

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460573

研究課題名(和文) HIV-1 Vprによるオートファジー制御の分子機構と感染における意義の解明

研究課題名(英文) Autophagy regulation by HIV-1 Vpr

研究代表者

博多 義之 (HAKATA, Yoshiyuki)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：30344500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： HIV-1 Vprのオートファジー制御能を独自に発見していた。本研究により制御にVprの既知結合因子は関与しないこと、Vprにはオートファゴソーム形成を促進する領域とオートリソソーム成熟を阻害する領域が存在すると分かった。また、制御のための因子を同定するとともに制御の分子機序を明らかにした。Vprは同定分子と結合することでオートファジーに必須の因子を活性化していると思われる。別に、Vprはオートファジーの最終過程を阻害する活性を持つ。本研究によりVprはオートリソソーム形成を阻害しないが、酸性オルガネラのpHを上昇させ、オートリソソーム中の分解酵素の機能を低下させていることが分かった。

研究成果の概要(英文)： We had discovered that HIV-1 Vpr has the ability to control an autophagy. Here we have tried to identify cellular factor(s) involved in this regulation and disclose its molecular mechanisms. We found that the Vpr-mediated autophagy regulation does not depend on cellular factors which have previously been reported to interact with Vpr. Interestingly, Vpr has two functions in autophagy regulation, augmentation of autophagosome formation and inhibition of autolysosome maturation. We identified a key factor by which Vpr facilitates autophagosome formation. Vpr seems to activate the cellular protein binding to the identified factor to initiate autophagy. We find that Vpr does not disturb the autolysosome formation but clearly impairs the acidity of cellular acidic compartments. These results indicate that Vpr decrease enzymatic function in acidic organelles through disruption of pH, leading to inhibition of autolysosome function.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス HIV オートファジー

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは酵母からヒトに亘る広範囲な生物の細胞において高度に保存された細胞内成分分解システムである。飢餓条件下、自己の一部を分解・代謝することで生存のために必要な栄養素を確保する役割を担っている。さらに、富栄養条件下においても常に基底レベルのオートファジーと呼ばれる活性が起動しており、時間と共にダメージを受け機能の低下した細胞内小器官等を適時正確に分解することで細胞生理機能の恒常性を維持していることが知られている。具体的には機能障害を受けたミトコンドリアや神経変性疾患に関与する易凝集性タンパク質等が処理される細胞質成分である。オートファジーシステムは複数の素過程からなり、これら一連の素過程が順序正しく連続的に進行するが細胞内成分の分解に必須である。オートファジーの最初の過程は細胞質に隔離膜と呼ばれる特殊な膜構造体出現する事に始まる。次いで、隔離膜が分解を受ける細胞内成分を含む細胞質領域を包み込むように伸展および湾曲する。隔離膜が閉じるとオートファゴソームと呼ばれる脂質二重膜構造体が完成する。その後、オートファゴソームは微小管などに沿って細胞内を核方向に移動し、細胞内成分を分解するための酵素を多量に含有する細胞内小器官(リソソーム)と膜融合する。この膜融合はオートファジーにおける膜の成熟過程と呼ばれており、膜融合の結果できる構造体はオートリソソームと呼ばれる。オートリソソーム内に運び込まれた細胞質由来成分は最終的にオートリソソーム中の酵素群により分解される。一般的にこれら酵素群の至適 pH は酸性側に傾いているため、より効率的に基質(細胞内成分)を分解するためには、オートリソソーム内の pH は酸性に保たれる必要があると考えられている。以上に加えて、感染性微生物(ウイルス)の分解・排除、免疫応答の制御、およびプログラム細胞死の制御などがオートファジーの重要な生理的機能として報告されている。

オートファジーは細胞内に侵入したウイルスを分解・排除して宿主細胞を守る役割を担っていることが明らかにされているが、宿主とウイルス間で起こり続けている長期に及ぶ攻防の結果として、多くの病原性ウイルスがオートファジーシステムに干渉し、その抗ウイルス活性を回避するためのウイルス遺伝子を進化上獲得してきていることも判明している。さらには、オートファジーシステムを積極的に乗っ取り、自己のウイルス複製のために利用するウイルスすら報告されている。前者には Herpes simplex virus 1 と Kaposi's sarcoma herpes virus、後者には Hepatitis C virus や poliovirus などが報告されている。

human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) とオートファジーシステムの関係性

については、その感染がオートファジーを誘導すること、HIV-1 タンパク質である Nef がオートファジーを制御しうることが報告されている。一方、Nef 以外のウイルスタンパク質がオートファジー制御能を持つのかについてはほとんど解析されていない。さらに、HIV-1 複製に関連する宿主因子を網羅的に同定した報告の中には複数のオートファジー関連遺伝子(*Atg* 関連遺伝子)が含まれていた。しかし、当然それら全てが Nef と相互作用するとは考え難く、別のウイルス因子と相互作用することが予想されていたが、当のウイルスタンパク質については未だ知られておらず、さらには同定された宿主因子がウイルス複製に影響する機序についても全く分かっていない。

HIV-1 がコードする Vpr は 98 個のアミノ酸からなるウイルスタンパク質である。近縁ウイルスである simian immunodeficiency virus でも *vpr* 遺伝子はよく保存されており、ウイルスが感染個体内で複製するために重要な機能を担う因子であると考えられている。Vpr は通常、感染細胞内でタンパク質として発現した後、ウイルス粒子中に取り込まれた状態で細胞外に放出されている。加えて、HIV-1 感染者の血清および脳脊髄液中にはウイルス粒子内には取り込まれていない Vpr が可溶性タンパク質としても存在している。これら Vpr は非感染 T 細胞および神経細胞に対して細胞毒性を持つ可能性が報告されている。その他、これまでに報告された Vpr の機能は、細胞周期を G2 期で停止させる機能、アポトーシス制御機能、preintegration complex の核内輸送機能、ウイルスおよび宿主遺伝子の転写制御機能など多岐に亘る。特に、細胞周期停止能力に着目し、Vpr をがん克服のために利用する基礎研究も報告されている。また、Vpr が免疫応答にも作用することが多く報告されている。その一つに、Vpr は CD4⁺T 細胞の NKG2D リガンドの発現を上昇させ、NK 細胞による攻撃を促している作用がある。さらに、CD40、CD80、CD83、および CD86 の発現を抑制することで、マクロファージの活性化や樹状細胞の成熟を阻害することが報告されている。さらに、Vpr は種々の細胞においてミトコンドリア膜の膜電位を脱分極することが知られている。脱分極したミトコンドリアはオートファジー(特にマイトファジーと呼ばれる)により分解されることが知られているものの、Vpr により機能障害を受けたミトコンドリアが同様にオートファジーによる分解を受けるのかは全く不明である。さらに、Vpr がオートファジーを制御する因子であるのかについても、全く解析されていない。

私は、本申請に先立ってまず Vpr がオートファジーを制御する活性を持つのかについて調べた。オートファジー活性の変動を追跡するマーカータンパク質である LC3 には、細胞質に拡散する LC3-I とオートファジーの進

行に伴い LC3-1 が脂質化修飾を受けて生成する LC3-II とがある。LC3-II は隔離膜およびオートファゴソームに集積する。従って、オートファジー活性は LC3-II の量または LC3-II を含む膜構造体の数により評価できる。Vpr を発現させた細胞では顕著な LC3-II 量の増加、および LC3-II を含んでいる膜構造体の蓄積が細胞質内に観察された。この結果は、Vpr がオートファジーを制御する因子であることを強く示唆していた。さらに、Vpr はオートリソソームの成熟を阻害するという予備的な実験結果を得ることができた。しかし、オートファジー制御に必要となる宿主側の分子は不明であり、かつ Vpr に依存したオートファジー制御が HIV-1 の複製にどのような役割を有しているのか未解明のまま残されていた。

2. 研究の目的

本申請研究では Vpr 依存的オートファジー制御に関わる宿主因子を同定するとともに、その分子機構を明らかにすることを目的とした。また、Vpr 依存的オートファジー制御の HIV-1 複製における意義を明らかにするとともに、様々な細胞における Vpr 依存的オートファジー制御の有無、およびその制御が細胞機能に与える影響などを解析し、エイズ病態との関連性を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究以前の予備的な実験結果から Vpr を発現した細胞では非発現細胞と比較して LC3-II 量が増加すること、および細胞質において LC3-II 含有膜構造体の数が増加することを確認していた。また、オートファジーの基質となる内在性タンパク質の p62/SQSTM1 に関して、その発現量が Vpr 発現細胞において増加するという結果などから、Vpr はオートリソソーム成熟過程を阻害していることが示唆されていた。

最初に Vpr 依存的オートファジー制御に関わる宿主因子を同定するために、これまでに Vpr と相互作用することが知られている宿主因子が制御に関係するのか調べた。まず、Vpr の既知機能の中で特定の機能を欠損させた Vpr 変異体の発現ベクターを作成した。これら変異体はそれぞれ特異的な宿主因子との相互作用を欠失させた変異体である。作成の際は PCR を利用した部位特異的変異導入法を用いた。作成した発現ベクターをリポフェクション法により培養細胞へ導入した後、Vpr 変異体を発現させた細胞および Vpr を発現していない細胞の LC3-II 量をウェスタンブロットにより測定することで変異体がオートファジー制御能を保持しているのか調べた。変異体がオートファジー制御能を示さなかった場合、既知機能に働いている宿主因子が Vpr 依存的オートファジー制御を担う分子装置の実体であることが示唆される。一方、変異体が Vpr と同様にオートファジー制御能を

保持していた場合は、制御のための分子装置は未知の宿主因子を含む可能性が高い。

本研究で行われた解析の結果、既知因子が Vpr 依存的オートファジー制御に関与しないことが判明したため、制御に関与する因子の同定を次に試みた。この際、タンデムアフィニティー精製法 (TAP 法) を第一の方法とした。Vpr は細胞周期を G2 期で停止させる活性を持つため恒常的に Vpr を発現する培養細胞は樹立できない。そこで、ドキシサイクリンによる制御下でのみ 2 種類のタグを付加した Vpr を発現する安定細胞株を作成し、タグ抗体を利用した TAP 法により Vpr を含むタンパク質複合体を単離する方法を採用した。しかし、Vpr の細胞周期に与える影響、あるいは細胞死への影響が強いため安定細胞株の作成は困難であり、別法による解析を進めるに至った。そこで、一過性に Vpr を大量に発現させた後、タグ抗体で Vpr を免疫沈降し、共沈してきた宿主タンパク質 (Vpr 結合因子) の解析を行った。免疫沈降された Vpr 結合因子の中に Atg 関連遺伝子産物が含まれているのか明らかにするため、いくつかの Atg 関連遺伝子産物に対する特異的抗体を利用したウェスタンブロット法を行った。また、Vpr 発現時に Atg 関連遺伝子産物の発現量が変動するのかウェスタンブロット法により解析した。

さらに、多数の Vpr 欠損変異体を作成し、それらのオートファジー制御能を LC3-II を指標に解析した。その結果、Vpr の特定領域がオートファジー制御に関与していることが示唆された。そこで次に、本領域を化学的にペプチド合成した。この際、ペプチド末端にはビオチンを付加した。本ペプチドを精製した後、アビジンビーズに固定し、細胞破砕液と混合した。その後、Vpr 由来ペプチドに結合した宿主因子を溶出し、質量分析により単離されたタンパク質の同定を行った。また、これまでの知見を精査することで Vpr の当該領域と結合する可能性が予想された幾つかの宿主因子については個別に特異的抗体を利用したウェスタンブロット法により単離物の中に含まれているのか調べた。Vpr 由来ペプチドとの結合が認められた宿主因子について、Vpr または Vpr 由来ペプチドに依存して細胞内局在が変化するのか、あるいは本来相互作用する既知分子群との結合状態が Vpr 発現により変動するのかについて免疫蛍光法あるいは免疫沈降法を利用することにより調べた。

Vpr 依存的オートファジー制御に関して、先に記した通り Vpr の発現によりオートリソソーム成熟過程が阻害されている可能性が示唆されていた。他のウイルスがオートファジーを制御する機構として、オートファゴソーム膜とリソソーム膜との膜融合過程を阻害する機構が報告されていたため、HIV-1 Vpr も同様の膜融合過程を阻害している可能性が第一に考えられた。別に、膜融合過程は阻害されずオートリソソームは正常に形成さ

れるものの、本来酸性度の高いオートリソソーム内の pH が Vpr により何らかの影響を受けている可能性も考えられた。膜融合過程に必須のタンパク質群とそれらの相互作用は既に報告されている。Vpr の発現によりこれら分子間の相互作用が変動するのかわかりにするために免疫沈降法を行った。さらに、Vpr 発現時のオートリソソームの pH について LysoTracker Red などの酸性オルガネラマーカーを利用することで解析した。

Vpr は HIV-1 感染時に見られる T 細胞や神経細胞の細胞死の一端を担う可能性が報告されている。また、血清および脳脊髄液中には遊離 Vpr が認められ、樹状細胞、マクロファージ、および神経細胞など様々な細胞に作用すると考えられている。遊離 Vpr をこれらの細胞に作用させた時にオートファジーを制御する能力があるのか、あるいは細胞死にどの程度影響するのかその相関を調べることで、エイズ病態で見られる細胞死とオートファジー制御との関連を明らかにできる。組換え体 Vpr(rVpr)を遊離 Vpr として使用するために、Vpr を大腸菌で発現させ精製することを試みた。また、ウイルス粒子内の Vpr についても同様な解析をするために Vpr 含有ウイルス様粒子の作成を試みた。

4. 研究成果

まず、Vpr 依存的オートファジー制御の中で実働する宿主因子の同定を試みた。Vpr は多機能性のタンパク質であり機能発揮には多くの宿主因子と相互作用することが知られている。また、相互作用のためのアミノ酸残基やドメイン領域も同定されている。これらの領域に変異を導入し、既知機能を欠いた Vpr 変異体の発現ベクターを作成した。作成した Vpr 変異体と既知因子との結合を免疫沈降法にて評価したところ、予想の通り両者間で結合が消失した。その後、LC3-II 量を指標にこれら Vpr 変異体のオートファジー制御能をウェスタンブロット法にて調べたところ、既知機能に欠陥を持つ作成した全ての Vpr 変異体がオートファジー制御能を保持していることが判明した。これらの結果から、Vpr によるオートファジー制御は既知機能と関連しないことが分かった。さらに、既知機能に参与する一連の宿主因子について、Vpr が担っているオートファジー制御には働いていないことが明らかとなった。制御に要する宿主因子を同定するために TAP 法を第一の方法として考えていたが、Vpr の細胞に与える影響などから別の方法を用いるに至った。培養細胞で一過性に大量発現した Vpr を免疫沈降し、ともに沈降する因子を単離した。その中に、代表的な Atg 関連遺伝子産物 (Beclin 1, Rubicon 等) が含まれているのかについて解析したところ、含まれていないことが判明した。従って、調べた限りの Atg 関連遺伝子産物は Vpr と直接・間接を問わず結合をしていないことが分かった。さらに、Vpr が Atg

関連遺伝子産物の発現量を変動させるのかについて調べたところ、顕著な差異は観察されなかった。

次に、様々な Vpr 欠損変異体を用いて Vpr 依存的オートファジー制御に必要なとされている Vpr 領域を調べたところ、Vpr にはオートファジーを促進する領域 (Vpr の N 末端付近 18 アミノ酸残基程) およびオートリソソームの成熟過程を阻害している領域の 2 つの領域が独立して存在していることが分かった。オートファジーを促進する領域に相当する部分を化学的にペプチド合成し、細胞に導入したところ、オートファジーを促進するという結果が得られた。これらの結果から Vpr はオートファジーを正負の両面で制御できる分子スイッチであることが示唆された。

次に、オートファジー制御に関わる Vpr 領域をピオチン化ペプチドとして化学合成した後、これをベイトとした Pull down 法を実行することで当該領域に結合する宿主因子を単離した。単離したものを質量分析にて同定した結果、様々な新規の Vpr 結合因子を同定することができた。同時に既報の Vpr に関する論文を精査することで当該領域と結合すると推測された宿主因子についても単離物に含まれるか検討したところ、特異的に結合する因子を同定できた。以上で同定された宿主因子群はオートファジー制御に参与することが既知である分子や関与が全く知られていない分子が含まれていた。これら同定した分子のオートファジー制御への関与をさらに解析したところ、アポトーシスにも関与することが報告されている分子の一つが特異的に Vpr の標的になっており、Vpr はこの分子と相互作用することでオートファジーの進行に欠かせない別の分子の細胞内局在を変化させて活性化していることが分かった。この局在変化は当該分子を含むタンパク質複合体を Vpr が解離していることによると考えられる。また、この局在変化こそが Vpr がオートファジーを促進するための分子機序であると考えられる。その他、微小管やミトコンドリアへ局在すると報告されている分子などが Vpr 由来ペプチドに特異的に結合する宿主因子として同定されたが、Vpr 依存的オートファジー制御への明確な関与は認めなかった。

上述したオートファゴソーム形成促進能に加えて、Vpr はオートファジーの最終過程を阻害する活性を持つ。後者の標的となっている過程として、オートファゴソームとリソソーム間の膜融合過程が考えられた。オートファゴソーム膜形成後に膜に動員される STX17 が細胞質の SNAP29 と結合し、さらにリソソーム膜に存在する VAMP8 と相互作用することで両方の膜が隣接し、膜融合が達成されると考えられている。Vpr が本過程を阻害するのか調べた結果、STX17 のオートファゴソーム膜への動員、および上述した分子間で起こる相互作用に重大な影響は認めなかった。

さらに、Vpr 発現時のオートリソソームの pH について酸性オルガネラマーカ―を利用し て解析した結果、Vpr は酸性オルガネラの pH を通常よりも上昇させていることが判明し た。最大の活性に低い pH を要求するオート リソソーム中の分解酵素群は、Vpr により上 昇した pH 条件下では機能低下していること が推察された。

遊離 Vpr またはウイルス粒子内 Vpr の機能 解析のためにリコンビナント Vpr の発現と精 製および Vpr 含有ウイルス様粒子の作成を試 みたが、前者は精製に困難な過程が多くあり、 後者は十分な Vpr を内包させる条件検討が想 定した通りには進まなかった。現在も条件検 討を行っている。

Vpr がオートファジー制御能を持つ事は本 研究により初めて明らかにされた成果であ る。Vpr がオートファジーを正負の両面で制 御するという結果から、当初想定していた分 子機構よりもはるかに複雑な機構を Vpr が制 御していることが示唆された。本研究により Vpr 依存的オートファジー制御のための宿主 因子が同定され、かつ制御のための分子機構 が解明された。今後は酸性オルガネラの pH を上昇させる機序のより詳細な解明を行い、 また、様々な細胞内での本制御の意義につい てエイズ病態への関与を含めて研究を継続 する。

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 2 件)

Yoshiyuki Hakata, Sayuri Tsuchiya, Hiroyuki Michiue, Takashi Ohtsuki, Hideki Matsui, Masaaki Miyazawa and Mizuki Kitamatsu、A novel leucine zipper motif-based hybrid peptide delivers a functional peptide cargo inside cells、Chemical Communications、査読有、51 巻、2015 年、413-416. DOI:10.1039/C4CC07459A

Yoshiyuki Hakata, Masaaki Miyazawa, Nathaniel R. Landau、Interactions with DCAF1 and DDB1 in the CRL4 E3 ubiquitin ligase are required for Vpr-mediated G2 arrest、Virology Journal、査読有、11 巻、2014 年、108. DOI:10.1186/1743-422X-11-108

[学会発表] (計 1 件)

博多 義之、HIV-1 Vpr has two distinct functions on autophagy regulation、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015/11/22-2015/11/24、Fukuoka international congress center (福岡県・福岡市)

[その他]

ホームページ等

近畿大学 医学部 免疫学教室

<http://www.med.kindai.ac.jp/immuno/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

博多 義之 (HAKATA, Yoshiyuki)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：30344500

(2) 研究分担者

宮澤 正顕 (MIYAZAWA, Masaaki)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：60167757