原 著

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase は HIV-1 粒子内への tRNA^{Lys3} 取込みを抑制する

岸本 直樹 1 , 鬼塚 彩 \mathcal{P}^{1} , 杉本 幸 \mathcal{P}^{1} , 高宗 暢 \mathcal{P}^{1} , 庄司 省 \mathcal{P}^{1} , 三隅 将 \mathcal{P}^{1} , 高宗 暢 \mathcal{P}^{1} , 庄司 省 \mathcal{P}^{1} , 三隅 将 \mathcal{P}^{1} , 高宗 暢 \mathcal{P}^{1} , 庄司 省 \mathcal{P}^{1} , 三隅 将 \mathcal{P}^{1}

目的: HIV-1 粒子を標的としたプロテオーム解析により、HIV-1 複製と関連する宿主性タンパク質を探索しその作用機序の解明を行う。

方法:精製した HIV-1 粒子を二次元電気泳動によって分離した後、質量分析によるプロテオーム解析を行った。プロテオーム解析によって明らかにした、ウイルス粒子内に取込まれている宿主性タンパク質をノックダウンした細胞および過剰発現させた細胞から産生されるウイルスを調製し、HIV-1 感染の各ステップにおける複製効率を評価した。

結果:プロテオーム解析の結果、ウイルス粒子内には glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) が取込まれていることを明らかにした。GAPDH の取込みを減少させたウイルスは感染価が上昇し、一方で GAPDH の取込みを増加させたウイルスでは感染価が減少した。この 2 種類のウイルスを詳細に調べたところ、HIV-1 逆転写反応のプライマーとなる tRNA^{Lys3} の取込み量がGAPDH の取込み量と逆相関していた。

結論: GAPDH は $tRNA^{Lys}$ の HIV-1 粒子内への取込みを抑制する働きをもつことを初めて明らかにした。本知見は、 $tRNA^{Lys}$ 取込み機構に関する更なる理解のために有用なものであると考えられる。

キーワード: HIV, GAPDH, 逆転写, tRNA^{Lys3}, LysRS

日本エイズ学会誌 15:158-163, 2013

序 文

HIV-1 ゲノムは約 9.2 kb であり、わずか 20 種類足らず のウイルス性タンパク質をコードしているにすぎないた め、HIV-1 は効率的な複製を行うために、多くの宿主性タ ンパク質を利用することが知られている。さらに, HIV-1 粒 子内に取込まれる宿主性タンパク質も重要な役割を担って いる。実際, Cyclophilin A や lysyl-tRNA synthetase (LysRS) のような宿主性タンパク質は、Pr55^{gag} や p160^{gag-pol} と相互 作用することでウイルス粒子内に取込まれるが、これら は、Pr55^{gag} の folding や逆転写反応のプライマーとなる宿 主由来 tRNA^{Lys3} をウイルス粒子内に取込むなどの機能を 有する1~6)。そこで、ウイルス粒子内に取込まれ、複製に 重要である宿主性タンパク質を探索するために、精製した ウイルス粒子そのものをサンプルとし二次元電気泳動およ U matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) を用いて解析したところ, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を同定

著者連絡先:三隅将吾(〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1 熊本大学大学院生命科学研究部薬学生化学分 野)

2013年3月22日受付;2013年5月14日受理

した。

GAPDH は解糖系酵素として有名であるが、近年 moonlighting protein として注目されているタンパク質である。その機能は DNA 修復や複製、アポトーシスなど多くの生体内機構の制御に関与することや $^{7\sim101}$ 、B型肝炎ウイルスのコアをリン酸化することやヒトパラインフルエンザウイルス 3型ではウイルス粒子内に取込まれることで感染を抑制するなどウイルス複製に関与することが報告されている 11,121 。そのため、GAPDH が HIV-1 複製機構に関与している可能性は高いが、これまでに GAPDH が HIV-1 粒子内に取込まれているという知見しかなく 131 、その役割については明らかになっていなかった。

本研究では、ウイルス粒子内に取込まれる GAPDH の量とウイルス粒子内に取込まれる tRNA^{Lys3} の量は逆相関を示すことを明らかにした。この知見は、HIV 複製機構にGAPDH が関与することを初めて明らかにしたものであり、HIV-1 複製機構に新しい知見を加えるものである。

方 法

二次元電気泳動に用いたウイルスは $HIV-1_{LAV-1}$ である $^{14)}$ 。 GAPDH の取込みを減少させたウイルスは,CEM/LAV-1 細胞に siRNA を処理し調製した $^{15)}$ 。一方,GAPDH の取込

みを増加させたウイルスは、HEK293 細胞に GAPDH 発現ベクターおよび HIV-1 発現ベクターである pNL-CH¹⁶⁾ を cotransfection することで調製した¹⁵⁾。逆転写後期産物および感染価の評価には TZM-bl 細胞を用いた。ウイルス粒子内に取込まれた tRNA^{Lys3} は、tRNA^{Lys3}-F-primer(5′-TGGCGCCCGAACAGGGAC-3′)をプライマーとして逆転写を行ったのち、tRNA^{Lys3}-F-primer および tRNA^{Lys3}-R primer(5′-GCATCAGACTTTTAATCTGAGGG-3′)を用いてリアルタイム PCR にて定量し、HIV-1 ゲノム RNA を SK38 および SK39 をプライマーとして用いた定量結果にて補正した¹⁵)。

結 果

 $HIV-1_{LAV-1}$ 持続感染細胞株である CEM/LAV-1 細胞の培養上清から精製した $HIV-1_{LAV-1}$ を二次元電気泳動および MALDI-TOF MS によって解析したところ、ウイルス粒子

内に GAPDH が取込まれていた。また、二次元電気泳動後 に western immunoblotting を行ったところ、等電点の異なる少なくとも 5 種類の GAPDH isoform (pI: 7.61, 7.63, 8.03, 8.50, 9.02) がウイルス粒子内に取込まれていることが明らかとなった。

GAPDH がウイルス粒子内に取込まれる意義について検討するために、細胞毒性がない濃度の siRNA を用いてウイルス産生細胞内 GAPDH を減少させ、ウイルス粒子内に取込まれる GAPDH の量を減少させたウイルスを作製した(図 1A; HIV- 1_{LAV-1})。このウイルスの感染価を TZM-bl 細胞を用いて評価したところ、感染価の有意な上昇が見られた(図 1B)。そこで、HIV-1 感染初期過程のどのステップが増強されているのかを検討した。その結果、ウイルス粒子内に取込まれる GAPDH の量が減少すると、逆転写後期産物量が増加していたため(図 1C)、逆転写反応に着目した。HIV-1 逆転写反応は、ウイルス粒子内に取込んだ宿主

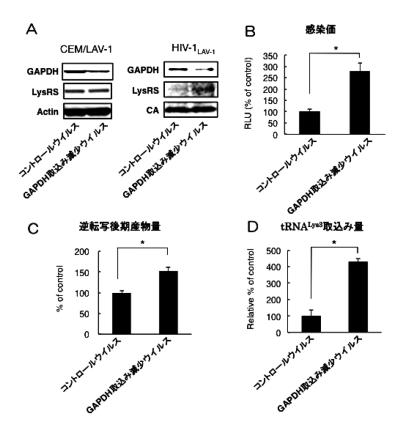


図1 粒子内 GAPDH 取込みを減少させたウイルスは、感染価が上昇する

(A) ウイルス産生細胞である CEM/LAV-1 細胞内 GAPDH を siRNA によってノックダウンした後に(CEM/LAV-1),培養上清から回収したウイルスは,ウイルス粒子内に取込まれる GAPDH が減少していた(HIV-1 $_{\text{LAV-1}}$)。一方,GAPDH に対する siRNA 処理によって細胞内 LysRS の発現に変化は見られなかったが,ウイルス粒子内に取込まれる LysRS は増加していた(HIV-1 $_{\text{LAV-1}}$)。(B)ウイルス粒子内に取込まれる GAPDH の量が減少すると感染価が上昇した。(C)ウイルス粒子内に取込まれる GAPDH の量が減少すると逆転写後期産物量が増加した。(D)ウイルス粒子内に取込まれる GAPDH の量が減少するとウイルス粒子内に取込まれる tRNA Lys3 の量が増加した。

由来 $tRNA^{Lys3}$ をプライマーとして用いる。ウイルス粒子内に取込まれた $tRNA^{Lys3}$ の検出を行ったところ,ウイルス粒子内に取込まれる GAPDH の量が減少すると取込まれる $tRNA^{Lys3}$ の量が増加することが明らかとなった(図 $tRNA^{Lys3}$ の量が増加することが明らかとなった(図 $tRNA^{Lys3}$ は $tRNA^{Lys3}$ と複合体を形成し, $tRNA^{Lys3}$ と相互作用することでウイルス粒子内に取込まれるとされていることから $tRNA^{Lys3}$ と同様に増加していた(図 $tRNA^{Lys3}$ と同様に増加していた(図 $tRNA^{Lys3}$ と同様に増加していた(図 $tRNA^{Lys3}$ と同様に増加していた(図 $tRNA^{Lys3}$ を可能に対する $tRNA^{Lys3}$ を可能に対する $tRNA^{Lys3}$ を可能に対する $tRNA^{Lys3}$ を表し、細胞内での $tRNA^{Lys3}$ を表し、 $tRNA^{Lys$

そこで、ウイルス産生細胞内の GAPDH を過剰発現させ ることでウイルス粒子内に取込まれる GAPDH の量を増加 させたウイルスを作製し、感染価の評価およびウイルス粒 子内に取込まれる tRNA Lys3 の検出を試みた。GAPDH 発現 ベクターおよび pNL-CH を cotransfection された HEK293 細胞では、GAPDH 発現の亢進が見られ(図 2A; HEK293)、 ウイルス粒子内に取込まれる GAPDH の量の増加が確認で きた(図 2A; HIV-1_{NL-CH})。得られた GAPDH の取込みが増 加したウイルスは、TZM-bl 細胞を用いた感染価の評価に おいて有意な減少を示した(図2B)。同様にウイルス粒子 内に取込まれた tRNA^{Lys3} の量も減少していた (図 2C)。ま た, GAPDH 発現ベクター処理によって, 細胞内の LysRS 発現量に差はないが、ウイルス粒子内に取込まれる LysRS の量は減少しているという結果も得た (data not shown)。 これらのウイルス粒子内に取込まれる GAPDH の量を増加 させることで得た結果は、取込まれる GAPDH の量を減少 させたウイルスとは逆の結果である。したがって、ウイル ス粒子内に取込まれる GAPDH の量と取込まれる tRNA Lys3 の量および感染価は逆相関を示すことが明らかとなった。

考 察

HIV-1 複製過程を十分に理解するためには、ウイルス複製に関与する宿主性タンパク質にも着目しなければならない。GAPDH は、A 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルスのウイルス複製に寄与することが報告されており、また、Ottらの報告^[3] によってHIV-1 粒子内に GAPDH が取込まれることは知られていたタンパク質である。しかし、これまでに HIV-1 複製との関係は十分に明らかにされていなかった。本研究では、HIV-1 逆転写反応のプライマー tRNA^{Lys3}の取込みにGAPDH が関与していることを示した。なお、現時点で

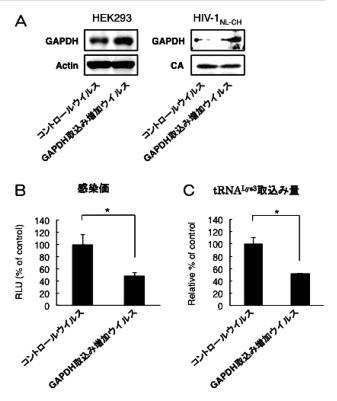


図2 粒子内 GAPDH 取込みを増加させたウイルスは、感染価が低下する

(A) HEK293 細胞に GAPDH 発現ベクターおよび pNL-CH を cotransfection 後,細胞内 GAPDH は増加しており(HEK293),一方,培養上清から回収したウイルスは,ウイルス粒子内に取込まれる GAPDH が増加していた(HIV- $\mathbf{1}_{\text{NL-CH}}$)。(B) ウイルス粒子内に取込まれる GAPDH の量が増加すると感染価が低下した。(C) ウイルス粒子内に取込まれる GAPDH の量が増加するとウイルス粒子内に取込まれる tRNA Lys3 の量が減少した。

GAPDH isoform の等電点の違いを明らかにすることはできていない。これまでに GAPDH の Ser, Thr, Tyr 残基がリン酸化などの翻訳後修飾を受けることが知られているため^{17,18)}, ウイルス粒子内に取込まれた GAPDH isoform もリン酸化などの翻訳後修飾を受けていると考えられる。今後 GAPDH isoform の等電点の違いを翻訳後修飾の観点から詳細に解析を進めることができれば、GAPDH と HIV-1 複製機構の関係をより詳細に明らかにすることができると考えられる。

本研究では、ウイルス粒子内に取込まれる GAPDH の量と tRNA^{Lys3} の量は逆相関を示すことを明らかにできた。われわれのグループは、GAPDH は逆転写酵素活性そのものに影響を与えず、さらに GAPDH のウイルス粒子内への取

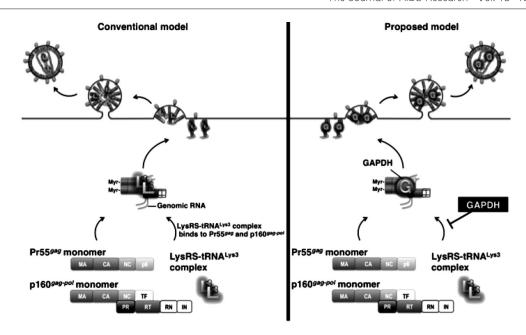


図 3 GAPDH による競合的 tRNA^{Lys3} 取込み阻害のモデル 簡単に示すために、それぞれを 1 分子で示した。これまで、LysRS-tRNA^{Lys3} 複合体は、Pr55^{gog} や p160^{gog-pol} と相互作用し HIV-1 ゲノム RNA とともにウイルス粒子内に取込まれることが知られてい たが(Conventional model)、本研究により、GAPDH は Pr55^{gog} や p160^{gog-pol} と相互作用しウイルス粒 子内に取込まれることで、LysRS-tRNA^{Lys3} 複合体の取込みを競合的に阻害していることが示唆され た(Proposed model)。

込みがウイルス粒子内に取込まれる HIV-1 ゲノム RNA そのものの量には影響しないということを確認している $^{15)}$ 。 Gabor らの研究によりウイルス粒子内に取込まれる $tRNA^{Lys3}$ の量が HIV-1 感染価に影響することから $^{3)}$, GAPDH は $tRNA^{Lys3}$ の取込みを競合的に阻害することで, HIV-1 の感染効率を低下させる宿主性タンパク質と考えられる。 HIV-1 は Tetherin や APOBEC3G/F などの感染抵抗性因子に対し Vpu や Vif といった拮抗する因子を有していることが知られている一方で, GAPDH に拮抗する因子についてはまだ同定できていない。 $Pr55^{sag}$ や $p160^{sag-pol}$ といった前駆体タンパク質が翻訳後, HIV-1 感染細胞の形質膜へ移行する際に多量体を形成し, GAPDH の結合領域をマスクすることにより, GAPDH の作用から逃れている可能性も考えられる。

まとめると、これまでの報告により $tRNA^{Lys3}$ の取込み機構は、 $tRNA^{Lys3}$ が LysRS と複合体を形成すること、さらに LysRS が $Pr55^{gog}$ や $p160^{gog-pol}$ と相互作用することから、 $LysRS-tRNA^{Lys3}$ 複合体取込み機構のモデルが提唱されている(図 3; Conventional model)。このモデルは、LysRS がカプシドの C 末端 領域 と相互作用することや $^{19,20)}$ 、 $tRNA^{Lys3}$ は逆転写酵素の thumb thumb

と $^{21)}$ をふまえたものである。一方で、われわれのグループは GAPDH は LysRS と相互作用せずに、 $^{15)}$ や 160 と相互作用することを共免疫沈降法によって確認していることから $^{15)}$ 、本知見によって、GAPDH が LysRS- $^{15)}$ で $^{15)}$ で

本知見は、HIV-1 複製機構に関与する宿主性タンパク質を新たに示し、更なる HIV-1 複製機構の理解につながるものであると考えられる。また、GAPDH が $Pr55^{gag}$ や $p160^{gag-pol}$ と相互作用する様式を模倣した低分子化合物は、新たな作用機序を持つ新規抗 HIV-1 薬として有用となるかもしれない。

謝辞

本研究に際し、pNL-CH の分与および有益なご意見を賜りました Swanstrom 教授(University of North Carolina)ならびに HIV-1 positive plasma を分与いただきました松下修三教授(熊本大学エイズ学研究センター)に深謝いたします。本研究に用いた、TZM-bl 細胞は、AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH より入手したものであり、本研究は、MEXT 科研費 24390032 の助成を受けたものです。

文 献

- Cen S, Khorchid A, Javanbakht H, Gabor J, Stello T, Shiba K, Musier-Forsyth K, Kleiman L: Incorporation of lysyltRNA synthetase into human immunodeficiency virus type
 J Virol 75: 5043-5048, 2001.
- 2) Franke EK, Yuan HE, Luban J: Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. Nature 372: 359-362, 1994.
- 3) Gabor J, Cen S, Javanbakht H, Niu M, Kleiman L: Effect of altering the tRNA (Lys) (3) concentration in human immunodeficiency virus type 1 upon its annealing to viral RNA, GagPol incorporation, and viral infectivity. J Virol 76: 9096-9102, 2002.
- 4) Ott DE, Coren LV, Johnson DG, 2nd Sowder RC, Arthur LO, Henderson LE: Analysis and localization of cyclophilin A found in the virions of human immunodeficiency virus type 1 MN strain. AIDS Res Hum Retroviruses 11: 1003-1006, 1995.
- 5) Thali M, Bukovsky A, Kondo E, Rosenwirth B, Walsh CT, Sodroski J, Gottlinger HG: Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. Nature 372: 363-365, 1994.
- 6) Kobbi L, Octobre G, Dias J, Comisso M, Mirande M: Association of mitochondrial Lysyl-tRNA synthetase with HIV-1 GagPol involves catalytic domain of the synthetase and transframe and integrase domains of Pol. J Mol Biol 410: 875–886, 2011.
- Sirover MA: New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase. Biochim Biophys Acta 1432: 159-184, 1999.
- 8) Sirover MA: On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. Biochim Biophys Acta 1810: 741–751, 2011.
- 9) Sirover MA: Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-

- 3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. J Cell Biochem 66: 133-140, 1997.
- 10) Ishitani R, Chuang DM: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antisense oligodeoxynucleotides protect against cytosine arabinonucleoside-induced apoptosis in cultured cerebellar neurons. Proc Natl Acad Sci USA 93: 9937-9941, 1996.
- 11) Duclos-Vallee JC, Capel F, Mabit H, Petit MA: Phosphory-lation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein kinase activity. J Gen Virol 79: 1665–1670, 1998.
- 12) De BP, Gupta S, Zhao H, Drazba JA, Banerjee AK: Specific interaction in vitro and in vivo of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and LA protein with cis-acting RNAs of human parainfluenza virus type 3. J Biol Chem 271: 24728-24735, 1996.
- 13) Ott DE, Coren LV, Johnson DG, Kane BP, 2nd Sowder RC, Kim YD, Fisher RJ, Zhou XZ, Lu KP, Henderson LE: Actin-binding cellular proteins inside human immunodeficiency virus type 1. Virology 266: 42-51, 2000.
- 14) Misumi S, Inoue M, Dochi T, Kishimoto N, Hasegawa N, Takamune N, Shoji S: Uncoating of human immunodeficiency virus type 1 requires prolyl isomerase Pin1. J Biol Chem 285: 25185–25195, 2010.
- 15) Kishimoto N, Onitsuka A, Kido K, Takamune N, Shoji S, Misumi S: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase negatively regulates human immunodeficiency virus type 1 infection. Retrovirology 9: 107, 2012.
- 16) Lee SK, Harris J, Swanstrom R: A strongly transdominant mutation in the human immunodeficiency virus type 1 gag gene defines an Achilles heel in the virus life cycle. J Virol 83: 8536-8543, 2009.
- 17) Rush J, Moritz A, Lee KA, Guo A, Goss VL, Spek EJ, Zhang H, Zha XM, Polakiewicz RD, Comb MJ. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. Nat Biotechnol 23: 94-101, 2005.
- 18) Seo J, Jeong J, Kim YM, Hwang N, Paek E, Lee KJ. Strategy for comprehensive identification of post-translational modifications in cellular proteins, including low abundant modifications: application to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J Proteime Res 7: 587–602, 2008.
- 19) Javanbakht H, Halwani R, Cen S, Saadatmand J, Musier-Forsyth K, Gottlinger H, Kleiman L: The interaction between HIV-1 Gag and human lysyl-tRNA synthetase during viral assembly. J Biol Chem 278: 27644-27651, 2003.

- 20) Javanbakht H, Cen S, Musier-Forsyth K, Kleiman L: Correlation between tRNALys3 aminoacylation and incorporation into HIV-1. J Biol Chem 277: 17389–17396, 2002.
- 21) Khorchid A, Javanbakht H, Parniak MA, Wainberg MA, Kleiman L: Sequences within Pr160gag-pol affecting the selective packaging of tRNALys into HIV-1. J Mol Biol 299: 17-26, 2000.

Human tRNA^{Lys3} Incorporation into HIV-1 Virions Was Suppressed by Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase

Naoki Kishimoto¹⁾, Ayano Onitsuka¹⁾, Yukihiko Sugimoto¹⁾, Nobutoki Такамине¹⁾, Shozo Shoji^{1, 2)} and Shogo Misumi¹⁾

Objective: HIV-1 replication are regulated by host proteins. Here, we focus on exploring novel host proteins related to HIV-1 replication and solving the roles.

Methods: A purified HIV- $1_{\text{LAV-1}}$ preparation was analyzed by 2D gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Viruses that showed a decrease or increase in the packaging level of host proteins were prepared and their replication efficiency were examined.

Results: Proteomic analysis demonstrated that glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is inside the virions. The GAPDH-packaging-defective virus showed an increased infectivity, whereas the enhanced-GAPDH-packaging virus showed an decreased infectivity. Additional analyses indicated an inverse correlation between the packaging level of tRNA^{Lys3} and GAPDH inside the virions.

Conclusion: We demonstrated that GAPDH suppressed the packaging of tRNA Lys3 into HIV-1. These results may allow us a better understanding of the mechanism for the tRNA Lys3 packaging.

Key words: HIV, GAPDH, reverse transcription, tRNA LysRS

¹⁾ Department of Pharmaceutical Biochemistry, Faculty of Medical and Pharmaceutical Science, Kumamoto University and ²⁾ Kumamoto Health Science University