

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32503

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590557

研究課題名(和文) HIV-1複製制御に係わる宿主因子の解析と HIV-1治療薬の探索

研究課題名(英文) Screening for novel host factors that regulate HIV-1 replication

研究代表者

高久 洋 (Takaku, Hiroshi)

千葉工業大学・附属研究所・専任研究員

研究者番号：50101267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではHsp70によるウイルス複製制御機構を明らかにし、HIV-1の感染・増殖を是正する方策を探った。その結果、宿主内因子であるHsp70はHIV-1感染細胞でも内在APO3Gを発現している細胞においてVifによるAPO3G分解を抑制し、HIV-1の粒子へのAPO3Gの取り込みを促進することで、HIV-1の感染性が著しく減弱した。PGA1が新規エイズ治療薬の候補と期待される結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We investigated a new role of prostaglandin A1 (PGA1) in the replication of HIV-1 in non-permissive cells. Because overexpression of HSP70 blocks the viral infectivity factor (Vif)-mediated degradation of APOBEC3G (A3G) via the ubiquitin-proteasome pathway, we examined the effects of PGA1 on A3G and HIV-1 replication. The induction of HSP70 synthesis by PGA1 blocked Vif-mediated A3G degradation and enhanced the incorporation of A3G into both wild-type and Vif-deficient viruses. Furthermore, we determined the viral titer of HIV-1 particles produced from PGA1-treated 293T cells. The induction of HSP70 synthesis by PGA1 significantly reduced the viral titer in the presence of A3G. Additionally, the p24 Gag antigen levels were dramatically reduced in non-permissive cells treated once or repeatedly with PGA1. These results suggest that a new mechanism used by prostaglandins may aid in the search for novel anti-retroviral drugs.

研究分野：分子生物学、ウイルス学

キーワード：APOBEC3G HSP70 HIV-1 HIV-1 Vif PGA1 non-permissive cells MAGI cells 宿主内因子

## 1. 研究開始当初の背景

エイズは多剤併用療法 (ART) によりエイズ発症阻止に効果を上げている一方で、ART では HIV を体内から完全に排除できず、恒常的に抗 HIV 薬を服用する必要がある。さらに、薬剤の副作用、あるいは薬剤耐性 HIV の発生と蔓延による治療効果の低減を考えると新たな医療法の開発が切望される。AIDS の原因ウイルスである HIV-1 の増殖・複製は宿主因子由来たんぱく質により正または負に制御されている。一方 HIV-1 はウイルス複製を負に制御する宿主因子の機能を相殺するウイルス由来タンパク質をコードしている。新規抗 HIV 薬の開発には、ウイルス複製を詳細に解明する必要があり、それには HIV-1 複製を負に制御する新たな因子を同定する必要がある。

## 2. 研究目的

宿主内分子シャペロン、heat shock protein (Hsp) は熱ショックや UV、微生物・ウイルス感染などのストレスに関連する様々な刺激により発現され、従来、タンパク質のフォールディングやトランスロケーション、さらにタンパク質の不可逆凝集の防止といった重要な役割を果たしている。今までに、申請者は熱ショックタンパク質がウイルスの複製を正または負に制御するかを解析することに取り組んできた。本研究では培養細胞による HIV-1 感染・増殖系を活用して、HIV-1 増殖を制御する宿主要因や宿主側の機能変化について様々な観点から分子レベルでの解析を行うことである。それにより HIV-1 感染・増殖に係わる宿主要因の全体像を解明し、HIV-1 感染症に対する新たな治療法の開発に道を開く。特に細胞内で多彩な機能を発揮する宿主因子・熱ショックタンパク質によるウイルス複製制御機構を明らかにし、HIV-1 による感染・増殖を是正する方策を探る。

## 3. 研究方法

(1) 細胞内における Hsp70-APOBEC3G (A3G) または HIV-1-Vif との相互作用を免疫沈降法で解析した。(2) Hsp70 強発現下 HIV-1 感染細胞での HIV-1-Vif による APOBEC3G 分解抑制機構の解析をポリユビキチン化法で検討した。(3) Hsp70 knock-down 細胞における APOBEC3G の安定性に対する内在性 Hsp70 の影響を RNAi 法を用いて確認した。(4) 内在性 APOBEC3G 発現 T 細胞における Hsp70 による HIV-1-Vif 依存的 APOBEC3G 分解抑制機構を解析するために免疫沈降法を行い、western blotting 法で確認した。(5) HIV-1 感染細胞系での Hsp70 による APOBEC3G 依存的 HIV-1 複製制御機構の解析を MAGI 細胞に HIV-1 を感染させ、感染 2 日後に TCID<sub>50</sub> を算出した。(6) エイズ治療に対する新薬としての Hsp70 発現誘導低分子化合物の探索とその抗 HIV-1 活性の評価を HIV-1 感染 permissive 細胞 と non-permissive 細胞を

用いて検討した。

## 4. 研究結果

(1) Hsp70 による Vif 存在下における APOBEC3G 安定性の検討。293T 細胞中に Hsp70 を強発現すると Hsp70 発現量依存的に APOBEC3G 発現量が増加した。また、pNL4-3 ではなく Vif 遺伝子を欠損させた HIV-1 感染性分子クローン発現プラスミド pNL4-3 Vif を transfection した 293T 細胞では、Hsp70 は APOBEC3G の発現に影響を与えなかった (図 1)。この結果より、これまでの報告と同様に Vif のある HIV-1 (野生型 HIV-1) プロウイルスを transfection した細胞では、APOBEC3G の分解が確認されたが、Hsp70 を強発現させた場合、Hsp70 発現量依存的に APOBEC3G の発現量が回復したことから、Hsp70 は APOBEC3G を安定化に寄与することが明らかとなった。以上の結果から、Hsp70 は Vif による APOBEC3G の分解を阻害することが示唆された。

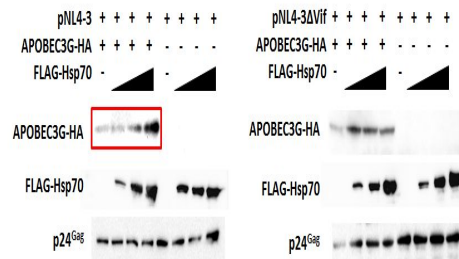


図 1 . Hsp70 による Vif 存在下における APOBEC3G 安定性

つぎに、Hsp70 の発現が Vif による APOBEC3G の分解に対して直接作用するのか検討するために、293T 細胞に Vif 発現プラスミド pcDNA-Vif (または empty plasmid) および pcDNA-APOBEC3G-HA (または pcDNA3.1)、pFLAG-Hsp70 (または empty plasmid) を co-transfection した。Transfection 後に細胞溶解物を回収し、western blotting 法により APOBEC3G および Hsp70、Vif、β-actin の発現を確認した。その結果、Hsp70 発現量依存的に Vif 存在下における APOBEC3G の定常的な発現レベルが増加した。一方、Hsp70 は Vif 非存在下においては APOBEC3G の発現量に対して影響を与えなかった。これらの結果は、APOBEC3G の発現に対する Hsp70 の影響は Vif 依存的であることを示唆している。

(2) 宿主細胞内における Hsp70-APOBEC3G または HIV-1-Vif との相互作用の解析。Hsp70-APOBEC3G または HIV-1-Vif との相互作用を、Vif 変異体ベクターを構築して細胞に導入し、免疫沈降法で確認したところ、Hsp70 は Vif が APOBEC3G を結合するのに重要である Vif の N 末端領域 (a. a. 1-107) に結合することで、APOBEC3G と Vif の結合を阻害することを明らかにした。

**(3) Hsp70強発現下HIV-1感染細胞でのHIV-1-Vif によるAPOBEC3G分解抑制機構の解析。** VifによるAPOBEC3Gの分解にはAPOBEC3Gがポリユビキチン化される必要があることから、VifによるAPOBEC3Gのポリユビキチン化に対するHsp70の影響を検討した。Hsp70はVifのN末端及びAC3Gの128-130番残基を含む領域に結合することでA3GとVifの結合を阻害し、VifによるA3Gの分解を抑制した。即ち、Hsp70はVifによるAPOBEC3Gのポリユビキチン化を阻害する機能を有していることをはじめて明らかにした(図2)。つぎに、内依存性Hsp70がHIV-1-Vif によるAPOBEC3G分解を制御しているかを検討した。pNL4-3をtransfectionした293T細胞中にHsp70を強発現するとHsp70発現量依存的にA3G発現量が増加した。また、Vif遺伝子を欠損させたHIV-1感染性分子クローン発現プラスミドpNL4-3 Vifをtransfectionした293T細胞では、Hsp70はAPOBEC3Gの発現に対する影響は見られなかったことから、HIV-1-Vif によるAPOBEC3G分解を内依存性Hsp70が制御していることが明らかとなった。

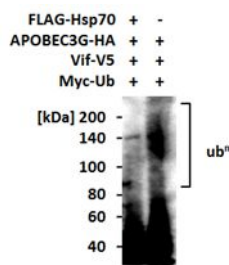


図2 .Hsp70の発現はAPOBEC3Gのポリユビキチン化を阻害

**(4) ヒト由来のHsp70によるAPOBEC3G発現への影響。** ヒト由来のHsp70によるAPOBEC3G発現への影響についての報告例はないが、微生物由来のHsp70がAPOBEC3GのmRNA発現を上昇させることが既に報告されている。そこで、この可能性を除外するために pulse-chase assay を行った。293T細胞に pcDNA-APOBEC3G-HA およびV5タグを付加したVif発現プラスミド pVif-V5、FLAG-Hsp70 さらにtransfection効率を標準化するために GFP発現プラスミド pCS-CDF-CG-PRE を co-transfectionした。Transfection後、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドで処理し、細胞溶解物を回収し、western blotting法によりAPOBEC3GおよびGFPの発現を確認した。その結果、pcDNA-APOBEC3G-HA およびpFLAG-Hsp70をtransfectionした際にはAPOBEC3G発現への影響は見られなかったことから、ヒトHsp70はAPOBEC3Gの発現に影響を与えないことが明らかとなった。さらに、これまでに報告があるように、pcDNA-APOBEC3G-HA およびpVif-V5をtransfectionした場合、APOBEC3Gの検出レベルが減少した事実からVif存在下においてAPOBEC3Gが分

解されたことが明らかとなった。一方で、pcDNA-APOBEC3G-HA および pVif-V5、pFLAG-Hsp70 を transfection した場合、APOBEC3Gの検出レベルは減少しなかったことから、Hsp70の発現はVifによるAPOBEC3Gの分解を著しく抑制することが示唆された。これらの結果より、ヒトのHsp70は微生物由来のHsp70のようにAPOBEC3Gの発現量を増加させることはなく、ヒトHsp70の発現はVifによるAPOBEC3Gの分解を著しく抑制することが明らかとなった。

**(5) 内在性APOBEC3G発現T細胞におけるVifのAPOBEC3G分解に対するHsp70による分解抑制効果の解析。** 内在的にAPOBEC3Gを発現しているnon-permissive細胞におけるHsp70によるVifのAPOBEC3G分解に対する影響を検討した。Hsp70強発現下においてVifによるAPOBEC3G分解を抑制するか検討するために、FLAG-Hsp70発現レンチウイルスベクターCS-FLAG-Hsp70およびVif-V5発現レンチウイルスベクターCS-Vif-V5、コントロールとしてCS-MCS (empty lentiviral vector) を作製した。作製したCS-FLAG-Hsp70またはCS-MCSをnon-permissive細胞であるH9細胞に感染させた。その結果、Vif非発現下においてはAPOBEC3Gの発現に差は見られなかったのに対し、Vif発現下においてはFLAG-Hsp70を発現させた際にはAPOBEC3Gの発現が上昇したことから、non-permissive細胞においてもHsp70はVifによるAPOBEC3G分解を抑制することが明らかとなった(図3)。以上の結果から、内在性APOBEC3G発現T細胞においてもHsp70はVifによるAPOBEC3Gの分解を抑制する機能を有していることが明らかとなった。

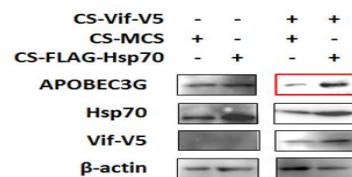


図3 . Hsp70をknock-downした内在性APOBEC3G発現T細胞におけるVifのAPOBEC3G分解に対する影響

**(6) Hsp70によるAPOBEC3G依存的なHIV-1感染抑制効果の解析。** Hsp70はVifによりAPOBEC3Gの分解を抑制することが明らかとなったことから、Vif存在下においてもAPOBEC3GはHIV-1粒子へ取り込まれ、さらにHIV-1の感染性は抑制されると考えられる。そこで、293細胞にpNL4-3(またはpNL4-3 Vif)およびpcDNA-APOBEC3G-HA(またはempty plasmid)、pFLAG-Hsp70(またはempty plasmid)をco-transfectionした。Transfection後に細胞溶解物並びにウイルスを含んでいる上清(HIV-1粒子)を回収し、



western blotting 法により細胞内の APOBEC3G の発現および HIV-1 粒子内への APOBEC3G の取り込みを確認した。その結果、pNL4-3 では Hsp70 発現量依存的に HIV-1 粒子への APOBEC3G の取り込みが増加していた。これは細胞内の Vif による APOBEC3G の分解が Hsp70 により抑制されたためである。つぎに、MAGI assay により作製した HIV-1 の感染性を検討した。MAGI 細胞に作製した HIV-1 を感染させ、感染 2 日後に TCID<sub>50</sub> を算出した(図 4)。図 4 が示すように APOBEC3G 発現下において Hsp70 発現量依存的に HIV-1 の感染性を抑制した。この結果は、HIV-1 粒子への APOBEC3G の取り込み量に相関していることから、Hsp70 は APOBEC3G 依存的に HIV-1 の感染性を抑制することが示唆された。

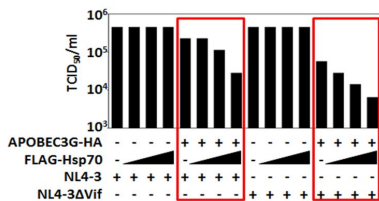


図 4 . HIV-1 感染性に対する Hsp70 の影響 (MAGI assay)

**(7) エイズ治療に対する新薬としての Hsp70 発現誘導低分子化合物の探索とその抗 HIV-1 活性の評価。** cyclopentenone prostanoids ファミリーであり、生体内に幅広く分布する prostaglandin (PG) に注目した、PG はウイルス感染時に、炎症や腎機能と流動調節、血液凝固と血小板凝集等の生理活性を有する物質である。特に血圧低下作用を有する prostaglandin A<sub>1</sub> (PGA<sub>1</sub>) は、ヘルペスウイルスなどの感染時にタンパク質の翻訳を遮断すると同時に二重鎖 RNA の合成を阻害することが報告されている。また、タンパク質のフォールディングや輸送、集合、分解等の細胞機能制御に関与する heat shock protein 70 (HSP70) の発現を促す作用がある。そこで本研究では、HSP70 誘導剤である PGA<sub>1</sub> による HIV-1 複製抑制効果を検討した。はじめに、PGA<sub>1</sub> 処理した 293T 細胞に APOBEC3G 発現プラスミドおよび HIV-1<sub>NL4-3</sub> または HIV-1<sub>NL4-3</sub> Vif 発現プラスミドを co-transfection し、細胞内の APOBEC3G 発現および HIV-1 粒子への APOBEC3G 取り込みを検討したところ、HSP70 の誘導が確認されたのと同時に、Vif による APOBEC3G 分解が抑制された(図 5)。

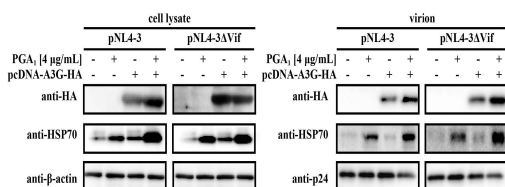


図 5 . PGA<sub>1</sub> による A3G の分解制御

また、H9 細胞を用い PGA<sub>1</sub> による HIV-1 抑制効果を検討した結果、PGA<sub>1</sub> を処理することで HIV-1<sub>NL4-3</sub> の複製を有意に抑制した(図 6)。この際、HIV-1<sub>NL4-3</sub> 感染 H9 細胞における内在性 APOBEC3G の発現を評価した結果、PGA<sub>1</sub> 処理により APOBEC3G の分解は抑制されていた。

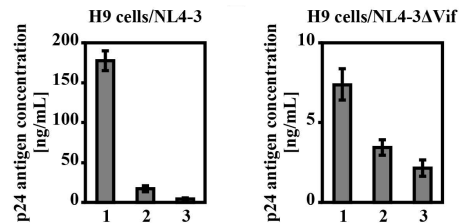


図 6 H9 細胞を用い PGA<sub>1</sub> による HIV-1 抑制効果 (レーン 1 : PGA<sub>1</sub> 未処理 ; レーン 2 : PGA<sub>1</sub> で 1 回処理 ; レーン 3 : PGA<sub>1</sub> で 2 回処理)

さらに、H9 細胞および CEM 細胞への HIV-1<sub>NL4-3</sub> 感染実験を行った結果、PGA<sub>1</sub> 処理により感染 14 日目においても p24<sup>Gag</sup> 抗原は検出限界以下であった。以上の結果より、HSP70 誘導剤である PGA<sub>1</sub> は、Vif による A3G の分解を抑制することで、HIV-1 複製を著しく抑制することが分かった(図 7)。

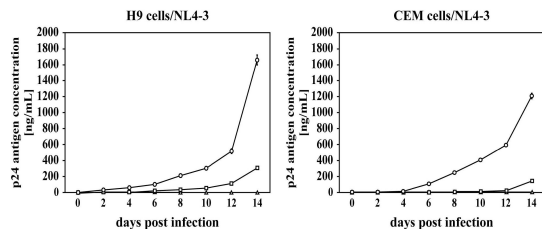


図 7 .PGA<sub>1</sub> による non-permissive T 細胞下における HIV-1 活性の評価

**まとめ。** Hsp70 は HIV-1 粒子への APOBEC3G の取り込みを促進し、APOBEC3G 依存的に HIV-1 感染性を抑制した。さらに、内在的に APOBEC3G を発現している細胞においても Hsp70 が Vif による APOBEC3G の分解を抑制することを確認した。これらの知見を基に、既存の抗 HIV 薬とは異なる作用点をもつ新規抗 HIV-1 創薬として宿主因子 Hsp70 の発現を誘導する低分子化合物の開発へと展開したところ、プロスタグランジン類に属するプロスタグランジン A<sub>1</sub> が宿主因子 Hsp70 を誘導し、HIV-1 感染細胞でも APOBEC3G の分解を抑制し、APOBEC3G の HIV-1 粒子への取り込みを促進することで、HIV-1 の感染性が著しく減弱することを明らかにした。最終的に本研究では、既存の抗 HIV 薬とは異なる作用点をもつ新規抗 HIV-1 薬としてプロスタグランジン A<sub>1</sub> の開発に成功した。

## 5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 8 件)

1 Nishitsuji H, Sawada L, Sugiyama R, Takaku H, ZNF10 inhibits HIV-1 LTR

- activity through interaction with NF- $\kappa$ B and Sp1 binding motifs, FEBS Lett., 査読有, in press.
- 2 Tsukimoto A, Sugiyama R, Abe M, Nishitsuji H, Shimizu Y, Shimotohno K, Kawai G, Takaku H. A new role for PGA1 in inhibiting hepatitis C virus-IRES-mediated translation by targeting viral translation factors, Antiviral Res., 査読有, Vol. 117, No. 5, 2015, pp.1-9.  
DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.01.013.
  - 3 Shimizu Y, Nishitsuji H, Marusawa H, Ujino S, Takaku H, Shimotohno K, The RNA-editing enzyme APOBEC1 requires heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q isoform 6 for efficient interaction with interleukin-8 mRNA, J. Biol. Chem., 査読有, Vol. 289, No. 9, 2014, pp.26226- 26238.  
DOI: 10.1074/jbc.M114.563221.
  - 4 Sugiyama K, Ebinuma H, Nakamoto N, Sakasegawa N, Murakami Y, Chu PS, Usui S, Ishibashi Y, Wakayama Y, Taniki N, Murata H, Saito Y, Fukasawa M, Saito K, Yamagishi Y, Wakita T, Takaku H, Hibi T, Saito H, Kanai T, Prominent steatosis with hypermetabolism of the cell line permissive for years of infection with hepatitis C virus, PLoS One, 査読有, Vol. 9, No. 4, 2014, pp.e94460.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0094460
  - 5 Sugiyama R, Abe M, Nishitsuji H, Murakami Y, Takeuchi H, Takaku H. Induction of heat-shock protein 70 by prostaglandin A<sub>1</sub> inhibits HIV-1 Vif-mediated degradation of APOBEC3G, Antiviral Res., 査読有, Vol. 99, No. 9, 2013, pp.307-311.  
DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.06.017.
  - 6 Kato K, Senoki T, Takaku H. Inhibition of HIV-1 replication by RNA with a microRNA-like function, Int J Mol Med., 査読有, Vol. 31, No. 1, 2013, pp.252-258.  
DOI: 10.3892/ijmm.2012.1170.
  - 7 Noguchi K, Ishibashi K, Miyokawa K, Hokari M, Kanno T, Hirano T, Yamamoto N, Takaku H. HIV-1 suppressive sequences are modulated by Rev transport of unspliced RNA and are required for efficient HIV-1 production, PLoS One, 査読有, Vol. 12, No. 7, 2012, e51393.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0051393.
  - 8 Nishitsuji H, Abe M, Sawada R, Takaku H. ZBRK1 represses HIV-1 LTR-mediated transcription, FEBS Lett., 査読有, Vol. 586, No. 10, 2012, 3562-3568.  
DOI: 10.1016/j.febslet.2012.08.010.
- transcription, 第 62 回日本ウイルス学術集会、2014 年 11 月 10 日~2014 年 11 月 12 日、パシフィコ横浜会議センター(神奈川県、横浜市)
- 2 杉山 隆一、阿部 真、西辻 裕紀、村上優子、武内 寛明、高久 洋、HSP70 誘導剤:ProstaglandinA<sub>1</sub> による新規 HIV-1 複製抑制機構の解明、第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、2014 年 05 月 07 日~2014 年 05 月 09 日、ハイランドリゾートホテル(山梨県、富士吉田市)
  - 3 長沼 晴樹、杉山 隆一、阿部 真、西辻裕紀、小関 寛、村上 優子、武内 寛明、高久 洋、HSP70 誘導剤である ProstaglandinA<sub>1</sub> による新規 HIV-1 複製抑制機構の解明、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日~2013 年 11 月 12 日、神戸国際会議場(兵庫県、神戸市)
  - 4 阿部 真、西辻 裕紀、谷口 善則、渡退宇裕、高久 洋、BST2 の抗 HIV-1 活性における ATP1B3 の影響、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日~2013 年 11 月 12 日、神戸国際会議場(兵庫県、神戸市)
  - 5 Leila Sawada, 西辻 裕紀, 阿部 真, 高久 洋、Evaluation and identification of KRAB-Zinc finger protein influence on HIV-1 gene expression, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日~2013 年 11 月 12 日、神戸国際会議場(兵庫県、神戸市)
  - 6 杉山 隆一、西辻 裕紀、村上 優子、武内 寛明、脇田 隆宇、高久 洋、HSP70 誘導剤;Prostaglandin A<sub>1</sub> は HIV-1 Vif による APOBEC3G 分解を抑制することで HIV-1 複製を阻害する。第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、2012 年 11 月 24 日~2012 年 11 月 26 日、慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川県、横浜市)
  - 7 Ryuichi Sugiyama, Hironori Nishitsuji, Makoto Abe, Masato Katahira, Hiroaki Takeuchi, Yuichiro Habu, Akihide Ryo, Hiroshi Takaku, Heat Shock Protein 70 Inhibits HIV-1 Vif-Mediated Ubiquitination and Degradation of APOBEC3G. The Twenty-Fifth International Conference on Antiviral Research (ICAR), 2012 年 04 月 16 日~2012 年 04 月 19 日、ロイトン札幌 (北海道、札幌)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高久 洋 (TAKAKU, Hiroshi)  
千葉工業大学・附属研究所・専任研究員  
研究者番号: 50101267

### (2) 研究協力者

Chang Myitt Oo  
阿部 真 (ABE, Makoto)

### [学会発表](計 7 件)

- 1 高木 啓太、西辻 裕紀、天野 亮、坂本 泰一、高久 洋、Effect of HEXIMI and 7SKsnRNA on HIV-1LTR-driven gene