

201009028A

厚生労働科学研究費補助金

ヒト TRIM5 α による HIV-1 産生阻害活性の誘導に必要な

宿主因子の解析 (H22-政策創薬-一般-015)

平成 22 年度 総括研究報告書

研究代表者 佐久間 龍太

平成 23 (2011) 年 5 月

目次

I. 総括研究報告書

- ヒト **TRIM5 α** による **HIV-1** 産生阻害活性の誘導に必要な宿主因子
の解析 (H22-政策創薬-一般-015) 1
佐久間 龍太

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 12

III. 研究成果の刊行物・別刷 13

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

ヒト TRIM5 α による HIV-1 産生阻害活性の誘導に必要な宿主因子の解析

(H22-政策創薬一般-015)

研究代表者：佐久間 龍太 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 助教

研究要旨

旧世界ザルの宿主因子 TRIM5 α は HIV-1 の侵入と産生の両面をそれぞれ異なる機序により強力に抑制する。一方、ヒト TRIM5 α の HIV-1 侵入、増殖阻害活性は非常に弱いが、HIV-1 成熟を遅らせることが示唆されている。このため少なくともウイルス産生の段階で HIV-1 のライフサイクルを阻害できる可能性がある。そこで、弱い抗 HIV-1 活性を増強するため、アカゲザル TRIM5 α が宿主内で利用している宿主因子・パスウェイの発見を目的として、実験系を樹立した。TRIM5 α と結合するタンパク質の同定、解析を共免疫沈降法によって、ウイルス粒子内のタンパク質組成の変化を二次元電気泳動を利用して調べる系をそれぞれ樹立し、既に複数の候補タンパク質が同定された。

研究分担者：なし

A. 研究目的

近年 HIV-1 感染症に対する治療法として多剤を併用する HAART が大きな成果を上げている。しかしながら、HAART では生涯にわたり多くの薬剤を飲み続けなければならず、投薬状況の悪化は薬剤耐性ウイルスの出現を招く。旧世界ザル TRIM5 α が HIV-1 の感染を抑制することは良く知られていたが、研究代表者による先行研究より、アカゲザル TRIM5 α (RhT5 α) が HIV-1 の感染のみならず増殖をも阻害することが明らかになった。(Nat Med. 2007;13(5):631-5) 侵入阻害の場合とは異なり、過剰発現させたヒト TRIM5 α (HuT5 α) は

HIV-1 の増殖を阻害できなかったが、HIV-1 粒子の成熟を遅らせる事が明らかとなり、HuT5 α でも HIV-1 の増殖を阻害できる可能性が示めされた。SIV が TRIM5 α や APOBEC といった「種の壁」を乗り越えてヒトへと移ってきたことを考えると、ヒト内在性の種間バリアは強力な抗ウイルス機構と考えられ、その一因である HuT5 α を利用し、HIV-1 感染症への対策とすることは効果的だと考えられる。本研究では種間バリアに関する学術的な意義のみならず、AIDS 発症予防・HIV-1 感染拡大の防止に応用可能な知見を得られると考えられ、その必要性は高いと言える。そこで本研究では、RhT5 α による HIV-1 の複製阻害のメカニズムを解明し、HuT5 α がなぜ

HIV-1 の複製を阻害できないのかを明らかにすることを目的とし、更に得られた知見に基づき HuT5 α による HIV-1 複製阻害活性の誘導を試みる。

平成 22 年度は 3 年間の研究計画の初年度として実験系の確立、平成 23 年度以降の研究対象となる複数の候補因子の同定を目的とした。

B. 研究方法

1. 融合細胞の作成

融合細胞を選択する目的で TE671-LKO 細胞を用いた。TE671-LKO 細胞はピューロマイシン耐性遺伝子のみを持つレンチウイルスベクターを感染させ、ピューロマイシンにて選択した細胞で、RhT5 α による産生阻害に対しては TE671 と同等の性質を持つ。同数の 293T 細胞と TE671-LKO 細胞を混和し遠心により沈殿、50% PEG/PBS にて室温で 2 分間処理した後、通常培地で一晚、選択培地で 2 日間培養したものを融合細胞として用いた。

2. Transfection

細胞は 60% confluent 程度の濃度で用意し、FuGene 6 (Roche)を用いたりポフェクション法にて遺伝子導入した。本研究で行われた全ての遺伝子導入実験では DNA 1 μ g あたり 2.5 μ l の FuGene 6 を用いた。

3. HIV-1 の力価測定

ウイルス感染の指示細胞として TZM-bl 細胞を用いた。TZM-bl 細胞では HIV-1 が感染すると LTR をプロモーターとしてルシフェラーゼと β -ガラクトシダーゼが発現する。48-well プレートに蒔かれた 5×10^4 の TZM-bl

細胞に、0.45 μ m のフィルターを通して精製したウイルス上清 100 μ l を感染させ、24 時間後に細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 免疫沈降法

293T 細胞へ RhT5 α 発現プラスミドを単独、もしくは Gag 発現プラスミドとともに transfection した。48 時間後の細胞抽出液から RhT5 α の C 末に付加した HA タグに対する抗体を用いて免疫沈降した。RhT5 α 、および共沈殿したタンパク質は 10 % SDS-PAGE にて展開し、CBB 法で染色した。

5. ウイルス粒子内タンパク質の 2 次元解析 RhT5 α あるいは HuT5 α 発現プラスミドと HIV-1 NL4-3 のプロウイルスプラスミドを 293T 細胞へ transfection し 48 時間後の培養上清中のウイルス濃度を HIV-1 Gag のタンパク質濃度として p24 量を ELISA にて測定した。5 μ g p24 量に相当するウイルス上清中に含まれるウイルス粒子を 20%シュークロースクッションを用いて密度依存的に精製・濃縮したものを BIORAD 社の 2 次元電気泳動システムにて分離・展開した。なお等電点泳動（1 次元目）は pH3-10 の等電点勾配を、2 次元目は 4-20%のグラジエントゲルを用いた。泳動後のゲルに対して CBB 染色を行い、各スポットを可視化した。

6. バンド・スポットからのタンパク質の同定 Gag の有無に応じて強度に変化を認めたバンド、RhT5 α の存在によって強度に増減を認め

たスポットを切り出し MALDI/TOFMS 解析にて含まれているタンパク質を解析した。本解析は、バンドを切り出した後、東京医科歯科大学のコアファシリティーに依頼した。

C. 研究結果

1. 細胞融合実験による宿主因子の性質決定

RhT5 α による HIV-1 産生阻害は細胞特異性があり、その活性を支持する細胞と支持しない細胞がある。この事は HIV-1 産生阻害には RhT5 α 以外の宿主因子も必要である、もしくはある種の細胞の中では RhT5 α による HIV-1 産生阻害を抑制する因子が存在しその因子を持つ細胞、持たない細胞が存在する可能性を示す。いずれの場合であっても、その宿主因子を同定する事は HuT5 α の抗 HIV-1 活性誘導に必須であるため、その性質決定を試みた。まず RhT5 α による HIV-1 産生阻害を支持する 293T 細胞と支持しない TE671 細胞の間に融合細胞を作製した。融合細胞群にプロウイルスプラスミドと RhT5 α もしくは HuT5 α 発現プラスミドを co-transfection し、48 時間後に TZM-bl 細胞を用いて融合細胞からのウイルス産生量を測定したところ、融合細胞群は HIV-1 産生阻害を支持した。(図 1)

2. 免疫沈降法による RhT5 α 結合因子の探索

RhT5 α はウイルス産生細胞中の Gag 前駆体の分解を誘導することでウイルス産生を阻害する。RhT5 α が Gag を分解する際に必要な宿主因子が、Gag を分解する場合にのみ RhT5 α と結合する可能性、Gag を分解する際に RhT5 α から外れてしまう可能性を検討する

ため、Gag の有無で過剰発現系での免疫沈降を行い、RhT5 α と共沈殿してきたタンパク質のバンドを検出した。Gag 存在の有無によって強度の変化したバンドを切り出し、MALDI/TOFMS 解析を行った結果、coronin 1c、vimentin を含む複数の候補タンパク質を同定した。(図 2) また、55 kDa 付近のバンドからは TRIM5 α が検出された。

3. 二次元電気泳動による新規因子の探索

RhT5 α は HIV-1 産生を阻害するがわずかに産生されたウイルス粒子内に取り込まれる。一方 HuT5 α は粒子産生を阻害せず、HIV-1 粒子内に取り込まれない。そこで、RhT5 α が HIV-1 Gag との相互作用に宿主因子を必要とするのであれば、その因子も粒子内に取り込まれるのではないかと考えた。そこで RhT5 α 存在下、非存在下において産生された HIV-1 粒子を濃縮しウイルス粒子内に含まれるタンパク質を二次元泳動にて展開した。コントロールとして、RhT5 α 非存在下で産生されたウイルスタンパク質を抗 p24 抗体にてウェスタンブロットを行い、Gag タンパク質が過去の報告と同様に展開されていることを確認した。また、メジャースポットとなるであろうウイルスタンパク質の位置を確認した。(図 3) ウイルス濃縮液を展開したゲルは CBB で染色し、スポット強度を比較、違いの認められたスポットを切り出して MALDI/TOFMS にて解析した。(図 4) 平成 22 年度の進展では一度の解析しか行っていないが HSP60、71 などのシャペロン分子など多くのタンパクが検出された。追試の後、再現性の取れたタンパ

ク質に関して、更に解析を進めていく。

4. 組み替え TRIM5 α の大腸菌発現系の確立
前述 2 種のゲルから同定された候補タンパク質、平成 23 年度以降の実験計画の進行によって得られる候補タンパク質が TRIM5 α 、もしくは HIV-1 のタンパク質と直接結合するかを調べるために、大腸菌を用いた組み替えタンパク質発現系を構築した。組み替えタンパク質の大腸菌での発現は抗 His タグ抗体で確認した。(図 5) 発現大腸菌内からは多くの分解・切断を受けたバンドが検出されたが精製に用いるタンパク質発現系は構築できたものと考えられる。

D. 考察

平成 22 年度の研究成果とし本研究計画で探すべき宿主因子は TRIM5 α による HIV-1 産生阻害を助けていることが示され、また次年度以降に解析すべき複数の候補因子の同定を行った。これら得られた因子の解析は次年度以降に行われる。大腸菌での組み替えタンパク質を利用して TRIM5 α 、HIV-1 ウイルスタンパク質との *in vitro* での結合の有無を確認後、過剰発現した、あるいはノックダウンした際のウイルス産生における効果を調べる計画である。

293T 細胞と TE671 細胞の PEG による融合実験では、融合細胞の性質上、各細胞がどのような割合で 293T 由来 TE671 由来の染色体を保持するかを同定することが困難であるため、単一細胞を株化するのではなく融合細胞

群として実験に用いた。融合細胞群は TE671 細胞側に導入したピューロマイシン耐性遺伝子を用いて選択することで、非融合細胞の存在を最低限に抑えたが、非融合 TE671-LOK 細胞の混入はさけられず、産生抑制効果は小さく観察されている事が考えられるが TE671 細胞に抑制因子が存在した場合、全ての融合細胞が RhT5 α による HIV-1 産生阻害を支持しない結果となる事から、図 2 の結果は「293T 細胞内に RhT5 α による HIV-1 産生阻害に必須の宿主因子が存在する」という可能性を強く支持している。

共免疫沈殿による解析では、強発現下での免疫沈降法であるため侵入のステップと産生のステップを区別する事ができないが、TRIM5 α がウイルスの増殖を阻害する過程で宿主因子を得る事は可能である。今回のデータより得られた候補の一つ vimentin は HIV-1 のアクセサリタンパク質 Vpr、Vif との結合が報告されている。特に Vpr はウイルス粒子中に Gag-p6 を介して取り込まれる事が明らかとなっており、ウイルス産生阻害への関与が期待される。一方で、今回同定された coronin はアクチンフィラメント上での輸送に関わるモータータンパク質であると考えられ、ウイルス感染時、コアが侵入してくる段階で関与している可能性と pr55Gag の細胞膜への輸送へ関与している可能性が考えられる。本研究ではそれら両面よりの解析を行う予定である。

2 次元展開を利用したウイルス粒子内の候補

因子の探索は条件設定等の問題があり、複数回の試験が行えていない。現在は実験系も安定したため、早急に追試を行い再現のとれたスポット、タンパク質から順に解析を行う。また、MALDI/TOFMS 解析を依頼するための技術的な問題から銀染色ではなく CBB 染色を行わざるを得ず、粒子中に含まれる微量のタンパク質の検出が非常に困難である。ウイルス粒子量を増加させるとメジャースポットの拡大、切り出しの際のコンタミネーションが危惧されるため、今後も染色条件の検討・最適化を続ける。

組み替えタンパク質の大腸菌からの発現は成功したが大腸菌内から得られたタンパク質の多くが分解、切断を受けていた。精製に用いる GST タグは His タグと同じ N 末端についているが、C 末端側には S-タグが付加しており、これらを用いて2段階の精製を行う事で全長タンパク質のみの回収・精製が可能であると考えている。今後、培養上清中に放出された組み替えタンパク質量の測定を行い、効率の良いタンパク質発現・回収・精製系を確立したい。

一般に TRIM5 α の抗ウイルス活性に関する研究では RhT5 α による侵入阻害活性に着目している。HIV-1は既に HuT5 α による侵入阻害活性を乗り越えており、またヒト細胞は RhT5 α を持たないことから、この機序をそのまま治療へ応用することは難しい。しかし、HuT5 α であっても増殖抑制活性は、弱くはあるが維持されている。本研究では AIDS 発症

予防の対策としてヒト内在性因子である TRIM5 α を利用する点で、また、内在性因子の抗ウイルス活性増強を目的とするため、比較的安全であることも特色である。更に本研究で得られた知見は広くレトロウイルス感染症予防・新興感染症対策に応用可能と考える。

E. 結論

実施初年度の研究計画は順調に進展しており、平成 23 年度以降に利用していく実験系の確立に成功、更に複数の候補因子を同定し、既に解析を進すすめている。また、組み替えタンパク質を用いて、候補因子と TRIM5 α また HIV-1 タンパク質の間に結合があるかを調べる実験系の構築も順調に進行しており、結果の評価系の準備も進んでいる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

アカゲザル TRIM5 α (RhT5 α)による HIV-1 産生阻害に対する SOCS1 タンパク質の影響
助川明香、佐久間龍太、大嶺青河、池田靖弘、山岡昇司 (演題番号:O2-2-07)

平成 23 年 11 月 8 日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

現在、特許等を申請できる状況には無いが、新規宿主因子の探査であることから、継続審査時の審査員の助言に従い、特許取得が可能な状態を維持する形での慎重な研究活動・成果報告を心がけたい。

2. 実用新案登録
前述 1 に準じる。

3. その他
特記事項なし

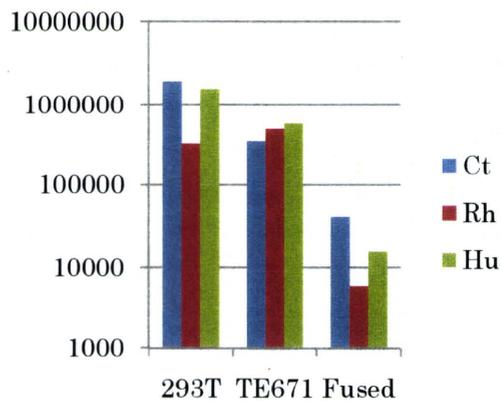


図1 支持細胞と非支持細胞による細胞融合実験

293T細胞とTE671細胞をPEGにより融合した後、薬剤選択した。これら融合細胞（Fused）にHIV-1プロウイルスプラスミドとRhT5 α 発現プラスミド（Rh）、HuT5 α 発現プラスミド（Hu）、もしくはコントロールプラスミド（Ct）をco-transfectionし、48時間後のウイルス産生量をTZM-bl細胞を用いて定量した。PEG融合細胞からの結果は、毎試験ごとに傾向は同じだが、測定値にブレが大きいため、複数回の試験のうち代表的な例を示す。

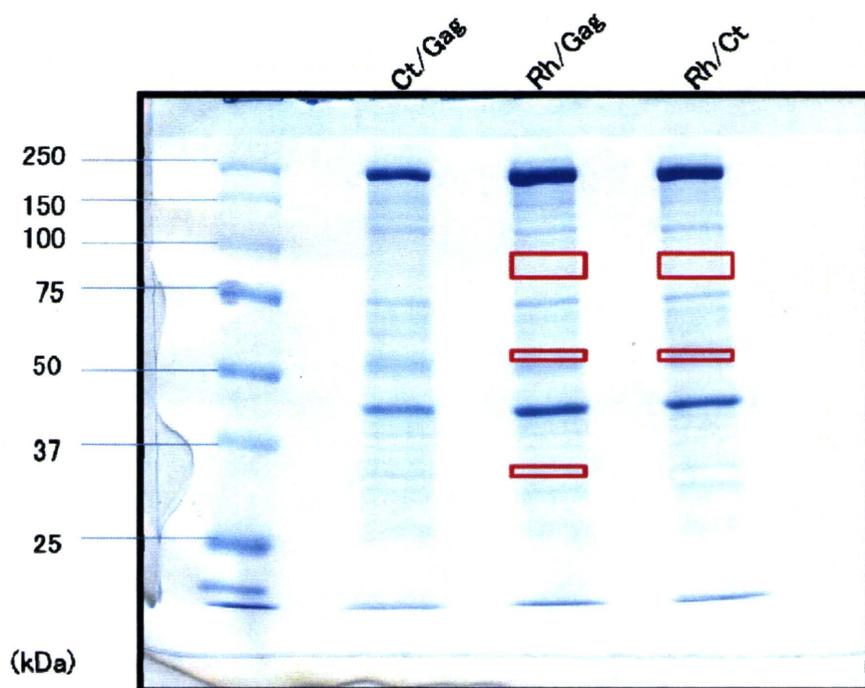


図2 共免疫沈殿後のCBB染色像

Gag 存在下、非存在下で RhT5 α を発現させた 293T 細胞の抽出液から抗 HA 抗体を用いて RhT5 α を免疫沈降し、沈降物を SDS-PAGE で展開、CBB 染色した像。3回の試験のうち代表的な像を示す。赤枠で囲われた領域を切り出し MALDI/TOFMS にて解析した。Ct はコントロールとして pcDNA3.1 が、Rh は RhT5 α 発現プラスミドが Gag は HIV-1 Gag 発現プラスミドとして p8.91 を transfection したものの。

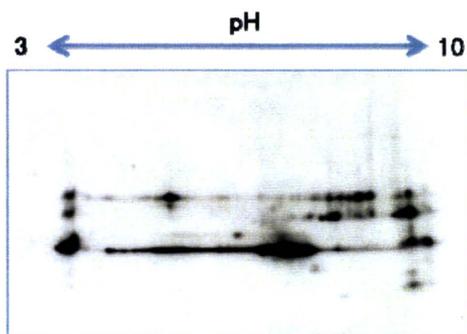
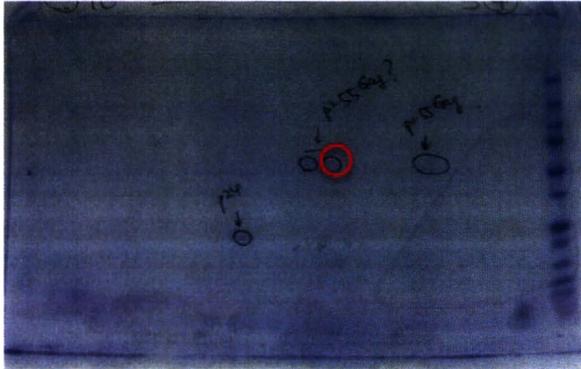


図3 ウイルス粒子内タンパク質2次元展開後の抗p24抗体によるウエスタンブロット
293T細胞より産生後、精製、濃縮したHIV-1粒子、p24量で5ng分に含まれるタンパク質を
を二次元電気泳動にて展開後、PVDF膜へと転写し、抗p24抗体を用いてウエスタンブロット
を行った。

a)



b)

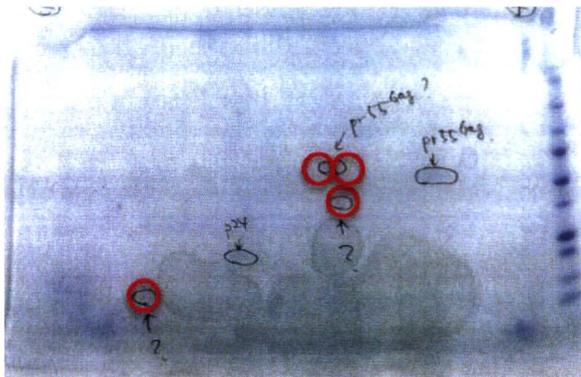


図4 ウイルス粒子内タンパク質2次元展開後のCBB染色像

293T細胞より産生後、精製、濃縮したHIV-1粒子、p24量で5ng分に含まれるタンパク質を2次元電気泳動にて展開後、CBB染色した。Rht5α非存在下で産生されたウイルスの結果を(a)にRht5α存在下で産生されたウイルス粒子の展開像を(b)に示す。p24を示すスポットと強度を比較し強度に変化の認められるスポット(赤丸)を切り出し、解析した。図3とは異なり図中右側からpH3-10の等電点グラジエントとなっている。なお、スポットが薄く視認が困難であるが、ゲルを切りだしてしまい記録の撮り直しが不可能であるため、ご容赦頂きたい。

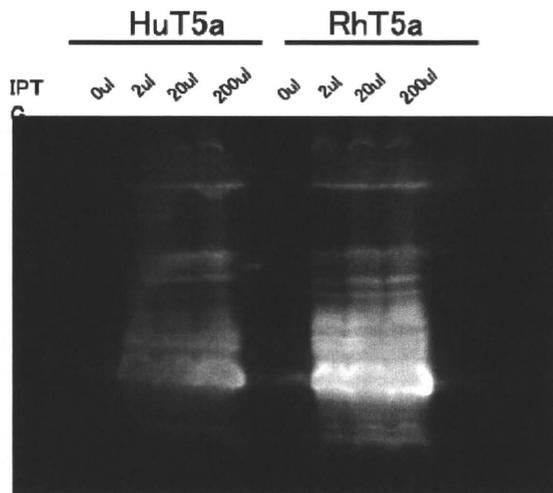


図5 大腸菌による組み替えタンパク質の発現確認

pET49b(+)-HuT5 α 、もしくは-RhT5 α を有する大腸菌 *Suffle* T7 の培養液中に IPTG を添加してタンパク質発現を誘導した。4時間の誘導後、遠心分離によって大腸菌を沈殿させ、超音波破碎後 SDS-PAGE、抗 His 抗体を用いたウエスタンブロットにて発現を確認した。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					

研究成果の刊行物・別刷

該当なし