

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860305

研究課題名(和文)胎盤関門におけるHIV母子感染抑制の分子機構の解明

研究課題名(英文)H11/HSPB8 confers HIV resistance to Human placental trophoblasts

## 研究代表者

工藤 あゆみ (KUDOH, Ayumi)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30616404

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の垂直感染は妊娠後期に至るまで低い割合で保たれることが知られているが、その分子生物学的メカニズムには不明な点が多く残されている。本研究課題では、HIV-2Vpxと相互作用するタンパク質リン酸化酵素を網羅的に探索し、その中から胎盤組織において特に強く発現するH11に着目し解析した。解析の結果、H11はVpxと直接結合するだけでなくプロテアソーム依存的に分解し、Vpxの本来の機能である抗レトロウイルス因子SAMHD1分解を阻害することで、HIV感染に不利な細胞内環境を構築するのを助ける因子であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：HIV infection relies on the dynamic interplay between host and virus factors. Placental trophoblasts cells form the interface between the fetal and maternal environments and serve to limit the maternal-fetal spread of viral infection. Although the primary trophoblast cells are known to express CCR5 and CXCR4, the co-receptors for HIV entry, these cells are highly resistant to infection of HIV-2 encoding an accessory protein Vpx that counteracts a host restriction factor SAMHD1. Using a proteomic approach, we identified H11 as a negative regulator of Vpx in human trophoblasts. We found that H11 interacted with Vpx and enforced the degradation of Vpx by a proteasome-dependent mechanism. Targeted knockdown of H11 in trophoblasts restored the function of Vpx leading to the efficient infection of HIV-2. These finding may support the hypothesis that marked expression of H11 in trophoblasts may contribute to the maternal-infant viral transmission during gestation periods.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-2 H11 Vpx 母子感染 胎盤

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は AIDS の原因ウイルスであり、2012 年の統計では世界の HIV 陽性者数は 3530 万人で毎年 230 万人の新規感染者のうち子供の感染は 26 万人、また 160 万人以上の AIDS による死亡者が発生しており、未だ深刻な感染症の一つととらえられている。HIV の主な感染経路は (1) 性的接触 (2) 母子感染 (3) 輸血 (4) 臓器移植・人工授精 (5) 医療事故 (6) 麻薬等の静脈注射などがあり、なかでも母子感染の確立は 30~40% と言われている。その内訳は母乳感染が約 20%、分娩時感染が約 15%、子宮内感染は約 5% ということが報告されている。胎盤内では HIV に感染した母体の血液と胎盤組織が長期間直接接触れるにも関わらず、妊娠高血圧症候群、絨毛羊膜炎や妊娠初期における子宮内感染の成立などの特別な場合を除き妊娠後期まで胎児への HIV 感染が阻止されている。これは合胞体栄養膜細胞と細胞性栄養膜細胞からなる胎盤関門により、感染が防御されることによるが、胎盤関門中でどのように HIV 感染が阻止されているのか、その分子機序は未だ解明されていない。

HIV 感染に抵抗性を持つ宿主因子として、これまでに TRIM5、APOBEC3G、SAMHD1、Tetherin が同定されている。dNTPase 活性を有する SAMHD1 が感染細胞内に高発現していると HIV 感染に対し逆転写過程で阻害的に作用するが、HIV のアクセサリタンパク質である Vpx はユビキチンプロテアソーム依存的に SAMHD1 を感染細胞内から分解除去することで、細胞の HIV 感染感受性を高めることが知られている。これまでの研究から、胎盤細胞では Vpx を発現させても SAMHD1 の分解が起きず、HIV-2 感染効率も非常に低く Vpx 量依存的な HIV-2 感染の安定化が認められた。このことは、胎盤細胞における HIV-2 感染感受性の制御には、Vpx のタンパク質安定性に関わるような、あるいは Vpx 機能を阻害するような因子が関わっている可能性を示唆している。

HIV 研究において現段階では、これまでとは別の視点から切り込みを入れた斬新な研究を行うことが求められている。そこで本研究課題では、近年 HIV 感染細胞における感染感受性に機能することが明らかとなった HIV2 アクセサリタンパク質である Vpx の機能制御に関わる宿主因子のスクリーニングに加え、胎盤に高発現する因子に着目することで、HIV 母子感染における HIV 感染感受性制御機構の分子生物学的、細胞生物学的解析を行い、背景を解明する。また、そこから HIV 感染制御機構の分子基盤に新たな解釈を与え、HIV 垂直感染の抑制法の構築や、母子感染に限らず HIV 新規治療法の提案を目指す。

胎盤関門では妊娠期間中、合胞体栄養膜細

胞を介し HIV に感染した母親の血液に長期間暴露されている。胎盤組織には CCR5、CXCR4 が発現しており HIV 感染例も報告がある (Hoxie et al., J Report Immunol 1998.)。また、細胞から細胞へウイルスが感染するトランスサイトーシスにより母子感染が起こる可能性がある (Arisa RA et al., Virology. 2003)。胎盤細胞において、HIV-2 感染実験を行ったところマクロファージと比較して 260 倍感染感受性が低下していた。また、胎盤由来細胞に Vpx を過剰発現させると Vpx 発現量依存的に HIV-2 感染が安定化することが明らかとなった。このことから、胎盤細胞における HIV-2 感染制御機構には Vpx の安定性や機能阻害を行う因子の関与が疑われた。

タンパク質の機能制御や安定性には、細胞内におけるタンパク質の翻訳後修飾が重要である。そこで、研究室が保有するライブラリ (タンパク質リン酸化酵素 440 種類) を利用し Vpx の機能制御や安定性に関わる因子のスクリーニングを行った。タンパク質リン酸化酵素ライブラリは、コムギ無細胞合成系によりタンパク質を合成し *in vitro* において Vpx との結合強度をアルファスクリーン法により数値化した。得られたランキングにそれぞれの因子の組織発現パターンを組み合わせ、胎盤において特に高発現が認められ、かつ Vpx と SAMHD1 との結合競合的に作用することが示された H11/HSPB8 (以下 H11 と表記) に着目した。

## 2. 研究の目的

子宮内での HIV 母子垂直感染は胎盤関門が高い HIV 感染抵抗性を有することから、妊娠後期まで低く保たれている。予備研究では、胎盤細胞に Vpx (HIV-2 アクセサリタンパク質) を過剰発現させると HIV-2 感染が成立することから、内在性 Vpx 阻害因子が胎盤細胞における HIV-2 感染感受性を制御している可能性が示唆された。そこで本研究課題では、Vpx に特異的に結合する宿主因子のうち、合胞体栄養膜細胞において高発現する因子に着目し HIV 母子感染における機能的意義について解明を試みるものである。本研究課題を通じて、胎盤関門を土台に Vpx 依存的な HIV 感染に新たな解釈を与え、宿主が本来備えている HIV 感染抑止作用を視野に入れた新しい母子感染抑止や HIV 治療戦略を提案することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) H11 と Vpx の結合性についてレコンビなんとタンパク質を用いたプルダウンアッセイを行い検証する。

(2) H11 との結合に必要な Vpx の領域を決定するため、ドメイン欠損変異体を HEK293 細胞に発現させ、プルダウンアッセイを行う。プルダウン産物はウェスタンブロットを行い解析する。

(3) H11 の機能が Vpx に与える影響につい

での検証。リコンビナントタンパク質を用いたリン酸化アッセイを行い、H11 が Vpx を直接リン酸化できるかどうか解析した。H11 の分子シャペロン活性が Vpx の細胞内発現に与える影響について検証するため、H11 (野生型、タンパク質リン酸化能失活型、分子シャペロン失活型) と Vpx を共発現させウェスタンブロットにより解析を行った。

(4) H11 発現が HIV-2 複製に与える影響についての検証。THP-1 に PMA を処理して分化させたマクロファージ (MDM) に H11 を強制発現させ、HIV-2-Luc ウイルスを感染させルシフェラーゼアッセイを行う。また、胎盤初代培養細胞を用い、H11 発現と Vpx 機能との相関について免疫沈降やウェスタンブロットによる発現解析を行うとともに、H11 を siRNA でノックダウンした場合の胎盤細胞における HIV-2 複製に与える影響について検証する。

#### 4. 研究成果

(1) Vpx の新規結合因子として同定した H11 コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて合成したリコンビナントタンパク質を用いた免疫沈降の結果、H11 と Vpx は *in vitro* にお

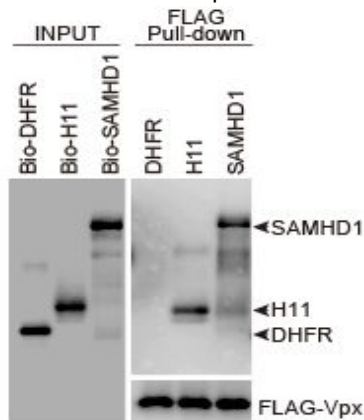


図 1 : H11 と Vpx は *in vitro* において結合する

いて共沈し、結合が確認された (図 1)。また、H11 と Vpx を 293T 細胞に強制発現させた細胞抽出液を用い免疫沈降を行ったところ、SAMHD1 と Vpx の結合と同様に H11 も Vpx と細胞内で結合していることが明らかとな

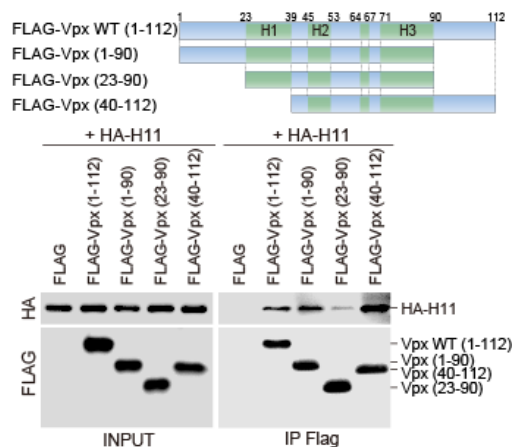


図 2 : H11 と Vpx の結合には Vpx の両末端が必要である

った。

(2) H11 との結合に必要な Vpx 領域を解析するため、Vpx の欠損変異体を作成し 293T 細胞に発現させ免疫沈降実験をおこなった。その結果、H11 は Vpx の N 末端と C 末端の両方を失った変異体には結合できなかった (図 2)。

(3) H11 はタンパク質リン酸化酵素としての機能ドメインと分子シャペロンとしての機能ドメインを有している。そこで我々は、H11 が Vpx と直接結合し Vpx をリン酸化するかどうかの解析を行った。コムギ無細胞合成系を用いて合成したリコンビナント H11 と Vpx を用いて  $^{32}\text{P}$  存在下において *in vitro* のリン酸化解析を行ったところ、過去に報告がある通り H11 の活性を示す自己リン酸化のバンドは検出されたが H11 特異的な Vpx のリン酸化は検出されず H11 は Vpx をリン酸化している可能性は極めて低いことが分かった。

次に我々は、H11 の細胞内での発現が Vpx の発現量や機能に与える影響について検証した。HEK293 細胞に Vpx を強制発現させたところ、すでに報告されている通り、内在性の抗レトロウイルス因子である SAMHD1 の分解が確認された。一方で、この Vpx による SAMHD1 の分解は H11 の発現量依存的に抑制された。さらに、この SAMHD1 の分解抑制は、Vpx の発現量の低下に呼応するように認められた (図 3A)。そこで H11 の発現量に伴い Vpx が分解された可能性について検証するため、プロテアソーム阻害剤である MG132 存在下において H11 依存的な Vpx 分解を解析した。H11 依存的な Vpx 発現量の低下は MG132 添加により Vpx 発現量の著明な回復を認めることから、H11 は Vpx をプロテアソーム依存的な分解に導く作用があることが示唆された (図 3B)。この H11 依存的な Vpx の分解は、H11 の蛋白質リン酸化酵素活性失活型 (K113G) では保持されたが、分子シャペロン活性失活型 (K141E) では失われることから、H11 は自身の分子シャペロン活性により Vpx を分解に導いていることが示唆された (図 3C)。

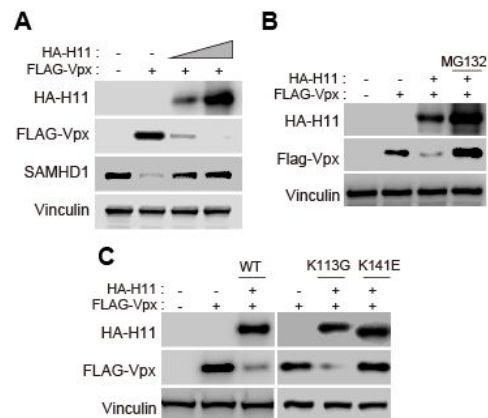


図 3 : H11 はプロテアソーム依存的に Vpx を分解する  
A) H11 の発現量依存的に Vpx 発現量が減少し、それと対応して SAMHD1 発現量が回復する。  
B) プロテアソーム阻害剤処理により H11 依存的な Vpx 分解が阻害される。  
C) H11 依存的 Vpx の分解は H11 のシャペロン活性失活型では観察されない。

(4) H11 発現が HIV-2 複製に与える影響に

ついて解析した。THP-1 細胞に PMA 処理を行いマクロファージに分化させ (MDM)、ウイルス複製をルシフェラーゼ活性により測定できる HIV-2 - Luc ウイルスを感染させ解析に用いた (図 4A)。この時、H11 を強制発現させた MDM では野生株の HIV-2 複製が抑制されていたが、一方で Vpx を持たない Vpx ウイルスの複製に H11 発現量は影響しなかった (図 4B)。この感染における SAMHD1 の発現量をウェスタンブロットにより検証したところ、Vpx 欠損ウイルスを感染させた細胞では SAMHD1 発現量に変化は認められないが、野生株のウイルスを感染させると SAMHD1 が Vpx により分解を受け発現量が減少した (図 4C)。一方で、H11 を強制発現させた MDM に野生株の HIV-2 を感染させた場合は SAMHD1 の発現量の低下が起きず、細胞は HIV-2 複製に抵抗性を回復した。同様の実験を 3 回繰り返し、SAMHD1 の発現量をウェスタンブロットの結果より定量したものを、グラフとして示す (図 4C)。

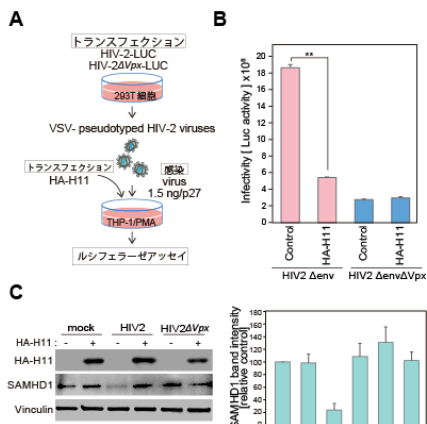


図 4: H11 強制発現させた単球由来マクロファージにおける HIV-2 複製と SAMHD1 分解実験の模式図。  
A) H11 強制発現させた HIV-2-LUC 感染マクロファージのルシフェラーゼアッセイ結果  
B) B) に示した細胞のウェスタンブロット

これらのことから、細胞に H11 が高発現すると Vpx による SAMHD1 分解が阻害され、SAMHD1 の dNTPase 活性が保持されることにより HIV-2 複製が抑制されたことが示唆された。

H11 は胎盤の合胞体栄養膜細胞において強く発現することが組織免疫染色の結果明らかとなっている。そこで胎盤組織における H11 の発現が HIV-2 複製を抑制している可能性について、胎盤初代培養細胞 (HVT 細胞) に H11 特異的 siRNA を用いたノックダウンを行うことで検証した。HVT 細胞にコントロール siRNA を処理した状態と、H11 特異的 siRNA を処理した状態を比較すると、コントロール siRNA を処理した状態では Vpx による SAMHD1 の分解効果あまり得られないが、H11 特異的 siRNA を処理した HVT では Vpx のタンパク質発現量が保たれ、SAMHD1 の分解活性が回復していることが明らかとなった (図 5A)。

また、胎盤細胞における H11 の発現量が HIV-2 複製に与える影響について検討したところ、コントロールと比較して H11 をノックダウンした細胞では HIV-2 ウイルス複製が増

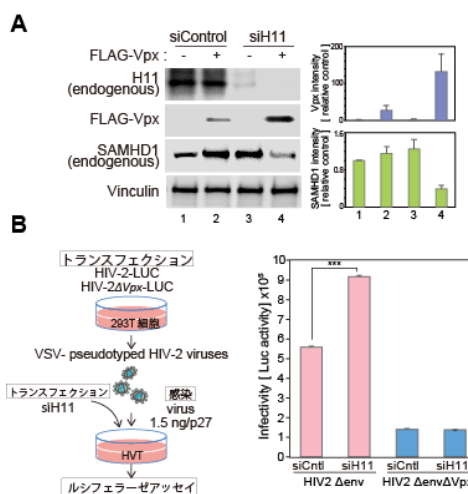


図 5: 胎盤細胞における HIV-2 複製と H11 発現ノックダウン  
A) 胎盤初代培養細胞株 (HVT) 細胞では Vpx による SAMHD1 分解が H11 発現により阻害される。  
B) 胎盤細胞における HIV-2 複製と H11 ノックダウンの影響

加していることが分かった (図 5B)。胎盤初代培養細胞を用いたこれらの結果から、胎盤細胞では H11 タンパク質の発現量が比較的高く保たれることで、HIV-2 アクセサリータンパク質の Vpx をプロテアソーム依存的に分解し、Vpx が持つ SAMHD1 分解機能を阻害することにより HIV-2 感染抑制的に作用していることが強く示唆された (図 6)。

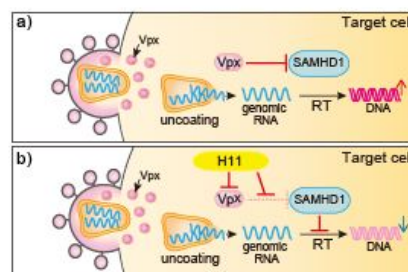


図 6: H11 高発現細胞における HIV-2 複製抑制機構の概念図  
a) H11 タンパク質発現量が低い血球細胞では、Vpx が SAMHD1 を分解し HIV-2 複製を助ける。  
b) H11 タンパク質発現量が高い胎盤の合胞体栄養膜細胞などでは、H11 が Vpx と直接結合し、さらに分解に導くことで SAMHD1 が本来の機能を発揮し HIV-2 複製に不利な環境を維持させることができる。

これらの結果から、今回新たに Vpx 結合因子として同定した H11 の機能が、胎盤組織の中でも特に母子の血液が交わる境界面にあたる合胞体栄養膜細胞において発現することにより、HIV-2 の母子垂直感染を防ぐ一助を担っていることが考えられた。また、H11 を強制発現させた MDM においても HIV-2 感染が抑制されたことから、細胞に H11 発現を誘導できる誘導剤を処理することで、HIV 感染抑制的な作用が得られる可能性が示唆された。

## 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 4 件)

(1) Ayumi Kudoh (7名略-1 番目), Akihide Ryo "H11/HSPB8 restricts HIV-2 Vpx to restore the anti-viral activity of SAMHD1" *Frontiers in Microbiology*, 13



June 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00883  
( 査読有 )

( 2 ) Kei Miyakawa, Ayumi Kudoh, Akihide Ryo ( 1 2 名略 6 番目 ) “ ASK1 restores the antiviral activity of APOBEC3G by disrupting HIV-1 Vif-mediated counteraction. ” Nature Communications Apr 22, No. 6:6945, 2015, doi: 10.1038/ncomms7945. ( 査読有 )

( 3 ) Mayuko Nishi, Ayumi Kudoh, Akihide Ryo ( 5 名略 3 番目 ) “ Induced cancer stem-like cells as a model for biological screening and discovery of agents targeting phenotypic traits of cancer stem cell. ” Oncotarget Vol.5, No. 18, pp8665-8680, 2014 ( 査読有 )

( 4 ) Satoko Matsunaga, Ayumi Kudoh, Akihide Ryo ( 1 0 名略 6 番目 ) “ Wheat germ cell-free system-based production of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of human parainfluenza virus type 3 for generation and characterization of monoclonal antibody. ” Frontiers in Microbiology May 13, Vol.5: 208, 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00208. eCollection 2014. ( 査読有 )

〔学会発表〕(計 4 件)

工藤あゆみ, 松永智子, 澤崎達也, 梁明秀, HIV-1 プロテアーゼによる自然免疫回避機構の解析, 第 29 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京ドームホテル(東京), 2015/12/1

Ayumi Kudoh, Satoko Matsunaga, Tatsuya Sawasaki, Akihide Ryo, HIV-1 protease cleaves TBK1 to evade innate immune responses, 第 14 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫), 2015/9/8, 国内.

工藤あゆみ, 松永智子, 澤崎達也, 梁明秀, ヒトプロテインキナーゼ ウイルスタンパク質インタラクトーム解析による HIV 感染制御因子の探索, 日本プロテオーム学会 2015 年会, くまもと森都心プラザ(熊本), 2015/7/23, 国内

Ayumi Kudoh, Kei Miyakawa, Satoko Matsunaga, Isao Kosugi, and Ryo Akihide, H11/HSPB8 confers HIV resistance to Human placental trophoblasts, 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 奈良県新公会堂(奈良), 2014/9/24

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 あゆみ (KUDOH, Ayumi)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号 : 30616404