

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08044

研究課題名(和文) 次世代HIV治療法開発を指向したHIV病原性タンパク質の新規翻訳機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of novel expression mechanism of HIV pathogenic protein to develop the next generation HIV therapy

研究代表者

高宗 暢暁 (TAKAMUNE, Nobutoki)

熊本大学・熊本創生推進機構・准教授

研究者番号：60322749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、Nef mRNAの5'非翻訳領域(5'UTR)のNefの発現に重要な領域であるNERを介したNef発現の機構を解明することを目的としている。研究の結果、Nef mRNAの5'UTRの特定領域となるNER内の変異によりNefの発現が著しく低下し、Nefの機能低下を導くことが明らかになった。さらにNERの変異によるNef発現レベルの低下にはNef mRNAの効率的な核外輸送機構が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nef is one of the accessory proteins of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and known as one of the virulence factors. Interestingly, the multiple-spliced Nef mRNAs have relatively long 5' untranslated region (5' UTR), which are more than 700 nucleotides. We have previously reported that the 5' UTR of nef mRNA is suggested to contain a functional cis element for efficient Nef expression. We further investigated to characterize the cis element for efficient Nef expression in this study. As a result, it was suggested that the secondary structure of the cis element is associated with the efficient expression of Nef. It was also suggested that the cis element of 5' UTR functions for the efficient nuclear export of the nef mRNA. The efficient Nef expression was associated with the Nef function for enhancing the HIV-1 infectivity. These results strongly suggest that the cis element of 5' UTR of nef mRNAs is important for efficient Nef expression and HIV-1 replication.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV Nef

1. 研究開始当初の背景

これまでに優れた抗 HIV 薬の開発が行われてきたが、現行の抗 HIV 療法では HIV 感染症の治癒は不可能で投薬を続けなければ後天性免疫不全症候群 (エイズ) となる。HIV のコレセプター-CCR5 を欠損したヒトは HIV に抵抗性がある。この CCR5 欠損ドナーの骨髄を移植した HIV 感染患者 (白血病患者) は、抗 HIV 療法を中断してもその血中 HIV レベルが検出限界以下となった (*N Engl J Med.* 2009)。HIV 感染症の functional cure の唯一の例である。これは世界に大きなインパクトを与えた。そしてこれを契機に、HIV 研究は次世代へ向けより現実的な治癒を積極的に目指す時代となった。しかし世界の HIV 感染者 3500 万人に CCR5 欠損骨髄の移植治療は現実的ではなく、HIV の治癒が非常に困難な課題であることに変わりはない。

HIV はヒトの CD4 陽性 T 細胞等に感染し、自身のゲノムを宿主ゲノムに組込む。潜伏化した HIV 感染細胞 (HIV 感染メモリー T 細胞等、HIV リザーバーと呼ばれる) を排除するためには、現行の抗 HIV 療法を 70 年以上継続する必要があるとされ (*Nat Med.* 2003)、事実上不可能である。

元来、宿主生物は自然免疫・獲得免疫等の免疫機能によりウイルス感染を排除する機能を有している。一部のウイルスは進化の過程で宿主免疫を回避する能力を獲得し、病原性を現す結果となった。HIV の有する宿主免疫回避能力は、一つには HIV アクセサリータンパク質 Nef に由来する。Nef の有する最も主要な機能のひとつが HIV 感染細胞における MHC class I のダウンレギュレーションである (*Nat Med.* 1996)。この機能によって HIV 由来のペプチド抗原提示が阻害されるため、HIV 感染細胞は細胞障害性 T 細胞 (CTL) による攻撃を回避することができる。また HIV 感染細胞のナチュラルキラー (NK) 細胞からの攻撃回避に Nef は関与する (*Immunity* 1999)。さらに Nef は HIV 感染細胞におけるアポトーシスを抑制する (*Nature* 2001, *Nat Med* 2001)。これら Nef の機能は HIV 感染細胞の持続性に寄与する可能性があり、HIV の排除を困難にしている原因のひとつとなっていると考えられる (*Adv Virus Res.* 2011)。

このような背景から、研究代表者は HIV 治癒を目指す次世代の HIV 治療法の開発を目指すにあたり、Nef を何らかの方法で抑制するコンセプトを検討するに値するものと考えている。

2. 研究の目的

平均的な mRNA はその 5' 非翻訳領域 (5'UTR) は平均 200 ヌクレオチド (nt) 程度であり 3'UTR は 1000 nt を超える。それに対して、Nef mRNA は 5'UTR が 700 nt 以上で 3'UTR は 200 nt 程度である。一般的に 3'UTR は microRNA による翻訳制御の標的として

配列を含むとして近年注目されている。一方、5'UTR は翻訳開始・促進等に関わる構造・領域の存在が知られている (例えば 5'Cap 構造、ウイルスにおいては IRES (internal ribosome entry site) 等)。代表者らはこの非常に長い Nef mRNA の 5'UTR に着目し、未知の Nef 発現促進・増強配列の存在を仮定し (未知の宿主因子も関与すると想定し) その探索を行った。

3. 研究の方法

Nef mRNA 発現系、Nef コード領域に luciferase gene を導入した Nef レポーター評価系を構築した。5'UTR に各種変異を導入し、Nef タンパク質発現における役割に関する検討を、Western blot 法による比較検出、luciferase assay による半定量評価を行った。

In vitro transcription 法により Nef mRNA を調製し、細胞に導入し Nef 発現レベルを評価した。

nef gene を欠損させた HIV-1NL4-3 発現ベクターを構築し、Nef mRNA 発現ベクターを細胞に co-transfection することで HIV-1 を調製した。HIV-1 の感染性の評価は、HIV-1 の感染評価に利用される Tzmb1 細胞を利用した。

生化学的手法により細胞分画を行い、細胞質と核の各画分を調製し、RNA を精製し、逆転写反応により cDNA とし、realtime PCR により Nef mRNA を定量した。得られた結果から細胞質と核における Nef mRNA の比を算出した。

4. 研究成果

Nef mRNA には少なくとも 5 種類のスプライズバリエーションが存在することが知られ、そのうち Nef2 mRNA が最も存在比が高い。本研究では HIV-1 NL4-3 の Nef2 mRNA 発現するプラスミドを構築し、この発現系を利用して各種 5'UTR 内の変異体を作成し、Nef の発現に関する各種検討を行った。Nef の mRNA の 5'UTR 領域をコードする HIV-1NL4-3 ゲノムの中に、制限酵素認識部位が存在することから、これらの部位を利用し、Nef mRNA 5'UTR 内の特定領域を部分欠損する変異 Nef mRNA 発現系を構築した。Nef のタンパク質発現レベルを western blot 法にて比較検討した。その結果、著しく Nef タンパク質発現レベルが低下する変異体と、Nef タンパク質発現レベルに影響しない変異体が認められた。これらの Nef mRNA の発現レベルやその安定性には差異は認められなかった。より定量的に Nef タンパク質発現レベルを評価するために、Nef コード領域に firefly luciferase gene を導入し、Nef-luc 発現系を構築した。5'UTR 変異の Nef-luc 発現に与える影響を luciferase 活性によって評価した。その結果、Nef タンパク質を western blot 法にて評価した場合と同様に、5'UTR の変異体は、5'UTR 野生型と比較して有意に低

いレベルの luciferase 活性を示した。これらの結果から、Nef mRNA の転写後において 5'UTR の特定の領域を介して Nef タンパク質の効率的な発現に関わるメカニズムの存在が示唆された。ここで本研究では Nef mRNA の 5'UTR の Nef 発現に重要な領域を Nef expression essential region (NER) と名付けた。上述した欠損変異だけでなく、NER 領域の配列を逆転させた変異体においても有意な Nef 発現レベルの低下が観察された。この NER 領域の RNA 2 次構造を RNAfold により予測した結果、複数の stem loop 構造を呈することが予測されたこと、NER の配列を逆転させた変異体においても有意な Nef タンパク質の発現レベルの低下を認めたことから、NER の RNA の 2 次構造も効率的な Nef 発現に関与している可能性が考えられた。

NER の変異による Nef タンパク質の発現レベルの低下が、Nef の有意な機能低下を導くかどうかを検討するために、HIV-1NL4-3 の発現ベクターの nef 欠損変異を導入したベクターを構築し、Nef mRNA 発現ベクターの 5'UTR 野生型もしくは NER 変異型と、構築した nef 欠損 HIV-1 発現ベクターを co-transfection することで、HIV-1 を作成し、その感染性を評価した。Nef は HIV-1 の感染性を増強させる作用を有する。その結果、NER 変異 Nef mRNA 発現系において産生された HIV-1 の感染性は、その野生型の発現系から産生された HIV-1 と比較して有意に低い結果となった。この時、DNA を導入した細胞における Nef タンパク質発現レベルは、NER 変異型は NER 野生型の場合と比較して有意に低レベルであることを確認した。以上の結果から、NER 変異により有意な Nef 低発現性を示し、それは Nef の有意な機能低下をもたらすことが確認された。

転写後の Nef mRNA レベル及び Nef mRNA の安定性に関して NER 野生型と NER 変異型の間で差異は認められなかったことから、転写後から翻訳に至る過程において NER が重要な役割を担っている可能性が考えられた。そこで野生型及び NER 変異型 Nef mRNA を in vitro transcription 法にて調製し、HEK293 細胞に RNA を導入し、Nef 発現レベルを luciferase 活性で評価した。その結果、NER 変異型の Nef 発現レベルは野生型と比較しても有意な低下が観察されなかった。RNA が細胞に導入され細胞質で翻訳されると考えると、少なくとも翻訳段階に野生型と NER 変異型に差異はないと考えられた。

Nef mRNA 発現ベクターである DNA を導入する場合と、Nef mRNA を導入する場合で結果が異なったことから、Nef mRNA の核から細胞質への移行の効率が、野生型と NER 変異体で異なっている可能性を考えた。そこ

で、野生型もしくは NER 変異型 Nef mRNA 発現ベクターを細胞に導入し、培養後、細胞質画分と核画分を生化学的手法で分画した。その後、各画分から RNA を精製し、逆転写酵素により RNA を cDNA へコンバートし、Nef mRNA レベルを定量比較するために realtime PCR に供した。細胞質と核における Nef mRNA の存在比を評価したところ、野生型と比較して NER 変異型の細胞質/核比は野生型のそれと比較して有意に低い結果となった。

以上の結果をまとめると、Nef mRNA の 5'UTR の NER は Nef の発現とその機能に重要な役割を担い、そのメカニズムの一つとして、Nef mRNA の効率的な核外輸送に寄与している可能性が考えられた。

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7件)

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

Mouree KR, Kishimoto N, Iga N, Kirihara C, Yamamoto K, Takamune N, Misumi S. 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.* 41, 612-618 (2018) 査読有り

Aoki M, Hayashi H, Rao KV, Das D, Higashi-Kuwata N, Bulut H, Aoki-Ogata H, Takamatsu Y, Yedidi RS, Davis DA, Hattori S, Nishida N, Hasegawa K, Takamune N, Nyalapatla PR, Osswald HL, Jono H, Saito H, Yarchoan R, Misumi S, Ghosh AK, Mitsuya H. A novel central nervous system-penetrating protease inhibitor overcomes human immunodeficiency virus 1 resistance with unprecedented aM to pM potency. *eLife.* e28020 (2017) 査読有り

Kishimoto N, Iga N, Yamamoto K, Takamune N, Misumi S. Virion-incorporated alpha-enolase suppresses the early stage of HIV-1 reverse transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 484, 278-284.

(2017) 査読有り

Kishimoto N, Onitsuka-Kishimoto A, Iga N, Takamune N, Shoji S, Misumi S. 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. Rep.* 8, 325-332. (2016) 査読有り

Ogawa M, Takemoto Y, Sumi S, Inoue D, Kishimoto N, Takamune N, Shoji S, Suzu S, Misumi S. ATP generation in a host cell in early-phase infection is increased by upregulation of cytochrome c oxidase activity via the p2 peptide from human immunodeficiency virus type 1 Gag. *Retrovirology* 12, 97. (2015) 査読有り

Ohta H, Takamune N, Kishimoto N, Shoji S, Misumi S. N-Myristoyltransferase 1 enhances human immunodeficiency virus replication through regulation of viral RNA expression level. *Biochem Biophys Res Commun.* 463, 988-993. (2015) 査読有り

[学会発表](計6件)

渡邊俊輝、高宗暢暁、岸本直樹、三隅将吾、HIV-1 Nef mRNA 5'非翻訳領域を介する効率的な発現機構の解明と制御法の探索、生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会)2017年12月5-9日、兵庫(神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸商工会議所)

渡邊俊輝、長峰啓志郎、岸本直樹、三隅将吾、高宗暢暁、HIV-1の感染性に寄与するNef mRNA 5'非翻訳領域に存在する翻訳機構に関わるcis領域、第89回日本生化学会2016年9月25-27日 宮城(仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス)

渡邊俊輝、長峰啓志郎、岸本直樹、三隅将吾、高宗暢暁、HIV-1の感染性に関わるNef mRNA 5'非翻訳領域に存在する転写後発現機構、第40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2016年8月26-28日 鹿児島(指宿 ベイテラス)

渡邊俊輝、長峰啓志郎、岸本直樹、三隅将吾、高宗暢暁、HIV-1病原性因子Nefの翻訳に重要な領域と感染性への影響、平成28年度日本生化学会九州支部例会、2015年5月14-15日 鹿児島(鹿児島大学)

高宗暢暁、太田光、岸本直樹、庄司省三、

三隅将吾、NMT1はHIV RNA発現レベルの調節を介してHIV複製を増強する、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会/合同大会2015年12月1-4日 神戸(神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸商工会議所)

長峰啓志郎、渡邊俊輝、岸本直樹、高宗暢暁、三隅将吾、HIVアクセサリータンパク質Nefの翻訳に関わるcis領域、平成27年度日本生化学会九州支部例会2015年5月16-17日 福岡(九州大学)

[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

高宗暢暁 (TAKAMUNE, Nobutoki)

熊本大学・熊本創生推進機構・准教授

研究者番号: 60322749