

研究題目 ヒト免疫不全ウイルスの出芽に関する宿主タンパク質の同定と機能解析

研究組織

研究代表者：吉村成弘（京都大学大学院生命科学研究科）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：山崎啓也（京都大学大学院生命科学研究科）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

本研究課題は、ヒト免疫不全ウイルスの出芽過程に関する宿主タンパク質を同定し、その機能を解明するとともに、出芽過程の分子機構を明らかにすることで、抗ウイルス治療に資する知見を得ることを目的とする。

[1-2] 研究の方法・経過

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）は、後天性免疫不全症候群の原因ウイルスであり、世界の感染者は 3670 万人に上る。毎年新たに 180 万人の新規感染患者と 100 万人の死亡者が出ており、世界で最も深刻な感染症の 1 つである。他のウイルスと同様に、感染、複製、出芽の各ステップで機能するタンパク質の機能が解明されてきたが、ウイルス出芽過程における宿主タンパク質の関与に関しては、未だ不明な点が多い。細胞膜直下において、ウイルスの殻タンパク質である Gag が、ゲノム RNA および Nef などのタンパク質を梱包して粒子が形成されると考えられているが、これらがいかんして膜の変形と切り離しを行うかに関する分子構造学的問題は依然として不明である。Gag と細胞膜との相互作用や Gag と宿主細胞との相互作用がいかんして膜の変形・切り離しに必要なエネルギーを生み出すかを明らかにすることは、HIV の出芽機構を解明する上で重要である。

研究代表者はこれまでに、独自に開発した高速原子間力顕微鏡と蛍光顕微鏡との相関イメージング技術 [Yoshida et al., PLOS Biol. 2018 etc.] を用いて、偽 HIV ウイルス粒子の出芽過程をライブイメージングする技術確立した。さらに、その動きを詳細に解析するこ

とで、細胞骨格と機能的に関係のある TRIP10 や Pacsin2 などの宿主タンパク質が出芽過程に深く関与していることを見いだした。この結果は、ウイルスタンパク質が膜変形のエネルギーコストをいかに支払うかという問題に対して、重要な手がかりを与えるものである。そこで、本研究課題では、このタンパク質を手がかりに、それと相互作用するタンパク質を網羅的に同定することで、出芽過程の全貌を分子レベルで明らかにすることを目的とする。具体的には、細胞膜直下での相互作用を検出するために、ビオチン化酵素との融合タンパク質を細胞内に発現させ、約 10 nm 以内の直近に位置するタンパク質をビオチン化してから抽出液を調製し、ビオチン化タンパク質を質量分析によって大規模に同定する BioID (proximity-dependent biotin identification) 法を用いる。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果 HIV-1 の出芽に関する宿主タンパク質の 1 つである CIP-4 に TurboID を融合させたものを COS7 細胞で発現させ、その近傍タンパク質をビオチン化し、質量分析でビオチン化タンパク質を同定した。さらに、ウイルスの有無で比を取り、ウイルス特異的に結合するタンパク質を定量的に評価した。

得られた候補から約 20 種類のタンパク質を選び出し、cDNA をクローニングした後に COS7 細胞で強制発現させ、pull-down アッセイにより相互作用を検証した。その結果、9 種が CIP-4 と、7 種が HIV のカプシドタンパク質である Gag と相互作用することが明らかになった。また、これらの候補タンパク質に EGFP を融合させた

ものを COS7 細胞で発現させ、mCherry 融合 Gag との共局在を共焦点蛍光顕微鏡のライブセルイメージングで検証すると、10 種類以上のタンパク質で共局在を見ることができた。

これらの成果は、BioID で同定したタンパク質が実際にウイルスタンパク質と何らかの相互作用をしていることを示すものであり、その有用性と実用性を示すものである。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究において、質量分析により同定され、かつウイルスとの相互作用・共局在が確認されたタンパク質の多くが、これまでにウイルスとの関連性が報告がされていない。BioID を用いた解析により、これまでに同定されていなかった宿主タンパク質を多数同定できたことは、ウイルス出芽過程の分子メカニズムを理解する上で非常に重要な成果である。

今後、これらのタンパク質の詳細な機能解析を進めることで、ウイルス出芽過程の分子機構の理解に大きく近づくことができる。また、出芽過程のみならず、侵入や複製過程にも BioID を用いた解析を用いることで、ウイルス生活環の総合的理解に発展させることも可能である。

【3】 主な発表論文等

[3-1] 論文発表

H. Yamazaki, H. Kosako and S.H. Yoshimura (2020) “Quantitative proteomics indicate a strong correlation of mitotic phospho-/dephosphorylation with non-structured regions of substrates.” *Biochim. Biophys. Acta. Proteins Proteom.*, 1868(1): 140295, DOI: 10.1016/j.bbapap.2019.140295.

[3-2] 学会発表

H. Yamazaki, H. Kosako and S.H. Yoshimura, “Quantitative proteomics indicate a strong correlation between mitotic phosphorylation /dephosphorylation and structural properties of substrate domains.” 64th Annual Meeting of the Biophysical Society, San Diego, USA, Feb. 18th, 2020.

[3-3] 成果資料等

なし

【4】 今後の課題等

今後の課題、その他等

特になし