

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08807

研究課題名(和文) HIV-1 Vifの細胞内調節機構および機能発現機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the regulatory mechanisms of intracellular level and function of HIV-1 Vif

研究代表者

新堂 啓祐 (Shindo, Keisuke)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：10602344

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-1 Vifに関する研究で2つの成果をあげることができた。

第1にCBF-betaによるVifの細胞内レベル維持機構はMDM2によるVifの分解を抑制することであることの解明である。これはVifとCBF-betaの結合を阻害する低分子化合物を抗HIV-1感染症治療薬として開発する実現性を期待させるものである。

第2にHIV-1 Vifの誘導する細胞周期停止は、VifがPP2A-B56ファミリー蛋白をユビキチン化し分解を促進することで誘導されていることの解明である。これはウイルスの病原性発現機構および感染性増強機構の解明のみならず、一般的な細胞周期制御機構の解明に寄与するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果の学術的意義としては、HIV-1感染症の新規治療薬の開発を支持するものと、病原性発揮や感染性増強のメカニズムを明らかにするものがあげられる。既存のすべてのHIV-1感染症治療薬に対して、それに耐性を示すウイルス変異が同定されている。VifはHIV-1の感染に必須のウイルス蛋白でありながら、その機能発現には決まった宿主蛋白との相互作用が必須であり、そこを標的とする抗ウイルス薬に対して生じた耐性変異はVif機能を失うことが予想され、薬剤耐性ウイルスを生じないと考えられる。

研究成果の概要(英文)： I have made two major achievements in the research on HIV-1 Vif.

First, I have elucidated that CBF-beta maintains intracellular levels of Vif protein mainly by suppressing MDM2-mediated degradation of Vif, suggesting higher probability of success for developing a new anti-HIV-1 drug that prevents interaction between Vif and CBF-beta.

Second, I have proposed and proved that HIV-1 Vif triggers G2 cell cycle arrest by ubiquitinating and promoting degradation of PP2A-B56 family proteins. These contribute to elucidate not only mechanisms of pathogenesis and replication augmentation of HIV-1, but also general regulation mechanisms of cell cycle.

研究分野：血液・ウイルス

キーワード：HIV-1 Vif CBF-beta PP2A MDM2 anti-HIV drug cell cycle arrest

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 Vif は T 細胞やマクロファージなど、ウイルスの自然な標的細胞への感染に必須の因子である。その機能の中心として、Vif は宿主の CUL5、ELOB、ELOC、RBX2 からなるユビキチンリガーゼと複合体を形成し、APOBEC3G や APOBEC3F など、宿主の強力なウイルス抑制因子をポリユビキチン化し、プロテアソームでの分解を促進することで、ウイルスの複製を可能にしていることが明らかにされてきた。

Vif は APOBEC3 をユビキチン化する一方、自身もユビキチン化を受けている。HECTE3 リガーゼである NEDD4 および AIP によるモノユビキチン化 (Dussart *et al.*, *BBRC* 2004) や、CUL5 による自己ユビキチン化 (Mehle *et al.*, *Genes Dev* 2004, Jager *et al.*, *Nature* 2011) などの報告がある。さらに、Vif の細胞内レベルは低く調節されており (Fujita *et al.*, *Microbes Infect* 2004)、その責任因子としてユビキチンリガーゼである MDM2 が同定されている (Izumi *et al.*, *Retrovirology* 2009)。このように、Vif は細胞内で様々な制御を受けながら、細胞内レベルを低く保たれていると考えられる。

HIV-1 は感染細胞を細胞周期停止に誘導するが、その責任因子として Vpr が知られていた。一方、Vif は Vpr とは独立に細胞周期停止を誘導することが報告された (Sakai *et al.*, *PNAS* 2006)。Vif による細胞周期停止誘導については、ユビキチンリガーゼ複合体の形成が必須であること (DeHart *et al.*, *JVI* 2008)、TP53 依存性であること、およびウイルス感染を増大させること (Izumi *et al.*, *PNAS* 2010) などが報告されていたが、Vif が細胞周期停止を誘導する経路において、Vif の直接の標的は明らかにされていなかった。

近年、Vif 複合体の機能発現に必須の補助因子として、転写補助因子である CBF β が同定された (Jager *et al.*, *Nature* 2011)。CBF β の機能として、1) Vif 蛋白の細胞内レベル上昇、および 2) ユビキチンリガーゼ複合体の立体構造維持の 2 つが考えられているが、さらに CBF β による Vif レベル上昇の機序として、プロテアソームでの分解を抑制する (Jager *et al.*, *Nature* 2011) あるいは、Vif の翻訳を補助する (Miyagi *et al.*, *JVI* 2014)、との報告があり、明快ではなかった。

2. 研究の目的

本研究は、HIV-1 Vif の多様な機能発現に関して、Vif 蛋白の細胞内制御機構も含めてその全貌を詳細に解明することで、将来的な Vif 阻害剤の開発に必要な情報基盤を構築することを目標としたが、以下の 3 つの具体的な目的を掲げ、並行して研究を行った。

- 1) HIV-1 Vif の細胞内レベル調節機構の解明
- 2) HIV-1 Vif による細胞周期停止機構の解明
- 3) HIV-1 Vif による RUNX ファミリー転写因子抑制効果の検討

3. 研究の方法

1) に関しては、MDM2 ノックアウト細胞を用いて、CBF-beta と結合しない Vif 変異体の蛋白量をイムノブロット法により解析した。また、MDM2 と結合しない Vif 変異を同定し、その変異を追加した Vif 変異体の蛋白量についても同様に解析した。

2) に関しては Vif の基質の網羅的検索により報告された PP2A-B56 分子についてノックダウン、Vif との共発現を行い、細胞周期解析を行った。さらに、Vif による細胞周期停止の決定基を同定し、データベース検索により細胞周期停止を誘導する Vif 株の頻度の推定を行った。

3) に関しては RUNX1 により転写制御される遺伝子のプロモーター部位をルシフェラーゼをレポーターとしたプロモーターアッセイ用のベクター (pGL3-Basic) にクローニングし、それらを細胞に導入し、Vif の過剰発現により活性が変化するかどうかを検討した。

4. 研究成果

1) HIV-1 Vif の細胞内レベル調節機構の解明

・CBF-beta と結合しない Vif 変異体の細胞内蛋白量は、通常の細胞では Vif 野生体より著しく低いレベルとなるが、MDM2 ノックアウト細胞では野生体と同等であった。

・また、MDM2 と結合しない Vif 変異 R93E を同定し CBF-beta と結合しない Vif 変異体に導入したところ、野生体と同等まで蛋白レベルが回復した。

・Vif R93 の位置を Vif 複合体結晶構造上で確認したところ、R93 は蛋白表面にあり、他の分子に覆われてはいないが CBF-beta のごく近傍にあるため、MDM2 がこの分子と結合するのを CBF-beta が干渉していることを推定した。

以上を持って、CBF-beta による Vif の細胞内レベルの維持機構は、CBF-beta が MDM2 による Vif のユビキチン化を抑制することであることの証明とし、論文として発表した。この成果の意義としては、Vif と CBF-beta の結合を阻害する低分子化合物を抗 HIV-1 薬と開発する際に、短期的な結合阻害でも MDM2 が Vif をユビキチン

化しやすくなりプロテアソームを介して分解を促進するため、抗ウイルス作用を発揮しうることを期待させ、そのような抗ウイルス薬の実現可能性をより高く感じさせることである。

2) HIV-1 Vif による細胞周期停止機構の解明

・293T に NL4-3Vif を発現させた際、内在性に発現の見られた PPP2R5A および PPP2R5D の蛋白量の減少が見られた。一方、細胞周期停止を誘導しない HXB2 Vif では PPP2R5A の減少は同様に見られたが、PPP2R5D の減少は見られなかった。

・Vif を細胞に発現させると G2 期の細胞が増加するが、PPP2R5A-E のそれぞれを共発現させた際には G2 期の細胞の増加がほぼ抑えられることが確認できた。

・293T で PPP2R5D をノックダウンすると G2 期の細胞が著しく増加した。

・細胞周期停止を誘導する Vif のアミノ酸配列として、I31/R33 および I31/K33 を同定した。データベースでは 4465 株のうち 1919 株の Vif がこのどちらかの配列を有していた。その割合はおよそ 43%であった。

・T 細胞株である CEM-SS 細胞では内在性の PPP2R5D および PPP2R5E の発現がイムノブロット法で確認でき、そのどちらも NL4-3 Vif の導入により蛋白量が著しく減少した。

以上より、PPP2R5A-E の Vif による分解が Vif による細胞周期停止に必要であり、また、293T においては PPP2R5D の分解は細胞周期停止の誘導に十分であること、T 細胞株では PPP2R5D と PPP2R5E の両方が関与していることが推測されること、Vif の多くの株で細胞周期停止誘導機能が保存されていることなどがわかり、論文として報告した。既報では PPP2R5D は Cdc25 を抑制することで細胞周期の進行を抑えていることが報告されているが、これに基づけば PPP2R5D の分解は細胞周期の進行に向かうはずであるが、Vif による分解では細胞周期停止に向かっており、説明がつかない。PPP2R5D には細胞周期制御に関して未知の機能があることが示唆される結果となり、この分野のさらなる研究が期待される。

3) HIV-1 Vif による RUNX ファミリー転写因子抑制効果の検討

我々の検討では HIV-1 Vif による RUNX1 転写活性の抑制は見られなかった。用いた実験系の問題かもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yusuke Matsui, Keisuke Shindo, Kayoko Nagata, Noriyoshi Yoshinaga, Kotaro Shirakawa, Masayuki Kobayashi and Akifumi Takaori-Kondo	4. 巻 291
2. 論文標題 Core binding factor beta protects HIV-1, type 1 accessory protein viral infectivity factor from MDM2-mediated degradation	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 24892-24899
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.M116.734673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kayoko Nagata, Keisuke Shindo, Akifumi Takaori-Kondo
2. 発表標題 Examining HIV-1 Vif determinants for inducing the cell cycle arrest
3. 学会等名 Annual Meeting of the Japanese Society for Virology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kayoko Nagata, Keisuke Shindo, Akifumi Takaori-Kondo
2. 発表標題 The roles of PP2A degradation in HIV-1 Vif-mediated cell cycle arrest
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kayoko Nagata, Keisuke Shindo, Akifumi Takaori-Kondo
2. 発表標題 PP2A-B56delta degradation is crucial for HIV-1 Vif-mediated cell cycle arrest
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kayoko Nagata, Keisuke Shindo, Yusuke Matsui and Akifumi Takaori-Kondo
2. 発表標題 Examining three models for Vif-mediated cell cycle arrest
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----