

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860302

研究課題名(和文) 霊長類免疫不全ウイルスの宿主域拡大を規定する機能の獲得メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism of primate immunodeficiency viruses to broaden host range

研究代表者

芳田 剛 (Yoshida, Takeshi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：00727521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：エイズの原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)の起源は、チンパンジーのウイルスであると考えられている。ヒトを含む動物は、ウイルス感染に抵抗するウイルス蛋白質を備えているが、ウイルスは変異し、それらから逃れる。

本研究は、HIV-1がヒトの抗ウイルス蛋白質BST-2から逃れる際、ウイルス蛋白質VpuをBST-2に結合させることを明らかにし、両蛋白質の結合部位を同定した。チンパンジーのウイルス(SIVcpz MB897株)のVpu蛋白質はヒトBST-2と結合しないことを明らかにしたため、HIV-1に進化する際にVpuはヒトBST-2との結合する能力を獲得したと推測される。

研究成果の概要(英文)：Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is thought to have originated in Africa through the evolution of immunodeficiency viruses infecting wild chimpanzees (SIVcpz). Although animals including human beings possess intrinsic defense proteins called restriction factors, viruses had overcome them by evolution.

In this study, we found that an HIV-1 accessory protein Vpu binds to a human restriction factor BST-2 to degrade it and identified the important domain of Vpu to bind to BST-2. Since we found that Vpu of SIVcpz MB897, a close strain to the main group of HIV-1 in the phylogenetic tree, cannot bind to human BST-2, suggesting that Vpu of an ancient virus acquired an ability to bind to human BST-2 during the evolution.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 レトロウイルス 抗ウイルス蛋白質 BST-2/tetherin ウイルスの進化 霊長類 エイズ 種差

1. 研究開始当初の背景

申請者がこれまで研究対象にしていたBST-2は、抗レトロウイルス宿主因子群のひとつである。この分子は細胞膜に発現する膜蛋白質で、感染細胞から出芽したウイルス粒子を細胞膜上につなぎとめること（繫留）により、ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）を含む多種のエンベロープウイルスの放出を抑制する。しかし、HIV-1はウイルス蛋白質 Vpu を用いて BST-2 の機能を阻害し、効率的にウイルスを放出している。興味深いことに、HIV-1 の祖先ウイルスであるチンパンジー免疫不全ウイルス (SIVcpz) は Nef 蛋白質を用いて宿主 BST-2 を克服することが報告されている。この事実は、SIVcpz がヒトへ伝染した際、自身の Nef ではヒト BST-2 を克服することができず、HIV-1 へと進化する過程で Vpu 蛋白質に機能を獲得したことを示唆する。

さらに、HIV-1 やその祖先ウイルス以外にも、宿主 BST-2 を克服するウイルスが種々報告され(表-1)、それぞれが異なるウイルス蛋白質を用いて異なる機序によって克服していることが明らかとなった。このことから BST-2 が様々なウイルスの増殖戦略にとって不都合であり、越えなければならない障壁であったことが推測される。このことより、報告されているウイルス種以外にも、BST-2 を克服するウイルスが存在する可能性がある。

表 1 種々のウイルスが宿主BST-2を克服している

ウイルス名	BST-2克服蛋白質	宿主
HIV-2	Env	ヒト
ウマ伝染性貧血ウイルス	Env	ウマ
ネコ免疫不全ウイルス	Env	ネコ
単純ヘルペスウイルス-1	Vhs, gM	ヒト
カボジ肉腫ウイルス	K5	ヒト
センダイウイルス	glycoproteins	ヒト
チクングニアウイルス	nsP1	ヒト
エボラウイルス	GP	ヒト

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、これらウイルス蛋白質による BST-2 克服の分子メカニズムを解明することである。このメカニズムにおいて両分子間の物理的相互作用が重要ではないかと考え、それを評価する実験系を用いる。本研究結果により、霊長類免疫不全ウイルスが種間バリア（種の壁）を越えてヒトへと宿主域を遷移させる進化の過程を明らかに出来るものと期待される。

3. 研究の方法

ウイルス蛋白質による BST-2 克服には、両分子間の「物理的相互作用」が重要であるが、それ以外の要因にも左右される可能性を示唆する実験結果を見出している。

そのため、この分子メカニズムを、「物理的相互作用」と「相互作用以外の事象」に区分し、以下の方法により解析する。

(1) 「物理的相互作用」については、申請者が確立した Vpu と BST-2 間の物理的相互作用を検出する系を応用して評価する。具体的には、チンパンジー-BST-2 を克服しない SIVcpz Vpu が BST-2 と相互作用するかの評価を行い、相互作用する場合は BST-2 蛋白質との結合部位を同定する。さらに、SIV や HIV-1 の Nef と BST-2 の結合についても、同様の実験系により評価する。

(2) 「相互作用以外の事象」については、ヒト BST-2 の 45 番目のスレオニン残基に着目する。この残基は、Vpu に克服されるうえで重要にもかかわらず、Vpu との結合には重要でないことを報告した。その上で、Vpu がヒト BST-2 を克服する際、BST-2 の 45 番目のスレオニン残基がリン酸化修飾されている可能性があるため、リン酸化スレオニンを擬態するグルタミン酸置換変異体 (T45E) を作製し、Vpu 蛋白質存在下・非存在下における機能を評価する。

(3) 前述の通り、未報告のウイルスによる BST-2 克服現象が存在する可能性があるため、その発見を目指す。そこで、Vpu のアミノ酸配列と相同性を持つウイルス蛋白質を検索し、その蛋白質が BST-2 に対して機能を持つかを評価する。

4. 研究成果

(1) - 最初に、BST-2 克服能のない SIVcpz (MB897 株) の Vpu は、自然宿主であるチンパンジーの BST-2 と結合しないことを見出した。さらに、この Vpu の細胞内部位を、チンパンジー-BST-2 と結合する Vpu (HIV-1 NL4-3) の細胞内部位と置換した変異体を作製したところ、BST-2 と結合し、BST-2 を克服した。結果から、SIVcpz Vpu が BST-2 を克服できない原因は BST-2 と結合しないため、であることが示唆された。

また、この Vpu はチンパンジー-BST-2 と同様、ヒト BST-2 とは結合しなかった。この事実は、SIVcpz が HIV-1 に進化する際に Vpu はヒト BST-2 との結合する能力を獲得したと推測される。その一方、SIVcpz Vpu はアカゲザル BST-2 とは、細胞内部位ではなく、膜貫通部位を介して結合していた。

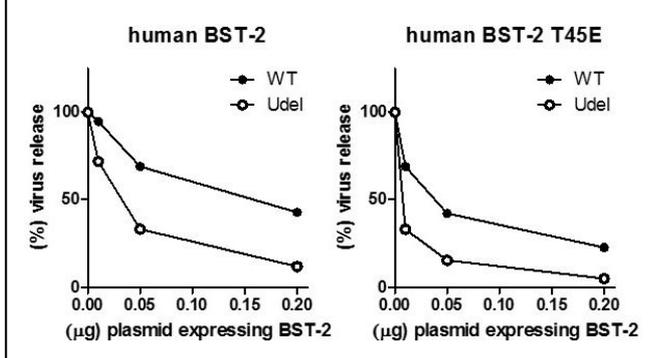
一方、2株の HIV-1 の Vpu (NL4-3 株と DH12 株) は膜貫通部位を介してヒト BST-2 と結合し、チンパンジー-BST-2 とは膜貫通部位に加え細胞内部位 5 アミノ酸を介して結合していることが判明した。さらに、アカゲザル BST-2 とは膜貫通部位では結合せず、細胞内部位 5 アミノ酸を介してのみ結合していた。この 5 アミノ酸は、ヒトを除く霊長類の BST-2 に保存されているため、この分子間の結合は、HIV-1 の祖先がかつてサルに感染していたことを示す「痕跡」の可能性はある。

しかし、HIV-1 の直近祖先と考えられている SIVcpz MB897 株の Vpu はこの 5 アミノ酸と結合せず、膜貫通部位を介してサル BST-2 と結合することを考え合わせると、「HIV-1 進化の中間体」である SIVcpz Vpu が、「進化の最終形」である HIV-1 Vpu の痕跡を持たないうえに、異なる痕跡を持つことを意味する為、学術的に興味深い。本研究成果を論文化し、報告する予定である。

(1) - 一方、BST-2 克服能のない HIV-1 Nef と、サル BST-2 を克服するサル免疫不全ウイルス (SIVmac239) の Nef を用いて、BST-2 との結合能を評価したところ、双方の Nef がともにヒトおよびサル BST-2 と結合することが判明した。この事実から、Nef にとって BST-2 との結合が BST-2 克服の十分条件ではないことが示唆された。また、両 Nef に保存されている 2 番目のグリシン残基はミリスチル化される部位であるが、それをアラニンへ置換すると、その結合能の大半を失うことを見出した。本結果から、Nef 蛋白質の膜への結合能が BST-2 との相互作用に重要であることが判明したが、相互作用部位の特定には至らなかった。

(2) BST-2 の 45 番目のスレオニン残基は Vpu に克服されるうえで重要にもかかわらず、結合には重要でないことを明らかにした。このスレオニン残基が Vpu の作用によりリン酸化修飾を受ける可能性を考え、リン酸化状態を擬態するグルタミン酸残基へと置換した BST-2 変異体を作製した (T45E)。野生型の BST-2 と比較して、Vpu 存在時 (WT) なら

図-1 BST-2によるウイルス放出抑制とVpuによる克服

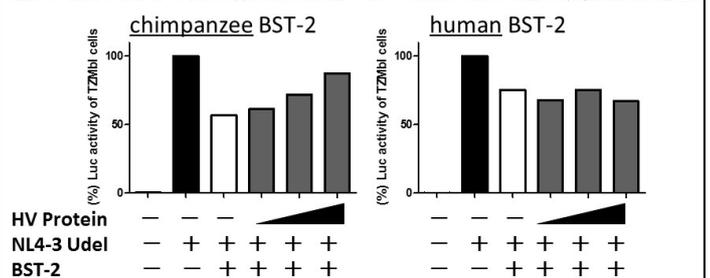


びに Vpu 非存在時 (Udel) の機能に変化がなかったため (図-1) この残基のリン酸化が重要な役割を果たす可能性は示唆されなかった。

(3) 昨年度までに見出した HIV-1 Vpu がサル BST-2 やチンパンジー-BST-2 の細胞内部位と結合する事実に着目した。Vpu の細胞内部位とヘルペスウイルス科のヒトに感染するウイルスが発現する蛋白質 (HV protein) がアミノ酸配列において低い相同性を有することを見出した (20 - 25% 程度)。そこで、BST-2 機能の阻害活性を評価したところ、チンパンジー-BST-2 の機能を阻害するが、ヒト BST-2 を阻害しないという結果を得た (図-2)。ヒト BST-2 のアミノ酸配列はチンパンジー-BST-2 のそれと相同性が高く、相違は 5 アミノ酸の置換と 5 アミノ酸の欠失のみである。そのため、これらの相違が上記の特異性を決定している、と考えられる。

BST-2 は、HIV-1 だけでなくエンベロープウイルスの放出を幅広く抑制すること、それに対して多くのウイルスが BST-2 を克服する機構を持つことが報告されているが (表 1 参照) 本研究結果と類似する報告はない。現在、本現象の作用機序解明のための解析をしており、結果を得られ次第、論文を投稿する計画である。

図-2 BST-2のウイルス放出抑制とヘルペスウイルス蛋白質による克服



さらに、HIV-1 Vpu はサル免疫不全ウイルスの Vpu を祖先に持つと考えられているが、その先の祖先については明らかになっていない。しかし、前述の HV protein がアミノ酸配列において HIV-1 Vpu と一定程度の相同性を有する事実、BST-2 克服の共通機能を持つ事実を考えれば、これら 2 つの蛋白質が共通の祖先をもつ可能性があり、今後、ウイルス蛋白質の成り立ちを進化学的側面から着目する可能性も探していきたい。

一方、ヒト BST-2 とチンパンジー-BST-2 のアミノ酸配列に相違があり、ウイルス蛋白質に対する感受性や特異性を決定している点について、大きな関心を持った (抗ウイルス蛋白質の動物種間における相違)。この種間相違を動物の進化の面から捉え、ヒトはチンパンジーとの共通祖先から進化する際に、この相違を得たと考えられる。BST-2

蛋白質の発現が、ウイルスに対する宿主防御機構であるインターフェロンにより誘導されることを考えると、その進化の原因にウイルス感染が関わった可能性が示唆される。今後長い時間をかけて、BST-2 を含めた動物の抗ウイルス蛋白質の種間相違がどのような経緯により獲得されたか、その経緯にウイルス感染が関わったのかを明らかにする手段を考え、実証していきたいと考えている。

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1件)

HIV-1 アクセサリー蛋白質およびその標的宿主因子の霊長類モデルによる評価

芳田剛、明里宏文

日本エイズ学会誌、査読なし、2015、Vol.17 No.1、 P7~13

[学会発表](計1件)

芳田剛、Is HIV-1 Vpu Oligomerization Required for Its Functions?

日本分子生物学会学術集会、2015年12

1日-4日、神戸国際展示場(兵庫県、神戸市)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

所属する東京医科歯科大学 ウイルス制御学分野のウェブサイト

<http://molv.org/128.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

芳田 剛 (YOSHIDA, Takeshi)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 00727521

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: