

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15170

研究課題名(和文)細胞膜上での宿主-ウイルス因子群の攻防がHIV-1病態形成に与える影響

研究課題名(英文)Elucidation of HIV-1 pathogenesis dictated by the interplay between viral factor and host factor on the cell membrane

研究代表者

豊田 真子 (Toyoda, Mako)

熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・特任助教

研究者番号：70771129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、HIV-1感染者コホートをを用いて、生体内におけるウイルス蛋白質(Nef)の機能と宿主因子(SERINC5)との相互作用の解析を行い、病態発現との関連性を明らかにすることを旨とした。未治療の日本人HIV感染者の血漿を用い、Nef領域の遺伝子配列解析、樹立Nefクローンをを用いたウイルス複製能の解析、SERINC5に対する阻害機能の解析を行い、HLAに関連した2つのNef変異(Y120F/Q125H)が血漿ウイルス量と逆相関することを見出した。また、これら2つのNef変異の組み合わせは、HIV-1の複製を低下させ、SERINC5に対する阻害活性を減弱化することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果によって、生体内で選択されるNef変異は、宿主因子であるSERINC5に拮抗する能力を損なうことでウイルスの感染性および複製能力を弱め、血漿ウイルス量の低下に寄与するものと示唆された。個体内でのウイルス蛋白質と宿主因子の相互機能解明は、宿主に本来備わる抗ウイルス機能の分子機序を活用した新しい治療基盤の構築につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：HIV-1 Nef plays an essential role in enhancing virion infectivity by antagonizing the host restriction molecule SERINC5. Because Nef is highly polymorphic due to the selective forces of host cellular immunity, we hypothesized that certain immune-escape polymorphisms may impair Nef's ability to antagonize SERINC5 and influence viral fitness in vivo. To test this, we identified 58 Nef polymorphisms that were overrepresented in HIV-infected patients in Japan sharing the same HLA genotypes. Specifically, we found that a number of the HLA-B*51:01-associated Y120F/Q125H mutations were most significantly associated with a reduced plasma viral load. A series of experiments showed that Y120F/Q125H impaired Nef's ability to antagonize SERINC5 and associated with decreasing virion infectivity and viral replication. Our results suggest that the differential ability of Nef to counteract SERINC5 by naturally occurring immune-associated mutations was associated with the plasma viral load in vivo.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 SERINC5 Nef 感染者コホート

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 感染における病態発現は、ウイルス因子とこれを抑制する宿主因子との攻防の結果と捉えることができる。ヒトは HIV-1 感染に対して内在性の宿主因子と呼ばれる防御システムを駆使し、HIV-1 複製を抑制するように働いている。例えば、SERINC5 などの宿主因子はウイルス粒子に取り込まれることで、HIV-1 感染性を減弱化させる。一方、Nef など細胞膜に局在するウイルス蛋白質はこれら宿主因子の機能を阻害し、ウイルスの感染性を増強する。ここ数年の研究において、Nef がウイルス粒子中への SERINC5 の取り込みを防ぐことでウイルス感染性を増強させる機序が明らかになってきたが、生体内でのウイルス複製・病態との関連性については未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、病態情報とリンクした HIV-1 感染者コホートを用いて、生体内におけるウイルス蛋白質 (Nef) の機能と宿主因子 (SERINC5) との相互作用の解析を行い、病態発現との関連性を明らかにすることを目指した。

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 (N=375) 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、検体の採取を行い、匿名化されたのちに実験と解析に用いた。

(2) 感染者由来の nef 遺伝子領域のシーケンス、クローニング、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、nested PCR を行い、Nef 領域のダイレクトシーケンスを行った。加えて、変異が認められた感染者においては、nef 領域に特異的なプライマーを用いて nef 遺伝子を増幅し、制限酵素サイトを導入して、GFP 発現ベクターおよびプロウイルスベクターにクローニングを行った。さらに、感染者の HLA 遺伝子型と得られた Nef 配列を用いて、インフォマティクス解析を行った。

(3) ウイルス複製能の解析

実験室株 (Nef-SF2) に変異を導入したプロウイルスベクターを 293T 細胞にトランスフェクションして、感染性ウイルス粒子を調製した。健常人の PBMC に調製したウイルスを感染させ、3 日後に PHA を加えて細胞を活性化させた。その後、3 日おきに半量の培養上清を回収し、ウイルス生産量を p24Gag-ELISA にて定量した。

(4) SERINC5 阻害機能の解析

変異を導入した実験室株 (Nef-SF2) または感染者由来の Nef クローンを 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製した。TZM 細胞に調製したウイルス粒子を感染させ、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、SERINC5 の阻害活性を定量的に評価した。

(5) SERINC5 細胞表面発現の低下活性の測定

Jurkat TAg-SERINC3/5 KO 細胞に SERINC5-iHA 発現プラスミドおよび感染者由来の Nef-GFP クローンをコトランスフェクションした際の、SERINC5 の細胞表面発現量を HA 抗体で染色し、フローサイトメトリーにて検出した。

(6) 細胞表面抗原の発現量の測定

感染者由来の Nef クローンがウイルスレセプター (CD4、CCR5、CXCR4)、HLA-A2 および CD74 の発現に及ぼす影響を抗体で染色し、フローサイトメトリーにて検出した。CD4 および HLA-A2 の発現は CEM-A2 細胞に、CCR5 および CXCR4 の発現は TZM-bl 細胞に、それぞれ、GFP 発現ベクターにクローニングした感染者由来 Nef クローンを導入することにより解析した。また、CD74 は、プロウイルスベクターにクローニングした感染者由来 Nef クローンを 293T 細胞にトランスフェクションすることで感染性ウイルス粒子を調製し、721.221 細胞に感染させることにより解析した。

4. 研究成果

(1) インフォマティクス解析

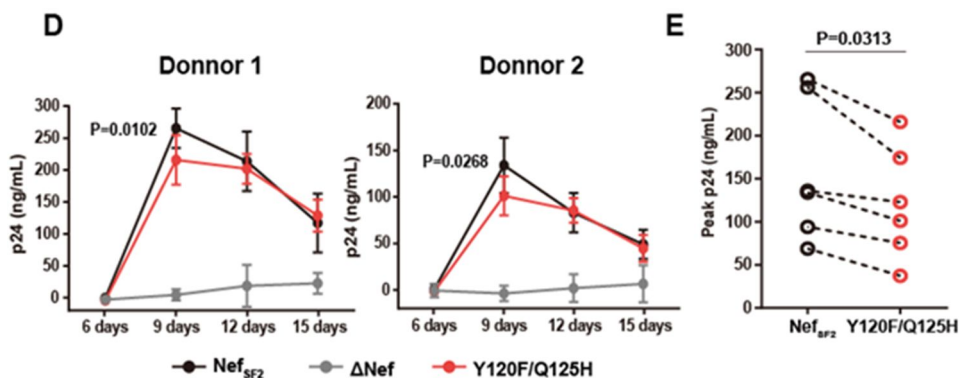
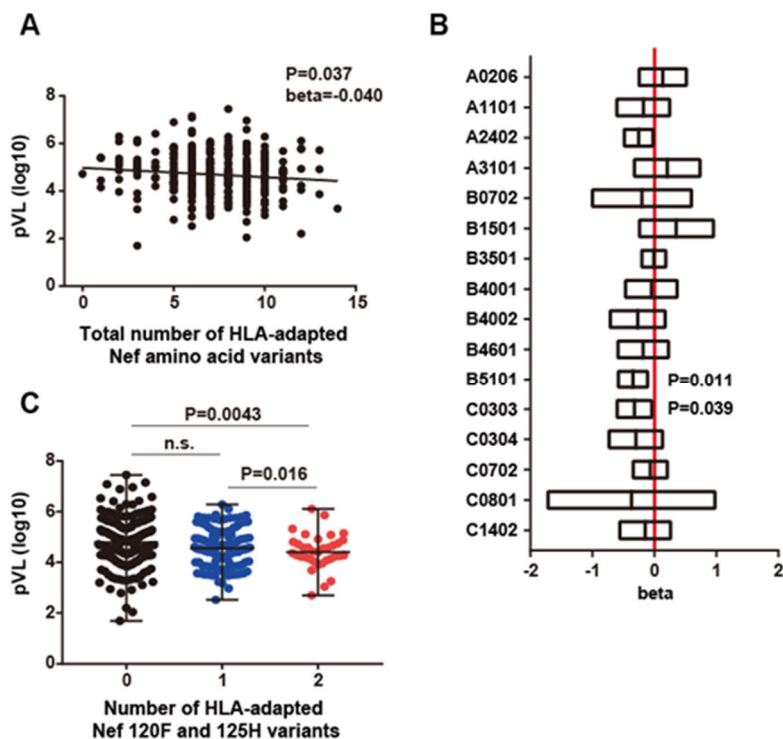
得られた Nef 遺伝子配列および血漿ウイルス量、HLA 遺伝子型を用いて、インフォマティクス解析を行ったところ、各感染者の Nef における変異の総和は、血漿ウイルス量 (pVL) に逆相関していた (図 A)。これにより、変異の蓄積が生体内のウイルス複製に負の影響をもたらすと示

唆された。さらに、詳細な解析を行ったところ、HLA-B*51:01 を持つ感染者に優位に頻度高く観察された Nef の 120 番目のアミノ酸変異 (チロシン (Y) からフェニルアラニン (F)) と 125 番目のアミノ酸変異 (グルタミン (Q) からヒスチジン (H)) の蓄積が、血漿ウイルス量の低下に関与していることを明らかにした (図 B、C)。

(2) Nef の変異がウイルス複製能に及ぼす影響

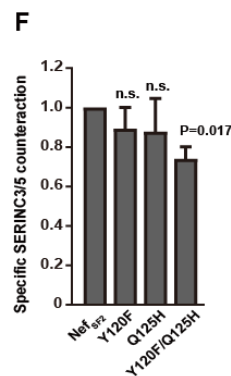
2 人の健常人の PBCM を用いて、Nef の Y120F/Q125H の変異がウイルス複製能に及ぼす影響を解析したところ、ウイルス複製がピークとなる 9 日目でのウイルス複製が Nef-SF2 と比較して優位に低下することを明らかにした (図 D)。

さらに、追加で 4 人の健常人でのウイルス複製解析を行い、Y120F/Q125H 変異ではウイルス複製能が優位に低下することを明らかにした (図 E)。



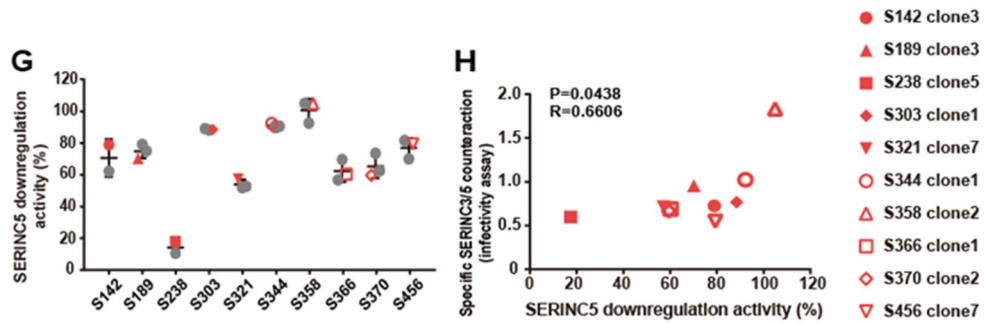
(3) Nef の変異が SERINC5 阻害機能に及ぼす影響

Nef の変異が SERINC5 阻害機能に及ぼす影響を解析したところ、Nef-SF2 と比較してシングル変異 (Y120F、Q125H) では阻害活性に差は認められなかったが、ダブル変異 (Y120F/Q125H) において、優位に阻害活性が低下することを明らかにした (図 F)。



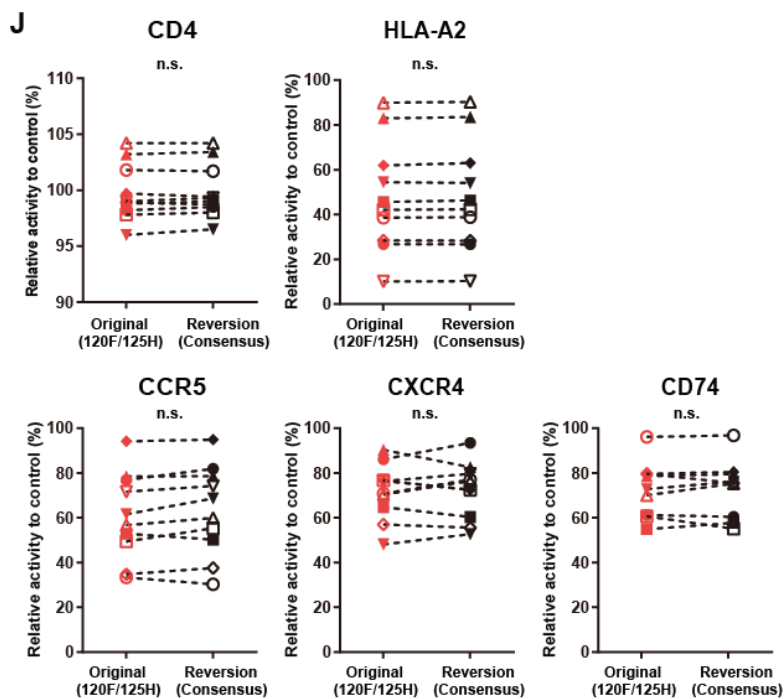
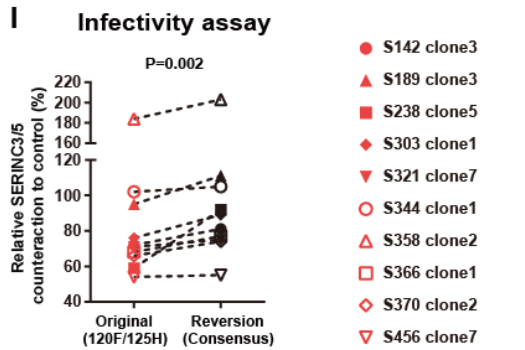
(4) Nef クローンが SERINC5 細胞表面発現の低下活性および SERINC5 阻害機能に及ぼす影響の解析

Y120F/Q125H 変異をもつ感染者 (N=10) の Nef クローンを樹立し、SERINC5 の細胞表面発現低下活性および SERINC5 阻害活性を解析した。感染者間での SERINC5 細胞表面低下活性に差が認められたが、感染者内でのクローン間においては、SERINC5 細胞表面低下活性に大きな差は認められなかった (図 G)。さらに、SERINC5 への細胞表面低下活性と SERINC5 阻害活性には相関が認められた (図 H)。



(5) Nef クローンの変異復帰が SERINC5 の阻害活性および細胞表面抗原の発現量に及ぼす影響の解析

120F/125H 変異をもつ感染者 (N=10) の Nef クローンの復帰変異 (Y120/Q125) を作製し、SERINC5 の阻害活性および細胞表面抗原の発現量変化の解析を行った。復帰変異において SERINC5 に対する Nef の阻害活性が回復することを明らかにした (図 I)。また、120F/125H 変異と復帰変異の間での、CD4、CCR5、CXCR4、HLA-A2 および CD74 の細胞表面発現に影響を及ぼさなかった (図 J)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Steven W. Jin, Nirmin Alshafi, Xiaomei T. Kuang, Shayda A. Swann, Mako Toyoda, Heinrich Göttinger, Bruce D. Walker, Takamasa Ueno	4. 巻 29
2. 論文標題 Natural HIV-1 Nef Polymorphisms Impair SERINC5 Downregulation Activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1449-1457.e5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.10.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 John P Barton, Erasha Rajkoomar, Jaclyn K Mann, Dariusz K Murakowski, Mako Toyoda, Macdonald Mahiti, Phillip Mwimanzi, Takamasa Ueno	4. 巻 5
2. 論文標題 Modelling and in vitro testing of the HIV-1 Nef fitness landscape	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virus Evolution	6. 最初と最後の頁 vez029, 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ve/vez029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Francis Mwimanzi, Isaac Ngare, Mako Toyoda, Masahiko Mori, Jaclyn Mann, Thumbi Ndung'u, Phillip Goulder, Takamasa Ueno	4. 巻 34
2. 論文標題 An HIV-1 Nef genotype that diminishes immune control mediated by protective HLA alleles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AIDS	6. 最初と最後の頁 1325-1330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/QAD.0000000000002559	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Mako Toyoda, Doreen Kamori, Toong Seng Tan, Kageaki Goebuchi, Jun Ohashi, Jonathan Carlson, Ai Kawana-Tachikawa, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, Massimo Pizzato, Takamasa Ueno	4. 巻 10
2. 論文標題 Impaired ability of Nef to counteract SERINC5 is associated with reduced plasma viremia in HIV-infected individuals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19416,1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-76375-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

[学会発表] 計11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Toong Seng Tan, Mako Toyoda, Takamasa Ueno
2. 発表標題 Contribution of extracellular loop structures of SERINC5 in HIV-1 infectivity restriction.
3. 学会等名 21st Summer Retrovirus Conference (SRC), Kobe, Japan. July 12-13
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mako Toyoda, Doreen Kamori, Massimo Pizzato, Takamasa Ueno
2. 発表標題 Naturally arising HIV-1 Nef mutations that affect counteraction of SERINC3/5 and virion infectivity.
3. 学会等名 19th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan. Nov 6-7 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toong Seng Tan, Mako Toyoda, Takamasa Ueno
2. 発表標題 Contribution of extracellular loop structures of SERINC5 in HIV-1 infectivity restriction
3. 学会等名 19th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan. Nov 6-7 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mako Toyoda, Doreen Kamori, Jonathan Carlson, Ai Kawana-Tachikawa, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, Takamasa Ueno
2. 発表標題 Impaired Nef's ability to counteract SERINC5 by immune-driven mutations
3. 学会等名 The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Seattle, USA, March 4-7 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mako Toyoda, Doreen Kamori, Massimo Pizzato, Takamasa Ueno
2. 発表標題 Naturally arising HIV-1 Nef mutations that affect counteraction of SERINC3/5 and virion infectivity.
3. 学会等名 The 33rd Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research, Kumamoto, Japan. Nov 27-29
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toong Seng Tan, Mako Toyoda, Takamasa Ueno
2. 発表標題 A single amino acid change in an extracellular loop of SERINC5 attenuates the ability to restrict HIV-1.
3. 学会等名 The 33rd Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research, Kumamoto, Japan. Nov 27-29
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Emmanuel James Nkuwi, George Peter Judicate Ndossi, Toong seng Tan, Godfrey Barabona, Mako Toyoda, Takamasa Ueno
2. 発表標題 Naturally occurring non-subtype B envelope sequences show diverse range of sensitivity to SERINC5-mediated inhibition of HIV-1 infectivity
3. 学会等名 The 2nd Joint MUHAS-KU Webinar (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Godfrey Barabona, Macdonald Mahiti, Mako Toyoda, Doreen Kamori, Salim Masoud, George Peter Judicate Ndossi, Bruno Sunguya, Eligius Lyamuya, Takamasa Ueno
2. 発表標題 Severe baseline immunosuppression is associated with higher levels of plasma inflammatory markers despite long term ART treatment in HIV infected Tanzanians
3. 学会等名 The 2nd Joint MUHAS-KU Webinar (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toong seng Tan, Mako Toyoda, Massimo Pizzato, Kenzo Tokunaga, Takamasa Ueno
2. 発表標題 A single amino acid change in SERINC5 abrogates the infectivity restriction function against retroviruses including HIV-1
3. 学会等名 21st Kumamoto AIDS Seminar (ONLINE Seminar) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Godfrey Barabona, Macdonald Mahiti, Mako Toyoda, Doreen Kamori, Salim Masoud, George Peter Judicate Ndossi, Bruno Sunguya, Eligius Lyamuya, Takamasa Ueno
2. 発表標題 Severe baseline immunosuppression is associated with higher levels of plasma inflammatory markers despite long term ART treatment in HIV infected Tanzanians
3. 学会等名 21st Kumamoto AIDS Seminar (ONLINE Seminar) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Emmanuel James Nkuwi, George Peter Judicate Ndossi, Toong seng Tan, Godfrey Barabona, Mako Toyoda, Takamasa Ueno
2. 発表標題 Naturally occurring non-subtype B envelope sequences show diverse range of sensitivity to SERINC5-mediated inhibition of HIV-1 infectivity
3. 学会等名 21st Kumamoto AIDS Seminar (ONLINE Seminar) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター感染免疫学分野ホームページ
<https://caids-kumamoto-u.wixsite.com/ueno-lab>

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
---------	---------