

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390115

研究課題名(和文)無細胞蛋白質合成技術を活用した抗HIV分子標的治療薬の創出

研究課題名(英文)A comprehensive protein interaction analysis for developing new therapeutic targets in HIV infection using cell-free protein synthesis technology

研究代表者

梁 明秀 (RYO, Akihide)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20363814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では我々が独自に開発したタンパク質相互作用解析技術を活用し、HIV-1 Vifによる抗ウイルス因子APOBEC3G (A3G) のユビキチン化および分解を阻害する因子としてASK1を同定した。ASK1はVifのBC-Boxに結合し、VifがA3Gをユビキチン化する際に必要な補助因子であるEloB/Cの結合を阻止した。また、抗HIV薬の一つであるAZTがASK1の発現を増加させることを見いだした。AZTを添加したT細胞では、ASK1の発現上昇とともにVifの活性低下が認められた。AZTには逆転写阻害活性だけでなく、ASK1を介した宿主抗ウイルス活性を増強させる作用があることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we took advantage of the comprehensive protein interaction analysis using cell-free protein synthesis technology. We established an assay system for monitoring the functional interaction between HIV accessory proteins and intrinsic anti-virus host factors. Using this system, we found that apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) interferes with the counteraction of Vif and revitalizes the A3G-mediated viral restriction. ASK1 binds the BC-box of Vif, thereby disrupting the assembly of the Vif-ubiquitin ligase complex. Consequently, ASK1 stabilizes A3G and promotes its incorporation into viral particles, ultimately reducing viral infectivity. Furthermore, treatment with the antiretroviral AZT (zidovudine) induces ASK1 expression and restores the antiviral activity of A3G in HIV-1-infected cells. This study thus demonstrates a distinct function of ASK1 in restoring the host antiviral system that can be enhanced by AZT treatment.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス タンパク質 プロテオーム 酵素 バイオテクノロジー HIV 宿主因子

### 1. 研究開始当初の背景

HIV-1 感染はいまだ世界的に拡大傾向にあり、日本においても感染者数は依然として増加傾向が続いている。多剤併用両方(cART)の出現によりウイルス複製はある程度制御することが可能になったものの、現治療では根治ができないため、生涯高価な薬を飲み続けなければならない。そのため長期服用による副作用や薬剤耐性株の出現が大きな問題となっている。また、長期療養にともなう患者のアドヒアランスや医療経済の問題、さらには日和見感染症や免疫再構築症候群、悪性腫瘍の発症等、医学的かつ社会的にも未解決な問題が山積している。これらの根本的な克服には、ウイルスの増殖や病原性を引き起こす病態メカニズムを詳細に解明し、そのエビデンスに基づいた創薬開発が必要である。一方、ウイルス複製を強力かつ効果的に阻止する内因性抗レトロウイルス宿主因子と、その機能を拮抗的に阻害するウイルスタンパク質との相互作用は、進化の過程でウイルスが自己複製実現のため獲得した形質として注目されている。本相互作用を治療標的にすることで、ヒトが本来有する抗ウイルス活性を回復させ、効果的にウイルス感染を阻止することが可能となると考えられる。

### 2. 研究の目的

HIV 感染症の根本的な克服には、宿主-ウイルス相互作用に基づいたウイルス増殖機構や病原性発現メカニズムを詳細に解明し、そのエビデンスに基づいた薬剤標的設定を行うことが必要である。本研究課題では我々が独自に開発した無細胞タンパク質合成技術を駆使し、HIV タンパク質と内因性抗レトロウイルス宿主因子との機能的相互作用を阻害する因子や化合物の同定を目指す。これにより、宿主細胞が有する抗ウイルス活性を増強させることで HIV の複製を阻止する新規の治療戦略の開発に向けた基盤研究を実施する。

### 3. 研究の方法

#### (1)無細胞合成系を用いた宿主-ウイルスタンパク質複合体の再構成

HIV アクセサリータンパク質および宿主タンパク質の全長 cDNA を、無細胞タンパク質発現ベクター pEU-His-ORF-bIs (bIs; biotin ligation site GLNDIFEAQKIEWHE, S1: linker sequence LHPPPPRIS) にサブクローニングを行い、コムギ無細胞発現ベクターを作製した。作製した pEU ベクターを鋳型に SPU primer 及び AODA2303 primer を用いて PCR 法により転写鋳型を作製し、SP6 polymerase を用いた転写反応により mRNA を合成、続いてコムギ無細胞合成系・重層法によりタンパク質合成を行った。合成時には、界面活性剤である Brij35 や塩化亜鉛  $ZnCl_2$  の添加によりウイルスタンパク質の可溶化を亢進させた。タンパク質のビオチン化は、下層にコムギ無細胞

系で合成した biotin ligase 1 $\mu$ l (~50ng/ $\mu$ l) および 終濃度 0.5 $\mu$ M Biotin を加えることにより行った。

#### (2)HIV-宿主タンパク質相互作用アッセイ系の構築

無細胞タンパク質合成技術を用いて作製した APOBEC3G、Tetherin/BST2、SAMHD1 などの宿主抗ウイルス因子およびそれらの拮抗因子であるウイルスタンパク質 (Vif, Vpu, Vpx) の相互作用について、アルファスクリーンを用い高感度かつハイスループットな検出系を構築した。アッセイ系の具体的な原理としては、Flag タグを融合したウイルスタンパク質と、biotin 化標識をした宿主因子をそれぞれ合成し、各タンパク質と宿主性因子または化合物を混和後、アルファスクリーンを用いてエネルギー転移による相互作用シグナルを検出することで、相互作用を阻害する因子または化合物を同定した。アルファスクリーンは、ドナーとアクセプターの 2 つのビーズを使用し、ドナービーズに結合した分子が、アクセプタービーズに結合した分子と生物学的に相互作用し、2 つのビーズが近接した状態 (200nm 以下) の時にのみ、発光シグナルを検出することができる (図参照)。



図. アルファスクリーンを用いた Vif-A3G相互作用アッセイ系

#### (3)HIV-宿主相互作用を標的とした化合物スクリーニング

HIV-宿主タンパク質相互作用を阻害する化合物の効率的なスクリーニング系を、アルファスクリーンを用いて構築し、HIVアクセサリー

タンパク質VifとAPOBEC3G (以下A3G)の相互作用を阻害する因子および低分子化合物の探索を実施した。本研究室所有の約1万5千種類の化合物ライブラリー(エナミン社)を10 $\mu$ M含有したバッファー内でアルファスクリーンを行い、顕著な親和性阻害を起こしたものを選択し、細胞を用いた2次スクリーニングにおいて選別した。

(4)HIV感染実験およびウイルス感染価の測定  
HEK293細胞を6ウェルプレートで培養し、pNL4-3 $\Delta$ Env-GFPまたはpNL4-3 $\Delta$ Env $\Delta$ Vif-GFP(各1 $\mu$ g)とpVSV-G(400 ng)および宿主因子をトランスフェクションした。48時間後に細胞上清を回収し、細胞上清中のp24抗原をELISAキット(Zepto Metrix)を用いて定量した。5 ngのGag p24で調整した細胞上清をM8166細胞培養系に添加し、24時間後にフローサイトメーターを用いてGFP陽性細胞をカウントした。

(5)タンパク質の構造予測とドッキングシミュレーション

ヒトASK1のカルボキシル末端部(CT)の立体構造を、分子オペレーティング環境ソフトウェアI-TASSERソフトウェアv2.1により解析し推定した。Vif(PDB:4N9F)とASK1 CTのドッキングシミュレーションはClusPro2.0ドッキングシミュレーションサーバを使用した。得られた結合予測部位について点変異体を作製し、GSTプルダウン法またはAlphaScreenを用いて結合活性を確認した。

#### 4. 研究成果

(1)Vif-A3Gの機能的相互作用を阻害する化合物の探索と同定

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成技術(ENDEXTテクノロジー)を活用し、HIVタンパク質および宿主タンパク質群の合成と、それらの相互作用を指標とした新たな薬剤アッセイ系の構築を行った。本アッセイ系を活用し、約1万5千種類の低分子化合物ライブラリーをスクリーニングした結果、約15種類のヒット化合物を得た。これらの薬剤および周辺化合物についてHIV感染細胞における抗ウイルス複製活性を測定したところ、2種類の化合物が期待された作用機序をもって顕著にウイルス複製を阻止することが明らかとなった。これらの化合物は強力なウイルス阻害活性をもち、ウイルス粒子内へのA3Gの取り込みを顕著に増加させた。また、T細胞におけるHIV複製を効果的に抑制することが示された。2種類の化合物は、IC<sub>50</sub>が1 $\mu$ M以下であり、創薬に向けた開発研究を準備中である。

(2)Vif-A3Gの機能的相互作用を阻害する因子の探索と同定

HIVアクセサリタンパク質はI型インターフェロン(IFN)誘導性の宿主免疫応答に拮抗してHIVの効率的な複製を促進するが、アクセサリタンパク質自身の制御機構については未解明な点が多い。我々はアクセサリタンパク質Vifの機能制御に関わる宿主プロテインキナーゼを探索したところ、Vifのユビキチンリガーゼ活性を負に制御する宿主キナーゼとしてASK1(Apoptosis Signal-regulating Kinase 1)を同定した。VifはELOB/C、CUL5などとE3複合体を形成して抗HIV因子APOBEC3Gをユビキチン-プロテアソーム系により分解する機能を持つことが知られているが、ASK1はVif内のよく保存されたBC-Box領域に結合し、VifのE3複合体形成能を低下させる機能をもつことが示唆された。コンピュータを用いたドッキングシミュレーションを実施した結果、ASK1はVif BC-Box内のSLQモチーフと相互作用することが示唆され、その部位の点変異を入れたVifはASK1と結合できないことが示された。また、興味深いことに、既存の抗HIV薬(逆転写酵素阻害剤)の一つであるアジドチミジン(azidothymidine, AZT)がASK1の発現を増加させることが明らかとなった。AZTを添加したT細胞では、ASK1の発現上昇に伴ってVifの活性低下が見られるとともに、産生されたウイルス粒子内にA3Gの取り込みが増加した。またこれらのウイルスゲノムにはA3Gによると考えられるA/Gの変異が多く認められた。このことから、AZTには本来の作用である逆転写阻害活性だけでなく、ASK1を介したVifの機能阻害という予想外の作用を持つことが明らかとなった。

(3)無細胞タンパク質合成系を用いた宿主-ウイルスタンパク質複合体の再構成および相互作用阻害因子の探索と同定

アルファスクリーンを用いて、宿主抗ウイルス因子群(Tetherin, SAMHD1)とそれらの拮抗因子として作用するウイルスタンパク質群(Vpu, Vpx)との相互作用を高感度に検出するアッセイ系を構築し、それらの相互作用を阻止する宿主因子を同定した。今回はTetherin-Vpu、SAMHD1-Vpxの拮抗的相互作用に着目し、これらの相互作用を負に制御する新たな宿主因子の探索を行った。具体的には、上記のコムギ無細胞系にて発現したリコンビナントタンパク質を用いたアルファスクリーンに加えて、ヒトユビキチンリガーゼライブラリーを用いた発現スクリーニングを採用することにより、より効率的に候補タンパク質の絞り込みを行った。その結果、*in vitro*および*in vivo*においてVpuおよびVpxのユビキチン化を司る宿主因子群を同定することができた。Vpxの分解を促進するユビキチンリガーゼとして同定されたH11およびSMURF2は、胎盤の合胞体性トロホプラストにおいて高い発現を示したことから、本因子群が胎盤におけるHIV母子垂直感染を抑制する

因子である可能性が示唆された。また、Vpu をユビキチン化して分解に導く新規ユビキチンリガーゼとして同定された March1 は感染モデル細胞において Tetherin 依存的な抗 HIV 活性を示し、ウイルスの粒子の産生を顕著に抑制することが示唆された。

#### 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7件)

Miyakawa K, Matsunaga S, Kanou K, Matsuzawa A, Morishita R, Kudoh A, Shindo K, Yokoyama M, Sato H, Kimura H, Tamura T, Yamamoto N, Ichijo H, Takaori-Kondo A, Ryo A: ASK1 restores the antiviral activity of APOBEC3G by disrupting HIV-1 Vif-mediated counteraction. *Nat. Commun.* 2015 Apr 22;6:6945. DOI: 10.1038/ncomms7945. 査読有.

Furukawa A, Sugase K, Morishita R, Nagata T, Kodaki T, Takaori-Kondo A, Ryo A, Katahira, M. Quantitative analysis of the location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014 Feb 24;53(9):2349-52. DOI: 10.1002/anie.201309940. 査読有.

Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno S, Yamamoto N, Ryo A. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology.* 2014 Jan 22;11:9. DOI: 10.1186/1742-4690-11-9. 査読有.

Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A. Generation of Rhesus Macaque-Tropic HIV-1 Clones That Are Resistant to Major Anti-HIV-1 Restriction Factors. *J. Virol.* 2013 Nov;87(21):11447-11461. DOI: 10.1128/JVI.01549-13. 査読有.

Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Tokarev A, Quinn G, Kimura H, Nomaguchi M, Adachi A, Yamamoto N, Guatelli J, Ryo A. Interferon-Induced SCYL2 Limits Release of HIV-1 by Triggering PP2A-Mediated Dephosphorylation of the

Viral Protein Vpu. *Sci. Signal.* 2012 Oct 9;245(5):ra73. DOI: 10.1126/scisignal.2003212. 査読有.

Furukawa A, Okamura H, Morishita R, Matsunaga S, Kobayashi N, Ikegami T, Kodaki T, Takaori-Kondo A, Ryo A, Nagata T, Katahira M. NMR study of xenotropic murine leukemia virus-related virus protease in a complex with amprenavir. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Aug 24;425(2):284-9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.083. 査読有.

Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J. Proteomics.* 2012 Aug 3;75(15):4863-73. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.05.047. 査読有.

##### [学会発表](計12件)

宮川 敬, 松永智子, 渡士幸一, 杉山真也, 溝上雅史, 脇田隆字, 梁 明秀: 宿主防御因子 Tetherin/BST2 による B 型肝炎ウイルス感染抑制とその回避機構の解明. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月 10-12 日, パシフィコ横浜(神奈川県)

Ayumi Kudoh, Kei Miyakawa, Satoko Matsunaga, Isao Kosugi, Ryo Akihide: H11/HSPB8 confers HIV resistance to Human placental trophoblasts. The 13<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara, 2014 年 9 月 23-26 日, 奈良県新公会堂(奈良).

Satoko Matsunaga, Ayumi Kudoh, Hirokazu Kimura, Akihide Ryo: Wheat germ cell-free system-based production of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of human parainfluenza virus type3 for generation and characterization of monoclonal antibody. Protein Island Matsuyama (PIM) International Symposium 2014, 2014 年 9 月 15-17 日, 愛媛大学(愛媛).

宮川 敬, 松永智子, 工藤あゆみ, 梁明秀: Vpx のリン酸化は HIV 感染を制御する. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2013 年 11 月 20-22 日, 熊本市市民会館(熊本).

工藤あゆみ, 宮川 敬, 松永智子, 小杉伊三夫, 梁 明秀: Vpx の機能抑制的に作用する宿主因子の同定とその作用機

序. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸国際会議場 (兵庫).

Mayu Miyamoto, Satoko Matsunaga, Kei Miyakawa, Akihide Ryo: Wheat germ cell-free protein production of human immunodeficiency virus accessory protein Vif. 第 12 回ヒトプロテオーム機構国際会議, 2013 年 9 月 14-18 日, パシフィコ横浜(神奈川).

Akihide Ryo : A proteomic approach to decipher the molecular link between HIV-1 Gag and host proteins. 第 12 回ヒトプロテオーム機構国際会議, 2013 年 9 月 14-18 日, パシフィコ横浜(神奈川).

Kei Miyakawa, Satoko Matsunaga, Ayumi Kudoh, Akihide Ryo: Identification and characterization of Vpx-interacting host protein kinases. CSHL Meeting, Retroviruses, 2013 年 5 月 21-24 日, New York (America).

工藤あゆみ, 宮川 敬, 松永智子, 森下了, 早川 智, 梁 明秀 : HIV アクセサリータンパク質 Vpx と相互作用する宿主因子の網羅的探索と機能解析. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2012 年 11 月 24 - 26 日, 慶應義塾大学(神奈川).

宮川 敬, 森下 了, 道場生基, 松永智子, 工藤あゆみ, 高折晃史, 梁 明秀 : HIV-1 Vif-APOBEC3G の相互作用を調節する新規宿主因子の同定. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2012 年 11 月 24 - 26 日, 慶應義塾大学(神奈川).

佐藤 遥, 宮川 敬, 工藤あゆみ, 梁明秀 : HIV-1 Vpu の翻訳後修飾とその意義. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2012 年 11 月 24 - 26 日, 慶應義塾大学(神奈川).

工藤あゆみ, 高濱正吉, 澤崎達也, 梁明秀 : Atypical protein kinase C による HIV-1 Gag Ser487 のリン酸化はウイルス感染性を増強する. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月 13-15 日, グランキューブ大阪(大阪).

〔その他〕

報道、プレス発表

梁 明秀 : 横浜市立大学、HIV と宿主との関係を解明, 神奈川新聞 (2014 年 6 月 13 日)

京都大学、横浜市立大学 他 : A3G タン

パク質はエイズウイルスを効率的に破壊できる, マイナビニュース他 (2014 年 1 月 31 日)

梁 明秀 : HIV の増殖, 人体のたんぱく質が関与, 日経産業新聞 (2013 年 2 月 1 日)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梁 明秀 (RYO, Akihide)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号 : 20363814