

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07518

研究課題名(和文) サイトカイン分泌経路を逆利用したHIVタンパク質輸送と細胞間伝播

研究課題名(英文) HIV protein trafficking and transmission through cytokine secretion pathways

研究代表者

森川 裕子 (Morikawa, Yuko)

北里大学・感染制御科学府・研究員

研究者番号：20191017

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)：HIV粒子の主構造タンパク質であるGagタンパク質は、SNARE分子のSyntaxin6(STX6)により細胞内輸送された。STX6欠損ではGagタンパク質が輸送されずHIV粒子の産生が低下した。サイトカインのTNF $\alpha$ もSTX6により輸送され、HIV感染ではTNF $\alpha$ 分泌が促進した。Gag-STX6-TNF $\alpha$ が相互作用したことから、TNF $\alpha$ 分泌を制御するSTX6をGagタンパク質が利用するためHIV感染ではTNF $\alpha$ 分泌が増加すると考察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質の輸送を制御するSNARE分子の1つ Syntaxin6(STX6)は、サイトカインTNF $\alpha$ を細胞内輸送し細胞外へ分泌させた。ところが、HIV粒子の主構造タンパク質であるGagタンパク質は自身の細胞内輸送にSTX6を利用した。Gag-STX6-TNF $\alpha$ の相互作用や共輸送が観察されたことから、報告されていた現象「HIV感染ではTNF $\alpha$ 分泌が亢進する」は、STX6を介したGagタンパク質輸送によってTNF $\alpha$ の分泌輸送が促進されると説明できた。

研究成果の概要(英文)：HIV Gag protein, the main structural protein of HIV particles, was transported by the SNARE molecule Syntaxin6 (STX6) in the cytoplasm. STX6 depletion impaired Gag trafficking and particle production. The cytokine TNF $\alpha$  was also transported by STX6, a phenomenon which was facilitated upon HIV infection. The Gag-TNF $\alpha$  interaction via STX6 suggested a possibility that Gag utilizes STX6 for its trafficking and cotraffics TNF $\alpha$ .

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV Gag 細胞内輸送 SNARE Syntaxin サイトカイン TNF 分泌経路

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) HIV Gagタンパク質の細胞内輸送制御分子

HIV感染者では血液中HIV粒子量と病態(進行)が相関することから、カプシドタンパク質であるGagタンパク質による粒子形成・出芽に関する研究が精力的になされてきた。イノシトールリン脂質PIP2やESCRT分子TSG101がHIV粒子出芽の制御因子として特定されたが、Gagタンパク質の細胞内輸送の制御因子は未同定である。

#### (2) HIV感染における炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$ , IL6)増加

HIV感染者では血中の炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$ , IL6)が増加することが知られているが、そのメカニズムは解明されていない。

#### (3) HIV感染シナプスにおける極性輸送メカニズム

HIV感染シナプス(感染細胞と標的細胞の接着)では、接着面にHIVタンパク質が極性輸送されHIV粒子が接着面から出芽するが、その分子機構は未解明である。

### 2. 研究の目的

#### (1) 炎症性サイトカイン分泌経路を介したGagタンパク質の細胞内輸送

Gagタンパク質輸送の制御分子候補としてQc-SNARE (Syntaxin6(STX6)とSNAP23)を見出していた。これを確認しその制御機構を解明する。STX6やSNAP23は炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$ , IL6)の分泌輸送制御分子であったことから、STX6やSNAP23を介したGagタンパク質輸送と炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$ , IL6)の分泌輸送の関係、すなわち共輸送あるいは競合を明らかにする。

#### (2) HIV感染細胞における炎症性サイトカインの分泌

Qc-SNARE (STX6 と SNAP23)によって制御される Gag タンパク質輸送と炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$ , IL6)分泌の関連性、すなわち HIV 粒子産生と炎症性サイトカイン分泌の相関性を解明する。炎症性サイトカインはmulti-directional に分泌され免疫細胞を呼び寄せることから、HIV 感染細胞からの炎症性サイトカインは周辺の免疫細胞を誘引するかを解析する。

#### (3) HIV感染シナプスにおけるHIVと炎症性サイトカインの極性輸送

HIV感染シナプス(感染細胞と標的細胞の接着)では、HIVタンパク質が接着面に極性輸送されるが、炎症性サイトカインも極性輸送されるかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) Qc-SNARE (STX6 と SNAP23)のノックダウン/ノックアウト

上皮系細胞(HeLa, 293T 細胞)では siRNA の一過性発現により STX6, SNAP23 をノックダウンした。免疫系細胞(Jurkat, U937, THP1 細胞)では shRNA 恒常発現および gRNA/Cas9 恒常発現により STX6, SNAP23 をノックダウンおよびノックアウトした。

#### (2) 共焦点顕微鏡と生細胞分子イメージング

Gag、Qc-SNARE (STX6 と SNAP23)、炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$ , IL6)をそれぞれ免疫染色し、共焦点顕微鏡で細胞内局在を観察した。また、これら分子に異なる蛍光タンパク質を付加し、共焦点顕微鏡と生細胞分子イメージング(タイムラプス)で観察した。共局在効率は Pearson's Correlation Coefficient を用いて算出した。

#### (3) HIV 産生と炎症性サイトカイン分泌

HIV 粒子産生量と炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$ )分泌量はそれぞれ ELISA で定量した。

#### (4) 共免疫沈降とプルダウン

Gag、Qc-SNARE (STX6 と SNAP23)、炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$ , IL6)に異なるタグを付加し、免疫沈降により相互作用を解析した。また、FLAG, GST プルダウンにより直接結合を解析した。

#### (5) 共培養

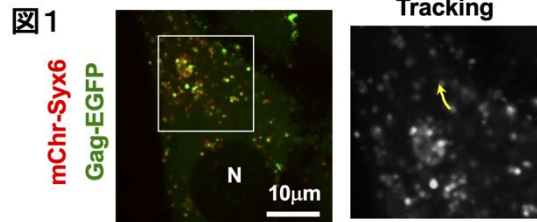
HIV 感染細胞と CellTracker 標識の非感染細胞(標的細胞)を低密度共培養し、感染細胞への標的細胞の誘引を生細胞イメージングで観察した。また高密度共培養で HIV 感染シナプスを形成

させ、Qc-SNARE (STX6 と SNAP23) と炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ ) の細胞内局在を共焦点顕微鏡で観察した。Transwell plate を用いて transmigration を解析した。

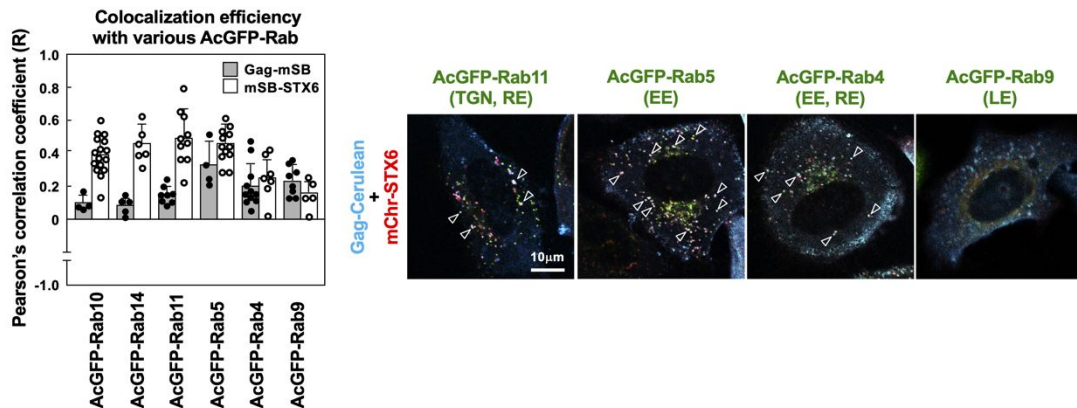
#### 4. 研究成果

##### (1) Qc-SNARE (STX6) を介した Gag タンパク質の細胞内輸送

Gag タンパク質輸送の制御分子候補として Qc-SNARE (STX6 と SNAP23) を見出していた。HeLa および 293T 細胞では、Gag タンパク質は TGN/初期エンドソーム (EE) の Qc-SNARE (STX6) と共局在し (共焦点顕微鏡)、共輸送された (図 1. 生細胞イメージング)。Rab family タンパク質を用いた解析から Gag/STX6 共局在部位は EE やリサイクリングエンドソーム (RE) であることが判明した (図 2)。Qc-SNARE (STX6 と SNAP23) をノックダウンすると Gag タンパク質の細胞内輸送が阻害され (共焦点顕微鏡)、HIV 粒子の産生が抑制された。免疫細胞 (Jurkat および U937 細胞) で調べたところ、STX6 をノックダウン/ノックアウトすると HIV 複製および粒子形成が抑制された。Gag タンパク質と STX6 の共局在が観察された。



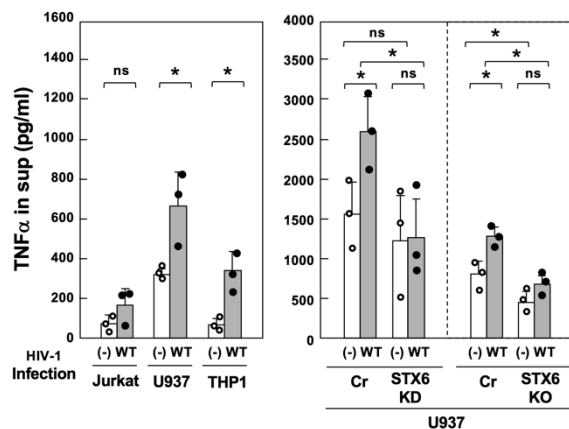
**図 2**



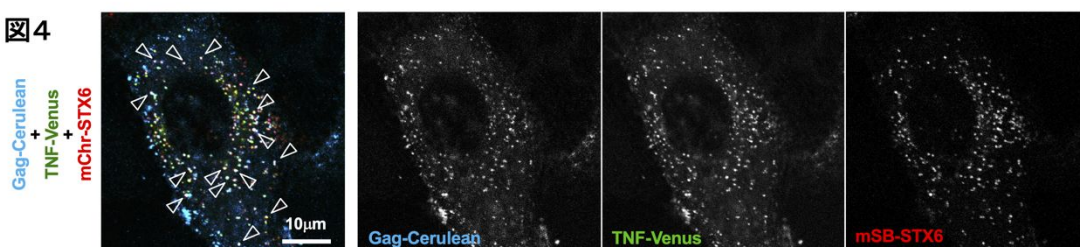
##### (2) STX6 による Gag タンパク質輸送に伴う TNF $\alpha$ の分泌促進

本研究では (1) に示したように、Qc-SNARE (STX6 と SNAP23) による Gag タンパク質輸送を明らかにした。ところが、炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ ) も Qc-SNARE (STX6 と SNAP23) によって分泌輸送されることが報告されている。そこで、STX6 によって制御される Gag タンパク質輸送と炎症性サイトカイン TNF $\alpha$  分泌の関係を調べた。免疫系細胞 (Jurkat, U937, THP1 細胞) では、HIV 感染により TNF $\alpha$  分泌が増加した。この HIV 感染による TNF $\alpha$  分泌増加は STX6 ノックアウト/ノックダウンで消失した (図 3)。Gag, TNF $\alpha$ , STX6 のかなりは共局在を示し (図 4. 共焦点顕微鏡)、Gag-STX6, STX6-TNF $\alpha$ , Gag-TNF $\alpha$  は共輸送された。Gag と TNF $\alpha$  は STX6 を共利用し競合は認められなかった。

**図 3**



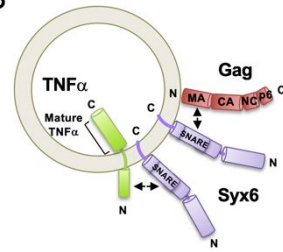
**図 4**



(3) Gag-STX6-TNF $\alpha$ の相互作用

Gagドメイン断片とSTX6ドメイン断片を用いた免疫沈降およびプルダウンにより、Gag-STX6の直接結合(Gag MAの第5ヘリックスとSTX6 SNAREドメインの相互作用)、STX6-TNF $\alpha$ の直接結合(STX6 C末端とTNF $\alpha$ 細胞質尾部の相互作用)が示された(図5 .Gag-STX6-TNF $\alpha$ の相互作用)。Gag-TNF $\alpha$ は膜を介して相互作用した。

図5



(4) HIV感染細胞による非感染細胞の誘引

感染Jurkat細胞と非感染Jurkat細胞の共培養下で非感染細胞の運動性を調べた(生細胞イメージング)。現在、transwell plateを用いて非感染細胞のmigrationを定量的に解析している。

(5) HIV感染シナプスにおけるGagタンパク質と炎症性サイトカインの極性輸送

感染細胞(Jurkat, U937, THP1細胞)ではGagタンパク質とTNF $\alpha$ の細胞内共局在が観察された。STX6をロックアウトすると共局在は消失した。HIV感染シナプス(感染細胞と非感染細胞の接着)を形成させると、Gagタンパク質は接着面に極性化した。一方、STX6およびTNF $\alpha$ は形質膜全体に局在した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tsurutani Naomi, Momose Fumitaka, Ogawa Keiji, Sano Kouichi, Morikawa Yuko	4. 巻 300
2. 論文標題 Intracellular trafficking of HIV-1 Gag via Syntaxin 6-positive compartments/vesicles: Involvement in tumor necrosis factor secretion	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 105687
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2024.105687	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 -

1. 著者名 Iida Naoyuki, Kawahara Madoka, Hirota Riku, Shibagaki Yoshio, Hattori Seisuke, Morikawa Yuko	4. 巻 15
2. 論文標題 A proteomic analysis of detergent-resistant membranes in HIV virological synapse: The involvement of vimentin in CD4 polarization	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v15061266	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 -

1. 著者名 Tanabe Reou, Morikawa Yuko	4. 巻 13
2. 論文標題 Efficient transendothelial migration of latently HIV-1-Infected cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1589 ~ 1589
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v13081589	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 -

1. 著者名 Miyakawa Kei, Nishi Mayuko, Jeremiah Sundararaj Stanleyraj, Morikawa Yuko, Ryo Akihida	4. 巻 2
2. 論文標題 MAL Inhibits the production of HIV-1 particles by sequestering Gag to intracellular endosomal compartments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Virology	6. 最初と最後の頁 836125 ~ 836125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fviro.2022.836125	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 -

1. 著者名 Okutomi Toshiki, Minakawa Satoko, Hirota Riku, Katagiri Koko, Morikawa Yuko	4. 巻 12
2. 論文標題 HIV reactivation in latently infected cells with virological synapse-like cell contact	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 417 ~ 417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v12040417	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------