

# 重松小百合 論文内容の要旨

## 主 論 文

“Anti-HIV-1 restriction factor, SAMHD1 restricts the retrovirus infection not only in myeloid cells and quiescent CD4<sup>+</sup> T cells but also in TE671 rhabdomyosarcoma cells”

抗 HIV-1 因子 SAMHD1 は骨髄系細胞や休止期 CD4<sup>+</sup>T 細胞だけでなく TE671 横紋筋肉腫細胞でもレトロウイルス感染を抑制する

重松小百合、松山俊文

International Journal of Integrative Biology、印刷中

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻  
(主任指導教員：松山俊文教授)

## 緒 言

近年、HIV-1 感染抑制因子として注目されている SAMHD1 (1-626aa) は、SAM ドメイン (45-110aa) と HD ドメイン (164-319aa) から構成されるタンパク質である。

HD ドメインは、dGTP 依存的な triphosphatase (dGTP triphosphatase) として細胞内のデオキシヌクレオチドを、デオキシヌクレオシド (dNs) と 3 リン酸に分解する活性を持つ。その結果、ウイルス逆転写に必要な細胞内 dNTP 量が不足しウイルス複製が阻害されると考えられている。一方、SAMHD1 は HIV-2 や SIV 由来アクセサリータンパク質である Vpx によってプロテアソームで分解され、その感染抑制活性を失うことが知られている。

多くの細胞が内因性の SAMHD1 タンパク質を発現しているにも関わらず SAMHD1 による HIV-1 感染抑制はミエロイド系細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞に限られており、そこから SAMHD1 の機能発現には細胞特異的な cofactor が必須であると考えられている。

しかし細胞によっては SAMHD1 の細胞内局在や SAM ドメインの HIV-1 感染抑制への意義など不明な点もあることから、本研究では SAMHD1 が HIV-1 感染抑制因子として働く新たな細胞を探索し、その細胞における SAMHD1 の機能解析を行うこととした。

## 対象と方法

1. 感染実験： SAMHD1 (1-626aa)、SAM 領域 (SAM ドメインを含む領域、1-119aa)、HD 領域 (HD ドメインを含む領域、120-625aa) を発現するプラスミドを作製した。感染に用いた Amphotropic MLV ベクターは、Amphotropic MLV env、MoMLV gag-pol、LacZ

レポーター遺伝子を持ったウイルス粒子を恒常的に産生する TELCeB6 の細胞上清を回収・遠心分離することで得た。HIV-1 ベクターは、293T 細胞に VSV-G、R8.91 (gag-pol- $\Delta$ env) と LacZ プラスミドを共発現させ、48 時間後の細胞上清を回収・遠心分離することで得た。

HeLa、293T、TE671、NP2、H292、C33A 細胞に SAMHD1 あるいは pcDNA3.1 (コントロール) を過剰発現させ 24 時間後にウイルス液を感染させた。SAMHD1 による感染抑制は、感染細胞が LacZ を発現する為、X-gal 染色で青染した細胞の数を測定することにより判定した。また、dGTP triphosphatase 依存的な感染抑制メカニズムの有無を調べる為にウイルス感染 3 時間後の TE671 細胞の上清に dNs (各 2.5mM) を添加し、48 時間後に X-gal 染色を行った。

2. タンパク質発現: SAMHD1 と Vpx あるいはコントロールプラスミドを共発現させた TE671 細胞の溶解液を電気泳動で分離し、ウェスタンブロットで SAMHD1、Vpx 及び  $\beta$ -actin タンパク質を検出した。

3. 細胞内局在同定: HA 標識 SAMHD1、SAM、HD を一次抗体 (抗 HA 抗体)、続く二次抗体 (Cy3-標識マウス IgG 抗体) で検出し、共焦点レーザー顕微鏡にて細胞内局在を観察した。

## 結果

- 1) SAMHD1 による MLV, HIV-1 ベクター感染抑制が 293T と TE671 横紋筋肉腫細胞株においてみられた。
- 2) TE671 細胞では、SAMHD1 による感染抑制は dNs の添加により解除された。
- 3) TE671 細胞では、核移行シグナル (NLS) を持つ SAMHD1 が細胞質に存在した。
- 4) TE671 細胞では、NLS を持つ SAM 領域タンパク質も細胞質に存在し、野生型 SAMHD1 よりも顕著な感染抑制を示した。
- 5) Vpx は SAMHD1 による感染抑制を解除したが、SAMHD1 タンパク質は分解されていなかった。

## 考察

本実験において dNs を添加することで SAMHD1 による HIV-1 感染抑制が解除された為、TE671 細胞では dGTP triphosphatase 活性による感染抑制メカニズムが働いていることが示唆された。

TE671 細胞では dGTP triphosphatase 活性を持たない SAM 領域タンパク質によっても感染抑制がみられた。SAM ドメインはタンパク-タンパク結合に重要な領域であることが報告されている。また、リコンビナントタンパク質を用いた実験では、SAM 領域が、ウイルスゲノムへの結合、ヌクレアーゼ活性に必須という報告もあることから、SAM ドメインに未知の cofactor が結合し、これらの活性を促進して感染抑制が行われているのかもしれない。その意味で、TE671 細胞は SAMHD1 の cofactor 研究へ有用な細胞株と言える。

また Vpx は従来の報告と異なり、SAMHD1 を分解することなく感染抑制を解除した。Vpx の結合領域が SAMHD1 の四量体形成に必要なドメインと重なることから、Vpx は SAMHD1 の分解誘導とともに四量体形成を阻害するメカニズムを介して SAMHD1 の感染抑制能を阻害している可能性が考えられる。