

平成 30 年 4 月 12 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：16K19141

研究課題名(和文) SERINC3/5とHIV-1 Nefの攻防と病態形成への影響

研究課題名(英文) Elucidation of HIV-1 pathogenesis dictated by the interplay between Nef and SERINC3/5

研究代表者

豊田 真子 (Toyoda, Mako)

熊本大学・エイズ学研究センター・研究員

研究者番号：70771129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：最近、HIV-1感染に対する宿主因子としてSERINC3/5が同定され、Nefが拮抗分子として働くことが報告された。本研究では、HIV感染者コホートを元に、SERINC3/5とNefの攻防が、HIV感染者の病態形成に与える影響を解析した。国内で集めた無治療のHIV-1慢性感染者のコホートにおいて、インフォマティクス解析を行ったところ、HLAクラスIアレルと相関するNefにおけるアミノ酸変異の蓄積の総和が血漿ウイルス量と逆相関することを明らかにした。さらに、見出されたHLA関連Nef変異はSERINC3/5への拮抗機能を低下させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The host proteins SERINC 3 and 5 have been revealed as inhibitors of HIV-1 infectivity that are counteracted by Nef. However, it remains unclear whether this ability affects viral replication in vivo. Here, we examined the effects of patient-derived sequences on Nef's ability to counteract SERINC3/5 and its association with patients' viral load. We collected plasma viral RNA from HLA-typed, treatment-naive, chronically HIV-1 subtype B-infected subjects and determined Nef-encoding region sequences. Correlation between the Nef polymorphisms and plasma viral load was analyzed. We identified two Nef mutations that are correlated inversely with viral load. The Nef's ability to counteract SERINC3/5 was assessed by using JTAG wild-type cells and the JTAG variant engineered to lack expression of both SERINC3/5. Viruses produced by JTAG, but not SERINC3/5-deleted JTAG, demonstrated that the two Nef mutations markedly impaired SERINC3/5 counteraction function.

研究分野：ウイルス学

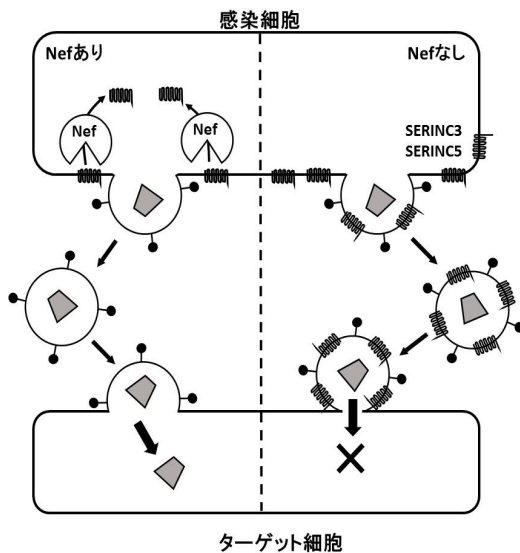
キーワード：ウイルス

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 は、他のレトロウイルスには存在しないアクセサリ-蛋白質 (Vif, Vpr, Vpu, Nef) と総称されるユニークな蛋白質をコードしており、これらが HIV-1 に特有の病原性発現の鍵と考えられている。なかでも Nef はウイルスの感染性を増強するという特徴的な機能を持つ蛋白質で、病原性の発現に重要な因子である。しかしながら、Nef がどのようにしてウイルスの感染性を増強しているのかはこれまで長く明確にされてこなかった。2015 年に 2 グループが HIV-1 感染性を抑制する新しい宿主制限因子 (SERINC3, SERINC5) を同定するとともに、HIV-1 Nef がその働きを拮抗することを Nature 誌に同時に報告した。SERINC はセリンの取り込みやスフィンゴ脂質の代謝・合成を担う分子として本邦の研究者によって 2005 年に報告されていたが、その後の続報はなく、見過ごされてきた分子であった。SERINC3 および SERINC5 は、10 個以上の膜貫通領域を有する蛋白質で、これらが、ウイルス粒子に取り込まれると、ウイルスの感染性が顕著に減弱化することが明らかにされた。Nef は感染細胞表面からの SERINC3 や SERINC5 の発現を減少させることで、ウイルス粒子中へのこれら膜蛋白の取り込みを防ぎ、感染性を増強させている。

図 1

SERINC3/5 による感染阻害と Nef の機能



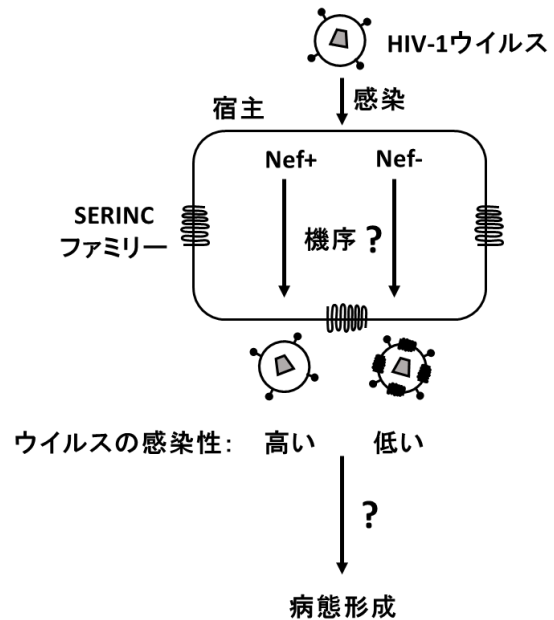
Nef により SERINC のウイルス粒子中の取り込みが阻害されることで、ウイルスの感染力が維持されることは示されたが、詳細な機序およびヒト個体の病原性とのかわりについては、良くわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では国内外の特徴的な HIV 感染者コホートを元に、ウイルスの感染性に及ぼすウイルス側因子の Nef と抗 HIV-1 活性を示す宿主側因子の SERINC ファミリーによる攻防が HIV 感染病態形成に及ぼす影響を明らかにすることを旨とする。

図 2

Nef および SERINC の相互作用概略図



3. 研究の方法

(1) HIV 感染者の検体

国内で集めた無治療の HIV-1 慢性感染者の検体を用いた。インフォームドコンセントを得た対象者からのみ、検体の採取を行なった。検体は、匿名化されたのちに実験と解析に用いる。したがって、研究者は、個人の特定ができない。

(2) HIV 感染者由来の Nef クローンの樹立およびインフォマティクス解析

感染者の血漿から HIV-1 ウイルス RNA を抽出後、RT-PCR により cDNA を調整した。nef 領域に特異的なプライマーを用いて nef 遺伝子断片をプラスミドベクターにクローニング後、シーケンス解析を行った。さらに、感染者あたり 1 クローンを選び、制限酵素サイトを導入してプロウイルスベクターまたは発現ベクターにサブクローニングした。また、血漿ウイルス RNA を用いて、感染者の HLA 遺伝子型とウイルス遺伝子型との関連解析を行った。

(3) SERINC3/5 への拮抗作用の解析
感染者由来の Nef クローンまたは変異を導入した実験室株 (SF2-Nef) を Jurkat TAg 細胞および SERINC3/5 をノックアウトした Jurkat TAg-SERINC3/5 KO 細胞にエレクトロポレーションして、感染性ウイルス粒子を調整した。TZM 細胞に調整したウイルス粒子を感染させ、個々のウイルスクローンの感染性を化学発光にて検出した。Jurkat TAg 細胞及び Jurkat TAg-SERINC3/5 KO 細胞で得たデータを比較することで、SERINC3/5 特異的に見られる活性を定量的に評価した。

(4) Nef 機能の解析
感染者由来の Nef クローンまたは変異を導入した実験室株 (SF2-Nef) を用い、Nef の特徴的な機能である CD4 や HLA クラス I の発現低下の解析を行った。具体的には、CEM-A2 細胞に Nef 発現ベクターをエレクトロポレーションし、24 時間後に細胞を回収後、表面抗原を抗体で染色することに検出し、フローサイトメトリーにて定量化した。

4. 研究成果

国内で集めた無治療の HIV-1 慢性感染者のコホートにおいて、インフォマティクス解析を行ったところ、HLA クラス I アリルと相関する Nef におけるアミノ酸変異の蓄積の総和が血漿ウイルス量と逆相関することを明らかにした。見出されたこれらの変異を実験室株 (SF2-Nef) に導入し、Nef の特徴的な機能である CD4 や HLA クラス I の発現低下および SERINC ファミリーへの拮抗機能の解析を行った。これにより、Nef の変異は CD4 および HLA クラス I の発現低下作用に影響を及ぼさなかったが、SERINC3/5 への拮抗機能を低下させることを明らかにした。また、見出された Nef 変異に関して感染者由来の Nef クローンをを用いて復帰変異を導入して、同様に感染者由来の Nef の機能解析を行った。各感染者のクローンにおいて、Nef の復帰変異は CD4 や HLA クラス I の発現低下作用に影響を及ぼさなかった。一方、復帰変異を導入した感染者の Nef クローンにおいて、SERINC3/5 への拮抗作用の回復が認められた。これにより、感染者に見出された HLA 関連 Nef 変異は、SERINC3/5 に拮抗する能力が損なわれており、これが HIV-1 感染宿主における血漿ウイルス量の低下との関連性を示唆する結果を得た。

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 1 件)

Mwimanzi Francis, Toyoda Mako, Mahiti Macdonald, Mann Jaclyn K, Martin Jeffrey N, Bangsberg David, Brockman Mark A, Goulder Philip, Kirchhoff Frank, Brumme Zabrina L, Ndung'u thumbi and Ueno Takamasa. Resistance of Major Histocompatibility Complex Class B (MHC-B) to Nef-Mediated Downregulation Relative to that of MHC-A Is Conserved among Primate Lentiviruses and Influences Antiviral T cell Responses in HIV-1-Infected Individuals. J Virol [査読有] 2018 vol. 92 no. 1 e01409-17 DOI: 10.1128/JVI.01409-17

[学会発表](計 8 件)

Toyoda Mako, Kamori Doreen, Carlson Jonathan, Gatanaga Hiroyuki, Kawana-Tachikawa Ai, Oka Shinichi, Pizzato Massimo, Ueno Takamasa. Naturally arising HIV-1 Nef variants that impair Nef's ability to counteract SERINC3/5 are associated with decreased plasma viremia. 18th Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto Kenmin Koryu Kaikan-Parea. October 30th-November 1st, 2017.

豊田真子, Kamori Doreen, Jonathan Carlson, 湯永博之、立川(川名)愛、岡慎一、Massimo Pizzato、上野貴将. Differential ability to antagonize SERINC3/5 counteraction by naturally arising HIV-1 Nef variants associating with decreased plasma viremia. 第65回日本ウイルス学会学術集会. 大阪国際会議場. 2017年10月24日-10月26日

Toyoda Mako, Kamori Doreen, Carlson Jonathan, Gatanaga Hiroyuki, Kawana-Tachikawa Ai, Oka Shinichi, Pizzato Massimo, Ueno Takamasa. Impaired Nef's ability to counteract SERINC5 is associated with decreased plasma viremia. 9th IAS Conference on HIV Science (IAS 2017) Paris, France. July 23-26, 2017.

Toyoda Mako, Kamori Doreen, Carlson Jonathan, Gatanaga Hiroyuki, Kawana-Tachikawa Ai, Oka Shinichi, Pizzato Massimo, Ueno Takamasa. Impaired Nef 's ability to counteract SERINC5 is associated with decreased plasma viremia. Keystone Symposia Conference. Modeling Viral Infections and Immunity. Stanley Hotel, Estes Park, Colorado. May 1-4, 2017.

豊田真子、Kamori Doreen、立川(川名)愛、瀧永博之、岡慎一、上野貴将。アクセサリー蛋白質に対する免疫淘汰圧がウイルス複製に与える影響。第30回日本エイズ学会学術集会・総会。鹿児島県民交流センター。2016年11月23日-11月25日

Toyoda Mako, Kamori Doreen, Pizzato Massimo, Ueno Takamasa. Naturally occurring HIV-1 Nef variants that impair Nef 's ability to counteract SERINC5 and enhance virion infectivity. 2nd Kumamoto IRCMS International Symposium and 17th Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto Kenmin Koryu Kaikan-Parea. October 31st-November 2nd, 2016.

豊田真子、Kamori Doreen、上野貴将。Viral fitness cost imposed by naturally occurring HLA-associated polymorphisms across HIV-1 accessory proteins. 第64回日本ウイルス学会学術集会。札幌コンベンションセンター。2016年10月23日-10月25日

Toyoda Mako, Kamori Doreen, Ueno Takamasa. Naturally occurring HLA-associated Nef polymorphisms that are associated with decreased plasma viral load and impaired Nef-mediated enhancement of virion infectivity. 41st Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Retroviruses. NY, USA. May 23-28, 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 真子 (Toyoda Mako)
熊本大学・エイズ学研究センター・研究員
研究者番号：70771129

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし