.1074/jbc.M114.574285.

5. Yamashita A, Hayashi Y., Nemoto-Sasaki Y, Ito M, Oka S, Tanikawa T, Waku K, Sugiura T.

Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms.

Prog Lipid Res. 2014 Jan;53:18-81. doi: 10.1016/j.plipres.2013.10.001.

[学会発表](計 4 件)

“スフィンゴリエリン合成酵素オリゴマー形成の解析”

林康広、田中勇輔、佐々木洋子、松本直樹、岡部史寛、杉浦隆之、山下純

第 87 回 日本生化学会 2014 年 10 月 15 日-18 日、京都府 京都市

“スフィンゴリエリン合成酵素のオリゴマー形成に関する研究”

林康広、佐々木洋子、松本直樹、田中勇輔、岡部史寛、杉浦隆之、山下純

第 56 回 日本脂質生化学会 2014 年 6 月 6 日-7 日、大阪府 東大阪市

“スフィンゴリエリン合成酵素 2 は HIV-1 の膜融合に関わる”

林康広、佐々木洋子、座間宏太、光武進、杉浦隆之、山下純

第 86 回 日本生化学会 2013 年 9 月 11 日-13 日、神奈川県 横浜市

“スフィンゴリエリン合成酵素 2 は HIV-1 の膜融合に関わる”

林康広、佐々木洋子、座間宏太、光武進、杉浦隆之、山下純
第 55 回 日本脂質生化学会 2013 年 6 月 6 日-7 日、宮城県 宮城郡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.e-campus.gr.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 康広 (HAYASHI, Yasuhiro)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：70582857