

い HIV-1/エイズのモデル研究システム構築の可能性が開かれた。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wang, H., Sakurai, A., Khamsri B., Uchiyama, T., Gu, H., Adachi, A., and Fujita, M. Unique characteristics of HIV-1 Vif expression. *Microbes and Infection* 7: 385-390, 2005.
- 2) Yoshida, A., Piroozmand, A., Sakurai, A., Fujita, M., Uchiyama, T., Kimura, T., Hayashi, Y., Kiso, Y., and Adachi, A. Establishment of a biological assay system for human retroviral protease activity. *Microbes and Infection* 7: 820-824, 2005.
- 3) Khamsri, B., Murao, F., Yoshida, A., Sakurai, A., Uchiyama, T., Shirai, H., Matsuo, Y., Fujita, M., and Adachi, A. Comparative study on the structure and cytopathogenic activity of HIV Vpx/Vpr proteins. *Microbes and Infection*, in press.
- 4) Kamada, K., Yoshida, A., Khamsri, B., Piroozmand, A., Yamashita, T., Uchiyama, T., Fujita, M., and Adachi, A. Construction of *gag*-chimeric viruses between HIV-1 and SIVmac that are capable of productive multi-cycle infection. *Microbes and Infection*, in

press.

- 5) 足立昭夫 HIV感染症. 日本臨床, 63 巻増刊号 12, 342-346, 2005.

2. 学会発表

- 1) 鎌田和弥、内山恒夫、山下知輝、Ahmad Piroozmand、Boonruang Khamsri、長尾多美子、藤田美歌子、足立昭夫. サル細胞に感染する HIV-1 DT の構築. 日本ウイルス学会、2005 年、横浜.
- 2) 藤田美歌子、長尾多美子、足立昭夫. HIV-2 Vpx は細胞増殖抑制効果を示す. 日本エイズ学会、2005 年、熊本.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

10. HIV-1 Vif 機能制御：Vif 新規機能探索

分担研究者 明里宏文（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター）
研究協力者 李永仲、飯島沙幸

研究要旨：HIV-1 Vif はウイルス粒子にパッケージされ、Gag p2/NC プロセッシングを特異的に制御する一方、過剰な Vif パッケージングによりウイルス成熟過程を阻害し、結果としてウイルス感染性を抑制する。昨年度の研究により、この作用を規定する領域が N 末端の 10-13 アミノ酸残基にある事が示唆されたことから、今年度はこの作用機序についてより詳細な解析を行った。その結果、Vif 10-13 アミノ酸残基（おそらくは Trp11 および Gln12）が Gag p2/NC processing 阻害およびそれによるウイルス感染性抑制作用に係る機能ドメインであることが明らかとなった。

A. 研究目的

ウイルス粒子内 Vif (v-Vif) は用量依存的に Gag p2/NC プロセッシングのみを特異的に抑制することでウイルス成熟過程を阻害し、その結果として HIV-1 の感染性を抑制する(Akari et al.: J Biol Chem 279,12355,2004)。昨年度の研究結果より、この作用を規定する領域が N 末端の 10-13 アミノ酸残基にある事が示唆された。本研究ではこの作用機序についてより詳細な解析を行った。

B. 研究方法

HIV-1 Vif タンパク質発現ベクターである pNLA1-43Vif を基に、site-directed mutagenesis 法により導入した一連の Vif N 末端欠失変異体もしくは点変異体発現ベクターを作成した。これらを HIV-1 分子クローンである pNL4-3Δenv 発現ベクターと共に H9 細胞または HeLa 細胞へ遺伝子導入し、24 時間後ウイルスおよび導入細胞を回収した。ウイルスタンパク質は Western blotting 法により解析を行った。ウイルス感染性は LuSIV 細胞を用いた single-round infectivity assay により評価した。

C. 研究結果

1) Vif N 末端 25 アミノ酸残基まで、4 アミノ酸残基ごとに連続する欠失変異体を作成し解析を行ったところ、細胞内における変異体の発現はほとんど野生型 Vif と同程度であった。またウイルス粒子への取り込み効率は、M-1 から M-5 までの変異体においてやや低下が見られた。しかしこれらの変異体間での違いは特に認められなかった（図 1）。

2) Vif N 末端欠失変異体発現ベクター及び pNL4-3Denv を HeLa 細胞へ遺伝子導入し、24 時間後得られたウイルスの感染性を LuSIV 法により測定したところ、M-3 変異体で 10-13 アミノ酸残基の欠失変異により感染性抑制作用は完全に消失した（図 1）。この機能欠損は野生型 Vif とは異なり、発現量を増加させてもウイルス感染性抑制効果はほとんど見られなかった（図 2）。

3) 次に、アミノ酸残基の欠失変異による Vif タンパク質全体への影響を考慮し、10-13 アミノ酸残基 (VWQV) を全てアラニンに置換した M-3/4A 変異体を作成し同様な検討を行った。その結果、M-3/4A は M-3 同様に感染性抑制作用はほとんど認められな

かった (図3)。

4) M-3 領域 (VWQV) において、本 Vif 作用を規定するアミノ酸残基を決定する目的で、1 ないしは2アミノ残基を Ala に置換した変異体を作成した (図4)。これを用いて解析を行ったところ、Trp11 および Gln12 を Ala に置換した変異体 (W11A/Q12A) のみで感染性抑制作用が欠失するという予備的結果が得られた (図4)。

D. 考察

Vif N 末端の 10-13 アミノ酸残基を欠失もしくは Ala へ置換することにより、Gag p2/NC cleavage およびウイルス感染性抑制効果が失われた。従って、この領域はこれらの Vif 作用の determinant であることが示された。また M-3 領域である 10-13 アミノ酸残基 (VWQV) に関する Ala-scanning による予備的結果から、Trp11 および Gln12 が本機能を司るアミノ酸残基であることが示唆された。最終的な確定には確認実験の結果を待たねばならないが、少なくともこの VWQV 領域が機能ドメインであることが示された。

今後はさらに Vif と Gag の結合様式を明らかにし、最終的にはこの Vif 構造を mimic することで新たな創薬ターゲットとなることが期待される。また同時に本機能の HIV 複製に係る生理的意義についても検討を進めていきたい。

E. 結論

Vif 10-13 アミノ酸残基 (おそらくは Trp11 および Gln12) が Gag p2/NC processing 阻害およびそれによるウイルス感染性抑制作用に係る機能ドメインであることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Kobayashi M, Tomonaga M, Izumi T, Fukunaga K, Sasada A, Abudu A, Miyauchi Y, Akari H, Iwai K, Uchiyama T: Ubiquitination of APOBEC3 proteins by the Vif-Cullin5-ElonginB- ElonginC complex. *Virology* 344, 263-266, 2006.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

図1 M-3領域の欠失によるVif感染性抑制効果の消失

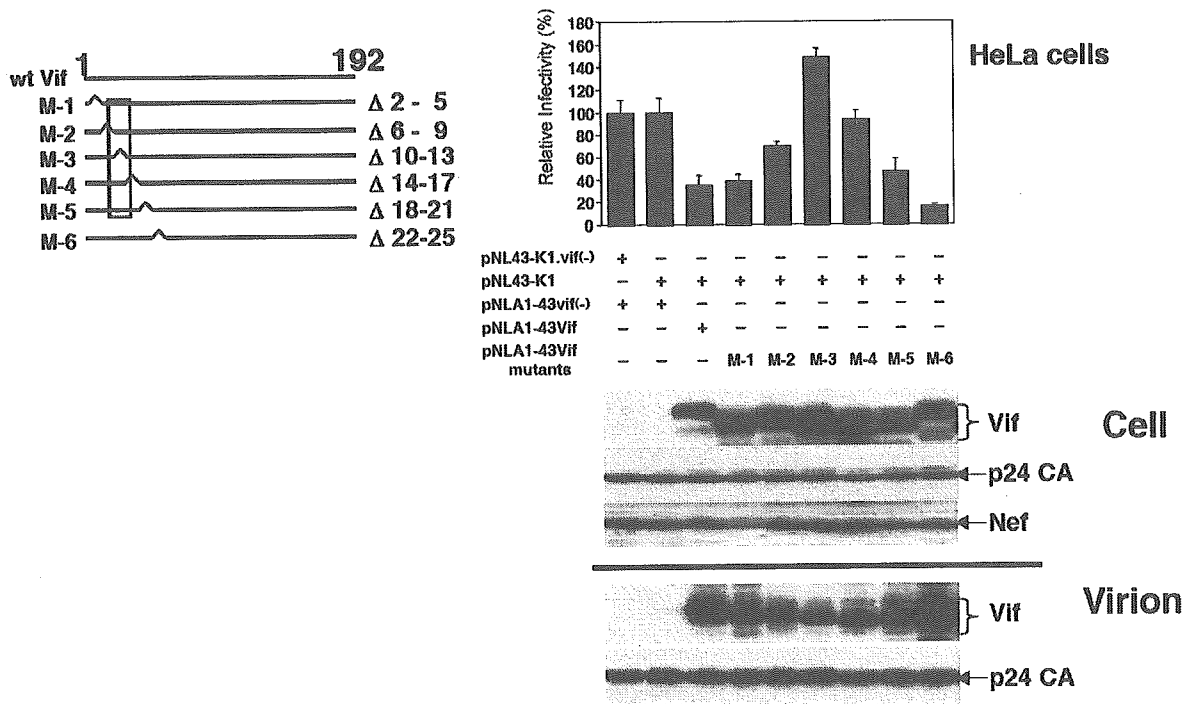


図2 M-3欠失変異による容量非依存性Vif機能の欠損

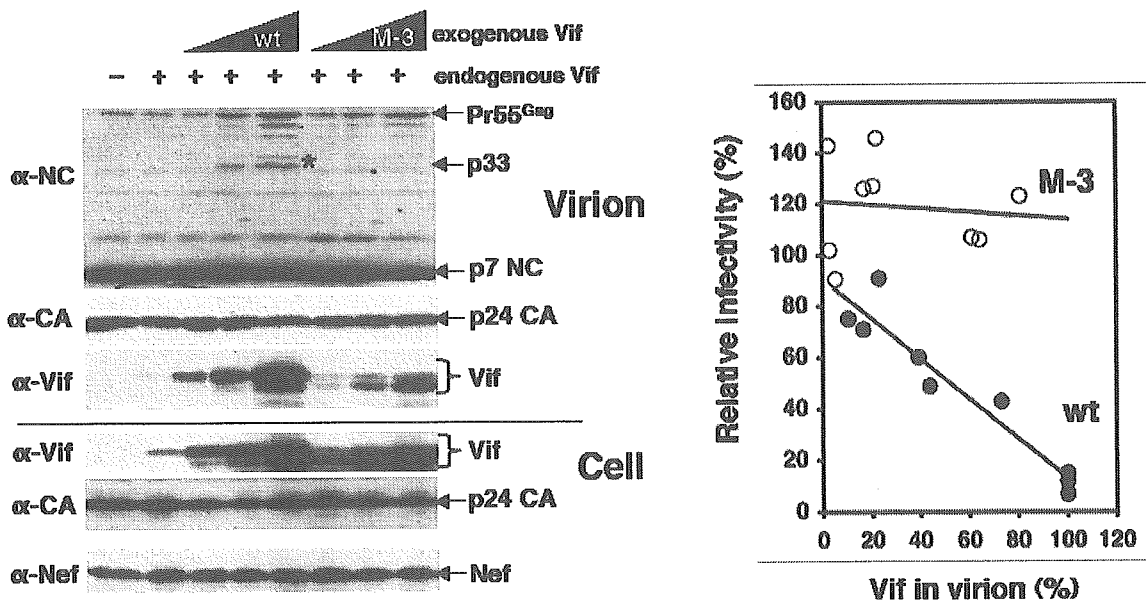


図3 10-13Ala置換変異体はM-3同様にVif機能が欠損した

	1	5	10	15	
wt Vif	MENRW	QVMIV	WQVDR	MR	
M-3	-----	-----	----	∴; アミノ酸欠失
M-3/4A	-----	-----A	AAA--	---	A; Alanineに置換

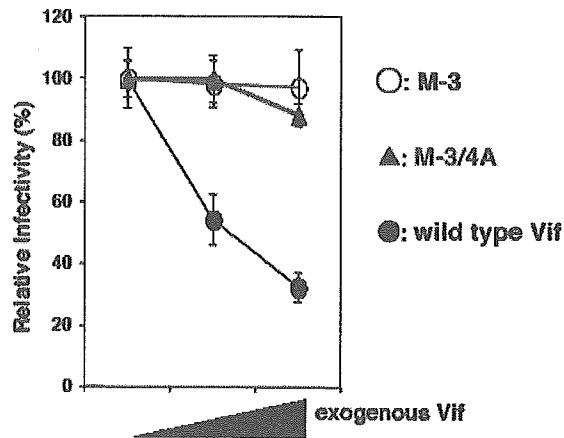
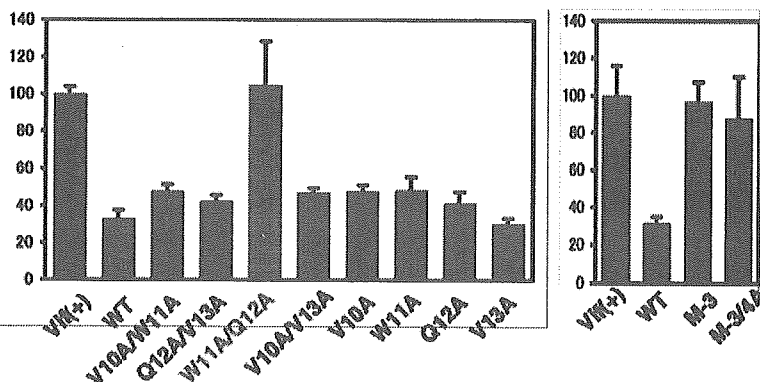


図4 Vif機能発現におけるTrp11, Gln12の意義

wt Vif	5	10	15	
	MENRW	QVMIV	WQVDR	MR
V10A/W11A	-----	-----A	A-----	---
Q12A/V13A	-----	-----	-----AA	---
W11A/Q12A	-----	-----	-----AA	---
V10A/V13A	-----	-----A	-----A	---
V10A	-----	-----A	-----	---
W11A	-----	-----	-----A	---
Q12A	-----	-----	-----A	---
V13A	-----	-----	-----A	---

A; Alanineに置換



11. HIV-1 Vpr 機能制御：Vpr 誘導細胞周期異常の機構解明

分担研究者 増田 道明 獨協医科大学・微生物学講座・教授

研究要旨 HIV-1 のアクセサリ蛋白 Vpr は宿主細胞周期の G2 期から M 期への進行を抑制する (G2/M arrest)。この現象は、組込み前のプロウイルス DNA の安定化や LTR の転写活性の増強等を介して、HIV-1 の増殖促進に寄与すると考えられている。しかし、Vpr による G2/M arrest の誘導機構については不明の点が多い。本年度は、分裂酵母を用いた分子遺伝学的実験や、アデノウイルスベクターおよび siRNA を用いたヒト培養細胞の遺伝子発現操作により、シグナル伝達分子の一種である 14-3-3 が Vpr による G2/M arrest の誘導に関与することを示した。また、HIV-1 と同じレンチウイルスであり、有用な動物モデルと考えられるネコ免疫不全ウイルス (FIV) のアクセサリ蛋白 Orf-A がヒトやネコ由来の培養細胞や分裂酵母細胞に G2/M arrest を起こすことを見出した。さらに、分裂酵母を用いた実験結果から、Vpr と Orf-A は同様の機序で G2/M arrest を誘導する可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) がコードする Vpr は多様な機能を持つアクセサリ蛋白である。特に、宿主細胞周期の G2 期から M 期への進行を抑制する (G2/M arrest) 作用は、組込み前のプロウイルス DNA の安定化や LTR の転写活性の増強等を介して、HIV-1 の増殖に対して促進的に働くと考えられている。しかし、Vpr が G2/M arrest を起こすメカニズムについては不明の点が多い。

本研究は、種々のモデル実験系を活用しながら、HIV-1 Vpr と機能的あるいは物理的に相互作用する宿主因子を同定し、その相互作用が G2/M arrest の誘導につながる機序を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

【分裂酵母を用いた実験】

nml1 プロモータ (チアミン非存在下で活性化) の下流に HIV-1_{NL4.3} の *vpr* 遺伝子を持つ pREP1-*vpr* (Masuda et al., 2000) を、HA タグおよび His タグのついた Wee1 (HA-Wee1) を発現する分裂酵母株 (O'Connell 博士より分与) に導入し、細胞周期や Wee1 発現への影響を解析した。HA-Wee1 を発現し、*rad24*、*chk1*、*cds1* 等のチェックポイント変異を有する分裂酵母株についても、同様の解析を行った。

Total RNA を鋳型とした RT-PCR により、7 種類のヒト 14-3-3 遺伝子 cDNA をクローニングした。14-3-3 β 、 ϵ 、 ζ 、 θ および σ は HeLa 細胞由来、14-3-3 γ は HEK293 細胞由来、14-3-3 η はヒト脳由来である。各 cDNA を pAUR224 の CMV プロモータの下流に挿入し、7 種類のヒト 14-3-3 発現プラスミドを構築した。これらの発現プラスミドを HA-Wee1 を発現する *rad24* 変異株に導入し、その効果を検討した。

【ヒト培養細胞を用いた実験】ヒト胎児肺由来 MRC5 細胞に Vpr と EGFP を共発現するアデノウイルスベクター Ad-VIG (Matsuda et al., 2003) を感染させた。一部の実験では、ベクター感染の 24 時間前に 14-3-3 に対する siRNA (Santa Cruz 社) を導入した。14-3-3 蛋白の発現はウエスタン法により解析した。細胞周期プロファイルは細胞を PFA 固定後に核を DAPI で染め、レーザースキャニングサイトメータで観察した。

14-3-3 β と EYFP の融合蛋白を発現するプラスミドベクターを構築した。これを、HeLa 細胞にトランスフェクションして Ad-VIG を感染させることにより、Vpr の発現が 14-3-3 β の細胞内局在に与える影響をレーザー共焦点顕微鏡にて解析した。さらに、14-3-3 β と EYFP の融合蛋白に SV40 T 抗原由来の核移行シグナル (NLS) を付加したものを発現

するプラスミドベクターも構築して HeLa 細胞に導入し、細胞周期への影響を解析した。

C. 研究成果

Vpr は分裂酵母においても細胞周期の G2 arrest を誘導すること、その際、Wee1 や Rad24 等の宿主因子が必須であることを以前報告した (Masuda et al., 2000)。今回の研究により、分裂酵母において Vpr を発現させると、Wee1 蛋白のリン酸化と発現量増加が起こることが示された。細胞周期のチェックポイント機構において Wee1 のリン酸化を司るとされつキナーゼとして Chk1 や Cds1 が知られている。しかし、Vpr による Wee1 のリン酸化は、*chk1* 変異や *cds1* 変異、あるいは両方の変異を持つ分裂酵母においても認められた。

Vpr による G2 arrest を起こさない *rad24* 変異株の分裂酵母では、Wee1 蛋白の基礎発現量の顕著な低下が認められた。Vpr を発現させると、Wee1 のリン酸化や若干の増加は認められるものの、Wee1 蛋白の絶対量は野生株で Vpr を発現した際に比べて明らかに少なかった。興味深いことに、*rad24* 変異株にヒト 14-3-3 β 、 ϵ あるいは ζ の発現プラスミドを導入すると、Wee1 の基礎発現量や Vpr 発現時の増加レベルが野生株と同程度にまで回復した。

アデノウイルスベクター Ad-VIG を用いて MRC5 細胞に Vpr を発現させると細胞周期の G2 arrest が起こる。しかし、siRNA を用いて 14-3-3 β あるいは ζ の発現を抑制した条件で Ad-VIG を感染させた場合は、G2 arrest の誘導が認められなかった。14-3-3 ϵ に対する siRNA で処理した場合には、無処理の場合と同様、Vpr による G2 arrest が起こった。

HeLa 細胞において、14-3-3 β は通常細胞質内に局在するが、Vpr の発現に伴い 14-3-3 β の核局在が認められるようになった。14-3-3 β に NLS を付加したものを HeLa 細胞で発現させると、Vpr の発現が無くても 14-3-3 β の核局在が認められるようになり、それに伴って G2 arrest が誘導された。

D. 考察

Wee1 は細胞周期のエンジンに対してブレーキとして働く分子である。分裂酵母にお

いて Vpr は Wee1 のリン酸化と発現レベルの上昇 (すなわち、ブレーキの増強) を誘導することが示された。Wee1 のリン酸化を伴う増加は、DNA 損傷等による細胞周期の G2 チェックポイントでも見られる。しかし、その際 Wee1 のリン酸化を司ると言われる Chk1 や Cds1 は Vpr による G2 arrest には不要であった。従って、他の未知のキナーゼが関与すると考えられる。Rad24 は哺乳動物の 14-3-3 ファミリー蛋白のオルソログであり、分裂酵母における Vpr 誘導 G2 arrest に必須である。本研究により、Rad24 やヒト 14-3-3 は分裂酵母における Wee1 の安定発現に重要であることが示された。また、14-3-3 β および ζ は、ヒト細胞における Vpr による G2 arrest の誘導にも必須であった。興味深いことに、ヒト細胞においては、Vpr による G2 arrest に伴い、14-3-3 β の核局在が見られた。14-3-3 β に NLS を付加し、強制的に核内で発現させた場合にも G2 arrest が誘導された。従って、Vpr は何らかの機序により 14-3-3 β の核移行を促し、それた核蛋白である WEE1 の upregulation に寄与することによって G2 arrest を誘導する可能性が示唆される。

E. 結論

Vpr はいわゆる G2 チェックポイントとは異なる機序により Wee1 のリン酸化と増量を起こすことにより G2 arrest を誘導し、その際、14-3-3 分子の核内移行が何らかの役割を果たすと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) 増田道明. 酵母を用いて行う AIDS/HIV 研究. 臨床病理. 53:942-949, 2005.

2. 学会発表

- (1) 鈴木順一郎、松田真理、藤澤隆一、増田道明. HIV-1 Vpr による G2 arrest に伴う 14-3-3 β の細胞内局在の変化とその意義. 日本ウイルス学会第 53 回学術集会, 横浜, 平成 17 年 11 月.
- (2) 増田道明、鈴木順一郎、松田直人. HIV-1 アクセサリー蛋白 Vpr による細胞周期 G2 arrest の分子機構に関する研究. 日本ウイルス学会第 53 回学術集会, 横浜, 平成 17 年 11 月.

研究協力者報告書

HIV の増殖・変異の制御に関する研究

12. - HIV 粒子のプロテオーム解析 -

協力研究者 三隅将吾 熊本大学・大学院医学薬学研究部・薬学生化学 助教授

研究要旨：本研究における HIV 粒子のプロテオーム解析は、ウイルス粒子を構成する蛋白質のうちウイルス複製に必須である新規細胞性蛋白質及び翻訳時・後修飾を明らかにすることによって、HIV の増殖・変異に関する未知の制御過程を解明し、新たな作用機序を持つ抗 HIV 薬を開発するための科学基盤を提供することにある。以下に本年度の研究成果を報告する。

1) R5 ウイルス及び X4 ウイルスの粒子内 p24 の一部は、ともにそのアミノ末端 Pro₁ がホルミル化の修飾を受けていることが明らかになった。ホルミル化 p24 は、前駆体蛋白質 Pr55 より、p24 が切断されてはじめてホルミル化を受けることから、ウイルス粒子内にホルミル化酵素が取り込まれていることが示唆された。また、ウイルス粒子中の p24 の約 30%がホルミル化を受けている可能性が示唆された。

2) p24 は、少なくともウイルス粒子内に 6 種以上の isoform (p24-a, p24-b, p24-c, p24-d, Nicked p24-a, Nicked p24-b) が存在し、p24-a のアミノ末端側に位置する Ser は特異的にリン酸化を受けていることが、alkaline phosphatase を用いた脱リン酸化実験により明らかになった。また、Nicked p24 が、ウイルス粒子内に存在することは、p24 の C 末端に自由度を与え、さらに、ウイルスが宿主細胞内へ侵入後、脱核の機構に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究の目的は、microvesicle を除去することによって高度に精製された HIV-1 粒子を調製後、プロテオーム解析を行い、粒子成分を明らかにし、最終的にその生物学的意義を明らかにすることによって、新規複製阻害剤開発のための分子基盤を構築することである。平成 17 年度の到達目標として、以下の 3 つの目標を設定した。

- 1) HIV-1 複製の未知制御因子の検索
- 2) p24(CA)N 末端ホルミル化のウイルス学的意義解明
- 3) HIV-1 粒子中の 4 種の cyclophilin A (CyPA) isoform のウイルス学的意義解明

B. 研究方法

1) 精製ウイルス粒子の調製

●ズブチリン法

HIV-1 持続感染細胞 (CEM/LAV-1、CEM-CCR5/JRFL) の培養上清をフィルター濾過後、超遠心し、ウイルスと microvesicle 混合物を得たのち、得られた沈査をズブチリンで処理し精製ウイルスを調製した。

●CD45 法

Anti-CD45-microbeads をウイルスと microvesicle 混合物に加え、microvesicle 表面の CD45 を介して microvesicle を除去することにより精製ウイルスを調製した。

2) 2次元ゲル電気泳動及び染色法

二次元電気泳動は、一次元目を固定化 pH ゲル(pH 6-8)で、二次元目をアクリルアミドゲル(12-14%)で行い、銀染色およびサイプロルビーで染色した。

3) Peptide mass fingerprint (PMF)法および Post source decay (PSD)による蛋白質の同定・解析

タンパク質の同定は酵素消化物の MALDI TOF-MS による質量分析、及びデータベース検索を行った。

C. 実験結果

1) HIV-1 複製の未知制御因子の検索に関して

プロテオーム解析のためのウイルス粒子は、目的に応じて、ズブチリシン法と CD45 法を使い分けた。ズブチリシン法では、microvesicle の除去とともにウイルス表面の蛋白質もズブチリシンにより切断されるため、ウイルス粒子内のタンパク質を同定する際に有効な手段となる。一方で、CD45 法は、ウイルス粒子外のタンパク質を保存したままウイルスを調製できる利点を生かし、ウイルス粒子外のタンパク質の同定には欠くことができない。本年度、HIV-1 粒子のプロテオーム解析の結果、JRFL および LAV-1 株共に、ウイルス粒子内に少なくとも 6 種類の p24 isoform が存在することを明らかにした。その内、intact p24 と比べ分子量が小さいに p24 isoform を、trypsin を用いて MALDI TOF-MS により解析したところ、C 末端が切断された isoform であることが判り、nicked-p24-a (pI 6.71, 約 22kDa) および nicked-p24-b (pI 6.71, 約 21kDa) と命名した。さらに、分子量が同じで等電点が異なる 3 種の p24 isoform (p24-a (pI 6.71), p24-b (pI 6.79), p24-c (pI 6.90), p24d (pI 6.91))は、リン酸化を受けていることが ProQ diamond を用いた解析の結果、明らかとなり、リン酸化の違いが等電点の

違いの一因と考えられる(2D-gel image は投稿準備中のため差し控えさせていただきます)。また、p24-a のアミノ末端 Ser は特異的にリン酸化を受けていることが alkaline phosphatase を用いた脱リン酸化実験により明らかとなり、これら p24 isoform の等電点の違いの原因の一因であることが示唆された。

さらに、JRFL および LAV-1 株の 2D gel を用いたディファレンシャルな解析の結果、それぞれの株に特異的なタンパク質の存在が確認された。

2) p24(CA)N 末端ホルミル化のウイルス学的意義解明に関して

これまでの LAV-1 株及び JRFL 株のプロテオーム解析から、ウイルス粒子内で前駆体タンパク質 Pr55 が HIV-1 protease によって切断を受けた後、HIV-1 p24 のアミノ末端がホルミル化を受けていることを明らかにしてきた。したがって、ウイルスが出芽する際に、細胞性のホルミル化酵素を粒子内に取り込んでいる可能性を示唆するが、p24 のアミノ末端ホルミル化に関与する細胞性酵素の検索は現在進行中である。

また、ウイルス粒子内のホルミル化を受けた p24 は、densitometric analysis の結果、約 30% を受けていることが明らかになった。

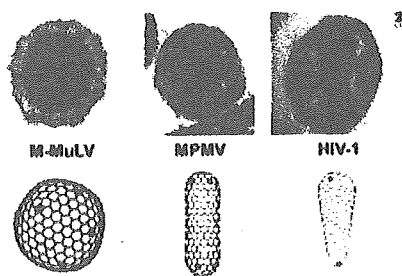
3) HIV-1 粒子中の 4 種の CyPA isoform のウイルス学的意義解明に関して

種々の T 細胞に X4 ウイルスを感染させ持続感染細胞をクローニングし、ウイルス粒子内の CyPA isoform とウイルス producer cell 内の CyPA との関わりを検討している。

また、標的細胞内の CyPA isoform とウイルス粒子内 CyPA isoform の関わりも検討中である。

D. 考察

HIV-1 p24 isoform の中に nicked form が存在することが明らかとなり、p24 の C 末端ドメインを構成する helix 3 と helix 4 の間で切断されていることが示唆された。helix 3 と helix 4 の間には HIV-1 protease の基質切断部位に相当する部分が 2 カ所存在しており、その部分で HIV-1 protease によって切断されるのか否かの解析を進めている。また、nicked-p24 のウイルス粒子内での存在意義に関しては次のように考えている。一般的にレトロウイルスは、Li 等の報告 (Nature 407, 409-413 (2000)) で代表されるように hexameric ring を形成することが知られている一方で、Barbie 等の報告 (J. Virol. 78, 2545-2552 (2000)) で報告されたように M-MuLV, MPLV, HIV-1 はず



K. Barbie et al. Journal of Virology
78, 2545-2552 (2004)

れのウイルスのコアの形状は、異なっていることから、コアの形状を規定する要因の一つになっているのではないかと考えている。さらに、ウイルスが細胞内に侵入し、グルタチオンをはじめとする細胞内のレドックス関連因子によって helix 3 と helix 4 の間のジスルフィド結合が切断されれば、hexameric ring 間の安定性を維持できなくなることが考えられるため、p24 のアミノ末端ホルミル化と共にウイルスコアの脱核の際に寄与していることも示唆される。

これまで研究を行ってきた、p24 のアミノ末端ホルミル化に関与する細胞性酵素の検索は現在進行中である。また、ウイルス粒子内に 4 種類存在する CyPA isoform が出芽後、どの時点で存在するのかに関しては、

ウイルス producer cell を用いた解析を行っている。最近、Bieniasz や Luban らによって、標的細胞内の CyPA が HIV-1 の感染性に関与するとの報告もあることから、ウイルス粒子内の CyPA isoform の役割との関わりも検討する必要性がでてきた。

E. 結論

プロテオーム解析により、ウイルス粒子内に約 30% 存在するホルミル化 p24 や Nicked p24 がウイルス粒子内に存在することにより、HIV-1 entry 後の脱核のための因子として寄与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Daisuke Nakayama, Shogo Misumi, Ryouzaburo Mukai, Kuniomi Tachibana, Mamoru Umeda, Hideaki Shibata, Nobutoki Takamune and Shozo Shoji
Suppression of Multiclad R5 and X4 Human Immunodeficiency Virus Type-1 Infections by a Coreceptor-Based Anti-HIV Strategy. *J. Biochem.* 138, 1-12 (2005)
- 2) Shogo Misumi, Daisuke Nakayama, Masashi Kusaba, Takaaki Iiboshi, Ryouzaburo Mukai, Kuniomi Tachibana, Tadashi Nakasone, Mamoru Umeda, Hideaki Shibata, Masafumi Endo, Nobutoki Takamune, and Shozo Shoji
Effects of Immunization with CCR5-Based Cycloimmunogen on Simian/HIVSF162P3 Challenge. *J.*

Immunol. 176, 463-471 (2006)

- 3) 三隅将吾、高宗暢暁、庄司省三 HIV
粒子のプロテオーム研究 疾患プロテオ
ミクスの最前線 遺伝子医学 Mook2
291-296 (2005)

口頭発表

- 1) Naomi Hasegawa, Shogo Misumi,
Nobutoki Takamune, Shozo Shoji
Seikagaku 77, 779 (2005)
- 2) Shogo Misumi, Shozo Shoji HIV-1 のプ
ロテオミクス 産学官連携を指向した九州
バイオサイエンスシンポジウム『疾患プロ
テオミクス最前線』 -新規テクノロジー
の開発から臨床応用まで- (2005)
- 3) Shogo Misumi HIV-1 粒子中の potential
protein の解析 白馬シンポジウム
(2005) 鹿児島

APOBEC3 ファミリーによる抗レトロウイルス自然免疫と HIV-1 Vif の機能

主任研究者：高折 晃史 京都大学医学研究科 血液・腫瘍内科学

研究要旨：新規抗 HIV-1 宿主因子 APOBEC3G による抗 HIV-1 活性、および HIV-1 Vif によるその中和機構に関する研究を行った。さらに他の APOBEC3 ファミリー蛋白の抗レトロウイルス活性に関する検討まで研究を展開した。これらの研究により、①APOBEC3G による抗 HIV-1 活性の分子メカニズム、②Vif による APOBEC3G 中和メカニズム、③APOBEC3G による抗 HTLV-1 活性、④マウス APOBEC3 による抗 MLV 活性に関し、重要な知見を得た。

A. 研究目的

HIV-1 Vif 蛋白は、HIV-1 の複製および生体における病原性に必須のアクセサリ蛋白質であるが、その機能の本態は長年の間不明であった。しかしながら、2002 年、まったく新規の抗 HIV-1 宿主因子として APOBEC3G が同定され、Vif はこれを中和する役割を果たしていることが明らかとなった。APOBEC3G は、cytidine deaminase に保存されたアミノ酸配列を有する DNA 変換酵素であるが、ウイルス粒子中に取り込まれ、逆転写の際に HIV-1 ウイルスのマイナス鎖 DNA の dC を dU に変換することにより、HIV-1 の複製を阻害する。一方、Vif は、本分子と結合しユビキチン-プロテアソーム系を介してこれを分解することでその抗ウイルス活性を抑えることが我々を含む複数のグループにより明らかにされた。これら一連の研究成果は、近年における HIV 研究の最も大きなブレークスルーであったが、APOBEC3G による抗レトロウイルス活性、および Vif 蛋白によるその中和機構の全容やより詳細な分子メカニズムに関してはいまだ未解明な点が多い。そこで、本研究の目的は、APOBEC3G を含む APOBEC ファミリー分子がいかに様々なウイルスに対する抗ウイルス活性を示し、逆にウイルスがいかにその分子を回避しているかのより詳細な分子レベルでの理解を得ること、およびその調節による新たな抗ウイルス薬（特に抗 HIV-1 薬）の開発を行うことである。

B. 研究方法

(1)APOBEC3G による抗レトロウイルス活性の機能解析

①種々の点変異体、および欠失変異体を用いて抗 HIV-1 活性、Cytidine deaminase 活性、2 量体形成、ウイルス粒子中への取込み能を検討した。

②HIV-1 以外のレトロウイルスとして、MLV および HTLV-1 への抗ウイルス活性を検討した。

③他のファミリー分子である、APOBEC3B、APOBEC3F、およびマウス APOBEC3 の抗ウイルス活性の検討を行った。

(2)Vif による APOBEC3 ファミリー蛋白の中和機構の解析

①Vif による APOBEC3G のユビキチン化を分子レベルで解析する目的で、Vif-BC-Cul5 複合体による *in vitro* ユビキチンアッセイを確立した。

②本アッセイ系を用いて、各種 APOBEC3G 変異体、Vif 変異体、APOBEC3F、APOBEC3B 等に関する検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、人と動物を用いた研究は行わなかった。

C. 研究結果

まず、本研究の開始点として、①ヒト APOBEC3G による抗 HIV-1 活性のメカニズムに関する研究を進め、APOBEC3G が HIV-

1ウイルスのマイナス鎖DNAにdCからdUへの変異を導入し、結果としてプラス鎖DNAにG/A hypermutationを導入することによりHIV-1の感染性を阻害すること、さらに、種々の点変異体を用いて、C端の活性部位が抗ウイルス活性に必須であることを示すと同時に、酵素活性以外の調節因子が抗ウイルス活性には必要であることを世界に先駆けて証明した(Shindo et al., *J Biol Chem*, 2003)。

次に、②HIV-1 Vif蛋白によるAPOBEC3Gの抑制機構に関して研究を進め、HIV-1 Vifは、ユビキチンリガーゼ(E3)複合体の構成蛋白であるCullin5, ElonginB, ElonginCと複合体を形成し(Vif-BC-Cul5)、E3複合体の基質認識サブユニットとしてAPOBEC3Gと結合し、これをユビキチン化することを世界で初めてin vitroのアッセイを用いて直接証明した (Kobayashi et al., *J Biol Chem*, 2005)。

同時に、APOBEC3GがHIV-1以外のレトロウイルスに対しても同様の抗ウイルス活性をもつかという点に関して研究を進め、③本分子が、ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-1)に対しても抗ウイルス活性を示すこと、さらに抗HTLV-1活性にはcytidine deaminase活性を必要としないことを世界で初めて証明した (Sasada et al., *Retrovirology*, 2005)。また、④マウスレトロウイルス(MLV)に対する抗ウイルス活性の検討から、ヒトAPOBEC3GがMLVに対する抗ウイルス活性を有すること、一方、マウスAPOBEC3Gは特異的にMLV粒子中への取り込みが行われないために、MLVに対する抗ウイルス活性をもたないことを証明し、APOBEC3Gに標的ウイルスの特異性が存在することを世界に先駆けて示した(Kobayashi et al., *J Virol*, 2004)。

さらに、APOBEC3G以外の本分子ファミリー蛋白による抗ウイルス活性に関して研究を進め、⑤APOBEC3BおよびAPOBEC3Fもまた抗HIV-1活性を有するが、その活性の強さ、およびVifに対する感受性に差がある

ことを報告した(Shirakawa et al., *Virology*, 2005)。

D. 考察

APOBECファミリー蛋白に関する研究は、近年におけるHIV-1研究の最も大きなブレイクスルーであったのみならず、本分子ファミリー蛋白が抗ウイルス自然免疫として重要な役割を担っていることを示しており、まったく新たな抗ウイルス自然免疫機構の概念を提供する極めてユニークかつ重要な研究である。申請者の研究はこれら一連の研究成果のなかで中心的役割をなすものであり、世界中のAPOBEC研究者からも高い評価をうけている。さらに、本分子ファミリーによる抗ウイルス活性機構の解明は、本分子を標的とした新規抗ウイルス薬の開発へとつながる意味で極めて臨床的、社会的な意義も高いと考えられる。今後は、これまでの研究成果をふまえた上で、さらに、本分子ファミリーによる抗ウイルス自然免疫機構、およびウイルスによるその制御機構の分子メカニズムに関する理解を深め、新規の抗HIV-1薬の開発を目標とし、研究を進めたい。

E. 結論

活発な研究が展開され、当初の計画はほぼ達成された。これらの研究成果は、世界的にみてもVifおよびAPOBEC3の研究分野において中心的役割をなすものであり、APOBECファミリー蛋白による新たな抗ウイルス自然免疫システムの概念の創出に大きく寄与したと考えられる。今後は、本研究成果をさらに発展させ、新規抗HIV-1薬剤の開発に向けて進みたいと考えている。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

欧文

- 1) K Shindo, A Takaori-Kondo, M Kobayashi, A Abudu, K Fukunaga, and T Uchiyama: The enzymatic activity of CEM15/Apobec-3G is essential for the regulation of the infectivity of HIV-1 virion, but not a sole determinant of its antiviral activity. *J Biol Chem* 278(45): 44412-44416, 2003.
- 2) M Kobayashi, A Takaori-Kondo, K Shindo, A Abudu, K Fukunaga, and T Uchiyama: APOBEC3G targets specific virus species. *J Virol* 78(15): 8238-8244, 2004.
- 3) M Kobayashi, A Takaori-Kondo, Y Miyauchi, K Iwai, and T Uchiyama: Ubiquitination of APOBEC3G by an HIV-1 Vif-Cullin5-Elongin B-Elongin C Complex Is Essential for Vif Function. *J Biol Chem* 280(19):18573-18578, 2005.
- 4) A Sasada, A Takaori-Kondo, K Shirakawa, M Kobayashi, A Abudu, M Hishizawa, K Imada, Y Tanaka, and T Uchiyama: APOBEC3G targets human T-cell leukemia virus type 1. *Retrovirology* 2:32, 2005.
- 5) BY Ma, SA Mikolajczak, A Danesh, KA Hosiawa, CM Cameron, A Takaori-Kondo, T Uchiyama, DJ Kelvin, and A Ochi: The expression and the regulatory role of OX40 and 4-1BB heterodimer in activated human T cells. *Blood* 106(6):2002-2010, 2005.
- 6) K Shirakawa, A Takaori-Kondo, M Kobayashi, M Tomonaga, T Izumi, K Fukunaga, A Sasada, A Abudu, Y Miyauchi, H Akari, K Iwai, and T Uchiyama: Ubiquitination of APOBEC3 proteins by the Vif-Cullin5-ElonginB-ElonginC complex. *Virology* 344(2):263-266, 2006.
- 7) Y Tanaka, H Marusawa, H Seno, Y Matsumoto, Y Ueda, Y Kodama, Y Endo, J Yamauchi, T Matsumoto, A Takaori-Kondo, I Ikai, and T Chiba: Anti-viral protein

APOBEC3G is induced by Interferon- γ Stimulation in Human Hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* In press.

8) A Takaori-Kondo: APOBEC Family and Antiviral Defense. *Int J Hematol* In press.

和文

- 1) 高折 晃史: Vif タンパク質による HIV-1 の感染性制御メカニズム。「生化学」第 76 巻 第 12 号 1449 項~1453 項、2004 年
- 2) 高折 晃史: 特集 HIV の複製と宿主因子「APOBEC3 ファミリー蛋白」。「ウイルス」第 55 巻 第 2 号 267 項~272 項、2005 年

2. 口頭発表

海外

- 1) A Sasada, A Takaori-Kondo, K Shirakawa, M Kobayashi, A Abudu, M Hishizawa, K Imada, Y Tanaka, and T Uchiyama: Inhibition of Human T-cell leukemia virus type 1 by APOBEC3G. 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, USA, Feb 22-25, 2005.
- 2) A Takaori-Kondo, M Kobayashi, Y Miyauchi, K Iwai, and T Uchiyama: Ubiquitination of APOBEC3G by an HIV-1 Vif-Cullin5-ElonginB/C complex. 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, USA, Feb 22-25, 2005.
- 3) M Kobayashi, A Takaori-Kondo, Y Miyauchi, K Iwai, and T Uchiyama: Ubiquitination of APOBEC3G by an HIV-1 Vif-Cullin5-ElonginB-ElonginC complex is essential for Vif function. The 2005 meeting on RETROVIRUSES, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, May 24-29, 2005.
- 4) A Takaori-Kondo, M Kobayashi, Y Miyauchi, K Iwai, and T Uchiyama: Ubiquitination of APOBEC3G by an HIV-1 Vif-Cullin5-ElonginB-ElonginC complex is essential for Vif

function. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Kobe, Japan, July 1-5, 2005.

本エイズ学会学術集会、熊本、平成 17 年 12 月 1 日-3 日

国内

1) 高折 晃史 : マウス白血病ウイルスによるマウス APOBEC3 回避機構。第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、平成 17 年 11 月 20 日-22 日

2) 白川 康太郎、高折 晃史、泉 泰輔、朝永 充則、笹田 亜麻子、Aierken Abudu、内山 卓 : Vif-ElonginB-ElonginC-Cullin5 複合体による抗レトロウイルス宿主因子 APOBEC ファミリー蛋白のユビキチン化。第 19 回日本エイズ学会学術集会、熊本、平成 17 年 12 月 1 日-3 日

3) 笹田 亜麻子、高折 晃史、白川 康太郎、アブドレイム アルキン、田中 勇悦、内山 卓 : APOBEC3G は、HTLV-1 の感染性を抑制する。第 19 回日本エイズ学会学術集会、熊本、平成 17 年 12 月 1 日-3 日

4) Aierken Abudu、高折 晃史、白川 康太郎、泉 泰輔、笹田 亜麻子、朝永 充則、内山卓 : Inactivation of murine APOBEC3G by murine leukemia virus protease. 第 19 回日

H. 知的所有権の取得状況

なし。

III. 業績一覽 (2005)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者名	題名	編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Takashi Okamoto	Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis	Young-Joon Surh and Lester Packer0	Oxidative Stress, Inflammation and Health	Marcel Dekker	N.Y USA	2006	In press
三隅将吾、高宗暢暁、庄司省三	HIV 粒子のプロテオーム研究	戸田年総 荒木令江	遺伝子医学 Mook2	メディカルドウ	日本	2005	291-296

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Chen, R., Yokoyama, M., Sato, H. , Reilly, C., and Mansky, LM.	Human immunodeficiency virus mutagenesis during antiviral therapy: impact of drug-resistant reverse transcriptase and nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors on human immunodeficiency virus type 1 mutation frequencies.	<i>J. Virol.</i>	79	12045-12057	2005
Kinomoto, M., Appiah-Opong, R., Brandful, JA., Yokoyama, M., Nii-Trebi, N., Ugly-Kwame, E., Sato, H. , Ofori-Adjei, D., Kurata, T., Barre-Sinoussi, F., Sata, T., and Tokunaga, K.	HIV-1 proteases from drug-naive West African patients are differentially less susceptible to protease inhibitors.	<i>Clin Infect Dis.</i>	41	243-251	2005
Kinomoto, M., Yokoyama, M., Sato, H. , Kojima, A., Kurata, T., Ikuta, K., Sata, T., and Tokunaga, K.	mino acid 36 in HIV-1 gp41 ectodomain controls fusogenic activity: Implications for the molecular mechanism of viral escape from a fusion	<i>J. Virol.</i>	79	5996-6004	2005

	inhibitor.				
Miyauchi, K., Rachael Curran, Erin Matthews, Komano, J. , Hoshino, T., Yamamoto, N., Don M. Engelman, and Matsuda, Z.	Mutations of conserved glycine residues within the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp41 can inhibit membrane fusion and incorporation of Env onto virions.	<i>Jpn J Infect Dis.</i>			In press
Miyauchi, K., Komano, J. , Yokomaku, Y., Sugiura, W, Yamamoto, N., and Matsuda, Z.	Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion.	<i>J. Virol.</i>	79	4720-4729	2005
Komano, J. , Futahashi, Y., Urano, E., Miyauchi, K., Murakami, T., Matsuda, Z., and Yamamoto, N.	The Interaction of HIV-1 with the Host Factors.	<i>Jpn J Infect Dis.</i>	58	125-130	2005
山本直樹、松田善衛、 村上努、 駒野 淳	AIDS の新たな治療標的を求めて : HIV-1 の宿主因子	<i>実験医学</i>	23	2068-2073	2005
Komano, J., Futahashi, Y., Urano, E., Miyauchi, K., Murakami, T. , Matsuda, Z., and Yamamoto, N.	The interaction of HIV-1 with the host factors.	<i>Jpn J Infect Dis.</i>	58	125-130	2005
櫻木 淳一	レトロウイルス粒子内ゲノム2量体化機構の解析	<i>蛋白質核酸酵素</i>	50	892-899	2005
Takahashi, H. , Maeda, M., Sawa, H., Hasegawa, H., Moriyama, M., Sata, T., Hall, WW., and Kurata, T.	Dicer and positive charge of proteins decrease the stability of RNA containing the AU-rich element of GM-CSF.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	340	807-814	2006
Okada, Y., Suzuki, T., Sunden, Y., Orba, Y., Kose, S.,	Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B	<i>EMBO Rep.</i>	6	452-457	2005

Imamoto, N., Takahashi, H. , Tanaka, S., Hall, WW., Nagashima, K., and Sawa, H.	receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles.				
Ichinohe, T., Watanabe, I., Ito, S., Fujii, H., Moriyama, M., Tamura, S., Takahashi, H. , Sawa, H., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T., and Hasegawa, H.	Synthetic double- stranded RNA poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection.	<i>J. Virol.</i>	79	2910- 2919	2005
Yan H, Mizutani TC, Nomura, N., Takakura, T., Kitamura, Y., Miura, H., Nishizawa, M. , Tatsumi, M., Yamamoto, N., and Sugiyama, W.	A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity.	<i>Antivir Chem Chemother.</i>	16	363-373	2005
Okamoto, T. , Sanda, T., and Asamitsu, K.	K. NF-kB signaling and carcinogenesis.	<i>Curr. Pharm. Design</i>			In press
Katagiri, D., Hayashi, H., Victoriano, A.F.B., Okamoto, T. , and Onozaki, K.	Estrogen stimulates transcription of human immunodeficiency virus type1 (HIV-1).	<i>Int. Immuno- pharm</i>			In Press
Sanda, T., Asamitsu, K., Ogura, H., Iida, S., Utsunomiya, A., Ueda, R., and Okamoto, T.	Induction of cell death in adult T-cell leukemia cells by a novel I κ B kinase inhibitor.	<i>Leukemia</i>			In Press
Victoriano, A.F.B., Asamitsu, K., Hibi, Y., Imai, K., Barzaga, N.G., and Okamoto, T.	Inhibition of HIV-1 replication in latently infected cells by a novel I κ B kinase inhibitor.	<i>Antimicrob. Agents Chemother.</i>			In press
Tozawa, K., Okamoto, T. , Kawai, N., and Hashimoto, Y., Nagata, D., Hayashi, Y., and Kohri, K.	Positive correlation between sialyl Lewis X expression and pathological findings in renal cell carcinoma.	<i>Kidney Int.</i>	67	1391- 1396	2005

Sanda, T., Iida, S., Ogura, H., Asamitsu, K., Murata, T., Bacon, K.B., Ueda R., and Okamoto, T.	Growth inhibition of multiple myeloma cells by a novel I κ B kinase inhibitor.	<i>Clin. Can. Res.</i>	11	1974-1982	2005
Kobayashi, S., Kajino, S., Takahashi, N., Kanazawa, S., Imai, K., Hibi, Y., Ohara, H., Itoh, M. and Okamoto, T.	53BP2 induces apoptosis through the mitochondrial death pathway.	<i>Genes Cells</i>	10	253-260	2005
Ota, S., Kanazawa, S., Kobayashi, M., Otsuka, T. and Okamoto, T.	Establishment of a simple and quantitative immunospot assay for detecting anti-type II collagen antibody using infrared fluorescence imaging system (IFIS).	<i>J. Immunol. Methods</i>	299	189-198	2005
Takahashi, N., Kobayashi, S., Kajino, S., Imai, K., Tomodo, K., Shimizu, S., and Okamoto, T.	Inhibition of the 53BP2S-mediated apoptosis by nuclear factor κ B and Bcl-2 family proteins.	<i>Genes Cells.</i>	10	803-811	2005
Imai, K., Nakata, K., Kawai, K., Hamano, T., Mei, N., Kasai, H., and Okamoto, T.	Induction of OGG 1 gene expression by HIV-1 Tat.	<i>J. Biol.Chem.</i>	280	26701-26713	2005
Tanaka, K., Hasegawa, J., Asamitsu, K. and Okamoto, T.	Prevention of the ultraviolet B-mediated skin photoaging by a nuclear factor κ B inhibitor parthenolide.	<i>J. Pharmacol. Exp. Ther.</i>	280	26701-26713	2005
Okamoto, T.	The epigenetic alteration of synovial cell gene expression in rheumatoid arthritis and the roles of NF- κ B and Notch signaling pathways.	<i>Mod Rheumatol</i>	15	79-86	2005
Harada, S. , Yusa, K., Monde, K., Akaike, T., and Maeda, Y.	Influence of membrane fluidity on human immunodeficiency	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	329	480-486	2005