

平成 30 年 4 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18922

研究課題名(和文) HIV粒子内への逆転写プライマー取込み阻害因子を基盤とする多剤耐性克服戦略

研究課題名(英文) Strategies overcome Multi-drug resistance in HIV: GAPDH as a restriction factor to suppress the packaging of the primer tRNA for reverse transcription

研究代表者

岸本 直樹 (KISHIMOTO, Naoki)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・助教

研究者番号：80756148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：宿主性タンパク質であるGAPDHは、HIV逆転写反応のプライマーとなるtRNALys3の取込みを阻害する因子である。本研究では、GAPDHによるtRNALys3の取込み阻害機構の詳細な解析を行った。その結果、GAPDHはHIV前駆体タンパク質のマトリックス領域およびカプシド領域と相互作用することを見いだした。興味深いことに、GAPDHを多量体化させる薬剤は、HIV粒子内へのtRNALys3の取込みを減少させた。これらの結果は、GAPDHによるtRNALys3取込み阻害機構を利用することで、逆転写反応の開始そのものを阻害する新しいコンセプトの抗HIV戦略が有用であることを示す。

研究成果の概要(英文)：GAPDH, a host protein, suppresses the packaging of tRNALys3, which is required for effective viral reverse transcription as a primer. Here, I investigated the mechanism of tRNALys3-packaging suppression by GAPDH. As results, GAPDH interacts with both matrix region and capsid region of viral precursor protein. Interestingly, GAPDH oligomerization prevents tRNALys3 packaging into virions. These findings indicate that utilization of the role of GAPDH in tRNALys3 packaging is effective for preventing initiation of HIV reverse transcription.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV 宿主因子 逆転写反応 tRNA

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染症 / AIDS の治療において、薬剤耐性ウイルスの出現は、抗 HIV 薬開発史上依然として解決されていない問題であり、HIV 感染者は常にその脅威に怯え続けなければならない。これまでに 30 種類を超える抗 HIV 薬が FDA の認可を受け臨床に供されているが、この数の多さは HIV 感染様態の最大の特性である易変異性を克服できていないことを意味する。その原因は、遺伝子修復能を備えない HIV に対し、HIV の持つ逆転写酵素などを初めとしたウイルス性因子を標的としていることにある。これは現在の治療戦略における大きな弱点である。したがって、既存のウイルス性因子を標的とした抗 HIV 薬開発からあえて逸脱し、HIV 複製を制御する宿主性因子の機能を利用するといった概念を抗 HIV 薬開発の際に導入して行くことでもしない限り、HIV の易変異性の問題を克服した次世代の抗 HIV 薬を創出することは難しいと思われる。

申請者は、宿主の有するグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) は HIV 前駆体タンパク質と相互作用することで、HIV 粒子内において開始される逆転写反応のプライマーとなる tRNA^{Lys3} の HIV 粒子内への取込みを競合的に阻害することを報告している。そこで、GAPDH による tRNA^{Lys3} 取込み阻害機構を利用することで、薬剤耐性を克服した新規 HIV 治療戦略を構築できるのではないかと考え本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、GAPDH の持つ抗 HIV 能を基に、「HIV 粒子内への tRNA^{Lys3} 取込み阻害」という逆転写反応の開始そのものを阻害する新しいコンセプトの抗 HIV 戦略開発を目指し、以下の 2 つを具体的な目的とした。

(1) GAPDH と HIV 前駆体タンパク質の相互作用様式の決定 (GAPDH と HIV 前駆体タンパク質の相互作用に寄与する領域をアミノ酸残基レベルで明らかにする。そして、GAPDH と HIV 前駆体タンパク質相互作用様式のタンパク質構造モデルを作製し、HIV 前駆体タンパク質と tRNA^{Lys3} / LysRS 複合体相互作用の阻害様式を構造学的観点から明らかにする。)

(2) GAPDH による tRNA^{Lys3} 取込み阻害機構を利用する化合物の同定

3. 研究の方法

Yeast two-hybrid (Y2H) 法および *in silico* 解析 (ドッキングシミュレーション) を行い、GAPDH と HIV 前駆体タンパク質の相互作用面を探索した。得られた結果をもとに、HEK293 細胞、HIV 持続感染細胞株である CEM/LAV-1 細胞、HIV 感染インジケータ細胞である TZM-bl 細胞を用いて種々の検討を行った。タンパク質の強制発現は、リポフェクション法を用いた。HIV 産生量は、ELISA 法によって検討した HIV 粒子内に取込まれた tRNA^{Lys3} は

RT-PCR 法により検出した。HIV 逆転写産物は qPCR 法によって定量した。

4. 研究成果

本研究ではまず、各種発現ベクターを作製し yeast two-hybrid (Y2H) 法による検討を試みた。その結果、GAPDH の C 末端領域と HIV 前駆体タンパク質のマトリックス領域やカプシド領域をコトランスフォーメーションした Y2HGold が相互作用を示すブルーコロニーを形成した。したがって、GAPDH の C 末端領域とウイルス前駆体タンパク質のマトリックス領域およびカプシド領域が、相互作用に必要であると示唆された。そこでさらに、詳細な相互作用領域を同定するために、Molecular Operating Environment (MOE) によるドッキングシミュレーションを試みた。HIV 前駆体タンパク質の構造は未だ解かれていないため、GAPDH (PDB ID: 1ZNG) 74) とマトリックス (PDB ID: 2H3I) 75) またはカプシド (PDB ID: 1E6J) 76) の単独の構造情報に基づき解析を行った。その結果、GAPDH とマトリックスのドッキングシミュレーションでは 9 個の候補を、GAPDH とカプシドのドッキングシミュレーションでは 3 個の候補をそれぞれ得た。HIV 前駆体タンパク質ではマトリックスの C 末端残基とカプシドの N 末端残基が結合状態にあるという条件を考慮し、結合状態の組み合わせを検討したところ、この条件を満たしうる候補としてひとつの候補を得た。そのため、この候補に着目し解析を行ったところ、興味深いことに、GAPDH のヘリックス 10 (255-267) がマトリックスやカプシドの両方の相互作用面に露出していた。GAPDH は細胞内においてホモ 4 量体を形成しており、GAPDH のヘリックス 10 は 4 量体表面に計 4 箇所露出している。そのため、GAPDH ヘリックス 10 は HIV 前駆体タンパク質との相互作用においてマトリックス領域とカプシド領域の 2 箇所と相互作用していることが示唆された。

次に、ドッキングシミュレーションの結果に基づき作製した変異体を用いて Y2H 法を行った。その結果、GAPDH の Asp²⁵⁶、Lys²⁶³、Glu²⁶⁷ は GAPDH とマトリックス領域との相互作用に、GAPDH の Asp²⁵⁶、Lys²⁶⁰ は GAPDH とカプシド領域との相互作用に必要であることが明らかとなった。

ドッキングシミュレーションおよび
変異体解析によって明らかにした相互作用

GAPDH	Asp ²⁵⁶	Lys ²⁶⁰	Lys ²⁶³	Glu ²⁶⁷
MA	Arg ⁵⁸	-	Gln ⁵⁹	Gln ⁶³
CA	Arg ⁸²	Glu ⁷⁶	-	-

次に、GAPDH の D256R/K260E/K263E/ E267R 変異体を作製し、HIV-1 産生細胞に種々の検討を行った。共免疫沈降法により、D256R/K260E/K263E/E267R 変異体は内在性 GAPDH とヘテロ四量体を形成すること、このヘテロ四量体は HIV 前駆体タンパク質との相互作用が

減弱することが確認できた。また、GAPDH の D256R/K260E/K263E/E267R 変異体を HIV 産生細胞に発現させることにより得たウイルスを解析したところ、変異体発現によって HIV 粒子内に取込まれる tRNA^{Lys3} の量が減少し、HIV 標的細胞内での逆転写反応が阻害されることが確認できた。これらの結果は、GAPDH の D256R/K260E/K263E/E267R 変異体は HIV 複製においてドミナントネガティブ体として働き、GAPDH の Asp²⁵⁶、Lys²⁶⁰、Lys²⁶³、Glu²⁶⁷ が tRNA^{Lys3} の取込みに重要であることを示している。

次に GAPDH による tRNA^{Lys3} 取込み阻害機構を利用する戦略について検討した。そのために、GAPDH を多量体化させることが知られているイソフルランを用いた検討を行った。その結果、細胞毒性が無い濃度のイソフルランを処理した後に得られるウイルスでは、僅かながら tRNA^{Lys3} の取込量が減少していた。今後はより効果的に GAPDH による tRNA^{Lys3} 取込み阻害機構を利用する化合物を探索する必要がある。

本研究では、GAPDH と同じく解糖系酵素である -Enolase (ENO1) や pyruvate kinase muscle type 2 (PKM2) に着目した検討も行い、ENO1 は逆転写過程を阻害すること、PKM2 は GAPDH と同様に tRNA^{Lys3} の HIV 粒子内への取込みを阻害することを明らかとした。今後、本研究で得られた知見を包括的に捉えることで HIV 粒子内への tRNA^{Lys3} 取込み阻害」という抗 HIV 戦略開発につなげたいと考えている。

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 3 件)

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.* (2017) 484(2): 278-284. doi:

10.1016/j.bbrc.2017.01.096. 査読有り
Mouree K.R., 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.* (2018)41(4):612-618. doi: 10.1248/bpb. B 17-00991. 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.* (2016) 8: 325-332. doi: 10.1016/j.bbrep.2016.09.015. 査読有り

[学会発表](計 6 件)

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 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会)、2017/12/8、2017/12/9、神戸ポートアイランド (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) (兵庫県・神戸市)

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, 2017/10/31, Kumamoto Kenmin Koryukan-Parea (Kumamoto) 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 (Osaka)

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 (熊本県阿蘇郡)

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、宮日会館 (宮崎県・宮崎市)

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・バイオフィオーラム 2016、2016/9/10、大阪大学大学院薬学研究科 (大阪府・吹田市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)
該当無し

取得状況(計 0 件)
該当無し

〔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

岸本 直樹 (KISHIMOTO, Naoki)
熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・
助教
研究者番号: 80756148