

## 第18回日本エイズ学会 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

## 新規 HIV-1 感染制御宿主因子の同定およびその機能解明

## Investigation of Newly Identified Host Proteins Regulating HIV-1 Infection

武内 寛明

Hiroaki TAKEUCHI

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・ウイルス制御学分野

Department of Molecular Virology, Tokyo Medical and Dental University

日本エイズ学会誌 20: 117-123, 2018

## はじめに

筆者はこれまで、「免疫不全ウイルスをモデルとして、ウイルス感染増殖機構を分子・細胞レベルで解明し、新規ウイルス感染制御法の基盤確立を目指す」ことを目標とした研究を進めてきた。具体的には、サル免疫不全ウイルスのヒトへの種間感染伝播を制御するヒト宿主タンパク質およびヒト免疫不全ウイルスの感染増殖伝播を制御するヒト宿主タンパク質を同定し、それらの分子作用機序のいくつかを明らかにしてきた。本稿では、筆者のこれまでの代表的な研究から明らかとなった「免疫不全ウイルスと宿主とのせめぎあい」について概説する。

## 1. サル免疫不全ウイルス (SIV) のヒトへの種間感染伝播機構に関わるウイルス側・宿主側因子

## 1-1. SIV 感染動態におけるヒト APOBEC3G の役割

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は、SIV が「種の壁」を乗り越え、ヒトに病原性を示す HIV へと変貌を遂げた歴史的背景が明らかとなっている。ところが、HIV はチンパンジーを除くヒト以外の生物種において感染増殖することがきわめて困難であり、そのため、HIV の宿主域は限定されていると理解されている<sup>1-4)</sup>。その宿主域の決定にはさまざまな宿主因子が関与していると考えられており、それらの同定に向けた研究が進められてきた。RNA-editing enzyme の一種である APOBEC3G (Apo3G) は、HIV ゲノムに G → A 変異を導入し感染性を失わせる HIV 抑制宿主因子として知られており、その抗 HIV 活性は HIV アクセサリータンパク質である Vif により相殺される<sup>5)</sup>。この感染制御機構はウイルス感染性を宿主特異的に維持するものであると考えられていた<sup>6)</sup>。ところが詳細な解析の結果、

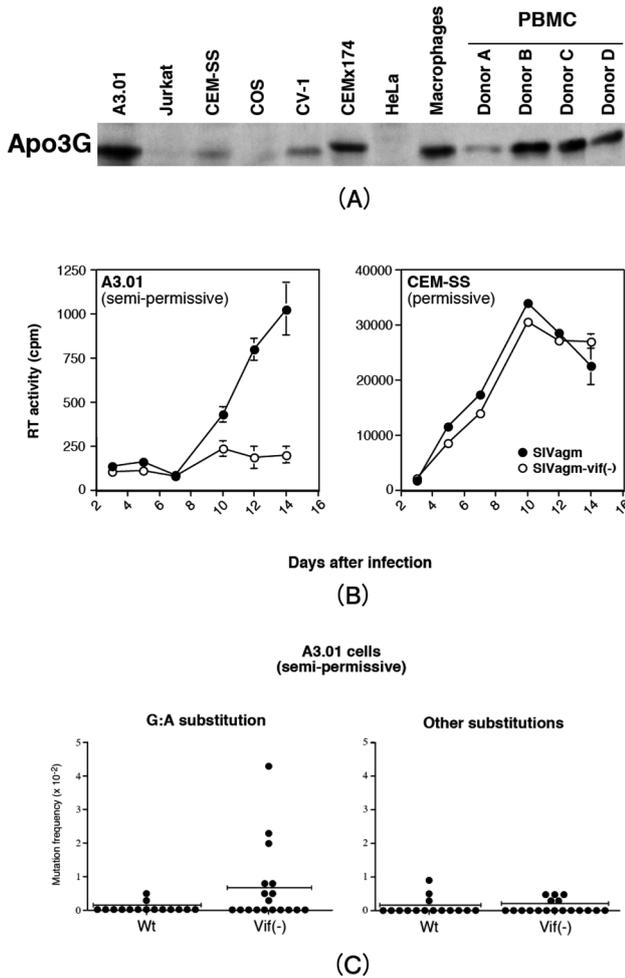
SIV 由来の Vif タンパク質は、ヒト細胞内における SIV ゲノムの G → A 変異挿入を阻止し感染性維持に必要であることが明らかになった (図 1)<sup>7)</sup>。このことは、ヒト Apo3G が SIV 感染において「種の壁」として機能しうることを示唆している。

## 1-2. SIV 感染動態におけるヒト Cyclophilin の役割

Cyclophilin A (CypA) は、免疫抑制剤である Cyclosporine A (CsA) の標的リガンドとして発見された、広範囲の生物種に存在している分子シャペロンであり<sup>8)</sup>、ウイルス粒子内に取り込まれた CypA および HIV-1 感染後の標的細胞側 CypA と、HIV-1 キャプシドタンパク質 (CA) との相互作用が HIV-1 複製に必須であることが知られている<sup>9,10)</sup>。一方、CypA のウイルス粒子内への取り込みは、レンチウイルスでは HIV-1 およびヒトに比較的近縁であるチンパンジーを宿主とする SIVcpz を除いて、HIV-2 や SIV には取り込まれないとされている<sup>11)</sup>。そのため、SIV に対するヒト CypA の効果はほとんど解析されていなかった。筆者はヒト細胞での SIV 感染動態に対するヒト CypA の効果について解析を行い、ウイルス複製に必須であるアクセサリータンパク質の 1 つである Vif が、SIV 粒子内へのヒト CypA の取り込みを制御し、ウイルス感染増殖効率を維持することを明らかにした (図 2)<sup>12)</sup>。このことはヒト Apo3G 非依存적であり、さらには HIV-1 Vif の効果としては認められなかったことから、SIV がヒト細胞において感染増殖するための特異的な事象と考えられる。この結果から、SIV がヒトに感染する際に、CypA は抑制的に機能しうる、すなわち「種の壁」としての可能性が示唆された。また以前から CsA による HIV-1 感染抑制効果はヒト CypA の機能阻害に起因することが知られているが<sup>13)</sup>、SIV 感染においては、CsA による明らかな感染増殖促進効果が示された<sup>14)</sup>。このことは、CsA に影響を受ける宿主因子が、ヒト細胞における SIV 感染指向性を規定していると考えられる。更なる解析の結果、CsA 感受性宿主因子であるヒト Cyclophilin B が SIV 感染抑制因子であることが明らかになった (図 3)<sup>14)</sup>。

著者連絡先：武内寛明 (〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学 (TMDU) 医歯学総合研究科ウイルス制御学分野)

2018年3月22日受付

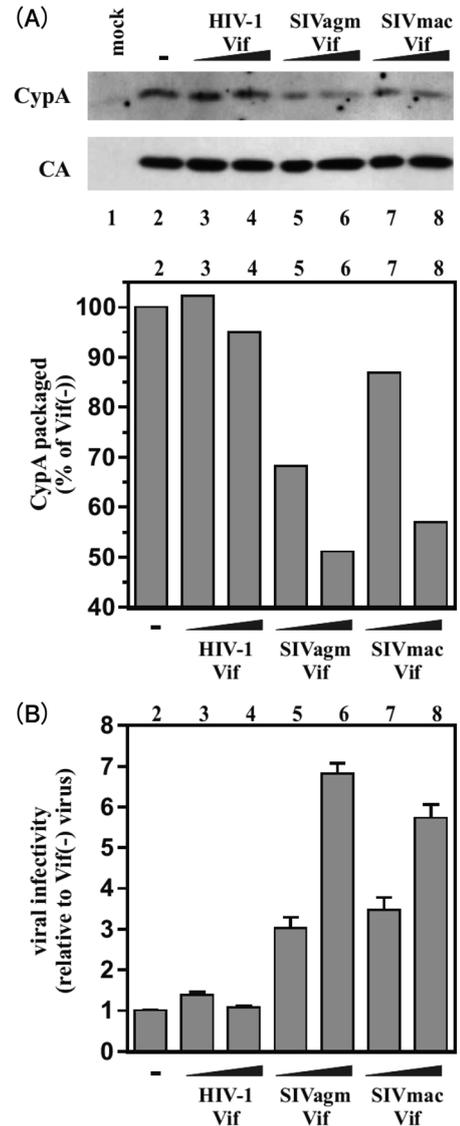


**図 1** SIV 感染動態におけるヒト APOBEC3G の役割 (A) ヒト細胞内における APOBEC3G (Apo3G) の発現を示す。(B) Apo3G 高発現 T リンパ球 (A3.01 細胞) および低発現 T リンパ球 (CEM-SS 細胞) における Vif 欠損 SIV の感染動態を示す。(C) A3.01 細胞内における SIV ゲノム (3'-LTR) 上の G → A およびその他の遺伝子変異の頻度を示す (Takeuchi *et al.* : J Biol Chem 280 : 375-382, 2005 より改編)<sup>7)</sup>。

これらの研究成果は、「免疫不全ウイルスの宿主指向性におけるシャペロンタンパク質の役割」を明らかにしたものである<sup>15,16)</sup>。

**2. ヒト免疫不全ウイルスの感染増殖伝播機構に関わるウイルス側・宿主側因子—HIV 感染動態における宿主リン酸化酵素 MELK の役割**

HIV-1 キャプシド (CA) タンパク質によって形成されるコア構造体は、感染直後の逆転写反応によるウイルス DNA 合成の“場”を提供・維持するために必要不可欠であると



**図 2** SIV Vif によるヒト CypA の SIV 粒子内取り込み制御と粒子感染性との相関

(A) Apo3G 発現がきわめて低い T リンパ球 (Jurkat 細胞) から産生された Vif 欠損 SIV 粒子内における HIV Vif (レーン 3-4) または SIV Vif (レーン 5-6, 7-8) タンパク存在量を増加させた場合の CypA 取り込み量を示す (上段: ウェスタンブロッティング法による CypA および SIV CA, 下段: SIV 粒子内の CypA 存在量を, CA タンパクを用いて相対定量したもの)。(B) CypA 取り込み量と SIV 感染性との相関を示す (Takeuchi *et al.* : J Virol 81 : 8080-8090, 2007 より改編)<sup>12)</sup>。

考えられている。近年、HIV-1 感染直後のウイルス DNA 合成効率を維持するためには、コア構造体の崩壊プロセスとの「時空間的」な関わり合いが必要であることが明らかになってきた<sup>17-20)</sup>。HIV-1 感染が成立するためには、感染

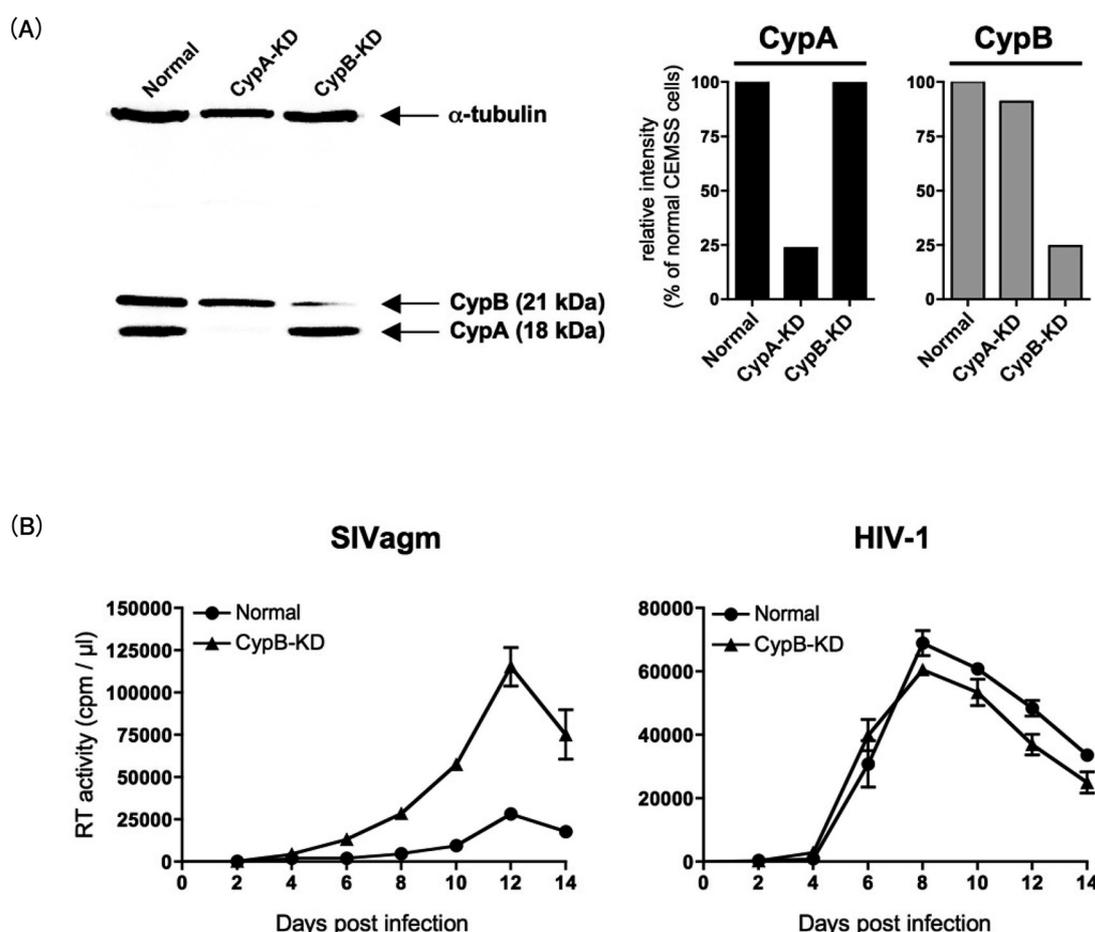


図 3 CypB 発現抑制ヒト T リンパ球 (CEM-SS 細胞) における HIV および SIV 感染増殖伝播効率  
 (A) 左側: ウェスタンブロット法による CypA または CypB 発現抑制ヒト T リンパ球内の CypA および CypB のタンパク発現量を示す。右側: CypA または CypB の発現量を, 内在性コントロールタンパク質 ( $\alpha$ -tubulin) を用いて相対定量した数値を示す。(B) 正常細胞または CypB 発現抑制細胞における HIV および SIV 感染増殖伝播効率の比較を示す (Takeuchi *et al*: *Retrovirology* 9: 3, 2012 より改編)<sup>14)</sup>。

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いまだ不明な点が多い。コア構造の崩壊プロセスについては, コア構造の安定化に寄与する宿主因子とコア崩壊を促す宿主因子とのバランスによって成り立っていると考えられている<sup>21)</sup>。以前より, CA タンパク質のリン酸化がウイルス DNA 合成効率の維持において重要であることが示されていることから<sup>22~24)</sup>, コア構造体崩壊から逆転写反応に至る脱殻過程の制御プロセスには, CA タンパク質のリン酸化が直接的に関与していると考えられてきたが, CA タンパク質のリン酸化とコア構造の崩壊プロセスとの関連性については明確ではなかった。筆者は RNA 干渉を利用して作製した機能遺伝子発現抑制 T 細胞ライブラリーを用いて HIV-1 感染制御因子を探索した結果, 宿主リン酸化酵素である Maternal

Embryonic Leucine Zipper Kinase (MELK) を新規 HIV-1 感染制御因子として見出した<sup>25)</sup>。T リンパ球内の MELK タンパク質を減少させると, HIV-1 感染直後の CA コア構造体の崩壊遅延とともにウイルス DNA 合成効率の低下が認められ (図 4), 細胞内 MELK タンパク質発現レベルを回復させると, HIV-1 感染効率が回復した (図 5)。しかしながら MELK 酵素活性変異体タンパク質を用いた場合は, それらの回復が認められなかったことから, HIV-1 感染性の維持には MELK の酵素活性が必要であることが強く示唆された (図 5)。更なる解析の結果, MELK は CA タンパク質の 149 番目のセリン残基 (CA-149) を特異的かつ段階的にリン酸化することがわかった (図 6)。

次に「段階的リン酸化」の意義を解明することを目的として, CA-149 番目のセリン残基をグルタミン酸に変換した「恒常的リン酸化状態を模倣した変異体: CA-S149E」

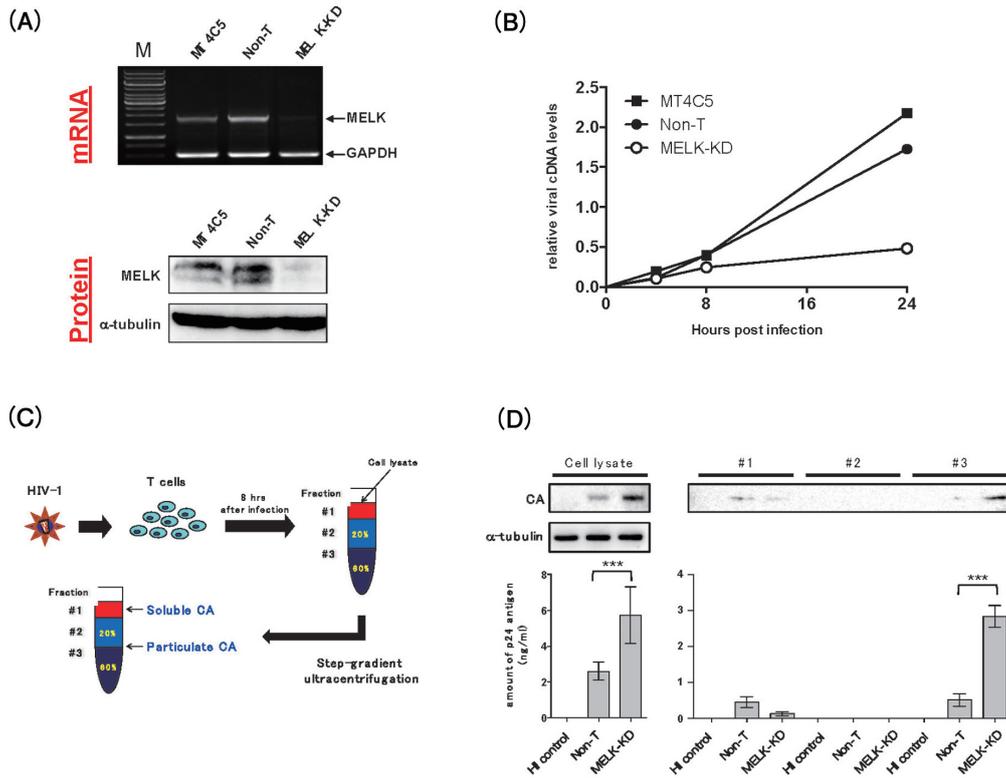


図 4 MELK の HIV コア構造体崩壊制御とウイルス DNA 合成における役割

(A) RNA 干渉を利用した MELK 発現抑制 T リンパ球 (MELK-KD MT4C5 細胞) を示す (上段: mRNA, 下段: タンパク量)。ヒト機能遺伝子を標的としない shRNA 発現コントロール細胞を Non-T 細胞として示す。(B) MT4C5, Non-T, MELK-KD 細胞内における HIV 感染 24 時間までのウイルス DNA 合成効率を示す。(C) HIV-1 感染 8 時間後の T リンパ球細胞内に存在する CA コア構造体をシュクロース密度勾配超遠心法により分離した。20% シュクロース上層 (Fraction #1) には崩壊後のコア由来 CA タンパク質 (Soluble CA) が集積し, 20%/60% シュクロース界面 (Fraction #3) には CA コア多量体 (Particulate CA) が集積する。(D) HIV-1 感染 8 時間後の MELK-KD 細胞内に存在する CA コア構造体は, Non-T 細胞内のそれと比較して有意に増加 (CA コア崩壊遅延を示している) していることがわかる (Fraction #3: Non-T と MELK-KD との比較)。上段はおのこの Fraction に含まれる CA タンパク質をウエスタンブロット法にて検出し, 下段は各 CA タンパク質を酵素免疫測定法にて定量したものを示している。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Takeuchi *et al.*: PLoS Pathog 13: e1006441, 2017 より改編)<sup>25</sup>。

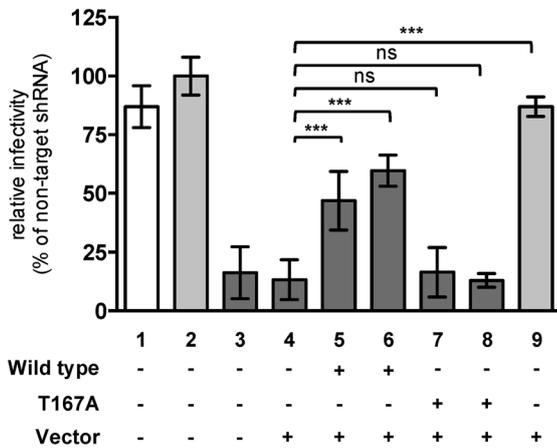


図 5 MELK または MELK 酵素活性変異体発現による MELK 再構築 T リンパ球を用いた HIV 感染効率の比較

MELK-KD 細胞および, MELK または MELK 酵素活性変異体発現による再構築細胞を用いた HIV 感染効率を示す (1: 正常細胞, 2: Non-T コントロール細胞, 3-4: MELK-KD 細胞, 5-6: MELK 再構築細胞, 7-8: MELK 酵素活性変異体 (T167A) 再構築細胞, 9: タンパク発現カセット導入コントロール細胞)。ns, not significant ( $p > 0.05$ ); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Takeuchi *et al.*: PLoS Pathog 13: e1006441, 2017 より改編)<sup>25</sup>。

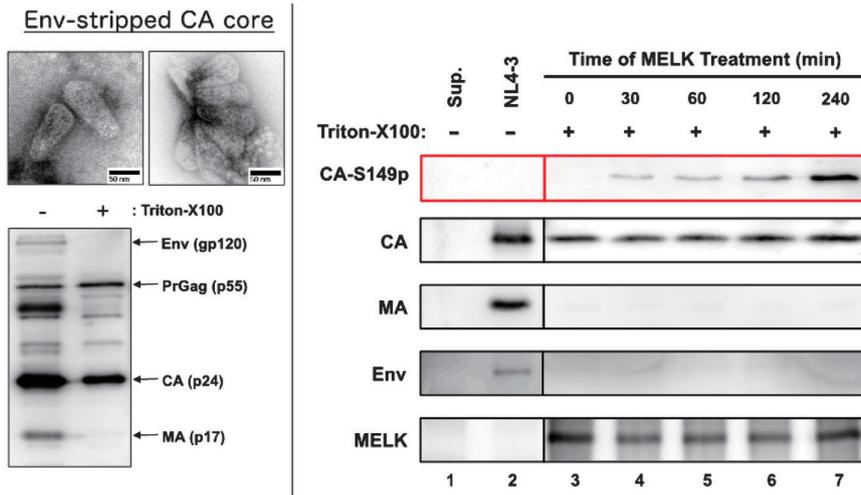


図 6 MELK による HIV コア構造体由来 HIV CA タンパク質の Ser-149 残基段階的リン酸化  
 左側：精製したウイルス粒子のエンベロープを取り除いた CA コア構造体 (Env-stripped CA core)。右側：CA Ser-149 残基のリン酸化を特異的に認識するリン酸化抗体 (CA-S149p) を用いて S149 のリン酸化状態を検出した結果、ウイルス粒子内の S149 のリン酸化は認められないが (lane 2)、時間経過とともに S149 リン酸化 CA コア構造体の増加が認められた (lanes 3-7) (Takeuchi *et al* : PLoS Pathog 13 : e1006441, 2017 より改編)<sup>25)</sup>。

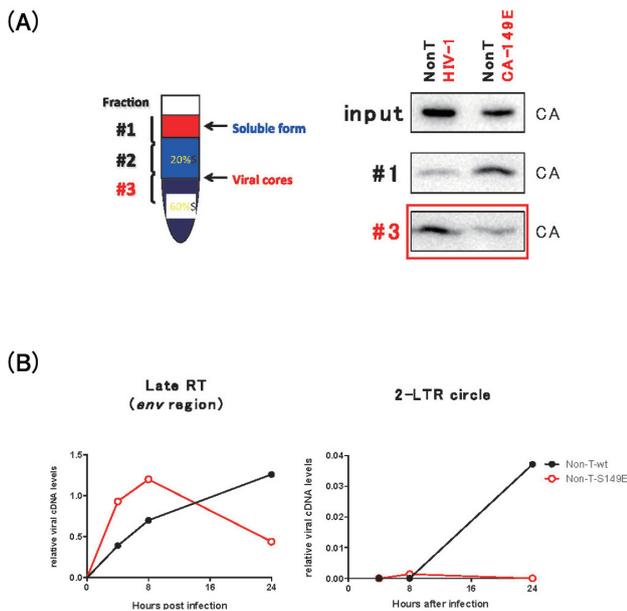


図 7 HIV CA-S149E 変異体の感染動態

(A) Non-T コントロール細胞を用いて図 4C と同様の方法でコア構造体崩壊動態を解析した。HIV CA-S149E 変異体感染 8 時間後の Non-T 細胞内に存在する CA コアは、HIV のそれと比較して有意に減少 (CA コア崩壊促進を示している) していることがわかる (Fraction #3 : Non-T HIV-1 と Non-T CA-S149E との比較)。(B) Non-T コントロール細胞内における HIV (Non-T-wt) および HIV CA-S149E 変異体 (Non-T-S149E) 感染 24 時間までのウイルス DNA 合成効率を示す (左側：逆転写後期産物、右側：ウイルス DNA の核内移行を示す 2-LTR form) (Takeuchi *et al* : PLoS Pathog 13 : e1006441, 2017 より改編)<sup>25)</sup>。

を作製し、HIV-1 感染動態に与える影響を解析した結果、感染直後の CA コア構造体の早期崩壊が起こり、ウイルス DNA 合成効率が促進されることがわかった (図 7)。ところが、早期に合成されたウイルス DNA は時間経過とともに減少し、さらにはウイルス DNA の細胞核への移行を示す 2-LTR form の形成効率が著しく低下することで、S149E 変異体のウイルス感染効率の低下を引き起こしてしまうことが明らかになった (図 7)。このことは、HIV-1 感染効率維持に対する「CA コア構造体崩壊のタイミング制御」の重

要性を強く示唆するものである。現時点において MELK 酵素活性の阻害効果が認められる化合物として、OTSSP167 が知られている<sup>26)</sup>。そこで OTSSP167 を用いて MELK が抗 HIV 薬の創薬分子標的となりうる可能性について検討を行った結果、HIV 感染直後のウイルス DNA 合成効率を低下させることで HIV 感染効率の低下に寄与することが明らかとなり、MELK 酵素活性阻害剤の抗 HIV 薬としての可能性を見出した (図 8)。

以上の結果から、MELK は HIV-1 感染直後の CA コア構

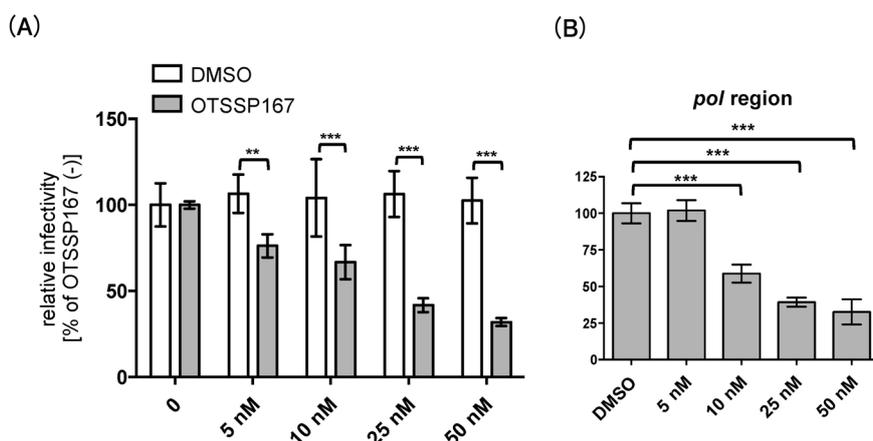


図 8 MELK 酵素活性阻害剤の HIV 感染動態に与える影響

(A) OTSSP167 の異なる濃度存在下における HIV 感染効率を示す。(B) OTSSP167 存在下における HIV 感染 T リンパ球細胞内 (感染 24 時間後) のウイルス DNA 合成効率を示す。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Takeuchi *et al* : PLoS Pathog 13 : e1006441, 2017 より改編)<sup>25</sup>。

造体を認識し CA タンパク質の 149 番目のセリン残基 (CA-149) を「段階的」にリン酸化することでコア構造体崩壊を制御する宿主リン酸化酵素であり、CA-S149 のリン酸化がコア構造体崩壊の引き金の 1 つであることが明らかとなった<sup>25</sup>。

## おわりに

本稿では、筆者がこれまでに行ってきた代表的な研究内容を概説した。近年の細胞生物学の発展により、ウイルスと感染標的細胞内因子との相互作用が徐々に明らかとなってきた。そのなかで、ウイルスに利用される細胞内因子と、ウイルス増殖を阻止しようとする細胞内因子とが混在している事実はいまへん興味深い。現時点での抗 HIV 薬はウイルス固有の酵素や増殖過程を標的としており、副作用が少なくウイルス増殖抑制効果がきわめて高いものが開発されてきている。しかしながら、HIV-1 感染症の根治にいたる方法はいまだ確立されておらず、持続感染が成立することにより引き起こされるウイルス変異や薬剤耐性ウイルスの出現等により、長期的な薬効が望みにくいのが現状である。より普遍的な HIV 増殖抑制効果を示す分子標的として宿主側の HIV 感染制御因子に着目した研究は、HIV 感染制御因子の機能を阻害する新たな抗 HIV 薬の開発につながるだけでなく、現時点での強力な抗 HIV 薬とともに併用することにより、感染初期段階の更なる有効な治療法の 1 つになると考えられる。HIV 感染現象をウイルス側だけでなく宿主側の側面からさまざまな概念・研究手法を用いて理解を深めることは、既存の治療法に加えて新たな感染制御法の基盤確立に貢献できるものと考えられる。

## 謝辞

第 18 回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞の受賞にあたり、米国留学後の日本での研究展開をつねに支えてくださり、本賞へご推薦いただいた俣野哲朗先生 (国立感染症研究所エイズ研究センター) に厚く御礼申し上げます。また本研究は小柳義夫先生 (京都大学ウイルス・再生医科学研究所) および Klaus Strebel 博士 (米国国立アレルギー・感染症研究所) の両人から薫陶を授かることなくして到底成し得ることはできませんでした。深く御礼申し上げます。また現在の研究にご助力をいただいております東京医科歯科大学ウイルス制御学分野の山岡昇司先生に、この場をおかりして御礼を申し上げます。

**利益相反** : 本研究において利益相反に相当する事項はない。

## 文 献

- 1) Besnier C, Takeuchi Y, Towers G : Restriction of lentivirus in monkeys. Proc Natl Acad Sci USA 99 : 11920-11925, 2002.
- 2) Cowan S, Hatzioannou T, Cunningham T, Muesing MA, Gottlinger HG, Bieniasz PD : Cellular inhibitors with Fv1-like activity restrict human and simian immunodeficiency virus tropism. Proc Natl Acad Sci USA 99 : 11914-11919, 2002.
- 3) Hofmann W, Schubert D, LaBonte J, Munson L, Gibson S, Scammell J, Ferrigno P, Sodroski J : Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection. J Virol 73 : 10020-10028, 1999.
- 4) Munk C, Brandt SM, Lucero G, Landau NR : A dominant

- block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 13843–13848, 2002.
- 5) Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH : Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418 : 646–650, 2002.
  - 6) Mariani R, Chen D, Schrofelbauer B, Navarro F, Konig R, Bollman B, Munk C, Nymark-McMahon H, Landau NR : Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 114 : 21–31, 2003.
  - 7) Takeuchi H, Kao S, Miyagi E, Khan MA, Buckler-White A, Plishka R, Strebel K : Production of infectious SIVagm from human cells requires functional inactivation but not viral exclusion of human APOBEC3G. *J Biol Chem* 280 : 375–382, 2005.
  - 8) Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW : Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226 : 544–547, 1984.
  - 9) Takeuchi H, Matano T : Host factors involved in resistance to retroviral infection. *Microbiol Immunol* 52 : 318–325, 2008.
  - 10) Sokolskaja E, Sayah DM, Luban J : Target cell cyclophilin A modulates human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol* 78 : 12800–12808, 2004.
  - 11) Franke EK, Yuan HE, Luban J : Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372 : 359–362, 1994.
  - 12) Takeuchi H, Buckler-White A, Goila-Gaur R, Miyagi E, Khan MA, Opi S, Kao S, Sokolskaja E, Pertel T, Luban J, Strebel K : Vif counteracts a cyclophilin A—imposed inhibition of simian immunodeficiency viruses in human cells. *J Virol* 81 : 8080–8090, 2007.
  - 13) Franke EK, Luban J : Inhibition of HIV-1 replication by cyclosporine A or related compounds correlates with the ability to disrupt the Gag-cyclophilin A interaction. *Virology* 222 : 279–282, 1996.
  - 14) Takeuchi H, Ishii H, Kuwano T, Inagaki N, Akari H, Matano T : Host cell species-specific effect of cyclosporine A on simian immunodeficiency virus replication. *Retrovirology* 9 : 3, 2012.
  - 15) Sakuma R, Takeuchi H : SIV replication in human cells. *Front Microbiol* 3 : 162, 2012.
  - 16) Takeuchi H : Contribution of Cyclophilin A to determination of simian immunodeficiency virus tropism : a progress update. *Vaccine* 28 (Suppl 2) : B51–54, 2010.
  - 17) Campbell EM, Hope TJ : HIV-1 capsid : the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol* 13 : 471–483, 2015.
  - 18) Ambrose Z, Aiken C : HIV-1 uncoating : connection to nuclear entry and regulation by host proteins. *Virology* 454–455 : 371–379, 2014.
  - 19) Fassati A : Multiple roles of the capsid protein in the early steps of HIV-1 infection. *Virus Res* 170 : 15–24, 2012.
  - 20) Hilditch L, Towers GJ : A model for cofactor use during HIV-1 reverse transcription and nuclear entry. *Curr Opin Virol* 4 : 32–36, 2014.
  - 21) Yamashita M, Engelman AN : Capsid-dependent host factors in HIV-1 infection. *Trends Microbiol* 25 : 741–755, 2017.
  - 22) Cartier C, Sivard P, Tranchat C, Decimo D, Desgranges C, Boyer V : Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection. *J Biol Chem* 274 : 19434–19440, 1999.
  - 23) Brun S, Chaloin L, Gay B, Bernard E, Devaux C, Lionne C, Chazal N, Briant L : Electrostatic repulsion between HIV-1 capsid proteins modulates hexamer plasticity and in vitro assembly. *Proteins* 78 : 2144–2156, 2010.
  - 24) Wacharapornin P, Lauhakirti D, Auewarakul P : The effect of capsid mutations on HIV-1 uncoating. *Virology* 358 : 48–54, 2007.
  - 25) Takeuchi H, Saito H, Noda T, Miyamoto T, Yoshinaga T, Terahara K, Ishii H, Tsunetsugu-Yokota Y, Yamaoka S : Phosphorylation of the HIV-1 capsid by MELK triggers uncoating to promote viral cDNA synthesis. *PLoS Pathog* 13 : e1006441, 2017.
  - 26) Chung S, Suzuki H, Miyamoto T, Takamatsu N, Tatsuguchi A, Ueda K, Kijima K, Nakamura Y, Matsuo Y : Development of an orally-administrative MELK-targeting inhibitor that suppresses the growth of various types of human cancer. *Oncotarget* 3 : 1629–1640, 2012.