

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06628

研究課題名(和文)次世代HIV治療戦略構築への展開を目指したNER機構解明

研究課題名(英文)Fundamental study of NER mechanism aiming to develop a novel HIV therapy in next generation

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、HIV-1の病原性因子NefのmRNAの5'UTRに存在するNef発現に重要な領域について詳細を調べた。NERと名付けたその領域にはSRタンパク質結合配列として知られる2つのヌクレオチド配列が存在し、これらが効率的なNef発現に特に重要であることを見出した。またNERは効率的なnef mRNAの核外輸送に関連し、またリン酸化タンパク質CLKが関与していた。まとめると、CLK-SRタンパク質-NER内のSR結合配列の3者が、nef mRNAの核外輸送機構を介して効率的なNef発現に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NefのmRNAは700ヌクレオチド以上ある比較的長い5'UTRを持つが、本研究により、これまでに知られていなかったNef発現に重要な機構の一端を明らかにすることができた。この機構はNef発現抑制のための新しい標的となる可能性がある。Nef発現の抑制はHIV-1感染細胞の免疫による排除を亢進させることにつながる可能性があり、治療を目指したHIV感染症の新たな治療戦略構築につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Nef, a virulence factor of HIV-1, is translated from the multiple-spliced 2-kb mRNAs transcribed from HIV-1 genome. In this study, we investigated critical region in 5' UTR of a nef mRNA for Nef expression, which was named as Nef-expression essential region (NER). We found that particular two nucleotide sequences, known as SR binding sequences, in the NER of nef mRNA are particularly important for the efficient Nef expression. Interestingly, treatment of TG003 known as CLK inhibitor induced to increase the Nef expression from nef mRNA in HEK293 cells, and the mutation within the particular two nucleotide sequence sites resulted in attenuation of the increase of Nef expression by TG003 treatment. Additionally, the NER was associated with efficient nef mRNA nuclear export. These results suggests that axis of CLK1-SR protein-the particular two nucleotide sequences in the NER is critical role for efficient Nef expression from nef mRNAs.

研究分野：HIV-1

キーワード：Nef CLK

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

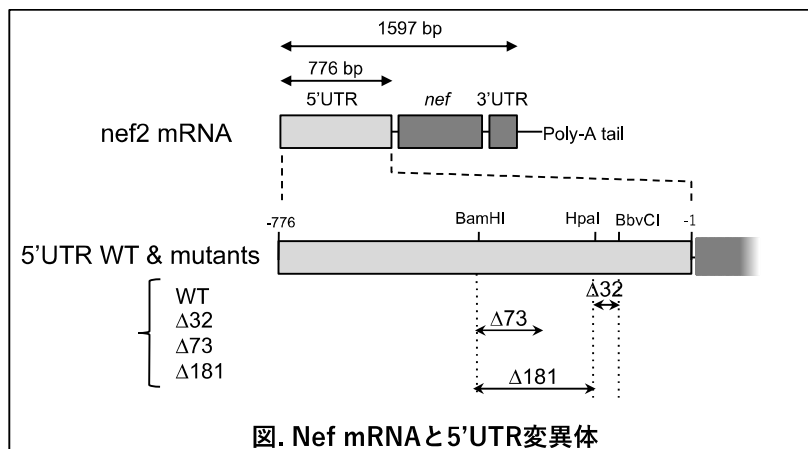
これまでに多くの抗 HIV 薬の開発が行われ著しい進歩を遂げてきたが、現行の抗 HIV 療法では HIV 感染症の治癒は不可能であり、投薬を続けなければ後天性免疫不全症候群 (エイズ) となる。HIV 治癒という非常に困難な課題が残されたままである。

HIV-1 が持つアクセサリタンパク質の 1 つである Nef は、その複製を増強する病原性因子として知られている。ウイルス複製において、Nef は細胞膜上の CD4 および MHC-I のダウンレギュレーションにより、ウイルス産生細胞への再感染の抑制及び効率的なウイルスの遊離を促進、並びに免疫応答からの回避に寄与している。また、ウイルスの標的細胞への侵入を妨げる宿主性タンパク質である SERINC5 のウイルス粒子への取り込みを妨げる機能も知られている。これらの機能により、Nef は効率的なウイルス複製および増強に寄与している。

HIV-1 をコードするゲノムは約 9.2 kb の長さであり、転写、選択的スプライシングの過程を経て、約 9 kb、4 kb 及び 1.8 kb の長さの異なる RNA が産生され、種々のウイルス性タンパク質が翻訳される。HIV-1 は長さの異なる RNA を翻訳するために、イントロン配列を持ったままの RNA を核外に輸送する手段を持つ。一般的に mRNA の核外輸送には、mRNA の Cap 構造を認識して Cap binding complex (CBC) が結合し、次に CBC に RNA binding complex である Transport export complex (TREX) 複合体が結合し核外輸送因子の TAP/NXF1-p15 ヘテロ二量体 (TAP-p15) をリクルートすることにより行われるが、本来、スプライシングが不完全である約 9 kb 及び 4 kb の RNA 前駆体は TAP-p15 経路での核外輸送は抑制を受ける。しかしながら、HIV-1 の Rev タンパク質はイントロンに存在する Rev response element (RRE) 領域を認識し結合し、核外輸送因子である CRM1 をリクルートすることによってイントロンを持つ RNA を CRM1 経路で核外輸送を行うことが知られている。

mRNA は開始コドンから終始コドンまでのタンパク質をコードする領域の他に、5'末端および 3'末端に非翻訳領域 (UTR) を有する。HIV-1 は選択的スプライシング機構により、異なるエクソンおよびイントロンをもつ mRNA を産生し、nef mRNA は 5 種類のスプライスバリエーションを産生することが知られている。多くの mRNA の 5'UTR は約 200 ヌクレオチド程の長さであるのに対し、nef mRNA の 5'UTR は全てのバリエーションに共通して約 700 ヌクレオチド以上の長さを持つことを特徴としている。その中でも nef mRNA splice variant 2 (以下 nef 2 mRNA) の存在比は 49% と最も高いことが報告されている。mRNA 5'UTR には 5'Cap 構造の付加、IRES (Internal ribosome entry sites) および uORF (Upstream open reading frame) などの転写翻訳に重要な領域を含むことが知られている。このことを踏まえ、研究代表者は nef mRNA の比較的長い 5'UTR には Nef 発現調節等に関わる未知の機構の存在の可能性を考えた。

これまでの研究代表者らの研究では HIV-1_{NL4-3} 株由来の nef2 mRNA を発現する pNef 2 発現ベクター (以下 pNef WT) 及び nef 2 mRNA 5'UTR の特定領域を欠損した pNef 5'UTR 欠損変異体 (pNef Δ 32 : 32 塩基欠損、pNef Δ 73 : 73 塩基欠損、pNef Δ 181 : 181 塩基欠損、図参照) を構築し、5'UTR と Nef 発現に関する知見を得てきた。HEK293 細胞に、pNef WT 及び各種 pNef 5'UTR 欠損変異体を導入し、Nef 発現を検出し比較した結果、pNef Δ 73 及び pNef Δ 181 において pNef WT と比較して Nef 発現が低下することが明らかとなった。一方 pNef Δ 32 は WT と同等の Nef 発現を示した。また欠損変異導入による Nef 発現の低下は、nef mRNA の産生量、安定性の違いによるものではないことを明らかにしてきた。研究代表者らは nef mRNA の 5'UTR に Nef の効率的な発現に必要な Nef-expression essential region (NER) の存在を明らかにしたが、その詳細な機構については不明なままであった。



2. 研究の目的

本研究では、比較的長い nef mRNA の 5'UTR に着目し、効率的な Nef 発現に関わるより詳細な配列部位の特定、並びに関係する未知の宿主因子の探索を行い、NER を介した Nef の効率的な発現機構(NER 機構)の解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

nef gene を欠損させた HIV-1_{NL4-3} 発現ベクターを構築し、Nef mRNA 発現系である pNef WT または pNef 5'UTR 欠損変異体を細胞に 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。

pNef WT、pNef 5'UTR 欠損変異体、pNef 5'UTR 塩基置換変異体を作成し、それぞれからの Nef 発現を、Western blot 法により検出し評価した。本研究では全て HEK293 細胞を使用して Nef 発現を評価した。

4. 研究成果

NER 欠損 nef mRNA からの Nef 発現は著しく低下することは明らかであったが、その Nef 発現低下の機能的な意義を確認するために、Nef の HIV-1 感染性増強効果を指標に機能的意義を検討した。Nef 欠損 HIV-1 発現ベクターと pNef WT または Nef 低発現性を示す pNef 5'UTR-NER 欠損変異体を HEK293 細胞に共導入し、細胞から産生された HIV-1 をインジケータ細胞である Tzmb1 細胞に感染させその感染性を比較した。その結果、WT の 5'UTR 由来 Nef の場合と比較して NER 欠損由来 Nef を共発現条件で産生された HIV-1 の感染性は有意に低いことが示された。このことから、NER 欠損による Nef の低発現性はその機能の有意な低下を伴うことが明らかとなった。

NER 欠損 nef mRNA における Nef 低発現性は、nef mRNA の産生量、安定性の違いによるものではないことは以前に示していた。転写後のステップである nef mRNA の核外輸送段階に注目した。pNef WT および pNef 5'UTR-NER 欠損変異体から転写される nef mRNA の核画分と細胞質画分の存在比(細胞質/核 ratio)を比較することで、WT と変異体の間における nef mRNA の核外輸送効率を比較した。その結果、WT の 5'UTR nef mRNA の場合と比較して NER 欠損 nef mRNA の細胞質/核 ratio が有意に低いことが示された。このことから、NER 欠損による Nef の低発現性は、nef mRNA の核外輸送効率の低下に起因することが明らかになった。

NER を介した効率的な Nef 発現機構 (NER 機構) が存在することを仮定し、この機構に関わる因子を探索するために、本研究では種々の酵素阻害剤を含む化合物ライブラリを利用した。pNef WT における Nef 発現に影響を及ぼし、一方 pNef 5'UTR 欠損変異体における Nef 発現に影響を及ぼさない化合物をスクリーニングしたところ、CLK 阻害剤である TG003 が候補化合物としてセレクトされた。Western blot 法による分析の結果で WT の 5'UTR である pNef WT からの Nef 発現は TG003 処理濃度依存的に亢進したが、Nef 低発現性を示す pNef Δ73 及び pNef Δ181 においては、TG003 処理による Nef 発現亢進の感受性が低下していることが確認された。さらに pNef Δ73 と pNef Δ181 の間で TG003 処理による Nef 発現亢進効果を比較すると、pNef Δ181 がより低感受性であった。

CLK は RNA 輸送や RNA スプライシング等に関わる SR タンパク質をリン酸化することが知られている。また SR タンパク質は RNA に結合するが、過去の報告で SR タンパク質が結合する RNA コンセンサス配列が知られていることから、NER においてこのコンセンサス配列が存在するか調べたところ、このコンセンサス配列と一致する 4 残基からなる配列が 2 箇所存在した。この 2 箇所の配列に注目し、pNef WT の当該配列に欠損変異または塩基置換変異を導入し、Nef 発現レベルを評価した。その結果、これら 4 残基からなるコンセンサス配列の変異体からの Nef 発現レベルは、pNef Δ73 及び pNef Δ181 と同等に低いレベルであった。さらに TG003 処理による Nef 発現亢進作用に対して、コンセンサス配列変異体は pNef Δ73 及び pNef Δ181 と同様に低感受性であった。このコンセンサス配列を 4 回繰り返した合成 RNA の処理の、pNef WT からの Nef 発現に与える影響を調べたところ、合成 RNA 処理によって Nef 発現が低下した。このことから、コンセンサス配列を含む合成 RNA が細胞内の nef mRNA の NER の機能を阻害していることが示唆された。

以上の結果をまとめると、nef mRNA の核外輸送と関連する NER 機構には、CLK、SR タンパク質、NER 上の 4 残基からなる特定配列が関与し、これらが Nef の効率的な発現に関与していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高宗暢暁、細川広太、渡邊俊輝、岸本直樹、三隅将吾
2. 発表標題 HIV-1 Nef mRNAの5'UTRに存在する機能領域に関する研究
3. 学会等名 第42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
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸本 直樹、入江 彩花、岡野 良祐、高宗 暢暁、三隅 将吾
2. 発表標題 HIV-1カプシドタンパク質のリン酸化とウイルス複製
3. 学会等名 平成31年度 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸本 直樹、高宗 暢暁、三隅将吾
2. 発表標題 解糖系酵素群による多様なHIV-1複製制御機構
3. 学会等名 和2年度 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------