

令和元年5月14日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08818

研究課題名(和文) 感染シナプスにおけるHIV蛋白の極性輸送と粒子形成の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism for polarized trafficking and budding of HIV in infectious synapses

研究代表者

森川 裕子 (Morikawa, Yuko)

北里大学・感染制御科学府・教授

研究者番号：20191017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：HIV感染細胞は非感染細胞と「感染シナプス」と呼ばれる接着構造を形成し、HIVを伝播する。本研究では、免疫シナプスにおけるQc-SNARE (Syntaxin, SNAP) 介在性のサイトカイン (TNF, IL-2) 分泌経路を利用してHIV Gag蛋白が細胞内輸送されることを明らかにした。これらの結果はHIV感染による免疫応答抑制を説明する。また、イメージング等により、GagとSyntaxinは共輸送され、Gag-Syntaxin複合体の輸送過程で既報のクラスリンアダプター-APsやESCRT-I分子TSG101と一時的に相互作用する可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫細胞は抗原提示細胞と免疫シナプスと呼ばれる接着構造を形成し、サイトカインを分泌して免疫応答を誘導する。HIVはTリンパ球に感染して免疫機能不全をおこすが、HIV感染Tリンパ球は非感染Tリンパ球と接触すると、シナプス様の接着構造を形成してHIVを伝播する。本研究では、Tリンパ球におけるサイトカイン分泌経路を利用してHIV Gag蛋白が細胞内輸送されることを示唆した。この結果はHIV感染による免疫応答抑制を説明する。また、Gag蛋白がサイトカイン分泌に関与する分子により輸送される過程で、様々な宿主因子と相互作用する可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：HIV infected cells form an adhesive structure with target cells, termed infectious synapse, leading to efficient transmission of HIV. The present study showed that HIV uses Qc-SNARE (Syntaxin, SNAP)-mediated secretion pathways for cytokines (e.g., TNF, IL-2) in immunological synapse for intracellular trafficking of HIV Gag protein. These results may explain suppressive immune responses in HIV infected cells. The study revealed that Gag and Syntaxin were cotransported and suggested that they were transiently interacted with clathrin adaptors (APs) and an ESCRT-I molecule TSG101 during the transport pathways.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV Gag 輸送 感染シナプス サイトカイン 細胞骨格系

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染細胞は標的細胞と接着すると、「感染シナプス」と呼ばれる免疫シナプス様構造を形成し、効率良く HIV を伝播する。HIV 感染シナプスでは HIV 成分が接着面に極性輸送され接着面からのみ粒子放出が起こるとともに、標的細胞の接着面には HIV 受容体 (CD4, CXCR4/CCR5) や細胞接着分子が集積する。すなわち、感染細胞側では HIV 成分の輸送経路や宿主機構が編成されると考えられるが、その詳細は解明されていない。HIV Gag 蛋白の輸送には、細胞骨格系、TSG101 (エンドソーム ESCRT-I 分子)、PIP2 (形質膜局在イノシトールリン脂質 PIP)、APs (クラスリンアダプター) 等の宿主因子の関与が示されてきた。本研究では、感染シナプスにおける Gag 蛋白の極性輸送を制御する宿主機構を解析する。

2. 研究の目的

HIV 感染シナプスでは、HIV Gag 蛋白の接着面への極性輸送が起こる。申請者は Gag 蛋白輸送の責任宿主分子を半網羅的に探索し、2つの Qc-SNARE (Syntaxin, SNAP) を特定した。これらは免疫シナプスにおけるサイトカインの分泌輸送の制御分子であった。本研究では、サイトカイン分泌経路を略奪利用した Gag 蛋白の微小管系小胞輸送を明らかにするとともに、それら制御分子を介した Gag 蛋白の cargo 輸送の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞：サイトカイン分泌輸送の Qc-SNARE 分子 (Syntaxin, SNAP) shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いてノックダウン Jurkat 細胞を作製した。また、CRISPR-Cas9 系でノックアウト Jurkat 細胞を作製した。後期エンドソームの輸送制御分子 Rab7 および Rab9 の shRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いてノックダウン Jurkat 細胞を作製した。Strawberry-Tubulin、EB1-mCherry、Lifeact-Strawberry 等の恒常発現 Jurkat 細胞を樹立した。これらの細胞に HIV を感染させた後、非感染細胞と共培養し感染シナプスを形成させた。HeLa および 293T 細胞では transfection により目的蛋白を発現させた。

(2) 共焦点顕微鏡と生細胞イメージング：出芽した HIV 粒子は抗 HIV-1 p17MA 抗体による免疫染色で検出した。後期エンドソームの CD63、ミトコンドリアの cox2 と ATP 合成酵素、V-ATP 分解酵素は免疫染色して観察した。Gag 蛋白と Syntaxin, AP 分子, TSG101 は EGFP, Cherry, Strawberry で蛍光標識した。共焦点顕微鏡で観察するとともに、リアルタイムの生細胞イメージングで動態を観察した。

(3) ELISA：HIV の産生とサイトカイン (TNF, IL-2) の放出はそれぞれ市販の ELISA kit で定量した。

(4) 生化学的解析：目的蛋白の相互作用は、それら共発現細胞を可溶化して共免疫沈降法で調べた。分子 (Syntaxin, AP, TSG101) の交換反応は、それぞれの発現細胞を超音波破碎し膜画分を分離した。それらを混合後、共免疫沈降法で解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞骨格系の再構築と HIV 蛋白の微小管系輸送：Strawberry-Tubulin 恒常発現 Jurkat 細胞を樹立した。HIV を感染させ、非感染細胞と共培養し感染シナプスを形成させたところ、MTOC はシナプス形成側 (細胞間接着部位側) だけでなく遠位側 (反対側) にも観察された。生細胞イメージングによる解析が必要と思われた。EB1-mCherry の発現は弱かった。また、アクチン結合性の Lifeact-Strawberry 恒常発現 Jurkat 細胞を樹立し、HIV を感染させ非感染細胞と感染シナプスを形成させた。細胞間接着側に厚いアクチン繊維が認められた。Strawberry-Tubulin 発現 HeLa 細胞では Gag-EGFP の微小管系輸送が確認された。微小管重合阻害薬で処理すると、Gag-EGFP 輸送は抑制された。

(2) 感染シナプスにおけるエンドソーム分子：Jurkat 細胞に HIV を感染させ非感染細胞と共培養して感染シナプスを形成させた。CD63 (後期エンドソーム分子) は細胞接着部位に局在する傾向が認められた。Rab7, Rab9 (後期エンドソームの輸送制御分子) の shRNA を Jurkat 細胞に導入しノックダウン細胞を樹立したところ、HIV 粒子産生は遅延・抑制された。また、PIP2 (形質膜局在の PIP) は感染シナプスの SMAC 遠位部にのみ観察されたことから、シナプス構造の維持に関与する可能性が考えられた。

(3) 感染シナプスにおけるミトコンドリア：Jurkat 細胞で HIV 感染シナプスを形成させた。cox2 (ミトコンドリア分子) は感染細胞側の細胞接着部位に極性化した。ATP 合成酵素 (ミトコンドリアに局在) も極性化を示した。ミトコンドリアにおける ATP 合成が HIV 出芽に利用される可能性が考えられた。感染細胞に ATP 合成酵素阻害薬 oligomycin 処理し、感染シナプスの形成が抑制されるか検討した。

(4) Qc-SNARE による Gag 蛋白輸送：Qc-SNARE (Syntaxin, SNAP) の shRNA あるいは gRNA+Cas9 を Jurkat 細胞に導入したところ、TNF 分泌輸送を制御する Syntaxin のノックダウン/ノックアウト細胞では Gag 蛋白の輸送阻害と粒子産生抑制が確認された。一方、IL-2, IFN- γ の分泌輸送を制御する SNAP のノックダウン細胞では粒子産生が顕著に抑制されたが、ノックアウト細胞は得られなかった (後に、必須因子と判明)。Syntaxin, SNAP のノックダウン細胞では HIV 感染によりそれぞれ TNF, IL-2 の産生が抑制された。すなわち、Gag 蛋白はサイトカイン分泌輸送経路を利用して輸送されると考察された。これらの結果は HIV 感染による免疫応答抑制を説明し

うる。

(5) Gag 蛋白輸送における責任宿主因子の動員 : Gag 蛋白、Syntaxin、クラスリンアダプターAP、ESCRT-I 分子 TSG101 をそれぞれ蛍光標識し生細胞イメージングで観察したところ、Gag と Syntaxin の共輸送は認められたが、APs は Gag とも Syntaxin とも共輸送されなかった。すなわち、Gag-Syntaxin 複合体は輸送過程で APs や TSG101 と一時的に相互作用する可能性が示唆できた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Momose F, Morikawa Y. Polycistronic expression of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase by using the *Thosea asigna* virus 2A-like self-processing Sequence. *Front Microbiol*, 7, 288, 2016 (doi: 10.3389/fmicb.2016.00288)

Takizawa N, Momose F, Morikawa Y, Nomoto A. Influenza A virus hemagglutinin is required for the assembly of viral components including bundled vRNPs at the lipid raft. *Viruses*, 8, 249, 2016 (doi: 10.3390/v8090249)

Miyakawa K, Nishi M, Matsunaga S, Okayama A, Anraku M, Kudoh A, Hirano H, Kimura H, Morikawa Y, Yamamoto N, Ono A, Ryo A. The tumor suppressor APC promotes HIV-1 assembly via interaction with Gag precursor protein. *Nat Commun*, 8, 14259, 2017 (doi: 10.1038/ncomms14259)

Takagi S, Momose F, Morikawa Y. FRET analysis of HIV-1 Gag and GagPol interactions. *FEBS Open Bio*, 7, 1815-1825, 2017 (doi: 10.1002/2211-5463.12328)

〔学会発表〕(計8件)

Hagiwara S, Momose F, Matsuda Z, Morikawa Y. Identification of intracellular trafficking pathways of HIV-1 Env and Gag proteins by using Rab proteins. 第64回日本ウイルス学会学術集会 2016年

Kamo M, Tateishi H, Yamamoto M, Okamoto Y, Morikawa Y, Misumi S, Otsuka M, Fujita M. Elucidation of action mechanism of heterocyclic compound BMMP having anti-HIV activity. 第64回日本ウイルス学会学術集会 2016年

Inanaga M, Momose F, Morikawa Y. Kinetic changes of cells upon HIV-1 Nef expression. 第65回日本ウイルス学会学術集会 2017年

Minakawa S, Momose F, Morikawa Y. Kinetic analysis of latently HIV-infected cells. 第65回日本ウイルス学会学術集会 2017年

Momose F, Morikawa Y. Accessibility assessment of the terminal region of influenza A virus genome segments by fluorescence in situ hybridization. 第65回日本ウイルス学会学術集会 2017年

Kamei T, Momose F, Morikawa Y. Co-transport mechanisms of influenza virus HA and NA for the apical plasma membrane. 第65回日本ウイルス学会学術集会 2017年

Tanabe R, Momose F, Morikawa Y. Establishment of in vitro transendothelial migration system of T cells for lymph node homing analysis of latently HIV-infected cells. 第66回日本ウイルス学会学術集会 2018年

Minakawa S, Momose F, Morikawa Y. Kinetic behaviors of latently HIV-infected cells in coculture with stromal cells. 第66回日本ウイルス学会学術集会 2018年

Inanaga M, Momose F, Morikawa Y. HIV-1 Nef expression causes T cell kinetic changing
Ogawa K, Momose F, Morikawa Y. HIV-1 粒子産生における後期エンドソーム分子 Rab7 及び Rab9 の関与. 第66回日本ウイルス学会学術集会 2018年

〔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 :

国内外の別 :

取得状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。