

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04659

研究課題名(和文) HIV感染を制御する細胞性因子に着目したウイルス伝播阻止基盤の構築

研究課題名(英文) Prevention of a virus propagation based on cellular factors controlling HIV infection

研究代表者

三隅 将吾 (Shogo, Misumi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授

研究者番号：40264311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、解糖系酵素GAPDH, Enolase, PKM2がHIV-1の複製を阻害することを明らかにした。特に、GAPDHおよびPKM2は、逆転写酵素のプライマーであるtRNALys3のウイルス粒子内取込みを阻害することにより、HIV-1複製を阻害していた。また、FDAが認可しているTrametinibによりHIV-1の脱殻過程が阻害されることを明らかにした。これらの知見は、現状ARTの問題点を解決するための新たな抗HIV戦略の開発にとって有用である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed that glycolysis enzymes GAPDH, Enolase, PKM 2 inhibit HIV-1 replication. In particular, GAPDH and PKM 2 inhibited HIV-1 replication by inhibiting packaging of tRNALys3, a reverse transcriptase primer, into viral particles. Moreover, we demonstrated that the uncoating process of HIV-1 is suppressed by FDA-approved Trametinib. These findings are useful for the development of a more effective anti-HIV strategy.

研究分野：生化学

キーワード：HIV-1 宿主因子

1. 研究開始当初の背景

より抗ウイルス効果の高い HIV 剤が開発されていく度に、HIV の薬剤耐性能の獲得に関する分子進化は想像を超えるものがあり、二重三重の備えを必要とすることの必要性があった。この HIV との戦いは、ウイルス因子(ウイルスが保有するウイルス特有の酵素)を標的とした創薬戦略を続ける限り終わりは見えないと予想された。申請者らは、研究開発当時、それまで以上により強力な HIV Protease (PR)阻害剤等を開発していく一方で、それらに対する耐性ウイルスに対抗するために、HIV 感染初期過程に関与する細胞性因子を標的とした抗 HIV 戦略を構築しておくことで、現行多剤併用療法の問題点をすこしでも改善する独創的な治療戦略を提案できると考えていた。

2. 研究の目的

本研究では、あえて HIV 伝播を制御する細胞性因子を探索・選別し、HIV 粘膜感染防止を目指した新規治療戦略を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

下記 1-3)を有機的に連結させた研究サイクルを回して研究を行った。

- 1) 感染初期過程に関与する新規細胞性因子の探索 (HIV 粒子プロテオーム解析)
- 2) 細胞性因子の HIV 感染初期過程における機能解析
- 3) 細胞性因子を標的とした化合物のスクリーニングと抗 HIV 効果の検証

但し、初年度の創薬標的として、次の細胞性因子に焦点を当てた。Pin1, ERK2, GAPDH は、3)から進めた。また、新たな細胞性因子の探索は、1-3)のサイクルに則って行った。

1) 感染初期過程に関与する新規細胞性因子の探索 (HIV 粒子プロテオーム解析)に関して

HIV 実験室株の調製、HIV 臨床分離株の調製、HIV 薬剤耐性株の調製に関しては、申請者らが実施してきたウイルス調製法を利用した (*J. Virol.* (2002) 76, 10000-8.)。また、二次元電気泳動を用いて HIV 粒子を構成するプロテオームを分離し、新規細胞性因子を同定方法もこれまでに実施してきた方法を利用した (*J. Virol.* (2002) 76, 10000-8.)。質量分析装置に関しては、Bruker daltonics 社の UltrafleXtreme™を用いて解析を行った (熊本大学薬学部)に現有)。なお、HIV 実験室株のプロテオーム解析はほぼ完了できたため、臨床分離株および薬剤耐性株を日本人のヒト末梢血単核細胞に感染させ調製したウイルスの解析を進め、より生体内環境を再現し、複製させたウイルスの解析を進めた。

2) 細胞性因子の HIV 感染初期過程における機能解析

種々の HIV 構成タンパク質を prey 分子としてすでに plasmid に組込んだものを現有するため、イーストツーハイブリッド法を用いて、新規細胞因子の標的タンパク質を特定した。さらに、HIV 持続感染細胞に特定した新規細胞因子特異的な siRNA を処理し、得られた細胞因子欠損 HIV 株の感染価を測定した。なお、HIV 感染過程のどのステップに関与する因子であるかは以下の方法により特定した。

脱殻過程 : *in vitro* 脱殻アッセイ (*Retrovirology* (2012)9, 107)

逆転写過程 : *in vitro* 逆転写産物定量アッセイ (*Retrovirology* (2012)9, 107)

組込み過程 : *in vitro* 組込みアッセイ (*Retrovirology* (2012)9, 107)

3) 細胞性因子を標的とした化合物のスクリーニングと抗 HIV 効果の検証

1) Pin1 阻害剤の探索と HIV 脱殻阻害効果の検証

HIV CA 由来の H₂N-HQA1pSPRTLN-COOH 配列を Nunc® CovaLink™ 96-Well Module にアミノ基を介して直接結合させ、Pin1 の基質認識に必須である WW ドメイン (Pin1-WW) を GST 融合蛋白質として発現させた精製蛋白質を加えインキュベーション後、POD 結合抗 GST 抗体を加え ELISA を行った。この際、候補阻害剤の存在下において基質ペプチドと Pin1-WW の相互作用が阻害されるものを探索した。本計画では、生薬成分からスクリーニングを開始し、一般的な化合物ライブラリーも視野に入れた。なお、候補阻害剤が見いだされた場合、*in vitro*脱殻アッセイを実施後、Tzm-bl 細胞を用いた HIV 感染実験でその効果を検証した。

2) ERK2 のウイルス粒子内取り込み阻害剤の探索と HIV 脱殻阻害効果の検証

Gupta ら (*J. Mol. Biol.* (2011)) は、ERK2 のウイルス粒子内の取り込みには、HIV CA の 83-95 残基に存在する Pro-rich ドメインが要求されると報告した。したがって、このドメインの構造を変化させる物質は、ERK2 のウイルス粒子内取り込みを阻害する候補となりうるため、統合計算化学システム MOE を使って、すでに明らかになっている CA の立体構造 (3H47) を利用し、化合物ライブラリーから Pro-rich ドメイン近傍に入りうる候補化合物を選択し、CEM/LAV-1 細胞に処理後、ウイルス粒子内への ERK2 の取り込みが実際に低下するか検証した。

3) FDA 承認済み新規の MEK 阻害剤 trametinib の ERK2 活性化阻害を介した HIV 脱殻阻害効果の検証

事前に HIV 持続感染細胞 CEM/LAV-1 細胞に

10 nM で Trametinib を処理すると、ウイルス粒子内の活性型 ERK2 の量が低下し、ウイルスの感染価が低下することを確認した。本研究では、実際に Trametinib 処理により、本当に ERK2 依存性の CA の Ser₁₆ 残基のリン酸化レベルが低下し、HIV の脱殻が阻害されるかを *in vitro* 脱殻アッセイによって検討した。また、より臨床条件を想定し、健常人から末梢血リンパ球を調製し、Trametinib 処理により得られたウイルスが実際に PBMC 内で複製できないかを検討した。

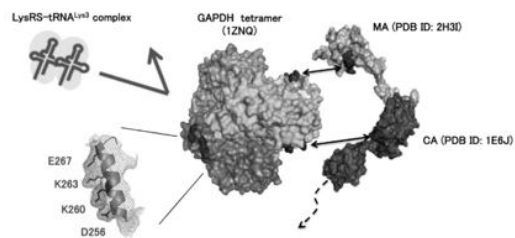
4) GAPDH 四量体安定化剤のスクリーニングと HIV 逆転写阻害効果の検証

Pattin ら (*Arch. Biochem. Biophys.* (2010)) は、Isoflurane が GAPDH の四量体構造を安定化することを報告していることから、統合計算化学システム MOE を使って、すでに明らかになっている GAPDH の四量体立体構造 (1U8F) を利用し、Isoflurane の GAPDH 結合部位を探索し、GAPDH 内の構造上の cavity にドッキングできる新規化合物をライブラリーから選択し、HIV 持続感染細胞 CEM/LAV-1 細胞に処理後、ウイルス粒子内への tRNA^{Lys3} の取込みが実際に低下するか検証した。

4. 研究成果

1) GAPDH の抗 HIV 活性に関して以下の知見を得た。

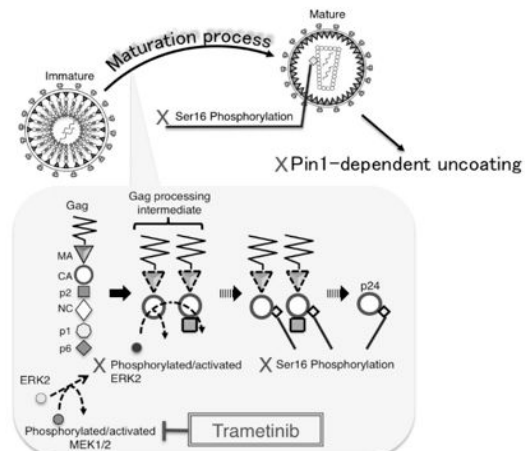
「HIV 粒子内への tRNA^{Lys3} 取込み阻害を担う GAPDH と HIV 前駆体タンパク質 Pr55^{gag} の相互作用部位」を明らかにした (*Biochem. Biophys. Rep.* (2016) 8: 325-332.)。HIV の複製においてウイルス粒子内への宿主由来の tRNA^{Lys3} 取込みは逆転写反応開始のための必須イベントである。リジル tRNA 合成酵素 (LysRS) と相互作用した tRNA^{Lys3} は、LysRS-tRNA^{Lys3} 複合体としてウイルス前駆体タンパク質と結合し、ウイルス粒子内に取り込まれることが報告されている。本研究により GAPDH 四量体 (GAPDH tetramer) がウイルス前駆体タンパク質のマトリックス (MA) およびカプシド (CA) ドメインと相互作用することにより、LysRS-tRNA^{Lys3} 複合体のウイルス粒子内取込みを阻害しているモデルを提唱できたと考えている。ウイルス前駆体タンパク質と LysRS-tRNA^{Lys3} 複合体の相互作用様式については、GAPDH が受ける翻訳後修飾の観点からもう少し詳細に調べる必要があると思われるが、今後この GAPDH とウイルス前駆体タンパク質の相互作用に関する知見を活用することで、より詳細な tRNA^{Lys3} 取込み機構を明らかにできることが期待されるとともに、GAPDH の抗 HIV 効果を増強するか、その作用をミミックできる分子を開発することにより、HIV 逆転写反応そのものを阻害する治療戦略を開発することに寄与できると考えられる (右図参照)。



Interaction between GAPDH and MA-CA polypeptide

2) 脱殻過程に関して新たな知見を得た。

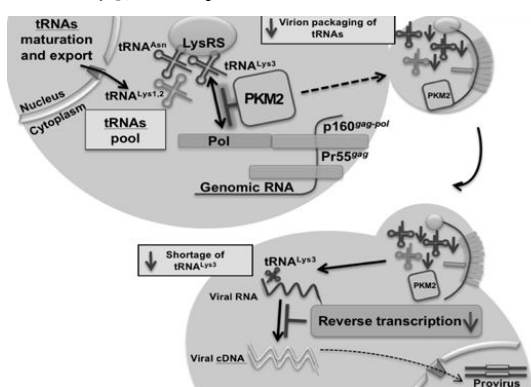
本研究では、MEK 阻害剤として世界で初めて承認された Trametinib が HIV 脱殻過程を阻害することにより、HIV 複製を阻害することを明らかにした (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2018) 495(2): 1846-1850)。HIV 粒子プロテオーム解析の結果、HIV がコードする CA タンパク質の Ser¹⁶-Pro¹⁷ モチーフにおいて Ser 残基特異的にリン酸化を受けていることを明らかにしてきた (*J. Biol. Chem.* (2010) 285, 25185-25195)。そして、このリン酸化を受けたモチーフを細胞内ペプチジルプロリルイソメラーゼ Pin1 が認識することにより、HIV-1 RNA を保護していた CA コアの Ser¹⁶-Pro¹⁷ モチーフにおける *cis-trans* 異性化反応を介して崩壊するという HIV 脱殻過程の新たなモデルを提唱している。さらに、CA タンパク質の Ser¹⁶-Pro¹⁷ モチーフを Ser 残基特異的にリン酸化する酵素が ERK2 であることを同定した (*J. Gen. Virol.* (2014) 95, 1156-1166)。ウイルス出芽時、ERK2 は CA タンパク質の前駆体である Pr55 とともにウイルス粒子内に取り込まれる。その後、前駆体タンパク質 Pr55 は HIV Protease によって processing を受け、intermediates を生じると、CA タンパク質の Ser¹⁶-Pro¹⁷ モチーフが ERK2 によってリン酸化を受けるというモデルを見出した。本研究では、HIV 持続感染細胞を Trametinib 処理することにより得られたウイルスは、ウイルス粒子内に取り込まれている MEK1/2 の活性が阻害されることにより、ウイルス粒子内の ERK2 の活性化が阻害され、結果的に Ser¹⁶ のリン酸化の効率が低下し、Pin1 依存的な脱殻過程が効率的に進行



しないために、感染価が低下することを明らかにした。そもそも、ERK2 はどのように活性化され、Ser¹⁶ のリン酸化を触媒するののに関して不明であった。そこで申請者等は、ERK2 の上流の MEK1/2 も HIV 粒子内に取込まれると仮定し、研究を進めた結果、本研究のターゲットとなった MEK1/2 がリン酸化された状態でウイルス粒子内に取り込まれていることをつきとめ、本研究成果につながった。本知見を基にして、脱殻過程そのものを阻害する新規治療戦略を立案したいと考えている。なお、Trametinib はすでに FDA で認可されている点は、抗 HIV 剤としての有用性も今後検討できると考えている。

3) PKM2 の抗 HIV 活性に関して以下の知見を得た。

新規抗 HIV 活性を有する解糖系酵素として PKM2 を同定した。



本研究成果は、*Biological and Pharmaceutical Bulletin* の 41 巻 (4 号) (2018) の表紙に採用された。PKM2 は、HIV 逆転写過程のプライマーとして重要な tRNA^{Lys3} のウイルス粒子内への取込みを阻害することにより、標的細胞におけるウイルスの複製を阻害する因子であることが明らかとなった。HIV は、標的細胞に感染後、細胞の代謝を解糖系優位にシフトさせることが最近明らかになっており、このような現象も宿主が有する抗 HIV 効果から逃れるために、宿主細胞の代謝をコントロールしている可能性が示唆された。

4) Pin1 阻害剤の探索と ERK2 のウイルス粒子内取り込み阻害剤の探索について

現在薬学部が保有する有用植物ライブラー由来の天然化合物を中心に今後探索を進め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 4 件)

Kishimoto N, Onitsuka-Kishimoto A, Iga N, Takamune N, Shoji S, Misumi S. 査読有 The C-terminal domain of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase plays an

important role in suppression of tRNA^{Lys3} packaging into human immunodeficiency virus type-1 particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2016) 8: 325-332. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.015.

Kishimoto N, Iga N, Yamamoto K, Takamune N, Misumi S. 査読有 Virion-incorporated alpha-enolase suppresses the early stage of HIV-1 reverse transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2017) 484(2): 278-284. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.096.

Dochi T, Akita A, Kishimoto N, Takamune N, Misumi S. 査読有 Trametinib suppresses HIV-1 replication by interfering with the disassembly of human immunodeficiency virus type 1 capsid core. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2018) 495(2): 1846-1850. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.177.

Mouree K.R., Kishimoto N, Iga N, Kirihaara C, Yamamoto K, Takamune N, Misumi S. 査読有 Virion-packaged pyruvate kinase muscle type 2 affects reverse transcription efficiency of human immunodeficiency virus type 1 by blocking virion recruitment of tRNA^{Lys3}. *Biol. Pharm. Bull.* (2018)41(4):612-618. DOI: 10.1248/bpb.b17-00991.

〔学会発表〕(計 8 件)

伊賀 望、岸本 直樹、鬼塚 彩乃、桐原 知江、高宗 暢暁、庄司 省三、三隅 将吾 抗 HIV-1 活性を持つ宿主性タンパク質 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase によるウイルス前駆体タンパク質のキャプチャリング機構
日本薬学会 第 136 年会 2016/3/26 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜)

伊賀 望、岸本 直樹、鬼塚 彩乃、桐原 知江、高宗 暢暁、庄司 省三、三隅 将吾 解糖系酵素 GAPDH、ENO1 が HIV-1 粒子内に取り込まれる意義の解明
第 15 回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2016 2016/9/10 大阪大学大学院薬学研究科 (大阪府・吹田)

山本 謙吾、岸本 直樹、伊賀 望、高宗 暢暁、三隅 将吾 HIV-1 標的細胞内における解糖系酵素 ENO1 の抗ウイルス作用
平成 29 年度 日本生化学会九州支部例会 2017/5/13 宮崎大学清武キャンパス (宮崎)

県・宮崎)

山本 謙吾、岸本 直樹、高宗 暢暁、三隅 将吾

Alpha-enolase は HIV-1 複製に対抗する二つの制御機能を兼ね備える

第 41 回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム 2017/8/31 休暇村南阿蘇 (熊本県・高森)

下賀 悠平、岸本 直樹、高宗 暢暁、三隅 将吾

HIV プロテオミクスによる HIV-1 カプシドタンパク質の解析

第 41 回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム 2017/8/31 休暇村南阿蘇 (熊本県・高森)

Naoki Kishimoto, Kengo Yamamoto, Nozomi Iga, Nobutoki Takamune, Shogo Misumi
Alpha-enolase showed negative effects on HIV-1 replication
The 65th ANNUAL MEETING OF THE JAPANESE SOCIETY FOR VIROLOGY 2017/10/24
Osaka International Convention Center
(大阪府・大阪)

Kumkum Rahman Mouree, Naoki Kishimoto, Nobutoki Takamune, Shogo Misumi
PKM2 expressed in HIV-1 producer cell affects the infectivity of progeny viruses by targeting reverse transcription step.
18th KUMAMOTO AIDS Seminar 2017/10/30
Kumamoto Kenmin Koryukan-Parea (熊本県・熊本)

岸本 直樹、伊賀 望、山本 謙吾、高宗 暢暁、三隅 将吾

GAPDH および ENO1 は moonlighting タンパク質として HIV 複製を制御する

2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 2017/12/6 神戸ポートピアホテル (兵庫県・神戸)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/emhs/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三隅 将吾 (MISUMI, Shogo)

熊本大学生命科学研究部・教授
研究者番号: 40264311

(2) 研究分担者

高宗 暢暁 (TAKAMUNE, Nobutoki)

熊本大学イノベーション推進機構・准教授
研究者番号: 60322749

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

該当無し