

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670062

研究課題名(和文) Moonlightタンパク質GAPDHはHIV根治療法開発の鍵になり得るか？

研究課題名(英文) Does Moonlighting protein GAPDH hold the key to develop a radical new therapy against HIV/AIDS?

研究代表者

三隅 将吾 (Shogo, Misumi)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：40264311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：HIV-1の複製は、宿主タンパク質により正もしくは負に制御されている。宿主タンパク質のいくつかは、アセンブリー中にウイルスピリオン内に取り込まれ、必須の役割を果たします。我々は、ムーライトタンパク質として知られるGAPDHがウイルス粒子内に取り込まれ、粒子内へのLysRSおよびtRNA^{Lys3}のパッケージング効率を低下させることを示しました。GAPDHのウイルス粒子内での取り込みを減らしたウイルスは感染性が増加し、GAPDHの取り込みを増やしたウイルスは、感染性が低下します。HIV複製におけるGAPDHの複製阻害メカニズムを明らかにすることは、新たな治療戦略を開発することに繋がるかもしれません。

研究成果の概要(英文)：Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication is positively or negatively regulated by host proteins. Some of the host proteins are incorporated inside the virions during assembly and play essential roles. Here, we revealed that glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), known as "moonlighting" protein, is incorporated into HIV-1 virion and decreases the packaging efficiency of lysyl-tRNA synthetase (LysRS) and tRNA^{Lys3} into particles. The GAPDH-packaging-defective virus showed an increased infectivity, whereas the enhanced-GAPDH-packaging virus showed a decreased infectivity. Elucidating the inhibitory mechanism of GAPDH in HIV replication may help us to develop a novel HIV therapeutic strategy.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 GAPDH 宿主因子 ウイルス複製 根治療法

1. 研究開始当初の背景

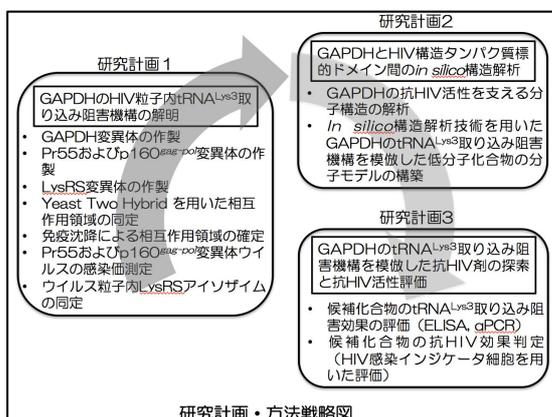
これまでに約 30 種類の抗 HIV 剤が FDA の認可を受けて臨床応用されてきたが、その薬剤の多さは、HIV が有する易変異原性のために薬剤がすぐに効かなくなってしまうことを意味している。その原因は、HIV には遺伝子修復能が備わっておらず、すぐに変異が導入されることにある。生体内において、HIV は群として存在し、個体内の免疫反応や薬剤による選択圧により、最終的に薬剤耐性ウイルスが出現する。この点に、現在の治療法開発における大きな弱点があり、HIV 感染に対する根治療法は存在しない。つまり、抗 HIV 戦略として、変異しやすいウイルス性蛋白を標的とするのではなく、変異が生じにくい宿主の細胞性抑制因子の機能を利用しようとする戦略は、根治療法開発の鍵を握っていると思われる。

申請者は、HIV 複製を負に制御する因子として世界で初めて GAPDH を発見し、その tRNA^{Lys3} 取り込み阻害機構が十分明らかとなれば、GAPDH の抗 HIV 効果を模倣した薬剤を開発することで、新たな治療戦略を創造できるのではないかと考え本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、GAPDH の HIV 粒子内 tRNA^{Lys3} 取り込み阻害機構を解明し、その阻害機構を模倣した抗 HIV 剤の探索とその抗 HIV 効果を評価することで、薬剤耐性ウイルスの出現を抑えた新規抗 HIV 戦略の構築を目的とした。**具体的な目的は以下の 3 つに絞った。**(1) GAPDH の HIV 粒子内 tRNA^{Lys3} 取り込み阻害機構の解明、(2) GAPDH と HIV 構造タンパク質標的ドメイン間の *in silico* 構造解析、(3) GAPDH の tRNA^{Lys3} 取り込み阻害機構を模倣した抗 HIV 剤の探索と抗 HIV 活性評価

3. 研究の方法

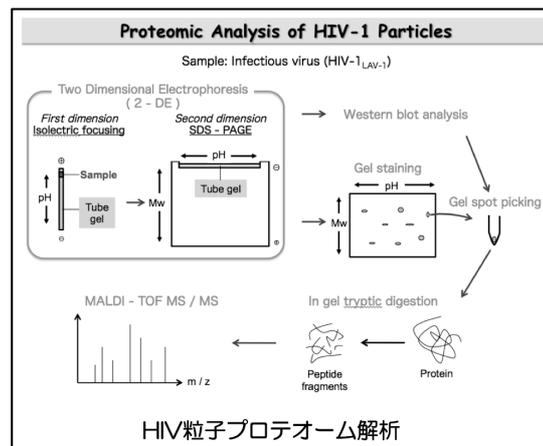


下記の研究計画・方法にて研究を実施した。

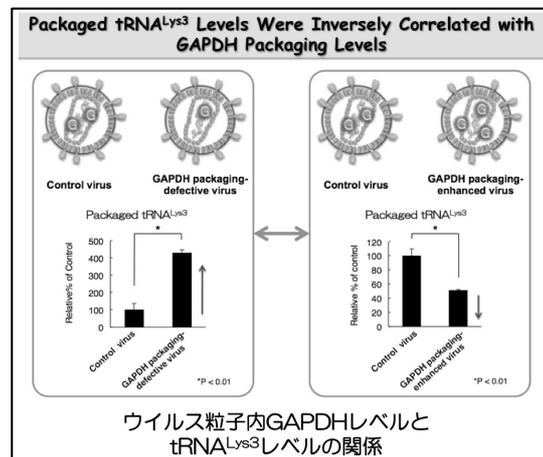
4. 研究成果

本研究では、まず新規 HIV 治療戦略開発のために、HIV 感染を制御する新たな宿主性タンパク質の探索及びその制御機構の解明を

試みた。MALDI-TOF MS を用いて HIV 粒子そのもののプロテオーム解析を行ったところ、



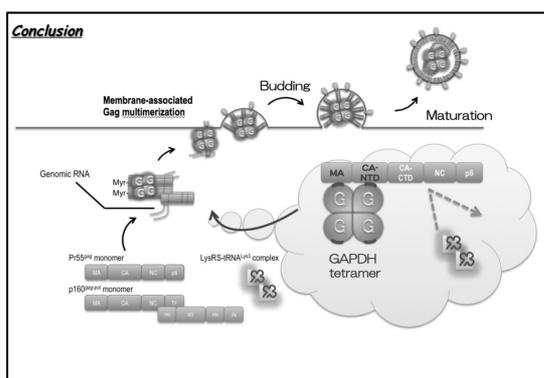
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) が候補としてあげられた。GAPDH をノックダウンした細胞や過剰発現した細胞からウイルスを調製し、HIV-1 感染インジケータ細胞やヒト末梢血単核球に感染させることで HIV-1 複製効率を評価した。さらに、GAPDH と相互作用するウイルス性タンパク質を共免疫沈降法等により評価したところ、ウイルス粒子内に取込まれる GAPDH の量が低下すると逆転写過程が増強され、感染効率が上昇することを明らかにした。その原因について詳細に調べたところ、GAPDH の取込み量を減少させたウイルスでは、ウイルス粒子内で開始される逆転写反応のプライマーとなる tRNA^{Lys3} の量が増加していた。tRNA^{Lys3} は lysyl-tRNA synthetase (LysRS) と複合体を形成し、LysRS とウイルス前駆体タンパク質 Pr55^{gag} や p160^{gag-pol} との相互作用を介しウイルス粒子内に取込まれるため、ウイルス粒子内 LysRS の検出を行ったところ、GAPDH の取込み量を減少させたウイルスでは tRNA^{Lys3} と同様に取込まれる LysRS の量も低下していた。一方、GAPDH のウイルス粒子内への取込み量を増加させたウイルスでは、減少させたウイルスとは逆の結果が得られた。



また、GAPDH も LysRS と同様にウイルス前駆

体タンパク質と相互作用していたことから、GAPDH は LysRS と競合することにより、プライマーである tRNA^{Lys3} の HIV 粒子内への取込みを減少させ、HIV 逆転写反応の開始を阻害する因子であることを初めて明らかにできた。本知見は、逆転写反応に必須となるプライマーの取込みを制御する GAPDH とウイルス前駆体タンパク質の相互作用を模倣することで、HIV の持つ異変異性に打勝つ新規抗 HIV 薬の開発に寄与できると考えられた。

そこで、tRNA^{Lys3} 取込み阻害能を有する GAPDH と Pr55^{gag} の相互作用面の同定を試みた。相互作用解析では、GAPDH を prey、Pr55^{gag} やそのプロセシング産物を bait とした Yeast two-hybrid (Y2H) 法や GAPDH (PDB ID: 1Z9Q)、HIV-1 MA (PDB ID: 2H3I)、HIV-1 CA (PDB ID: 1E6J) を用いた *in silico* 解析を行った。また、GAPDH 変異体発現ベクターを処理した HIV-1 産生細胞由来のウイルスを調製し、HIV-1 複製効率を評価した。その結果、Y2H 法では、GAPDH の C 末端領域 (151-335) が Pr55^{gag} と相互作用し、また MA 及び CA と相互作用していた。さらに *in silico* 解析によって予想された相互作用面となる領域に変異を導入した各種変異体は、Y2H 法において相互作用が消失した。さらに、GAPDH 変異体を処理した HIV-1 産生細胞由来のウイルスでは、GAPDH WT 処理で見られた HIV-1 複製効率の低下が消失した。一方で GAPDH は、細胞質においてほとんどが四量体として存在していた。したがって、GAPDH 四量体を構成する 2 カ所の C 末端領域が Pr55^{gag} の MA 及び CA 領域と相互作用することにより、GAPDH は立体障害的に tRNA^{Lys3} の HIV-1 粒子内への取込みを阻害していると考えている。今後、今までの抗 HIV 戦略とは全く異なる宿主因子を利用した治療戦略を開発することにつなげたいと考えている。



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1件)

Kishimoto N, Onitsuka A, Sugimoto Y, Takamune N, Shoji S, Misumi S. Human tRNA^{Lys3} incorporation into HIV-1 virions was suppressed by

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. 査読有, *The Journal of AIDS Research* (2013) 15(3): 158-163., http://jaids.umin.ac.jp/journal/journal_vol15_no03_j.html

[学会発表](計6件)

岸本 直樹、鬼塚 彩乃、伊賀 望、高宗 暢暁、庄司 省三、三隅 将吾、宿主因子 GAPDH による tRNA^{Lys3} 取込み阻害機構の解析、第 28 回 日本エイズ学会学術集会・総会、2014/12/3-5、大阪(大阪国際会議場)

岸本 直樹、鬼塚 彩乃、伊賀 望、高宗 暢暁、庄司 省三、三隅 将吾、Transfer RNA^{Lys3} の HIV-1 粒子内への取込み阻害能を有する GAPDH 分子認識機構と機能発現、第 62 回 日本ウイルス学会学術集会、2014/11/10-12、横浜(パシフィコ横浜)

岸本 直樹、鬼塚 彩乃、高宗 暢暁、三隅 将吾、HIV 感染における glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase の負のムーンライト機能、第 13 回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2014、2014/9/20-21、富山(富山国際会議場)

岸本 直樹、鬼塚 彩乃、高宗 暢暁、三隅 将吾、宿主細胞は HIV 逆転写反応開始阻害因子として GAPDH を備え持つ、フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー、2014/9/19-20、つくば(つくば国際会議場)

岸本 直樹、鬼塚 彩乃、高宗 暢暁、三隅 将吾、ムーンライトタンパク質 GAPDH と HIV 前駆体タンパク質の相互作用は HIV 粒子内への逆転写プライマー取込みを競合的に阻害する、第 38 回 タンパク質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2014/9/11-13、久山(久山レイクサイドホテル)

岸本 直樹、鬼塚 彩乃、杉本 幸彦、高宗 暢暁、三隅 将吾、ムーンライトタンパク質 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase は HIV-1 複製制御能を発揮する、日本薬学会 第 134 年会、2014/3/27-30、熊本(熊本大学)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/enhs/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三隅 将吾 (MISUMI, Shogo)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：40264311