

HIVアクセサリ―遺伝子Vprを標的とした新規抗エイズ療法開発

所 属 国立国際医療センター・難治性疾患研究部
研究者 大沢宜明

要旨

HIV-Vpr に結合する宿主蛋白質として GAPDH を同定し、機能解析を行った。Vpr は C-末端側に存在するロイシンリッチな領域(LR-20)を介して GAPDH と直接結合して活性化し、細胞内の ATP 量を上昇させることを明らかにした。

1. 研究目的

抗エイズ療法として HAART 療法が行われているが、本治療を受ける HIV 感染者中のウイルス半減期は約 4 3 ヶ月、ウイルスの完全駆逐は 6 8 年かかるとの試算がなされている。一方、現在の全世界における HIV 感染者は 4,000 万人でその内の 90%が開発途上国に居住している。このような現状から、安価で安全かつ新しい戦略に基づいた新規抗エイズ療法の開発が急務と考えられる。

HIV-1 アクセサリ―遺伝子の一つである Vpr は、プロウイルス DNA の核内への移行、潜伏感染した細胞に対するウイルス再産生誘導、さらに、感染した細胞を G2/M 期に貯留させるなどの機能を有することが知られている。申請者が所属する国立国際医療センター研究所、難治性疾患研究部では、Vpr 遺伝子を自由に調節することが可能な細胞株（以下 MIT-23）を世界に先駆けて樹立し、これを用いて Vpr により誘導される細胞周期異常が HIV-LTR 転写活性上昇の分子基盤になっていることを示唆する解析結果が得られている。この知見は、Vpr により誘導される細胞周期異常の分子機構を解析することにより、新しい抗 HIV 因子が開発される可能性を強く示唆する。Vpr の機能の一つに、ウイルス産生誘導が挙げられるが、本研究では、特に細胞外に存在する Vpr により誘導されるトランス作用に着目して、以下のようなステップで解析を展開する。

Vpr と結合する宿主側蛋白質の同定及び分子機構の解析

↓

Vpr の機能を阻害するペプチドあるいは化合物の同定

↓

Vpr により誘導されるウイルス再産生誘導に対する阻害効果の検定

具体的には、Vpr が結合する宿主側の蛋白質を同定し、この蛋白質との結合を阻害することにより、Vpr の機能を阻害するペプチドあるいは化合物を探索する。本研究により、これまでとは作用機構の異なる全く新しい抗 HIV 因子が同定され、新規抗エイズ療法開発の可能性が明らかになると期待される。

また、HIV 感染者の血清中に Vpr 蛋白質が存在することが報告されており、潜伏感染した細胞でのウイルス産生を誘導し、エイズ発症に関与していることが示唆される。さらに、細胞外に添加した Vpr が細胞内に取り込まれることも報告されている。これらのことに着目し、細胞外に添加された Vpr 蛋白質の作用（以下、トランス作用）及び細胞内での動態を解析し、Vpr によるウイルス産生誘導の分子機構を明らかにすることを目的とする。

2. 研究方法

-Two-hybrid screening-

HIV 感染者の Vpr のアミノ酸配列中、高度に保存されている領域である、61-80 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を合成し、ベイトベクターに組み込んだ。HeLa 細胞由来の cDNA ライブラリーをターゲットとし、Two-hybrid assay を行った。得られた陽性クローンをそれぞれ精製し、auto-sequencer により塩基配列を解析した。

-リコンビナント Vpr 蛋白質による GAPDH の活性化誘導-

大腸菌株 BL21 にて発現させた GST-Vpr 融合蛋白質をグルタチオンセファロース・アフィニティーカラムにて抽出した後、PreScission プロテアーゼ処理にてリコンビナント Vpr を精製した。

同様に、大腸菌株 BL21 にて発現させた His-GAPDH 融合蛋白質をニッケル・アフィニティーカラムにて抽出した後、エンテロキナーゼ、プロテアーゼ処理にてリコンビナント GAPDH を精製した。

この、精製 VPR を細胞培養液中に添加して 3 日間培養した後、NADH→NAD への脱水素反応を指標とした GAPDH 活性を測定した。

3. 研究成果

Vpr は C-末端側 45 アミノ酸の領域内に HIV-LTR の転写活性を上昇させるなどの機能ドメインを含むことが報告されている。さらに、転写因子である p300/CBP はこの領域内に含まれる LxxLL モチーフを介して Vpr と結合することが報告されている。また、この領域には、種々の HIV 変異体においても、高度に保存された配列を持つ。この領域 (LR-20) を含むアミノ酸をコードするオリゴヌクレオチドと、HeLa 細胞由来の cDNA ライブラリーとで Two-hybrid assay を行い、得られた陽性クローン 100 個の塩基配列を解析したところ、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)等の ATP 産生に係わる蛋白質

群が高頻度にクローン化された。そこで、この Vpr と GAPDH との相互作用に着目して研究を行った。

リコンビナント Vpr 蛋白質および GAPDH を精製し、in vitro で反応させた後、抗 Vpr 抗体で免疫沈降した。抗 GAPDH 抗体で解析したところ、Vpr と GAPDH とが共沈してくることが確認された。

さらに、この反応系に、LR-20 ペプチドを加えると、この共沈物は減少したことから、Vpr と GAPDH は Vpr の C-末端側、61 番目から 80 番目の領域を介して直接結合することが示唆される。

次に、この複合体形成による GAPDH の活性への影響を検討したところ、Vpr 発現細胞及び、リコンビナント Vpr を培養液中に添加した細胞抽出液で、共に GAPDH の活性上昇が認められた。また、リコンビナント GAPDH を用いた in vitro での活性においても、Vpr 存在下において、Vpr に依存して活性が上昇した。

精製した Vpr 蛋白質を用いた、HIV 潜伏感染細胞株 U1 でのウィルス再産生の誘導系を確立した。

4. 考察・まとめ

Vpr のトランス作用としては、HIV 産生誘導が報告されている。また、HIV の感染からウィルス産生に至る一連の機構はすべて、宿主細胞内の ATP をエネルギー源としている。Two-hybrid assay により、ATP 産生に係わる一連の蛋白質群が同定されたことから、Vpr によって宿主細胞内の ATP 産生調節がなされている可能性が示唆される。高頻度に同定された GAPDH は細胞内で直接結合すること、また、その活性がトランスにも誘導されること、さらに in vitro の実験系で GAPDH に Vpr を投与することで直接活性上昇が誘導されるという結果が得られたことは、上記の可能性を強く支持するものである。

Vpr-GAPDH 間の結合部位として、Vpr 側の領域を同定できたことにより、この領域のペプチドを用いた抗 Vpr 因子としての展開が期待される。これは、LR-20 ペプチド存在下において、GAPDH-Vpr の結合が阻害されることから支持される。

今後の展開としては、このペプチドを用いた Vpr によるウィルス産生誘導に対する阻害効果について、U1 細胞を用いたウィルス産生系を用いて検討する。さらに、Vpr-GAPDH 間の GAPDH 側の結合領域の同定、機能解析を行う予定である。

Vpr と複合体を形成する宿主側の蛋白質を同定し、その結合を阻害することで、新しい抗 HIV 因子の探索が可能となり、ひいては新しい抗エイズ療法の開発につながる可能性が期待される。本研究において明らかとなった宿主側蛋白質、GAPDH と Vpr との結合部位に関する情報から、Vpr の機能を抑制するペプチド療法の開発を試みたいと考えている。本研究を展開していくことにより、より安全かつ安価な新規抗エイズ療法開発の可能性を明らかにできるものと期待される。

5. 研究発表

-論文発表-

・ Osawa Y., Shimura M., Suzuki Y., Ishizaka Y. “Identification of a Dominant Negative Peptide Derived from Vpr/HIV-1 Interfering with the Association of GAPDH and its Activation” 投稿準備

備中

-口頭発表-

・ 大沢宜明, 志村まり, 鈴木康哲, 石坂幸人 HIV アクセサリー遺伝子産物 Vpr と結合する宿主側蛋白質の同定及び機能解析 第 25 回日本分子生物学会 2002 年 12 月 横浜

6. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1) 特許取得 | なし |
| 2) 実用新案登録 | なし |
| 3) その他 | なし |