

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659224

研究課題名(和文)mRNA輸送因子GANPによるHIV-1感染阻止分子Apobec3G制御

研究課題名(英文)Regulation of HIV-1 restriction factor Apobec3G by mRNA export factor

研究代表者

阪口 薫雄(SAKAGUCHI, NOBUO)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：70192086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：HIVウイルスは体内に侵入して長期間の感染経過をたどる。APOBEC3G(A3G)はHIV-1ウイルスに細胞の抵抗性をもたらす宿主因子であることが明らかにされている。本研究でmRNA輸送因子GANPがHIV-1粒子にA3Gを能動的に導入することを見出した。GANPは、T細胞内でA3Gと直接結合すること、両分子はGagタンパク質の異なる部位を介して取込まれること、GANPがA3Gをウイルス粒子のコア領域に運ぶことを明らかにした。その結果、感染性を著しく低下させ、「不活性型ウイルス」を産生させる。この成果は生体内ワクチンとしての新規治療、予防技術の開発に繋がるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：HIV-1 viruses cause the AIDS-associated disease symptoms during the long-term infection period. We found that mRNA export factor GANP is encapsidated into the virions as a host factor associated with cytidine deaminase APOBEC3G (A3G). GANP is involved in the HIV-1 mRNA export pathway under the Rev-dependent manner. GANP binds to HIV-1 genomic (g)RNA in the virion by regulating viral RNA metabolism. GANP directly interacts with A3G in T-cells, and the interaction is through a unique region of Gag protein involved in HIV-1 gRNA encapsidation. GANP efficiently promotes the A3G incorporation into the viral core and enhances the non-infectious viral production in the host. This knowledge would suggest the feasibility of developing the in-vivo vaccination procedure.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫学 感染 RNA

1. 研究開始当初の背景

HIV-1はEnvタンパクのgp120/gp41がCD4と結合し、そしてCXCR4/CCR5を介してT細胞内に感染する。HIV-1ゲノム(g)RNAは、逆転写で産生されたマイナス鎖DNAからプラス鎖DNAが合成された後、二本鎖DNAとして染色体に組み込まれる。感染細胞では宿主の転写機構によってHIV-1gRNAが産生され、細胞質のP-bodyへ輸送される。その後、様々な宿主因子を利用しHIV-1の自己構成因子を産生させ、ウイルス粒子を形成する。HIV-1のライフサイクルはこの後、HIV-1ウイルス粒子が分泌される。エイズ感染患者ではウイルス感染が長年にわたって潜伏し、免疫応答の変化に伴って様々な感染病態を呈する。この原因の一つには、宿主因子が持つウイルス感染時の生体防御反応によるためと考えられる。

近年、cytidine deaminase APOBEC3G (A3G)がHIV-1感染を阻止する宿主因子であることが明らかにされた(Sheehy et al., *Nature*, 2002)。A3GはVif(-)の条件下ではあるものの、確実にHIV-1の感染性を失活させることができる。このことからA3GによるHIV-1感染阻止機能の解明によって、これまで未解決なHIV-1感染における様々な疑問を説明できると期待されている。この様なA3Gのパートナーとして、我々の研究室ではAPOBECファミリーに属するAIDが末梢のB細胞でGANPと直接結合し、AIDを抗体遺伝子のV領域DNAへ運ぶことを明らかにした(Maeda et al., *JBC*, 2010)。GANPは、B細胞で抗体の親和性亢進に必須な分子である(Kuwahara et al., *Blood*, 1999, *PNAS*, 2000, 2004)。

2. 研究の目的

HIV感染は免疫応答の破綻を引き起こしつつ病態を進行させる。申請者はmRNA核外輸送分子GANPがHIV-1粒子に能動的に侵入する宿主因子であることを見出した。本研究はGANPとA3Gがウイルス粒子に取り込まれる経路の詳細を明らかにする。

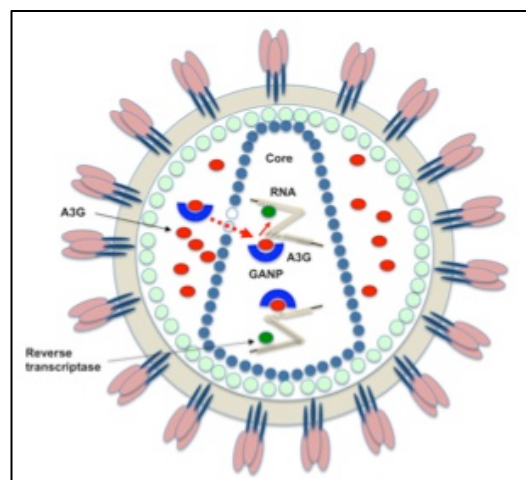
3. 研究の方法

GANPが非スプライス型の全長HIV-1gRNAのRev依存性核外輸送を促進し細胞質内、ウイルス粒子内でHIV-1gRNAと結合している宿主因子であることをRNA結合免疫沈降法で確定する。

ウイルス粒子内へどのような経路で取り込まれるのか、HIV-1Gagタンパクとどのように連携しているのか、そしてどのようにウイルスコアまで達するのかをGag変異体を用いて明らかにする。ウイルス粒子内でA3Gとどのように結合し、HIV-1ウイルス感染阻害機能を制御しているのかを明らかにする。宿主因子GANPのHIV-1感染への免疫応答制御の生理的意味を明示する。

4. 研究成果

HIV感染は免疫応答の破綻を引き起こしつつ病態を進行させる。mRNA核外輸送分子GANPは、HIV-1粒子に能動的に侵入する宿主因子であることを見出した。GANPはHIV-1gRNAと結合し、gRNAの代謝を制御し、A3Gのウイルス粒子に入り込んでいくことを見出した。さらにGANPはA3Gと直接結合し、ウイルス粒子への取り込みを制御していることが明らかとなった。GANPがA3Gの機能を制御し、感染能力の無い「不活性型ウイルス」の産生を促し、生体内ワクチンとして免疫応答を高める効果を示す可能性が考えられる。GANPとA3Gがウイルス粒子に取り込まれる経路の詳細を明らかにした。HIV-1のmRNA輸送経路に着目し、GANPが非スプライス型の全長HIV-1gRNAのRev依存性核外輸送を促進し細胞質内、ウイルス粒子内でHIV-1gRNAと結合することを明らかとした。さらに、ウイルス粒子内への取り込み経路の解析から、GANPはHIV-1Gagのキャプシド領域が、A3Gはヌクレオキャプシド領域が必要であり、異なる部位を介して取込まれることを明らかとした。さらに、過剰発現GANPによって効率よくA3Gをウイルス粒子のコアに運ぶことを示した。GANPによって運ばれたA3Gは、A3Gの標的モチーフへの変異導入効率を有為に増加させた。以上の結果は、HIV-1のmRNA輸送経路においてGANPが非スプライス型の全長HIV-1gRNAのRev依存性核外輸送を促進し細胞質内、ウイルス粒内でHIV-1gRNAと結合することと密接に関連することを裏付けている。そしてGANPがA3Gの機能を制御し、感染能力の無い「不活性型ウイルス」の産生を促すことで、生体内ワクチンとして免疫応答を高める効果を示すことから新しい治療技術の開発につながるものと期待された。



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11件)

(1) Eid MMA, Maeda K (co-first author), Almofty SA, Singh SK, Shimoda M, Sakaguchi

N. GANP regulates the choice of DNA repair pathway by DNA-PKcs interaction in AID-dependent IgV region diversification. *J. Immunol.*、査読有、2014、192: in press
DOI: 10.4049/jimmunol.1400021

(2) Ye B, Dai Z, Liu B, Wang R, Li C, Huang G, Wang S, Xia P, Yang X, Kuwahara K, Sakaguchi N, Fan Z. Pcid2 inactivates developmental genes in human and mouse embryonic stem cells to sustain their pluripotency by modulation of EID1 stability. *Stem Cells*、査読有、2014、32: 623-635
DOI: 10.1002/stem.1580

(3) Takamura S, Kajiwarra E, Tsuji-Kawahara S, Masumoto T, Fujisawa M, Kato M, Chikaishi T, Kawasaki Y, Kinoshita S, Itoi M, Sakaguchi N, Miyazawa M. Infection of adult thymus with murine retrovirus induces virus-specific central tolerance that prevents functional memory CD8+ T cell differentiation. *PLoS Pathog.*、査読有、2014、10: e1003937
DOI: 10.1371/journal.ppat.1003937

(4) Ogiwara H, Yasui F, Munekata K, Takagi-Kamiya A, Munakata T, Nomura N, Shibasaki F, Kuwahara K, Sakaguchi N, Sakoda Y, Kida H, Kohara M. Histopathological evaluation of the diversity of cells susceptible to H5N1 virulent avian influenza virus. *Am. J. Pathol.*、査読有、2013、184: 171-183
DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.10.004

(5) Silsirivanit A, Araki N, Wongkham C, Vaeteewoottacharn K, Pairojkul C, Kuwahara K, Narimatsu Y, Sawaki H, Narimatsu H, Okada S, Sakaguchi N, Wongkham S. CA-S27: a novel Lewis a associated carbohydrate epitope is diagnostic and prognostic for cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.*、査読有、2013、104: 1278-1284
DOI: 10.1111/cas.12222

(6) Sakurai A, Takayama K, Nomura N, Munakata T, Yamamoto N, Tamura T, Yamada J, Hashimoto M, Kuwahara K, Sakoda Y, Suda Y, Kobayashi Y, Sakaguchi N, Kida H, Kohara M, Shibasaki F. Broad-spectrum detection of h5 subtype influenza a viruses with a new fluorescent immunochromatography system. *PLoS One*、査読有、2013、8: e76753
DOI: 10.1371/journal.pone.0076753

(7) Rezano A, Kuwahara K, Yamamoto-Ibusuki M, Kitabatake M, Moolthiya P, Phimsen S, Suda T, Tone S, Yamamoto Y, Iwase H, Sakaguchi N. Breast cancers with high DSS1 expression that potentially maintains BRCA2 stability have poor prognosis in the relapse-free survival. *BMC Cancer*、査読有、2013、13: 562

DOI: 10.1186/1471-2407-13-562

(8) Maeda K, Almofty SA (co-first author), Singh SK, Eid MMA, Shimoda M, Ikeda T, Koito A, Pham P, Goodman MF, Sakaguchi N. GANP interacts with APOBEC3G and facilitates its encapsidation into the virions to reduce HIV-1 infectivity. *J. Immunol.*、査読有、2013、191: 6030-6039
DOI: 10.4049/jimmunol.1302057

(9) Singh SK, Maeda K (co-first author), Eid MMA, Almofty SA, Ono M, Pham P, Goodman MF, Sakaguchi N. GANP regulates recruitment of AID to immunoglobulin variable regions by modulating transcription and nucleosome occupancy. *Nat. Commun.*、査読有、2013、4:1830
DOI: 10.1038/ncomms2823

(10) Kuwahara K, Nakaya T, Phimsen S, Toda T, Kitabatake M, Kaji T, Takemori T, Watanabe T, Sakaguchi N. Lyn signaling to upregulate GANP is critical for the survival of high-affinity B cells in germinal centers of lymphoid organs. *J. Immunol.*、査読有、2012、189: 3472-3479
DOI: 10.4049/jimmunol.1200649

(11) Kitabatake M, Toda T, Kuwahara K, Igarashi H, Ohtsuji M, Tsurui H, Hirose S, Sakaguchi N. Transgenic overexpression of G5PR that is normally augmented in centrocytes impairs the enrichment of high-affinity antigen-specific B cells, increases peritoneal B-1a cells, and induces autoimmunity in aged female mice. *J. Immunol.*、査読有、2012、189: 1193-1201
DOI: 10.4049/jimmunol.1102774

[学会発表] (計 25 件)

(1) Maeda K, Almofty SA, Singh SK, Eid MMA, Shimoda M, Ikeda T, Koito A, Pham P, Goodman MF, Sakaguchi N、GANP interacts with APOBEC3G and facilitates its encapsidation into the virions to reduce HIV-1 infectivity, Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2014、2014. 1. 20、仙台国際センター (宮城)

(2) Almofty SA, Maeda K, Singh SK, Eid MMA, Shimoda M, Kawabata T, Sakaguchi N、Role of mammalian TREX-2 component in HIV-1 mRNA export、第42回日本免疫学会学術集会、2013. 12. 12、幕張メッセ (千葉)

(3) 前田和彦、サーラルモフティ、シェイレンドラシン、モハメドエイド、下田真唯子、川畑輝弥、阪口薫雄、HIV 感染経路における宿主因子 GANP の役割、第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、2013. 11. 21、市民会館崇城大学ホール(熊本市民会館)、熊本市国際交流会館 (熊本)

(4) Maeda K, Singh SK, Eid MMA, Almofty SA,

Sakaguchi N, GANP regulates transcription and nucleosome occupancy at the immunoglobulin variable region for AID-accession, The 9th China-Japan Joint Laboratory Workshop: Pathogenesis, Gene Regulation and Signal Transduction、2013. 11. 1、Chinese Academy of Sciences (北京、中国)

(5) Maeda K, Almofty SA, Shimoda M, Singh SK, Eid MMA, Kawabata T, Ikeda T, Shida H, Koito A, Sakaguchi N, Role of mammalian TREX-2 component GANP in HIV-1 infection、第 14 回熊本エイズセミナーGCOE ジョイント国際シンポジウム、2013. 10. 30、熊本キャッスルホテル、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル (熊本)

(6) Singh SK, Maeda K, Eid MMA, Almofty SA, Shimoda M, Sakaguchi N, GANP regulates APOBEC3G targeting for reduction of HIV-1 infectivity、第41回日本免疫学会学術集会、2012. 12. 5、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸ポートピアホテル (兵庫)

(7) Almofty SA, Maeda K, Singh SK, Eid MMA, Shimoda M, Sakaguchi N, Escorting APOBEC3G toward the full length HIV-1 mRNA at the cytoplasmic P bodies、第41回日本免疫学会学術集会、2012. 12. 5、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸ポートピアホテル (兵庫)

(8) 前田和彦、サーラルモフティ、シェイレンドラシン、モハメドエイド、下田真唯子、池田輝政、小糸厚、阪口薫雄、GANP を介した APOBEC3G の抗 HIV 感染阻止機構の解析、第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、2012. 11. 25、慶応義塾大学、日吉キャンパス (神奈川)

(9) Maeda K, Almofty SA, Singh SK, Eid MMA, Shimoda M, Ikeda T, Shida H, Koito A, Pham P, Goodman MF, Sakaguchi N, Mammalian TREX-2 component GANP is involved in HIV-1 mRNA export、第 13 回熊本エイズセミナーGCOE ジョイント国際シンポジウム、2012. 10. 26、ホテル日航熊本、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル (熊本)

〔図書〕 (計 6 件)

(1) 下田真唯子、前田和彦、阪口薫雄、臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、免疫グロブリンの体細胞高頻度突然変異誘導と GANP、2014、61(5)、pp472-479

(2) 前田和彦、阪口薫雄、臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、胚中心 B 細胞の高親和性成熟における GANP の役割、2013、60(2)、pp115-121

(3) 前田和彦、阪口薫雄、臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、B 細胞の生存維持と miRNA、2012、58(3)、pp251-258

(4) 阪口薫雄、前田和彦、免疫学コア講義 改

訂 3 版、南山堂、編集 2012、第 6 章、第 9 章、付表 1

(5) 北嶋正大、阪口薫雄、臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、自己免疫疾患と B1 細胞、2012、57(2)、pp125-132

(6) 前田和彦、阪口薫雄、臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、プロテインホスファターゼ 2A の調節と自己免疫、2012、57(2)、pp119-124

〔その他〕

新聞報道

2013年12月17日、読売新聞、「エイズ治療につながる可能性」

2013年12月18日、熊本日新聞、「タンパク質 HIV破壊に貢献」

2013年12月19日、西日本新聞、「HIV感染力阻害酵素 運び役の機能確認」

テレビ報道

2013年12月16日、TBSテレビ、「朝ズバッ!」、RKK熊本放送「ニュースローカル」、NHK熊本放送局「クマロク!」

ホームページ等

<http://www.k-immu.jp/ja/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪口 薫雄 (SAKAGUCHI NOBUO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：70192086