

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 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790510

研究課題名（和文） HIV-1 感染抵抗性因子 Rac2 によるウイルス増殖制御様式の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of anti-HIV-1 activity mediated by Rac2

研究代表者

博多 義之（HAKATA YOSHIYUKI）

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：30344500

研究成果の概要（和文）：サイトカイン産生制御において Rac2 が関与する細胞内情報伝達経路を特定した。また、その産生パターンから HIV-1 感染抵抗性の分子機序として、Rac2 による炎症性サイトカイン発現制御機構の関与が示唆された。Nef と同様にオートファジー制御因子として働くウイルスタンパク質を同定した。さらに、Rac2 はウイルスタンパク質との相互作用を介してオートファジーに影響を与え、結果としてウイルス増殖の制御に関与しうることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We identified a new function of human Rac2. Rac2 negatively or positively regulates several cytokines production at transcriptional level. The transcriptional regulation by Rac2 involves specific molecules acting in cellular signal transduction pathway. The regulation of inflammatory cytokines would be the one of mechanisms by which Rac2 mediates the anti-HIV-1 activity. We found that Rac2 associates with viral proteins which can control autophagy. These interactions implied that Rac2 suppresses HIV-1 replication thorough modification of cellular autophagy activity controlled by viral proteins.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス、HIV-1、rac2、感染抵抗性因子、感染制御

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 感染者からウイルスを完全に排除する方法は未だに開発されていない。一方、HIV-1 感染者に対して用いられている抗レトロウイルス薬を使用した多剤併用療法は、ウイルスの複製を抑えることでエイズ発症遅延に成績の極めて良い効果を発揮している。しかし、服用の中断に伴いウイルス複製は再開しエイズ発症の経過をとることが報告されている。このことは抗レトロウイルス薬による HIV-1 複製抑制下においても HIV 排除のための宿主免疫応答が有効に誘導できていないことを示している。従って、発症遅

延のためには長期におよぶ投薬が必要となり、結果として深刻な副作用の原因となっている。さらに多剤併用療法下において薬剤耐性ウイルスの出現事例がこれまでに世界中で数多く報告され、現存の薬剤のみでは近い将来ウイルスを制御できなくなる可能性が顕在化している。そのため、新たな作用機序を持つ低分子抗ウイルス薬の開発が急務の課題となっている。また、これまでに試行されたワクチン開発の失敗事例から、感染防衛能を持つワクチン開発のためには強力な免疫賦活化法の確立が必要であることが示唆されている。新規抗 HIV-1 薬の開発および合

理的な免疫賦活化法の確立のためには、HIV-1 感染動態を制御している宿主因子を新たに同定し、それらの因子がどのような分子機序でウイルスに干渉するのか理解する必要がある。

HIV-1 感染が成立すると考えられる高い頻度で非防御的な性接触を繰り返しているにもかかわらずなお感染が成立しないヒト集団が存在し、彼らは HIV 曝露非感染者として知られている。HIV 曝露非感染者からはウイルスゲノムおよび HIV-1 に特異的な抗 IgG 抗体がその血中に検出されないものの、HIV-1 抗原に対して明らかな反応性を持つ IgA 抗体が生殖器粘膜等に認められる。HIV-1 曝露非感染者の HIV-1 感染に対する抵抗性は、曝露非感染者が持つ遺伝的要素に依存していると予想されており、実際にこれまで幾つかの抵抗性に関与する責任遺伝子が報告されている。

我々は以前に、HIV-1 曝露非感染者群と感染者群の末梢血単核球を HIV-1 抗原で刺激した条件下において両者間で発現に差異のある遺伝子をマイクロアレイ解析し、HIV 曝露非感染者群においてのみ有意に発現が増強した遺伝子の一つとして Rac2 を同定した。さらに両群において Rac2 とその近傍のゲノム領域の配列を網羅的に解析した結果、HIV-1 曝露非感染者群に集中する 3 箇所の一塩基多型 (SNP) を Rac2 のイントロン領域に同定した。その後、同定した SNP が HIV-1 曝露非感染者に認められる Rac2 高発現の責任配列であること、さらに、HIV-1 曝露非感染者に集中して認められる SNP (感染抵抗性型 SNP) を持つ健常人とそれ以外の多型 (感染感受性型) を持つ健常人の末梢血単核球に HIV-1 を感染させたところ、前者における感染効率が後者に比べて著しく減少することを見いだした。以上の結果は、多型に依存した Rac2 発現制御機構が存在し、感染抵抗性型の多型アリルをもとに高発現した Rac2 が HIV-1 感染を抑制している事を強く示唆していた。そこでさらに我々は siRNA により Rac2 の発現を減少させた Rac2 発現抑制細胞、感染抵抗性型および感受性型の Rac2 アリルをそれぞれ持つ健常人の末梢血単核球を用いて、Rac2 が発揮する感染抵抗性の分子メカニズムについて解析を行った。その結果、Rac2 は MAPK の主要な経路の 1 つである p38 経路の活性化を通して HIV-1 感染に必須の CCR5 の発現を抑制し、また CCR5 のリガンドであり HIV-1 感染を阻害することが報告されている CCL5 の発現を上昇させていることが分かった。従って、Rac2 の抗 HIV-1 活性の基盤となる分子機構の 1 つは、CCR5 を利用して感染する HIV-1 (R5 HIV-1) が感染標的細胞上の CCR5 に結合する過程を阻害するものであることが示唆された。しかしながら一方で、CCR5 でな

く CXCR4 を利用して感染する HIV-1 (X4 HIV-1) を Rac2 発現抑制細胞に感染させた場合も、親細胞に感染させた場合と比較してウイルスの増殖が明らかに上昇した。この結果から CCR5・CCL5 が関与する機構とは別に、さらなる第 2、第 3 の未知のメカニズムによっても Rac2 は HIV-1 の複製を阻害していることが考えられた。

Rac2 は Rho ファミリーに属する低分子量 G タンパク質であり、宿主の自然免疫および獲得免疫の両システムに重要な役割を担っていることが知られている。Rac2 が担っている抗 HIV-1 活性のための作用機序の全容解明は、新規抗ウイルス薬開発のための新しい標的過程の発見、および合理的な免疫賦活化法の確立につながることを予想される。また、Rac2 は、HIV-1 以外のヒトレトロウイルスやヒト以外の動物レトロウイルスにも抗ウイルス効果を発揮する可能性がある。従って、感染抵抗性因子として Rac2 を解析することは、広範囲に及ぶウイルス感染症制御に向けた基礎研究となる事が期待される。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、Rac2 が担う抗 HIV-1 活性のうち未知の分子機序に焦点を当てそれを解明し、HIV-1 感染における Rac2 機能の全容を理解することを目的とした。Rac2 が中心的役割を担い HIV-1 感染に対し抵抗性を発揮する具体的な分子機序の候補として、Rac2 による種々のサイトカイン産生の制御が考えられた。予備的な実験の結果から感染初期に応答する炎症性サイトカインの発現が Rac2 の発現により、サイトカインの種類によって正または負に変動することを認めていた。そこで、いずれの細胞内情報伝達経路を利用することで Rac2 はこれらサイトカインの産生を制御しているのか明らかにする。

(2) 別の未知分子機序の候補として、Rac2 のオートファジー誘導による機序が予想された。ウイルス感染時、Rac2 が直接オートファジー経路に働くことを示した報告はないが、NADPH oxidase はオートファジー誘導能を持つと知られている。また、Rac2 は NADPH oxidase の構成要素としても機能することが知られている。そこで Rac2 のオートファジー誘導能を調べ、Rac2 発現量に依存したオートファジー経路の活性化、およびそれに続く HIV-1 粒子のオートファゴソーム/リソソーム内における分解が認められるのか検討し、この機構が HIV-1 感染抵抗性に寄与するのか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Rac2 発現抑制細胞、Rac2 過剰発現細胞およびそれらの親細胞を菌体成分 (LPS) で

刺激した際、培養上清に分泌されるサイトカイン量がその種類に応じて Rac2 発現依存的に増減することをこれまでに観察している。Rac2 の発現量を抑えると、IL-6 発現は減少し、TNF alpha 発現は著しく上昇した。サイトカイン発現量は HIV-1 感染病態に関与しており、Rac2 による発現制御が抗 HIV-1 活性の実体である可能性がある。発現制御の分子メカニズムを明らかにするためにまず、刺激後に分泌されたサイトカイン量が対応する各サイトカイン mRNA 量を反映しているのか調べた。具体的には上記細胞を LPS で刺激して経時的に RNA を抽出した後、サイトカイン mRNA 量を Real-Time RT-PCR 法により定量した。次に、転写産物の分解に Rac2 が影響するのか調べた。上記細胞群を LPS 刺激してサイトカイン mRNA の転写を一定時間誘導した後、転写阻害剤を培地に加え転写を止め、その後引き続き培養した細胞から経時的に RNA を抽出した。これら RNA を用いて Real-Time RT-PCR 法によりサイトカイン mRNA を定量し、分解速度を評価した。TNF alpha mRNA の分解には TTP、IL-6 mRNA の分解には Zc3h12a が働くことが知られている。そこで分解因子の発現量を Real-Time PCR 法および Western blotting 法により調べた。また、Rac2 によるサイトカイン発現制御が何れの細胞内情報伝達経路に依存しているのか調べた。LPS 刺激は情報伝達経路のうち、MAPK 経路、NFkappaB 経路、および IRF 経路を主に活性化させる。MAPK 経路に働く因子群は LPS 刺激後にリン酸化を受けることで活性化している。そこでまず Rac2 の発現量が MAPK のリン酸化に影響するのか調べた。上記細胞群を刺激後、経時的に細胞を回収・破砕し、そこに含まれているリン酸化 MAPK の量を特異的抗体を用いた Western blotting 法により調べた。IRF と NFkappaB 経路の下流で働く転写因子は標的遺伝子の最適な発現のために核への局在が厳密に制御されている。そこで、これら転写因子の核局在が Rac2 により影響を受けているのか調べるために上記細胞群を刺激後、経時的に細胞を回収し核と細胞質とを分画した。その後各転写因子に特異的な抗体を用いた Western blotting 法により各分画の転写因子量を測定した。

(2) Rac2 のオートファジー制御への関与は明らかでないものの、Rac2 が構成要素となりうる NADPH oxidase はオートファジーを活性化すると報告されている。また近年、Rac2 は HIV-1 がコードするタンパク質 Nef と機能的に相互作用することが報告された。Nef はオートリソソームへの成熟を抑制することでオートファジーによる HIV-1 粒子の分解を防いでいると報告されている。以上から、Rac2 はオートファジー経路を促進し HIV-1 増殖を

制限するものの、Nef がその効果を抑制する可能性が考えられた。そこでまず、Rac2 がオートファジーの制御に関与するのかについて検討した。オートファジー関連因子である LC3 タンパク質の脂質修飾および修飾 LC3 のオートファゴソーム膜への局在はオートファジーを追跡するマーカーとして知られている。前者は Western blotting 法により、また後者は間接免疫蛍光法により検出できる。オートファジーにおける Rac2 の関与を評価するために、Rac2 過剰発現細胞等におけるオートファジーについて、上記の通り LC3 をマーカーとして調べた。次に、オートファジー制御が認められている HIV-1 のタンパク質と Rac2 との結合を共免疫沈降法により調べた。次に、Rac2 とウイルスタンパク質を細胞に共発現した条件下で細胞のオートファジー活性が変動するのか LC3 をマーカーに Western blotting 法により調べた。以上により、Rac2 のオートファジーにおける機能が抗 HIV-1 作用として機能しているのかについて検討した。

4. 研究成果

(1) Rac2 による抗 HIV-1 活性の分子機序の一つとして炎症性サイトカインの産生制御が考えられたため、それについて解析した。Rac2 発現を抑制した細胞と親細胞に LPS を加え培養し、経時的に上清中の TNF alpha と IL6 を定量した結果、Rac2 抑制により TNF alpha 発現量が数千倍上昇し、IL6 は 1/20 程度に低下していた。一方、2 本鎖 DNA を細胞刺激に用いた際の IL6 は、むしろ Rac2 発現抑制細胞において多量に産生された。このことから IL6 産生における Rac2 の効果はシグナル伝達経路毎に異なることが示唆された。また Rac2 および恒常活性型の Rac2 変異体を過剰に発現させた細胞では IL6 発現量に明らかな増加を認めた。次に、上記細胞群の細胞内サイトカイン mRNA を定量したところ、上清中のサイトカイン量と正に相関した。一方、LPS 刺激後に転写を抑制し、経時的に mRNA を回収・定量をしたところ、Rac2 発現に依存したサイトカイン mRNA 分解速度に変化は認められなかった。つまり、Rac2 による mRNA 発現調節は転写後の mRNA の分解にあるのではなく、転写自体の段階にあることが分かった。次に、LPS 刺激時に活性化されるシグナル伝達分子について解析した結果、Rac2 の発現量により変化するサイトカイン mRNA 量と MAPK ファミリーに属する p38、JNK、ERK のリン酸化状態に明確な相関関係はないことが分かった。これらのことから、Rac2 は MAPK の活性化には寄与しないことが考えられた。また、IRF ファミリータンパク質について LPS 刺激にตอบสนองした核局在に Rac2 は影響を与えないことが分かった。一方で、Rac2 は NFkappaB 活性に

影響を及ぼしていることが分かった。Rac2 による NFkappaB 活性化が下流の幾つかの遺伝子群の発現に必要であり、結果としてサイトカイン mRNA の転写が制御されていると分かった。以上からサイトカイン産生における Rac2 の新機能が発見でき学術的に意義が深く、また、Rac2 が担う HIV-1 感染抵抗の分子機序として、Rac2 による炎症性サイトカインの発現制御が示唆された点、重要な知見を得ることができた（論文作成中）。

(2) Rac2 が HIV-1 感染抵抗性因子として機能するための分子作用機序候補として、Rac2 のオートファジー制御によるウイルス分解の促進が考えられた。そこで、Rac2 によるオートファジー制御の検出を試みた。Rac2 過剰発現細胞などにおいてオートファジーマーカーである LC3 の脂質修飾等を追跡した結果、Rac2 は顕著なオートファジー制御活性を有していないことが示唆された。一方、HIV-1 がコードする種々の制御/アクセサリタンパク質を用いた解析およびオートファジー制御における機能解析の結果、Rac2 は Vpr と結合すること、また Nef と同様、Vpr がオートファジーを制御する活性を持つことなどが明らかとなった。これは本研究で初めて明らかにされた Vpr 活性である。その後、Vpr が Rac2 の活性に影響すること、および Vpr が Rac2 の細胞内局在を変化させていることが分かった。Rac2 自身にオートファジー制御能は認められないものの、制御能を持つウイルスタンパク質との相互作用を介して間接的にオートファジーに関与する可能性が示唆された。Rac2/ウイルスタンパク質の機能的相互作用を世界に先駆けて明らかにできた点で意義深く、ウイルス制御に向けた新たな展開に繋がる重要な知見が得られた。

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 1 件)

① Li J, Hakata Y*, Takeda E, Liu Q, Iwatani Y, Kozak CA, Miyazawa M*. (*corresponding author)、Two Genetic Determinants Acquired Late in Mus Evolution Regulate the Inclusion of Exon 5, which Alters Mouse APOBEC3 Translation Efficiency、PLoS Pathogens、査読有、8 巻、2012、e1002478
doi: 10.1371/journal.ppat.1002478.

[学会発表] (計 2 件)

① 博多 義之、Vpr 依存的 G2 期停止における Vpr と宿主因子との分子間相互作用、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13

日～11 月 15 日、大阪国際会議場

② Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, Y. Hakata, J. Li, E. Takeda, and C. Ishihara、Functional consequences of mouse APOBEC3 gene polymorphisms and multiple genetic factors that influence the production of virus-neutralizing antibodies in Friend virus-infected mice、The 23rd Workshop on Retroviral Pathogenesis、2011 年 11 月 2 日～11 月 5 日、Montpellier, France

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/immuno/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

博多 義之 (HAKATA YOSHIYUKI)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号：30344500

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：