

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08809

研究課題名(和文) HIV-1感染症におけるA3Gのアセチル化とVif/HDAC3複合体の役割

研究課題名(英文) Role of A3G acetylation and Vif/HDAC3 complex in HIV-1 infection

研究代表者

白川 康太郎 (Shirakawa, Kotaro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80728270

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)：1) HIV-1 Vifがヒストン脱アセチル化酵素HDAC3と結合し、Vifを安定化することを確認した。APOBEC3Gがアセチル化されることを発見し、HDAC3により脱アセチル化されるリシン残基を質量分析で5箇所同定した。一部のアルギニン変異体はVif感受性に変化が見られた。
2) Duo Fluor HIVを用いて潜伏感染細胞を分離し、非感染細胞と比較して潜伏感染細胞特異的に発現が上昇した2遺伝子、低下した33遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスが細胞のメカニズムをハイジャックして利用するその一端を発見した。HIV-1感染症を克服するためには、潜伏感染するために必要なメカニズムを明らかにする必要があり、本研究で潜伏感染細胞を分離しその遺伝子発現変化を解析できたことは新たなステップになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：1) We identified that five lysine residues of APOBEC3G are acetylated and deacetylated by HDAC3. Its non-acetylated Arginine mutant is less sensitive to Vif mediated degradation.

2) Latently HIV-1 infected T-cells are sorted and its gene expression profile is compared to virus producing cells and non-infected cells. We identified 33 genes specifically down-regulated in latently infected cells and two genes specifically up-regulated genes compared to non-infected cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 Vif ヒストン脱アセチル化酵素 DNAシトシン脱アミノ化酵素APOBEC3G 潜伏感染

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2002年に発見されたAPOBEC3G (A3G)はDNAシトシン脱アミノ化酵素であり、HIV-1の逆転写の際にHIV-1マイナス鎖DNAゲノム中のシトシンを脱アミノ化することで変異を導入し抗HIV-1活性を有する。一方、HIV-1 VifはCullin5やElongin B/Cなどの宿主因子とE3リガーゼ複合体を形成し、A3Gをユビキチンプロテアソーム経路で分解することでウイルス粒子中へのA3Gの取り込みを抑制する。2012年にHIV-1 Vifはヒストン脱アセチル化酵素HDAC3と結合することが明らかとなった (Jäger et al., Nature, 2012)。アセチル化修飾はユビキチン化修飾とともにリシン残基を標的とし競合することから (Liu et al., Nature, 2008など)、HIV-1 VifがHDAC3を動員することは効率的なA3Gのユビキチン化のためではないかと考えられた。予備実験ではヒストンアセチル化酵素によりA3Gがアセチル化就職を受けていることがわかっている。またHIV-1潜伏感染細胞ではヒトで18種類あるHDACのうち、HDAC3がHIV-1転写の抑制に重要であるとする報告があり (Barton et al., PLoS One, 2014, Keedy et al., J Virol, 2009)、HIV-1 VifがHDAC3を動員し、能動的にHIV-1転写を抑制することで潜伏感染に関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究ではHIV-1と宿主T細胞の新たな攻防をA3GとVif/HDAC3複合体の側面から検討し、さらにこの複合体による転写制御およびHIV-1潜伏感染の側面からHIV-1感染症におけるVifの新たな役割を検討することでHIV-1感染症の新規治療法開発の基盤とすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) A3Gのアセチル化を質量分析で解析し就職を受けているリシン残基を同定する。そのアルギニン及びアラニン変異体を作製しVifによる分解への影響、蛋白安定性、核酸結合能を検討する。

2) デュアル蛍光レポーターHIV (Duo Fluo HIV) を Jurkat T 細胞および活性化 T 細胞に感染させ GFP/mKO2 陽性ウイルス産生性感染細胞、mKO2 単独陽性潜伏感染細胞、非感染細胞をセルソーターで分離する。各分画での遺伝子発現の変化を CAGE 法により解析し、Vif 欠損 Duo Fluo HIV と比較する。

4. 研究成果

1) APOBEC3Gのアセチル化をp300過剰発現およびHDAC阻害剤投与時に抗アセチルリシン抗体を用いてウエスタンブロット法で確認した。p300過剰発現の有無でサンプルを作成し免疫沈降したAPOBEC3Gを質量分析により解析し、既報のVif感受性に関わるリシン残基を含む5カ所のアセチル化リシン部位を同定した。このアセチル化はp300の過剰発現で増強し、HDAC3の過剰発現で減弱した。該当リシンのアルギニン変異体を作成し機能解析を行い、C末端のアルギニン変異体で蛋白安定性、Vif抵抗性に影響が見られた。

2) Duo Fluo HIVを用いてJurkat T細胞および初代培養活性化T細胞を用いてGFPおよびmKO2陽性のウイルス産生性感染細胞とmKO2単独陽性の潜伏感染細胞を単離した。Alu-PCR法により潜伏感染細胞とウイルス産生性感染細胞で同程度のウイルスゲノム挿入を確認した。次にqPCR法でウイルスRNAを検討し、ウイルス産生細胞でのみウイルスRNAの検出を確認した。単離した潜伏感染細胞はPMA、TNF α 、SAHA添加によりGFPおよびウイルス蛋白を産生した。ウイルス産生性感染細胞、潜伏感染細胞および非感染細胞の各分画での遺伝子発現をCAGE法により解析した。各分画7500万CAGEタグの遺伝子発現変動解析を行い非感染細胞や潜伏感染細胞と比較してウイルス産生性感染細胞では2000程度の遺伝子に発現の変化が見られた。潜伏感染細胞と非感

染細胞での発現変動解析では遺伝子発現が非常に似ていたが、その中で、潜伏感染細胞で特異的に発現が増加する2遺伝子、発現が低下する33遺伝子を同定した。現在これらの遺伝子発現を変化させた場合の潜伏感染の成立および維持への影響を検討しており、さらにVif欠損型Duo Fluo HIVを作製しその遺伝子発現の変化を検討中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Shirakawa K, Wang L, Man N, Maksimoska J, Sorum AW, Lim HW, Lee IS, Shimazu T, Newman JC, Schröder S, Ott M, Marmorstein R, Meier J, Nimer S, Verdin E. Salicylate, diflunisal and their metabolites inhibit CBP/p300 and exhibit anticancer activity. *Elife*. 2016 May 31;5. pii: e11156.
2. Maruyama W, Shirakawa K, Matsui H, Matsumoto T, Yamazaki H, Sarca AD, Kazuma Y, Kobayashi M, Shindo K, Takaori-Kondo A. Classical NF- κ B pathway is responsible for APOBEC3B expression in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Sep 23;478(3):1466-71. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.148.
3. Kishimoto W, Nishikori M, Arima H, Miyoshi H, Sasaki Y, Kitawaki T, Shirakawa K, Kato T, Imaizumi Y, Ishikawa T, Ohno H, Haga H, Ohshima K, Takaori-Kondo A. Expression of Tim-1 in primary CNS lymphoma. *Cancer Med*. 2016 Oct 5. doi: 10.1002/cam4.930.
4. Matsui Y, Shindo K, Nagata K, Yoshinaga N, Shirakawa K, Kobayashi M, Takaori-Kondo A. Core Binding Factor β Protects HIV, Type 1 Accessory Protein Viral Infectivity Factor from MDM2-mediated Degradation. *J Biol Chem*. 2016 Nov 25;291(48):24892-24899.
5. Takiuchi Y, Kobayashi M, Tada K, Iwai F, Sakurada M, Hirabayashi S, Nagata K, Shirakawa K, Shindo K, Yasunaga JI, Murakawa Y, Rajapakse V, Pommier Y, Matsuoka M, Takaori-Kondo A. HTLV-1 bZIP factor suppresses TDP1 expression through inhibition of NRF-1 in adult T-cell leukemia. *Sci Rep*. 2017 Oct 9;7(1):12849. doi: 10.1038/s41598-017-12924-0.
6. Kawata T, Tada K, Kobayashi M, Sakamoto T, Takiuchi Y, Iwai F, Sakurada M, Hishizawa M, Shirakawa K, Shindo K, Sato H, Takaori-Kondo A. Dual inhibition of the mTORC1 and mTORC2 signaling pathways is a promising therapeutic target for adult T-cell leukemia. *Cancer Sci*. 2018 Jan;109(1):103-111. doi: 10.1111/cas.13431.
7. Eso Y, Uza N, Shirakawa K, Sawada K, Katsuragi K, Matsuura M, Seno H. Choledochoduodenal Fistula during Chemotherapy with Brentuximab Vedotin for Methotrexate-associated Lymphoproliferative Disorder. *Intern Med*. 2018 Mar 9. doi: 10.2169/internalmedicine.0557-17.
8. Yoshinaga N, Shindo K, Matsui Y, Takiuchi Y, Fukuda H, Nagata K, Shirakawa K, Kobayashi M, Takeda S, Takaori-Kondo A. A screening for DNA damage response molecules that affect HIV-1 infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 May 21;513(1):93-98. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.168.
9. Yamazaki H, Shirakawa K, Matsumoto T, Kobayashi M, Sarca AD, Maruyama W,

Kazuma Y, Matsui H, Fukuda H, Shirakawa R, Shindo K, Ri M, Iida S, and Takaori-Kondo A Endogenous APOBEC3B Overexpression Constitutively Generates DNA Substitutions and Deletions in Myeloma Cells. *Sci Rep.* 2019 DOI: 10.1038/s41598-019-43575-y

10. Fukuda H, Li S, Sardo L, Smith JL, Yamashita K, Sarca AD, Shirakawa K, Standley DM, Takaori-Kondo A, Izumi T. Structural Determinants of the APOBEC3G N-Terminal Domain for HIV-1 RNA Association. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019 May 21;9:129. doi: 10.3389/fcimb.2019.00129. eCollection 2019.
11. Matsumoto T, Shirakawa K, Yokoyama M, Fukuda H, Sarca AD, Koyabu S, Yamazaki H, Kazuma Y, Matsui H, Maruyama W, Nagata K, Tanabe F, Kobayashi M, Shindo K, Morishita R, Sato H, Takaori-Kondo A. Protein kinase A inhibits tumor mutator APOBEC3B through phosphorylation. *Sci Rep.* 2019 Jun 5;9(1):8307. doi: 10.1038/s41598-019-44407-9.

〔学会発表〕(計 24 件)

〔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: <http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~hemonc/>

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。