

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659229

研究課題名（和文） 抗 HIV 新規 restriction factor の探索

研究課題名（英文） Study of novel HIV restriction factors

研究代表者 小柳 義夫 (KOYANAGI YOSHIO)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：80215417

研究成果の概要（和文）：

生体細胞には外来病原体の感染を抑止する分子群が備わっていることがわかってきた。その分子のひとつである SAMHD1 の抗 HIV 活性の発揮には deoxynucleoside triphosphate (dNTP) hydrolase 活性が重要であり、この分子は細胞内 dNTP プールを枯渇させ、ウイルス逆転写反応を阻害する。そこで、この SAMHD1 はレンチウイルスに限らず DNA ウイルスに対しても抑制的に働くことを仮定し、SAMHD1 の発現を低下させた非分裂骨髄系細胞では単純ヘルペスウイルス(HSV) の複製効率が増加することを見出した。このことより SAMHD1 は非分裂骨髄系細胞で抗ウイルス分子として幅広く働くことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Accumulating evidences have suggested that the host cells possess intrinsic anti-viral factors. SAMHD1 is a newly identified anti-HIV host factor that has a dNTP triphosphohydrolase activity and depletes intracellular dNTP pools in non-dividing myeloid cells. Since DNA viruses utilize cellular dNTPs, we investigated whether SAMHD1 limits the replication of DNA viruses in non-dividing myeloid target cells. Indeed, a double stranded DNA viruses, herpes simplex virus type 1, are subject to SAMHD1 restriction in non-dividing target cells in a dNTP dependent manner. This study suggests that SAMHD1 is a potential innate anti-viral player that suppresses the replication of a wide range of DNA viruses as well as retroviruses that infect non-dividing myeloid cells during infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：キーワード：AIDS, HIV, restriction factor, SAMHD1, Vpx, マクロファージ, HSV

1. 研究開始当初の背景

生体にウイルスが感染して病原性の発揮を阻止するようにある種の細胞にはこれら外来病原体の感染を抑止する分子群が備わっていることが HIV 研究からわかってきた。ところで、HIV をはじめとするレンチウイルスは、マクロファージ細胞/単球細胞を自然宿主とする。この細胞への感染には、多くのレ

ンチウイルスに特有のアクセサリ遺伝子である Vpx/Vpr が必須であり、これらの遺伝子がコードする蛋白質により排除されるウイルス抑制宿主因子 (Restriction factor: 以下 RF と略す) が存在すると想定されてきた。研究開始当初は未知の RF を単離・同定するための実験を開始した。その時を同じくして複数の欧米のグループより Vpx 結合蛋白質

としてマクロファージ細胞/単球細胞に発現する SAMHD1 が、抗 HIV 因子であるとの報告 (Nature 474:654-7, 2011, Nature 474:658-661, 2011) が相次ぎ、研究課題を急遽 SAMHD1 の作用機序の解析研究にシフトさせた。

2. 研究の目的

Vpx 標的分子の解析とともに、Vpx 標的分子のひとつとして新規に同定された SAMHD1 の蛋白質性状解析と抗ウイルス活性の分子機序の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 組換え蛋白質の作製と酵素反応: 単球系ヒト細胞株である THP1 の cDNA より *samhd1* を PCR 法により単離し、大腸菌での全長の GST タグ付加 SAMHD1 蛋白質の発現を行った。そして、タグ配列除去精製蛋白質と各種ヌクレオチド分子に対するヌクレオチド分解作用を、遊離リン酸産物を検出する Biomol Green アッセイにより測定した。

(2) 細胞と感染実験: THP1 細胞に特異的 shRNA レンチウイルスベクターの発現により SAMHD1 をノックダウンした細胞とランダム配列を標的とした shRNA 発現細胞、ならびに、ヒト単球細胞を IL-4 ならびに GM-CSF を添加培養し、樹状細胞に分化させた細胞に、Vpx 蛋白質導入ベクターに暴露した。その後、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) kos 株を感染させ、細胞におけるウイルス複製効率を PCR 法により測定した。また、THP1 細胞については HIV-1 の感染性を GFP 発現ウイルスにより測定し、陽性コントロールとした。

4. 研究成果

(1) Vpx 標的分子の解析: THP1 細胞にレンチウイルスベクターを導入し、Vpx 恒常発現細胞を樹立した。この細胞では、GFP 発現 HIV-1 の複製効率は明らかに増加していた。また、SAMHD1 の発現量は低下していた。

(2) SAMHD1 の蛋白質性状解析: SAMHD1 は SAM 領域に蛋白質結合ドメイン、HD 領域に dNTP hydrolyase 活性があることが知られているが、その基質特異性や酵素活性発現プロセス、ならびに、補助因子の介在の実体にはついてはまだまだ不明の点があった。そこで、この全長の組換え蛋白質を合成し、酵素学的解析をおこなった。その結果、この酵素活性は、HD ドメインが担っており、その活性はメタルイオン依存性であること、そして、高親和性の基質として 1, 2, ならびに 3 リン酸リボヌクレオチドがなりうることを見いだした。これらの結果は、SAM 領域を欠損するこの蛋白質にデオキシリボヌクレオチド 3 リン酸 (特に deoxyGTP にのみ) に対して高い親和性の nucleotidase 活性があり、リボヌクレオチドに対して親和性は低いという報告 (Nature

480:379-382, 2011) と異なる。酵素活性発現プロセスについては生化学的解析実験から、この分子の多量体化が重要な役割を担っている結果を得ている。本研究により新規に同定された RF によるウイルス感染抑制メカニズムの多様性が明らかにされ、これをもとにした HIV に対する治療戦略の基礎知見確立に貢献すると考える。

(3) SAMHD1 の抗ウイルス効果: 代表的 2 本鎖 DNA ウイルスである HSV-1 について解析実験をおこなった。shRNA により SAMHD1 の発現を低下させた THP1 細胞ならびに初代樹状細胞では、HSV の複製効率が增加すること、SAMHD1 存在下でもヌクレオチドの添加により、dNTP プールを増加させるとウイルス複製が上昇することを見出した (PLoS Pathog, 印刷中)。この抗ウイルス活性は、分裂細胞ではほとんどみられないことより、細胞分裂が止まった骨髄系細胞に特異的に作動する抑制因子であることが想定される。これらの作用機序をもとにした治療戦略が期待される。

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 11 件)

1. Hollenbaugh JA, Gee P, Baker J, Daly MB, Amie S, Kasai N, Kanemura Y, Ward BM, Koyanagi Y, Kim B. Host factor SAMHD1 restricts DNA viruses in non-dividing myeloid cells. PLoS Pathog, 印刷中. 査読有.

2. Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y. Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation. *J. Virol.* 87:701-5, 2013 doi: 10.1128/JVI.01453-12, 査読有.

3. Sato K, Gee P, Koyanagi Y. Vpu and BST2: still not there yet? *Front. Microbiol.* 2012;3:131. doi:10.3389/fmicb.2012.00131.5, 査読有.

4. Iwami S, Sato K, De Boer RJ, Aihara K, Miura T, Koyanagi Y. Identifying viral parameters from *in vitro* cell cultures, *Front. Microbiol.* 3:319, 2012 doi: 10.3389/fmicb.2012.00319, 査読有.

5. Sato K, Misawa N, Fukuhara M, Iwami S, An DS, Ito M, Koyanagi Y. Vpu augments the initial burst phase of HIV-1 propagation and downregulates BST2 and CD4 in humanized mice. *J. Virol.* 86:5000-5013, 2012 doi: 10.1128/JVI.07062-11. 査読有

6. Ebina H, Kanemura Y, Suzuki Y, Urata K, Koyanagi Y. Integrase-independent HIV-1

infection is augmented under physical and chemical stress and produces a viral reservoir. *Virology* 427(1):44-50, 2012 doi: 10.1016/j.virol.2012.02.004, 査読有.

7. Watanabe T, Urano E, Miyauchi K, Ichikawa R, Hamatake M, Misawa N, Sato K, Ebina H, Koyanagi Y, Komano J. The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDI/D4GDI limits HIV-1 replication. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28:913-922, 2012

doi:10.1089/AID.2011.0180, 査読有.

8. Gee P, Ando Y, Kitayama H, Yamamoto SP, Kanemura Y, Ebina H, Kawaguchi Y, Koyanagi Y. APOBEC1-mediated editing and attenuation of herpes simplex virus 1 DNA indicate that neurons have an antiviral role during herpes simplex encephalitis. *J. Virol.* 85:9726-9736, 2011 doi: 10.1128/JVI.05288-11, 査読有.

9. Sato K, Misawa N, Nie C, Satou Y, Iwakiri D, Matsuoka M, Takahashi R, Kuzushima K, Ito M, Takada K, Koyanagi Y. A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. *Blood.* 117:5663-5673, 2011 doi: 10.1182/blood-2010-09-305979, 査読有.

10. Sato K, Koyanagi Y. The mouse is out of the bag: insights and perspectives on HIV-1-infected humanized mouse models. *Exp. Biol. Med.*, 236:977-985, 2011 doi: 10.1258/ebm.2011.010294, 査読有.

11. Yamamoto SP, Okawa K, Nakano T, Sano K, Ogawa K., Masuda T, Morikawa Y, Koyanagi Y, Suzuki Y. Huwel, a novel cellular interactor of Gag-Pol through integrase binding, negatively influences HIV-1 infectivity. *Microbes Infect.* 13:339-349, 2011 doi:

10.1016/j.micinf.2010.12.002, 査読有.

[学会発表] (計 7 件)

1. 小柳義夫. レトロウイルス感染におけるエフェクター分子北海道大学遺伝子制御研究所研究集会「感染と癌 -感染癌のエフェクター分子とその標的-」(招待講演) 2012年9月18日 北海道大学医学部学友会館(札幌)

2. Sato K, Misawa N, Satou Y, Matsuoka M, Ito M, Koyanagi Y. Positive contribution of HIV-1 Vpu for viral propagation in vivo. 37th Retroviruses Meeting 2012年5月22日 Cold Spring Harbor (米国)

3. Ebina H, Kanemura Y, Suzuki Y, Urata K, Misawa N, Koyanagi Y. DNA damage induces

illegitimate integration of HIV-1 in the presence of integrase inhibitor, leading to produce a viral reservoir. 37th Retroviruses Meeting Cold Spring Harbor, poster, New York, 2012年5月22日 Cold Spring Harbor (米国)

4. 小柳義夫. Overview of infection model of humanized mice 1st Samsung Humanized Mice Symposium (招待講演) 2012年4月13日 ソウル (韓国)

5. Sato K, Misawa N, Satou ., Matsuoka M, Ito M, Koyanagi Y. Induction of immune activation by the depletion of regulatory CD4+ T cell during acute HIV-1 infection in humanized mouse model. 19th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2012年3月5日 シアトル(米国)

6. Gee P, Okamoto S, Kanemura Y, Ebina H, Koyanagi Y. Biochemical characterization of the HIV-1 restriction factor SAMHD1. 第19回 Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. 2012年3月6日 シアトル (米国)

7. Gee P, Kanemura Y, Ebina H, Koyanagi Y. 第12回熊本エイズセミナー, 2011年10月20日 阿蘇リゾート グランヴィリオ ホテル (阿蘇市)

[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 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/KoyanagiHP/saito/TOP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小柳 義夫 京都大学・ウイルス研究所
(ウイルス研)・教授
研究者番号：80215417

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：