

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460550

研究課題名 (和文) HIV-1コア構造崩壊メカニズムの多面的解析

研究課題名 (英文) Extensive analysis on HIV-1 core disassembly including the timing or triggering of uncoating

研究代表者

武内 寛明 (Takeuchi, Hiroaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20451867

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 4,000,000 円

研究成果の概要 (和文) : HIV-1感染が成立するためには、感染直後のCAコア構造体が「適切なタイミング」で崩壊することが重要であると考えられているが、コア崩壊のタイミング制御メカニズムについては未だ不明な点が多い。本研究では、HIV-1感染直後のCAコア構造体を認識しCA-149番目のセリン残基 (CA-S149) を「段階的」にリン酸化することでコア構造崩壊を制御する宿主リン酸化酵素を同定し、CA-S149のリン酸化がコア構造体崩壊の引き金の一つであることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : Phosphorylation of the HIV-1 capsid has long been known to regulate viral uncoating and cDNA synthesis processes, but the cellular kinases responsible for this have remained unidentified. Here, we report that a host cell kinase MELK dictates optimal capsid disassembly through phosphorylation of Ser-149 in the multimerized HIV-1 core, which leads to efficient viral cDNA synthesis in target cells. The phosphorylation-mimetic capsid mutation of Ser-149 caused aberrant capsid disassembly and too-early completion of reverse transcription, and impeded nuclear entry of HIV-1 cDNA, suggesting the importance of well-ordered capsid disassembly in the early stages of viral replication. This discovery will facilitate understanding of the functional link among virus uncoating, reverse transcription and nuclear entry, and is expected to contribute to developing a novel strategy for AIDS therapy.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1

1. 研究開始当初の背景

現在までに、薬剤併用化学療法により効果的な HIV-1 複製制御が可能となってきたが、この方法をもってしても体内からウイルスを完全に排除することが出来ないのが現状である。このことから、HIV-1 感染症の予防および治療法を開発するにあたり、個体レベルにおける宿主免疫応答系および細胞レベルでのウイルス増殖機構の更なる解明とその制御法の開発が急務となっている。

近年、HIV-1 複製過程における CA タンパク質の機能について、ウイルス粒子の形態安定化と細胞侵入直後の脱殻過程を調節しているだけでなく、逆転写反応効率およびウイルスゲノムの核移行段階への直接的な関与を示唆する結果が示されてきており、CA タンパク質が HIV-1 複製過程において多くの重要な機能を担っていることが明らかになりつつある。しかしながら、脱殻過程を経て細胞質に侵入した CA コア構造体がどのようなタイミングで崩壊し、ウイルスゲノムを細胞質に放出するかについては不明な点が多い。また、逆転写過程とコア崩壊過程との関連が示唆されているが、その詳細についても不明な点が多いのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) のキャプシド (CA) タンパク質の多機能性を解析するために、

(1) 感染初期過程における CA タンパク質によって構成されるコア構造の崩壊制御メカニズムを解析し理解を深めること、

(2) 感染初期過程におけるウイルス複製制御の新たな手法確立に寄与していくこと、

の2項目に焦点を当てて研究遂行することが目的である。

3. 研究の方法

「HIV-1 CA コア崩壊制御因子: MELK」のコア崩壊制御機構の解明

RNA 干渉法を用いたゲノムワイドスクリーニング法により見出した HIV 感染必須宿主因子: Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase (MELK) は、HIV-1 感染 MELK 発現抑制細胞内において、逆転写反応効率の顕著な低下および脱殻過程を経た HIV-1 CA コア崩壊速度が遅くなることを見出している。また、大腸菌を用いて作製した組換え HIV-1 CA タンパク質を用いた *in vitro* phosphorylation assay を行ったところ、HIV-1 CA タンパク質が MELK のリン酸化基質であることが分かった。そこで、HIV-1 CA コア崩壊制御における MELK のリン酸化酵素活性の必要性について解析を進め

ていく。具体的な解析方法を以下に記す。

(1) HIV-1 CA 領域内に存在する Ser/Thr 残基を含むペプチドを用いた *in vitro* phosphorylation assay

MELK は、Serine/Threonine protein kinase であることから、CA 領域内に存在する Ser/Thr 残基を含んだペプチド群を作製する。ペプチドデザインについては、HIV-1 CA コア構造において宿主因子との相互作用部位として考えられるコア構造の外側に位置する helix 構造を含んだペプチドを作製し、これらが MELK のリン酸化基質になり得るかどうかなどを、luminescent ADP detection 法による *in vitro* phosphorylation assay により解析する。

(2) HIV-1 CA の Ser/Thr 残基変異体の作製

上記の実験により見出された MELK のリン酸化標的的部位となり得る可能性が高い Ser/Thr 残基に対し、それらがリン酸化された場合の生理的応答を解析する目的で疑似リン酸化変異体を作製する。具体的には、Ser/Thr 残基を酸性アミノ酸である Glu に置換した変異体を site-directed mutagenesis 法を用いて作製し、恒常的リン酸化状態を模倣した HIV-1 CA 疑似リン酸化変異体とする。

(3) MELK 発現抑制細胞を用いた MELK 再構築実験 (HIV-1 感染過程におけるリン酸化酵素活性の必要性についての検討)

MELK 発現抑制細胞に MELK 発現カセットを組み込んだ細胞を作製し、HIV-1 感染実験を行うことで、HIV-1 CA コア崩壊プロセスおよび HIV-1 cDNA 合成効率が回復するかどうかを検討する。また、MELK のリン酸化酵素活性の必要性を確認するために、MELK 酵素活性変異体を用いた再構築細胞も作製し、HIV-1 CA コア崩壊プロセスおよび HIV-1 cDNA 合成効率への影響を見極める。具体的な実験方法を以下に記す。

① コア崩壊プロセスを見極める方法: 我々が独自に開発した Fate-of capsid 法 ([Hori T, Takeuchi H*, et al, J. Virol. 2013](#)) を用いて解析をおこなう。

② 逆転写反応効率を見極める方法: HIV 感染細胞由来の DNA を用いて、リアルタイム PCR 法により逆転写反応により合成された HIV-1 cDNA (R/U5 領域、U5/gag 領域、pol および env 領域等) を特異的に検出および定量する。

4. 研究成果

(1) MELK の HIV-1 CA タンパクに対するリン酸化標的アミノ酸残基の同定解析

HIV-1 CA タンパクに含まれる Ser/Thr 残基を網羅したペプチドをデザイン合成し (図 1)、luminescent ADP depletion 法による *in vitro* phosphorylation assay をおこなった。その結果、ペプチド#8 および#9 の2種が、

MELK によりリン酸化されることがわかり、このペプチド2種に含まれる4つの Ser/Thr 残基 (Thr-119, Ser-146, Thr-148, Ser-149) が MELK のリン酸化標的アミノ酸残基であることが示唆された (図2)。

No.	Position in CA	Sequence
#1	11 aa - 25 aa	VHQAI S PR T LN A WVK
#2	25 aa - 40 aa	KVVEEKAF S PEV I PM
#3	35 aa - 48 aa	EVI P MF S AL S EG A T
#4	42 aa - 55 aa	AL S EG A T P QDLN T M
#5	49 aa - 62 aa	PQDLN T MLN T VG G H
#6	66 aa - 79 aa	MQMLKE T INEE A E
#7	100 aa - 114 aa	RG S DIAG T T S T L Q E Q
#8	113 aa - 126 aa	EQIGW M T H NP P IPV
#9	143 aa - 159 aa	RM Y S P T S ILDIR Q G
#10	166 aa - 180 aa	DRFYK T LR A E Q A S Q E
#11	173 aa - 187 aa	RAEQ A S Q E V K N W M T E
#12	182 aa - 195 aa	KN W M T E T LL V Q N AN
#13	194 aa - 208 aa	AN P D C K T IL K AL G PG
#14	205 aa - 217 aa	LG P GA T LE E M M T A
#15	211 aa - 225 aa	LE E M M T AC Q GV G PG

図1: HIV-1 CA タンパクの全ての Ser/Thr 残基を含むペプチド一覧 (15種)

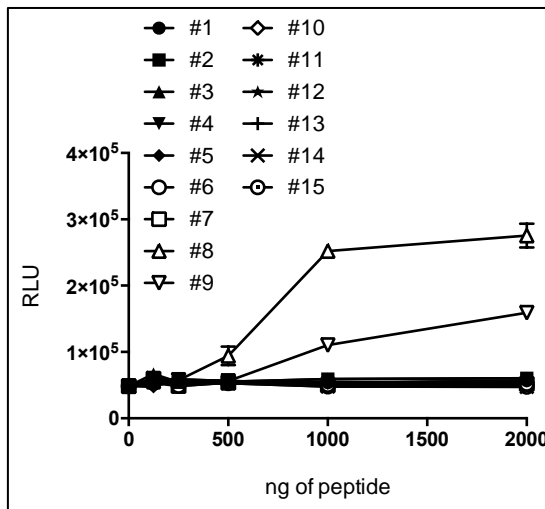


図2: HIV-1 CA ペプチドを用いた MELK kinase assay の結果

#8 および#9 ペプチド2種において、ペプチド量が増加するに従い、MELK によってリン酸化されたペプチドが増えていることを示している。

(2) HIV-1 CA 恒常的リン酸化変異体の解析
上記の実験において MELK のリン酸化標的候補部位のリン酸化の重要性を解析する目的で、Ser/Thr 残基を酸性アミノ酸である Glu に置換した変異体 (T119E, S146E, T148E, S149E) を作製し、逆転写反応過程への影響を解析した。具体的には、上記4種のリン酸化変異体 HIV-1 を MELK 発現抑制 T リンパ球に感染させ、ウイルス DNA 合成効率をリアルタイム PCR 法により経時的に測定した。その結果、S149E 変異体のみ MELK 発現抑制細胞において DNA 合成効率が回復することが分かり、MELK による CA タンパクのリン酸化は Ser-149 残基を標的として起こることが示唆された (図3)。

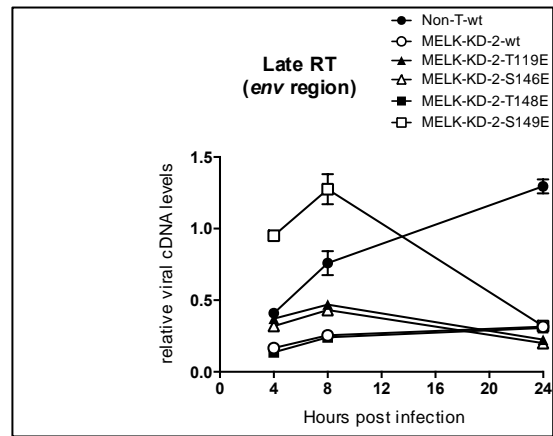


図3: 恒常的リン酸化変異体 (HIV-1 CAT119E, S146E, T148E, S149E の4種) の MELK 発現抑制 T リンパ球細胞内におけるウイルス DNA 合成量の経時変化

MELK 発現抑制 T リンパ球に上記4種のリン酸化変異体を感染させ、感染24時間後までのウイルス DNA 合成量の経時変化を測定したところ、S149E 変異体のみウイルス DNA 合成効率が回復した (MELK-KD-2-S149E と MELK-KD-2-wt との比較)。

(3) MELK 発現抑制 T リンパ球における MELK タンパク再構築実験 (MELK 酵素活性の必要性についての検討)

MELK 発現抑制 T リンパ球におけるウイルス感染効率の低下が、MELK に依存する効果かどうかを見極めるために、MELK 発現抑制細胞に MELK タンパクの発現回復をさせることで HIV-1 感染効率が復帰するかどうかを検討した。具体的には、MELK 発現抑制細胞に酵素活性を有する MELK 発現カセットもしくは酵素活性を失くした MELK 変異体発現カセットを組み込むことで MELK 再構築細胞を作製し、レポータータンパク発現 HIV-1 ベクターを用いて感染効率を検討した。その結果、酵素活性を有する MELK タンパクによる再構築細胞のみ感染効率の回復が認められたことから、HIV-1 感染制御には MELK の酵素活性が必要であることがわかった (図4)。

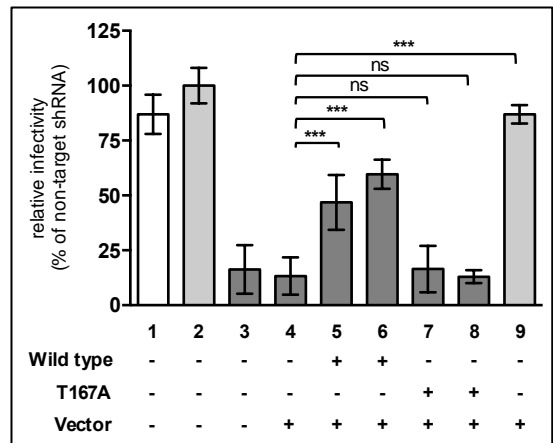


図4: MELK 発現抑制 T リンパ球における MELK 再構築細胞の樹立および HIV-1 感染効率の比較

T リンパ球細胞株 (1) およびコントロール細

胞株 (2 および 9) への HIV-1 ベクター感染効率を基準に、異なる MELK 発現抑制細胞集団 (3 および 4)、MELK 再構築 MELK 発現抑制細胞集団 (5 および 6) そして酵素活性を失くした MELK 変異体再構築 MELK 発現抑制細胞集団 (7 および 8) との HIV-1 ベクター感染効率を比較した結果を示している。酵素活性を有する MELK タンパクを再構築した MELK 発現抑制 T リンパ球において HIV-1 ベクター感染効率が優位に回復していることがわかる。

(4) 総括

本研究は、HIV-1 感染前期過程における宿主リン酸化酵素 MELK の HIV-1 コア崩壊制御メカニズムの解析を行い、HIV-1 コア崩壊制御メカニズムの理解を深めることが目的であった。本研究により、MELK が HIV-1 コア崩壊制御宿主因子であることを明らかにし、リン酸化による HIV-1 コア崩壊制御メカニズムを世界で初めて明らかにした (図 5)。

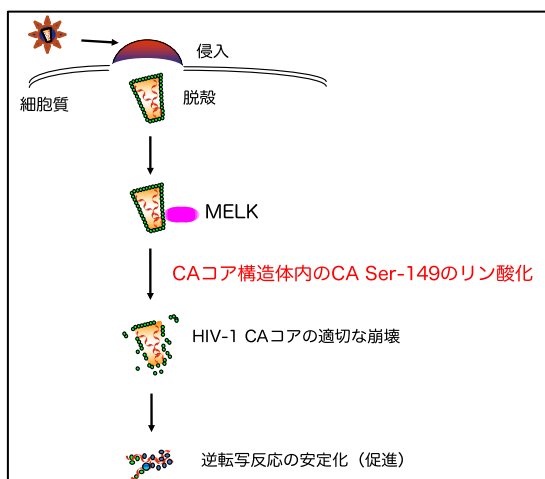


図 5 : MELK は HIV-1 CA コアの Ser-149 残基をリン酸化することで CA コア崩壊制御を行い、逆転写反応効率を維持するための必須宿主因子である。

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 4 件)

1. Takeuchi H^{*§}, Saito H., Noda T., Miyamoto T., Yoshinaga T., Terahara K., Ishii H., Tsunetsugu-Yokota Y., and Yamaoka S[§]. Phosphorylation of the HIV-1 capsid by MELK triggers uncoating to promote viral cDNA synthesis. *PLoS Pathog.* in press 2017. (査読有)

2. Wenfeng H., Goda T., Takeuchi H, Yamaoka S., Horiguchi Y., Akira M., and Miyahara Y. Specific Recognition of Human Influenza Virus with PEDOT Bearing Sialic Acid-Terminated Trisaccharides. *ACS Appl Mater Interfaces*. 9(16): 14162-14170. 2017. (査読有)
3. Horiguchi Y., Goda T., Matsumoto A., Takeuchi H, Yamaoka S., and Miyahara Y. Direct and Label-free Influenza Virus Detection Based on Multisite Binding to Sialic Acid Receptors. *Biosensors and Bioelectronics*. 92: 234-40. 2017. (査読有)
4. Sukegawa S., Sakuma R., Ohmine S., Takeuchi H, Ikeda Y., and Yamaoka S. Suppressor of Cytokine Signaling 1 Counteracts Rhesus Macaque TRIM5alpha-Induced Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Production. *PLoS ONE* 9(10) e109640. 2014. (査読有)

*: Main contribution

§: Corresponding author

[学会発表] (計 9 件)

国際学会 (口頭発表)

1. Takeuchi H^{*}. The timing and triggering of HIV-1 uncoating: the essential role of MELK for optimal capsid core disassembly. U.S-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) AIDS Panel Meeting, Washington DC, USA, 2016.
2. Saito H, Takeuchi H^{*} and Yamaoka S. N-terminally truncated POM121C, a component of nuclear pore complexes, inhibits HIV-1 replication. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, New York, USA, 2015.

3. **Takeuchi H***, Saito H, Miyamoto T, Yoshinaga T, Ishii H and Yamaoka S. AMPK-RPK is a host essential factor for optimal capsid disassembly to promote viral cDNA synthesis during the early stage of HIV-1 infection. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, New York, USA, 2014.

国内学会（口頭発表）

4. **武内 寛明***. HIV-1 キャプシドコア構造体崩壊を制御する宿主因子群 ～それらの理解の深化から HIV-1 感染制御への展望～ 第 30 回日本エイズ学会学術集会 2016 年 11 月 24-26 日、かごしま県民交流センター（鹿児島県、鹿児島市）

シンポジウム講演

5. **武内 寛明***、山岡 昇司. リン酸化酵素 MELK による HIV-1 感染後期過程制御機構の解析 第 29 回日本エイズ学会学術集会 2015 年 11 月 29-30 日、12 月 1 日、東京ドームホテル（東京都、文京区）

6. **Hiroaki Takeuchi***, Shoji Yamaoka. MELK regulates multiple steps of HIV-1 replication in human cells. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015 年 11 月 22-24 日、福岡国際会議場（福岡県、福岡市）

発表言語：英語

7. **武内 寛明***、山岡 昇司. 新規 HIV 感染制御因子 AMPK-RPK による HIV コア構造体崩壊制御機構の解析 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 10-12 日、パシフィコ横浜会議センター（神奈川県、横浜市）

8. **武内 寛明***. レトロウイルス（ラパトアセッション）第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 10-12 日、パシフィコ横浜会議センター（神奈川県、横浜市）

9. **武内 寛明***、山岡 昇司. 新規 HIV 感染制御因子 AMPK-RPK による HIV 感染制御機構の解析 第 28 回日本エイズ学会学術集会 2014 年 12 月 3-5 日、大阪国際会議場（大阪府、大阪市）

***: Main contribution**

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
武内 寛明 (TAKEUCHI, Hiroaki)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号：20451867

(2)研究分担者
該当なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
該当なし ()

研究者番号：

(4)研究協力者
該当なし ()