

## HIV 逆転写：逆転写酵素基質選択の制御

主任研究者： 佐藤 裕徳 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター  
研究協力者： 横山 勝 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター

**研究要旨：**HIV-1 逆転写酵素 (RT) の基質選択過程を標的とする新たな阻害剤を得るために、約 300 万の化合物ライブラリーを用いて *in silico* screening を行い、ATP 結合阻害活性が期待される低分子化合物を 161 種抽出した。実験で調べた 3 種の化合物は、いずれも RT のポリメラーゼ活性の非競合阻害活性 (混合型) をもっていた。さらに 1 種は ATP 同様に酵素活性のアロステリック調節因子として働き、基質アナログ感受性を昂進した。すなわち、RT の基質選択制御を標的とする阻害剤開発のためのリード化合物としての活性をもつことがわかった。

### A. 研究目的

HIV 感染症の諸問題は、HIV が細胞に感染し、高速で変異しながら増殖することに端を発する。HIV 感染症に科学的な方法で介入するには、ウイルスの増殖と変異のしくみを理解する必要がある。HIV の変異率は他の RNA ウイルス同様に高い。これは、主に逆転写酵素 (RT) による基質選択の精度が低く、かつ校正機能を持たないためとされる。HIV の変異性に介入し、治療とワクチンの効果を高めるには、RT の基質選択メカニズムを理解する必要がある。

DNA ポリメラーゼの基質選択のしくみは、まだ十分にはわかっていない。遺伝と進化に関連する生物学上の未解決課題といえる。精度が低いとされる HIV RT でさえ塩基置換率は約  $10^4$  置換/塩基で、高度の忠実度を保っている。RT をモデルとして DNA 合成酵素の高精度の基質選択のしくみを解き明かすことは、学術的意義も大きい。

我々は、昨年度までに、薬剤治療の効果が低下した感染者から、基質類似体感受性が低下し、同時に変異発生能の低下したウイルスを分離した。このウイルスの RT をモデルにして、基質選択の制御機構を解析したところ、高度の基質選択性の発現には、細胞質に mM 濃度で豊富に存在する ATP が必要であることを見出した。さらに、精製 RT の反応速度解析により、ATP は RT のアロステリック調節因子として、基質親和性を調節する働きがあることを見つけた。

これらの知見をもとに、ATP の RT への結合を阻害すれば、RT の基質選択制御は破綻し、ウイルスは弱毒化すると考えた。今回、

ATP 結合を阻害する低分子化合物を得るために、ATP 結合部位に結合する低分子化合物の *in silico* screening を行った。また、得られた低分子化合物の酵素活性と耐性発現への影響を調べた。

### B. 研究方法

#### (1) ATP 結合を阻害する低分子化合物の *in silico* screening

北米で開発された統合計算化学システム MOE (カナダ CCG 社) を用いて、MOE-Molfilter (菱化システム) および ASEDock2005 (菱化システム) により *in silico* screening を行った。

#### (2) 活性測定

活性測定に用いた東南アジア流行株 HIV-1 CRF01\_AE の 93JP-NH1 株 (薬剤感受性株) と ERT-mt6 株 (ヌクレオシドアナログ多剤耐性株) の p66/p51 活性型 2 量体 RT の精製は、Ni-NTA 親和性クロマトグラフィー (QIAGEN) を用いた。RT 活性測定は、poly(rA)p(dT)<sub>12-18</sub> を用いたホモポリマー系で測定した。

### C. 研究結果

#### (1) *In silico* screening

① 約 300 万の化合物ライブラリー (ナミキ商事、2004.5) の中から、MOE-Molfilter により以下の条件、すなわち  $1 \leq \text{donor} \leq 5$ 、 $10 \leq \text{accepter} \leq 20$ 、 $-100 \leq \text{SlogP} \leq 0$ 、 $350 \leq \text{weight} \leq 650$  によりフィルタをかけることで、ATP や AMP

に性質が類似した低分子化合物を 657 種抽出した。ただし、donor は水素結合のドナー数、accepter はアクセプタ数、SlogP は疎水性度を表すパラメータ、weight は分子量を表す。

② 上記①で得られた 657 種の低分子化合物の、RT の ATP 結合部位へのドッキングシミュレーションを ASEDock2005 (菱化システム) により行った。このとき、RT の構造は Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) から入手したプレトランスロケーション構造 (pdb code:1N6Q) を用いた。その結果、結合エネルギーが ATP よりも大きい低分子化合物を 161 種抽出した。

③ 上記②により得られた 161 種の低分子化合物の中から、特に結合エネルギー大きく、かつ購入できた 33 種について活性測定を行い、特に強く活性を阻害した 3 種の低分子化合物 (図 1: #7、#24、#28) を抽出した。

## (2) 酵素活性への影響

① *In silico* screening により得られた 3 種の低分子化合物#7、#24、#28 の酵素活性への影響を反応速度解析により調べた。ERT-mt6 株の#7、#24、#28 存在下における基質濃度と反応速度の関係 (図 2 上) を調べると、いずれの化合物においても基質濃度の増加にともない反応速度は単調に増加するが、化合物濃度の増加にともない最大反応速度  $V_{max}$  は減少し、酵素活性を阻害する。したがって、いずれの化合物も阻害剤として働いている。

② 上記①の基質濃度と反応速度の関係の逆数プロット、すなわちラインウェーバー・バークプロット (図 2 下) すると、いずれの化合物においても、逆数プロットにより得られた化合物濃度の異なる直線は横軸近傍で交差している。

③ 基質濃度と反応速度の関係を解析することで低分子化合物#7、#24、#28 の解離定数を求めた。RT/DNA 複合体に対する解離定数を  $K_i$ 、RT/DNA-基質複合体に対する解離定数を  $K_i'$  とすると、#7 では 93JP-NH1 株のとき  $K_i=73 \mu\text{M}$ 、

$K_i'=111 \mu\text{M}$ 、ERT-mt6 株のとき  $K_i=42 \mu\text{M}$ 、 $K_i'=50 \mu\text{M}$ 、#24 では 93JP-NH1 株のとき  $K_i=51 \mu\text{M}$ 、 $K_i'=52 \mu\text{M}$ 、ERT-mt6 株のとき  $K_i=67 \mu\text{M}$ 、 $K_i'=100 \mu\text{M}$ 、#28 では 93JP-NH1 株のとき  $K_i=131 \mu\text{M}$ 、 $K_i'=118 \mu\text{M}$ 、ERT-mt6 株のとき  $K_i=224 \mu\text{M}$ 、 $K_i'=185 \mu\text{M}$  であった。

## (3) 耐性発現への影響

低分子化合物#7、#24、#28 の耐性発現への影響を AZTTP の dose response curve (図 3) により調べた。低分子化合物#7 では 93JP-NH1 株、ERT-mt6 株のいずれにおいても#7 の濃度の増加とともに、dose response curve は右にシフトし、 $IC_{50}$  は増加する傾向が見られる。その傾向は 93JP-NH1 株よりも ERT-mt6 株において大きい。低分子化合物#24 では 93JP-NH1 株、ERT-mt6 株のいずれにおいても  $IC_{50}$  の#24 濃度依存性をあきらかにすることはできなかった。低分子化合物#28 では 93JP-NH1 株、ERT-mt6 株のいずれにおいても、dose response curve は僅かであるが左にシフトし、 $IC_{50}$  は減少する傾向がある。

## D. 考察

*In silico* screening により抽出した低分子化合物が基質の競合阻害因子として働いているとしたら、ラインウェーバー・バークプロットすると得られた直線は縦軸上で交差する。しかし、図 2 ではラインウェーバー・バークプロットは横軸近傍で交差する。ゆえに *in silico* screening により得られた低分子化合物は、ATP と同様に基質の非競合阻害因子 (混合型) である。

低分子化合物の解離定数は、#7 および #24 では  $K_i$  は  $K_i'$  よりも小さい。一方、#28 では  $K_i$  は  $K_i'$  よりも大きい。以上の結果は #7 および #24 は RT/DNA 複合体に対してより強く結合し、#28 は RT/DNA-基質複合体に対してより強く結合することを示唆する。

## E. 結論

以下の結果が得られた。① *in silico* screening により約 300 万化合物の中から ATP 阻害活性が期待される低分子化合物を 161 種抽出した。② 得られた低分子化合物

の中から実際に実験で調べた3種(#7、#24、#28)は、いずれもRTの非競合阻害剤(混合型)として働いた。③#7はATP同様に酵素活性のアロステリック調節因子として働き、基質アナログ感受性を昂進した。すなわち、RTの基質選択制御を標的とする阻害剤開発のためのリード化合物としての性質をもつ。まだ阻害活性が低いので、これらの化合物をもとに活性の最適化を行なう予定でいる。

## F. 健康危険情報

該当事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 口頭発表

- (1) 吉居廣朗、神山陽香、大石和徳、田中勇悦、佐藤裕徳、山本直樹、久保嘉直: HeLa細胞におけるCD4非依存性HIV-1の細胞侵入抑制機構. 第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年11月19-21、名古屋。
- (2) 久保嘉直、横山 勝、吉居廣朗、神山陽香、田中勇悦、佐藤裕徳、山本直樹: CXCR4糖鎖付加によるHIV-1感染防御と、その回避機構. 第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年11月19-21、名古屋。
- (3) 神山陽香、吉居廣朗、田中勇悦、佐藤裕徳、山本直樹、四童子好廣、久保嘉直: ビタミンA 類似体Geranylgeranoic acid (GGA)によるHIV-1感染の抑制. 第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年11月19-21、名古屋。
- (4) 駒野 淳、二橋悠子、磯貝まや、浜武牧子、松田善衛、佐藤裕徳、椎野貞一郎、武部 豊、山本直樹: 挿入変異を伴う多剤耐性HIV-1 (CRF01\_AE)における薬剤耐性亢進のメカニズム—薬剤耐性獲得におけるRNase H 活性の関与. 第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年11月19-21、名古屋。
- (5) 横山 勝、守 宏美、佐藤裕徳: HIV-1 RTにおけるATP結合阻害因子の酵素活性と耐性発現に及ぼす影響. 第20回日本エイズ学会総会、2006年12月1-3、東京。
- (6) T. Nakasone, J. Takamatsu, W. Sugiura, H. Sato, M. Nishizawa, S. Yamamoto, N. Yamamoto. Rapid and

convenient enzymatic phenotyping of HIV-RT by using a real-time Amp-RT assay. XVI International AIDS Conference, 13-18 August 2006, Toronto Canada.

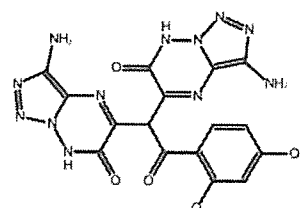
## 2. 論文発表

Matsuoka-Aizawa S, Gatanaga H, Sato H., Koike K, Kimura S, and Oka S. Cooperative contribution of gag substitutions to nelfinavir-dependent enhancement of precursor cleavage and replication of human immunodeficiency virus type-1. Antiviral Research. 70(2):51-9, 2006.

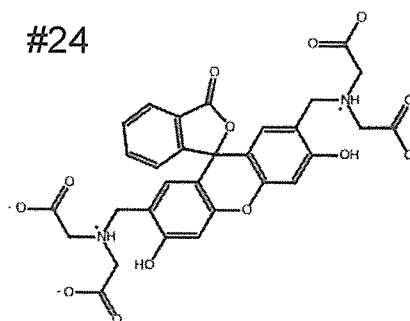
## H. 知的所有権の取得状況

なし

#7



#24



#28

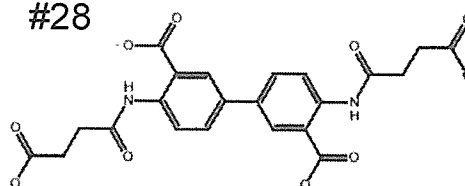


図1 *In silico* screeningにより得られた3種の低分子化合物。

図2 *In silico* screening により得られた#7、#24、#28の酵素活性への影響。

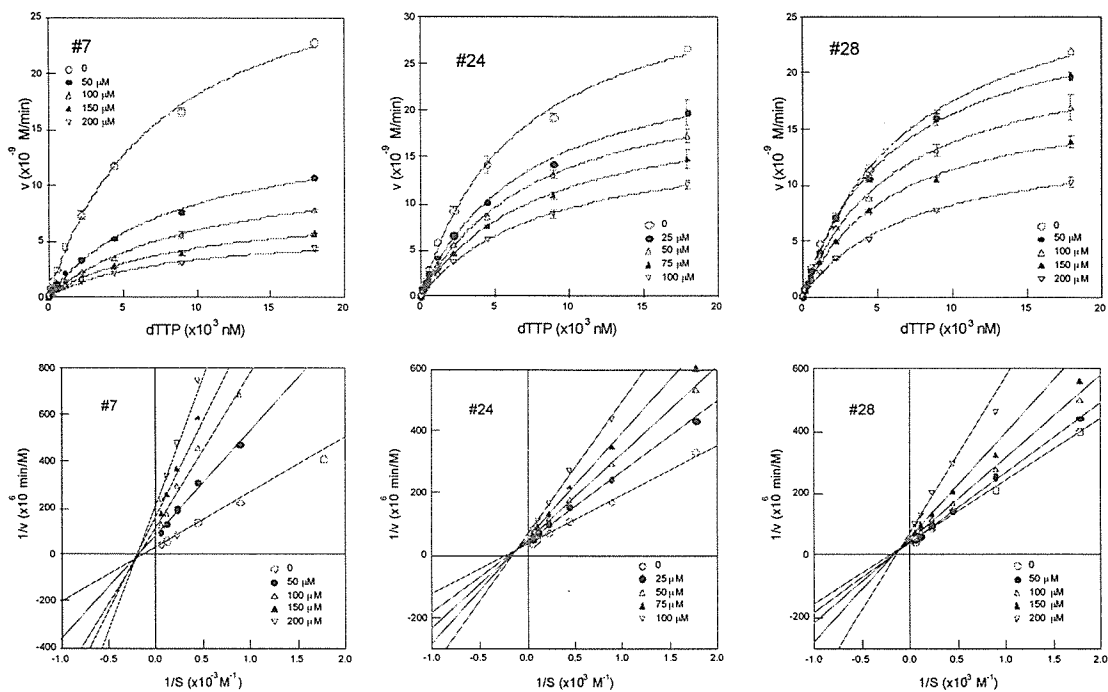
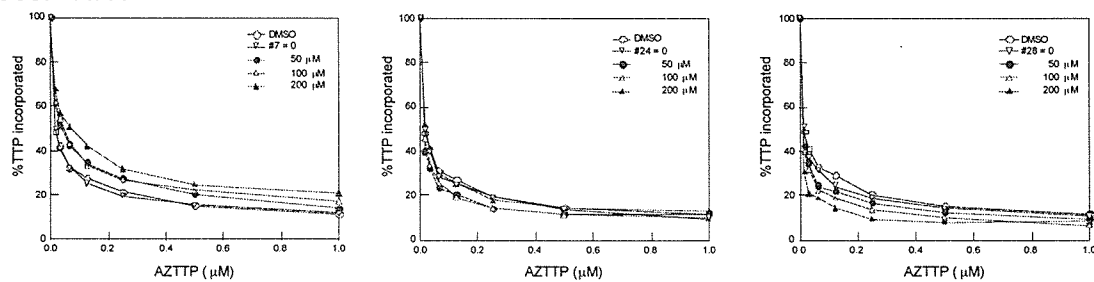
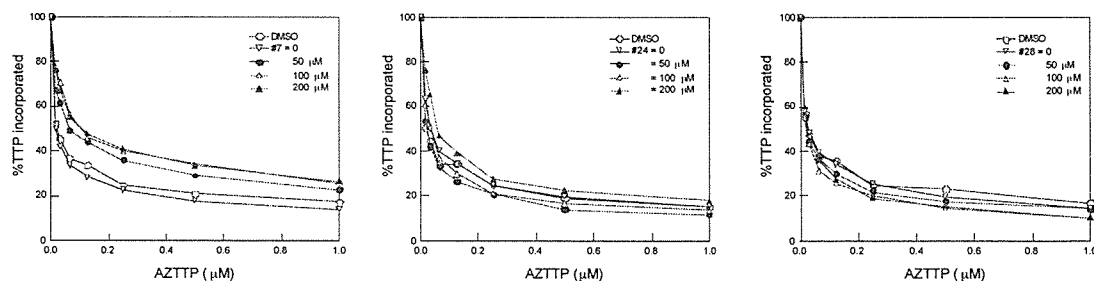


図3 *In silico* screening により得られた#7、#24、#28の耐性発現への影響。

93JP-NH1



ERT-mt6



分担研究報告書

Vif 機能制御（Vif およびその結合因子の構造機能解析）

分担研究者 足立昭夫(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部ウイルス病原学分野)

**研究要旨** HIV-1 複製に必須な Vif の機能およびその機能領域について解析し、以下の結果を得た。(1) HIV-1 の種特異的増殖（ヒト細胞で良く増殖するがサル細胞では増殖不能である特性）のウイルスゲノム上の決定領域を SIVmac とのキメラウイルスを用いて解析した。各種キメラウイルスのカニクイザルリンパ球由来 HSC-F 細胞、アカゲザル末梢血単核細胞 (PBMC) およびブタオザル PBMC での増殖能から、*gag* 遺伝子（シクロフィリン A 結合ループ対応領域）および *vif* 遺伝子が決定因子であることが明らかになった。さらに、*env* 遺伝子もウイルス増殖速度に大きく影響することが示された。本研究で構築したサルおよびヒト細胞で増殖可能なキメラウイルスは、全ウイルスゲノムの約 93% が HIV-1 由来であり、個体レベルの HIV-1/エイズ研究の礎となり得る。(2) 詳細かつ広範な点変異体解析の結果から、HIV-1 Vif の N 末端側に抗ウイルス細胞因子 APOBEC3G/F との結合・反応領域 (G/F で一部異なる) があることが明らかになった。

A. 研究目的

HIV-1 Vif は自然宿主細胞でのウイルス複製に必須であり、したがって、エイズ発症にも必須である。新規の抗 HIV-1 創薬研究等に向け、Vif の機能解明およびその責任領域の決定は急務である。Vif 活性の作用機構に関しては、非許容細胞内標的分子 APOBEC3G/F の同定により、分子生物学的理解が飛躍的に進展してきている。本年度は、HIV-1 の種特異的増殖能と Vif との関係について詳細に解析するため、HIV-1 と SIVmac 間で数種類のキメラウイルスを構築し、そのサルリンパ系細胞（細胞株および初代細胞）での増殖能を検討した。また、HIV-1 Vif 内の良く保存されたアミノ酸残基に点変異を導入し、構築された多数の変異体の分子生物学的解析を行なうことで、HIV-1 Vif 内の APOBEC3G/F

結合・反応領域の同定を試みた。

B. 研究方法

1. HIV-1 (pNL432) に SIVmac (pMA239) の *gag* 遺伝子の一部 (HIV-1 のシクロフィリン A 結合ループに対応する領域) あるいは *vif* 遺伝子を挿入置換して得られた感染性クローン、および両方の置換を持つ感染性クローンの細胞指向性を解析した。これらのキメラウイルスクローンの構築は頻用されている遺伝子工学的手法に従った。ウイルス増殖能決定のための標的細胞には、カニクイザル由来リンパ球細胞株である HSC-F 細胞、アカゲザルやブタオザル由来の末梢血単核細胞 PBMC (CD8 陽性細胞を除いた PBMC) を用い、ウイルスの増殖は逆転写酵素の産生量で定量した。シング

ルサイクルのウイルス複製は、MAGI アッセイ法あるいは Gag-p24 の産生量を ELISA 法で測定することにより定量した。MAGI 法により定量するウイルスサンプルは、ヒト 293T 細胞に Env 欠損体、VSV-G 発現ベクターおよびヒト、カニクイザルあるいはアフリカミドリザル由来 APOBEC3G (当研究室で分子クローン化) 発現ベクターを共導入して得た。また、Gag の発現量を指標とするウイルス複製の定量は、上記と同様の VSV-G シュードウイルスを 293T 細胞、アカゲザル由来 LLC-MKII 細胞およびヨザル由来 OMK637 細胞に感染させ、三日後に感染細胞内の p24 量を測定することで行なった。

2. 上記と同様の手法で HIV-1 Vif (pNL432) の N 末端から C 末端にかけて点変異 (主としてアラニン置換) を導入し、合計 26 種類の変異体を構築した。これらの点変異体を 293T 細胞やヒトリンパ球 H9 細胞を用いて分子ウイルス学的に解析した (H9 細胞での増殖能、VSV-G シュードウイルスの MAGI 感染価、細胞内発現量、APOBEC3G との結合能、ウイルス粒子中の APOBEC3G 取り込み)。また、上記の APOBEC3G の他にヒト APOBEC3F を分子クローンして発現ベクターを構築し、APOBEC3F と点変異体との反応性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒトと動物を用いた研究は行なっていない。

### C. 研究結果

1. HIV-1 の種特異的増殖における Vif の役割 [米国立アレルギー・感染症研究所 (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, USA.) の Dr. Tatsuhiko Igarashi および Dr. Malcolm A.

Martin との共同研究]。今回構築した感染性 (ヒトリンパ球細胞株 M8166 で増殖する) キメラクローン NL-Sca/NL-ScaR (シクロフィリン A 結合ループ対応領域が SIVmac239 由来)、NL-SV/NL-SVR (*vif* 遺伝子が SIVmac239 由来) および NL-ScaV/NL-ScaVR (シクロフィリン A 結合ループ対応領域と *vif* 遺伝子の両方が SIVmac239 由来) のうち、NL-ScaV/NL-ScaVR のみが親株である HIV-1 NL432 と異なりカニクイザル由来 HSC-F 細胞で増殖した (R は *vpr* 遺伝子が野生株並みに正常に発現するクローンであることを示す)。NL-ScaVR はシングルサイクルでの感染実験でも、ヒトおよびサル (カニクイザルおよびアフリカミドリザル) 由来の APOBEC3G を不活性化し、また、サル細胞 (アカゲザルおよびヨザル) でのポストエンタリーのウイルス複製効率が親株である NL432 より有意に上昇していることが確認された。NL-ScaVR のゲノムの約 93% は HIV-1 由来である。NL-ScaVR の HSC-F 細胞馴化型クローン NL-DT5R は、HSC-F 細胞で親株よりはるかに速やかに増殖した。ゲノムの塩基配列を親ウイルスと比較したところ、*env* 遺伝子の二か所がアミノ酸置換を伴う変異を起こしていることがわかった。NL-DT5R はブタオザルやアカゲザル由来 PBMC (CD8 陽性細胞欠失 PBMC) でも増殖可能であった。特に、ブタオザル PBMC では、全例 (5/5) でウイルス増殖が認められ、SIVmac239 とあまり遜色のない場合もあった。

2. HIV-1 Vif (192 アミノ酸残基) と APOBEC3G/F との相互作用。構築した 26 種類の変異体のうち、12 クローンが H9 細胞でのウイルス増殖が検出できないかあるいは増殖効率が有意に低下していた。このうち、3 クローンの変異は Cullin 5 結

合部位として知られる C 末側の領域にあったが、他の 9 クローンの変異は N 末側に二ヶ所に分かれて存在した。アミノ酸番号 21-43 は、APOBEC3G 存在下の変異体の MAGI 感染価、変異体ウイルス粒子内の APOBEC3G 量および変異体と APOBEC3G との結合能（免疫沈降法）から、APOBEC3G 結合領域と結論した。もう一つの領域（アミノ酸番号 69-79）のうち、69 番目のアミノ酸は既に我々が報告している Vif の安定性に関わる領域内であったが、76 および 79 番目のアミノ酸は APOBEC3F 存在下における VSV-G シュードウイルスの MAGI 感染価から、Vif と APOBEC3F との相互作用に重要であることがわかった。76 および 79 番目のアミノ酸は実際に APOBEC3F との結合に関与していた（免疫沈降法）。さらに、上記の MAGI アッセイの結果から、APOBEC3G 結合領域の N 末側にも APOBEC3F との相互作用に重要な領域があることが明らかになった。

#### D. 考察

1. HIV-1 がサル細胞で増殖するためには、SIVmac の *gag* 遺伝子の一部（HIV-1 のシクロフィリン A 結合ループに対応する領域）および *vif* 遺伝子が必須であることが明らかになった。サル細胞に感染・増殖するキメラ HIV-1（NL-ScaV、NL-ScaVR、NL-DT5 および NL-DT5R）はゲノムの約 93% が HIV-1 由来である。カニクイザル由来 HSC-F 細胞でのウイルス馴化実験から、ウイルス増殖能には *env* 遺伝子が大きな影響を与えることもわかった。しかし、サル PBMC での増殖が最も良いと考えられる NL-DT5R でさえも SIVmac239 には及ばず、サル個体感染実験を目指すには更なるゲノムの改良が必要である。今後は、カニクイザルのみならずブタオザルやアカゲザ

ル由来細胞株でもウイルス馴化実験を行ない、ゲノムの変異・進化を検証する予定である。また、X4 ウイルスである NL-DT5R の *env* 遺伝子を R5 や R5-X4 ウイルスの *env* 遺伝子と置換したウイルスを構築し、これらの細胞指向性や増殖速度等についても検討する予定である。機能領域に基づく Vif の試験管内改変やシクロフィリン A 結合領域の試験管内改変も HIV-1 のサル細胞での増殖能向上に有効であるかもしれない。これらの結果を全て総合して、HIV-1 の個体内ウイルス増殖および病原性発現機構の解析に最適化されたサル指向性 HIV-1 を構築することを当面の目標としたい。

2. HIV-1 Vif が抗ウイルス細胞因子 APOBEC3G を中和するメカニズムは既におおよそ明らかにされている。Vif は APOBEC3G と結合してこれを分解し、最終的にウイルス粒子中への APOBEC3G の取り込みを著しく抑制する。実際、この分解に関わる Vif 内の Cullin 5 結合部位（C 末端側に存在）も明らかにされている。本研究では、詳細な分子遺伝学的解析により、Vif の N 末端側に APOBEC3G/F 結合領域（G/F で領域が異なる）があることを新たに示した。APOBEC3G/F の中和活性に必要な Vif の領域は一部異なるが重なっており、Vif と APOBEC3G/F とがどのように複合体を形成するか知るためには更なる解析が必要である。Vif の立体構造が解明されれば（研究継続中）、詳細な分子モデルの構築が可能となる。

#### E. 結論

本研究により、Vif は HIV-1 の種指向性に極めて重要であることが明らかになり、新しい 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。また、HIV-1 Vif の

N 末端側に抗ウイルス細胞因子 APOBEC3G/F との結合領域が存在することが初めて示された。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kamada, K., Igarashi, T., Martin M. A., Khamsri, B., Hatcho, K., Yamashita, T., Fujita, M., Uchiyama, T., and Adachi, A. Generation of HIV-1 derivatives that productively infect macaque monkey lymphoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 16959-16964, 2006.
- 2) Khamsri, B., Fujita, M., Kamada, K., Piroozmand, A., Yamashita, T., Uchiyama, T., and Adachi, A. Effects of lysine to arginine mutations in HIV-1 Vif on its expression and viral infectivity. *International Journal of Molecular Medicine* 18: 679-683, 2006.
- 3) Piroozmand, A., Khamsri, B., Fujita, M., Adachi, A., and Uchiyama, T. Morphological study on biologically distinct *vpx/vpr* mutants of HIV-2. *Journal of Medical Investigation* 53: 271-276, 2006.
- 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* 8: 1075-1081, 2006.
- 5) 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* 8: 10-15, 2006.

##### 2. 学会発表

- 1) 山下知輝、鎌田和弥、Boonruang Khamsri、八町和樹、藤田美歌子、内山恒夫、足立昭夫. HIV-1 Vif と宿主因子 APOBEC3G との結合機能部位の解析. 日本ウイルス学会、2006年、名古屋.
- 2) 藤田美歌子、Boonruang Khamsri、山下知輝、鎌田和弥、Ahmad Piroozmand、長尾多美子、土肥直哉、足立昭夫. マクロファージでのゲノム逆転写/核移行過程における HIV-1 Vpr と HIV-2 Vpx の役割の相違. 日本ウイルス学会、2006年、名古屋.
- 3) Boonruang Khamsri、山下知輝、藤田美歌子、鎌田和弥、内山恒夫、足立昭夫. The Vpu 124 D and RK30AA mutations impair virus release from infected macrophages. 日本ウイルス学会、2006年、名古屋.
- 4) 藤田美歌子、長尾多美子、足立昭夫. HIV-2 Vpx の機能領域解析. 日本エイズ学会、2006年、東京.

#### 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。



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さらに展開し、①APOBEC3 蛋白による抗レトロウイルス活性の詳細、②Vif による APOBEC3 蛋白中和のメカニズム、③MLV による新規の APOBEC3 蛋白回避メカニズムに関し、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イクスルーであった。本研究は、それらの研究成果をさらに発展させ、APOBEC3G による他のレトロウイルスを含めた広範なウイルスに対する抗ウイルス活性や、他の APOBEC3 蛋白による抗ウイルス活性、さらには、MLV によるマウス APOBEC3 回避機構の研究を行った。これらの研究により、APOBEC3 蛋白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 APOBEC3 蛋白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）の開発を行うことを目標として研究を進めた。

## B. 研究方法

(1) APOBEC3 蛋白による抗レトロウイルス活性の機能解析

① HIV-1 以外のウイルスに対する抗ウイルス活性として、レトロウイルスであるマウス白血病ウイルス (MLV) およびヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1)、さらにへパドナウイルスである B 型肝炎ウイルス (HBV) への抗ウイルス活性を検討した。

② 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。

③ Vif を持たない MLV がいかにして APOBEC3 による抗ウイルス作用を回避するかの分子メカニズムを解析した。

(2) Vif による APOBEC3 ファミリー蛋白の中和機構の解析

① Vif 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 APOBEC3 蛋白に対する、Vif の中和効果に関する検討を行った。

(3) APOBEC3G の発現調節解析

肝細胞における APOBEC3G の発現調節を Real time PCR およびルシフェラーゼレポートアッセイを用いて検討した。

(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

(1) APOBEC3 蛋白による抗レトロウイルス活性の機能解析

① APOBEC3GがHIV-1以外のレトロウイルスや他のウイルス科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、本分子が、HTLV-1(Sasada, Takaori-Kondo(他7名) *Retrovirology* 2:32, 2005) や HBV(Noguchi(他13名, 13番目) *J Gen Virol* in press)に対しても抗ウイルス活性を持つことを示した。

② APOBEC3G 以外の APOBEC3 蛋白による抗ウイルス活性に関して、APOBEC3B 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, Takaori-Kondo(他10名) *Virology* 344:263, 2006)。

③ MLVに対する抗ウイルス活性の検討から、マウス APOBEC3 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(Kobayashi, Takaori-Kondo(他4名) *J Virol* 78:8238, 2004)、さらにそのメカニズムは、Vif のようなアクセサリ蛋白を用いず、ウイルス RNA とプロテアーゼを用いた全く新しい機構であることを証明した(Abudu, Takaori-Kondo(他6名) *Curr Biol* 16:1565, 2006)。

(2) Vif による APOBEC3 蛋白の中和機構の解析

HIV-1 Vif 蛋白による APOBEC3G の中和機構に関して、HIV-1 Vif は、ユビキチン連結酵素(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的に証明した

(Kobayashi, Takaori-Kondo(他3名) *J Biol Chem* 280:18573, 2005)。

② 本アッセイを用いて、各種 APOBEC3 蛋白の Vif に対する感受性は、そのユビキチン化能に依存していることを証明した(Shirakawa, Takaori-Kondo(他10名) *Virology* 344:263, 2006)。

(3) APOBEC3G の発現調節に関して、肝細胞において IFN- $\alpha$  により APOBEC3G が誘導されることを示した(Tanaka(他11名, 10番目) *Biochem Biophys Res Commun* 341(2):314-9, 2006)。

### D. 考察

APOBEC3 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、新たな抗ウイルス自然免疫機構の概念を提供しており、ウイルス感染における宿主応答機構を考える上で極めてユニークかつ重要な研究であり、学術的な意義も高い。我々の研究成果は、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 APOBEC3 研究者からも高い評価をうけている。さらに、APOBEC3 蛋白による抗ウイルス宿主応答機構の解明は、本分子群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。今後も、これまでの研究成果をさらに発展させる形で、APOBEC3 蛋白による抗ウイルス自然免疫機構とウイルスによるその回避機構の分子メカニズムの詳細に関する理解を深め、新規抗 HIV-1 薬の開発を目標として研究を進めたい。

### 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。我々の研究成果は、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、APOBEC3 蛋白による新たな抗ウイルス自然免疫機構の概念の創出に大きく寄与したのみならず、ウイ

ルスによる APOBEC3 回避機構に関して、全く新規のメカニズムを提唱するに至った。その科学的な意義は極めて大きく、今後は、それら研究成果のさらなる発展と新規抗 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 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.
- 2) 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- $\alpha$  Stimulation in Human Hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 341(2):314-9, 2006.
- 3) A Takaori-Kondo: APOBEC Family and Antiviral Defense. *Int J Hematol* 83(3):213-216, 2006.
- 4) A Abudu, A Takaori-Kondo, T Izumi, K Shirakawa, M Kobayashi, A Sasada, K Fukunaga, and T Uchiyama: Murine retrovirus escapes from murine APOBEC3 via 2 distinct novel mechanisms. *Curr Biol* 16(15):1565-1570, 2006.
- 5) C Noguchi, N Hiraga, N Mori, M Tsuge, M Imamura, S Takahashi, Y Fujimoto, H Ochi, H Abe, T Maekawa, H Yatsuji, K Shirakawa, A Takaori-Kondo, and K Chayama: Dual Effect of APOBEC3G on Hepatitis B Virus. *J Gen Virol in press*.

和文

- 1) 高折 晃史: HIV-1 の対宿主戦略。「感染・炎症・免疫」第 36 巻 第 2 号 106 項～111 項、2006 年
- 2) 高折 晃史: HIV-1 とユビキチン。「蛋白質核酸酵素増刊-ユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー-」第 51 巻 第 10 号 1433 項～1436 項、2006 年

### 2. 口頭発表

海外

- 1) A Abudu, A Takaori-Kondo, K Shirakawa, T Izumi, A Sasada, M Tomonaga, and T Uchiyama: Murine leukemia virus escapes from murine APOBEC3 via two distinct mechanisms. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Denver, USA, Feb 5-Feb 9, 2006.

国内

- 1) A Takaori-Kondo: Escape of retroviruses from antiviral innate immunity by APOBEC3 proteins. ウイルス研究所コロキウム-ウイルス基盤研究の展開-、京都、平成 18 年 2 月 13-14 日(invitation)
- 2) 高折 晃史: APOBEC3G による抗ウイルス作用とウイルスによるその回避機構。第 9 回白馬シンポジウム in 京都-エイズ研究最前線-、京都、平成 18 年 10 月 12 日-13 日(invitation)
- 3) 泉 泰輔、高折 晃史: HIV-1 Vif のユビキチン化の分子メカニズム。第 54 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、平成 18 年 11 月 19 日～21 日
- 4) 泉 泰輔、高折 晃史、白川 康太郎、Aierken Abudu、内山 卓: HIV-1 Vif のユビキチン化の分子メカニズム。第 20 回日本エイズ学会学術集会、東京、平成 18 年 11 月

30日～12月2日

5) 白川 康太郎、高折 晃史、泉 泰輔、  
Aierken Abudu、内山 卓：Protein Kinase  
AによるAPOBEC3Gのリン酸化と機能調節。  
第20回日本エイズ学会学術集会、東京、平  
成18年11月30日～12月2日

6) Aierken Abudu、高折 晃史、白川 康  
太郎、泉 泰輔、内山 卓：Murine leukemia  
virus escapes from murine APOBEC3 via two  
distinct novel mechanisms. 第20回日本エ  
イズ学会学術集会、東京、平成18年11月  
30日～12月2日

#### H. 知的所有権の取得状況

なし。

## HIV ゲノム二量体化とウイルス感染初期過程

分担研究者 櫻木淳一（大阪大学微生物病研究所 ウイルス感染制御分野）

### 研究要旨

分担研究者が独自に構築した、HIV ゲノム二量体化を効果的に検出できるシステム・HIV ゲノム組換えを定量的に算出できるシステムを用いてゲノム二量体化の詳細な解析に取り組んだ。その結果以下のことが現在までに明らかになった。

1, HIV 粒子内で実際に働く二量体化シグナルの必要十分領域は 144 塩基であった。この RNA 領域の取りうる二次構造として提唱されている BMH 型が *in vivo* で二量体化に働いている証拠は得られなかった。この領域を用いてゲノム二量体化が不十分な変異体を作成した結果、逆転写の伸長ステップに著しい阻害が見いだされた。

2, HIV の様々なサブタイプ間のゲノムヘテロ二量体化効率は組み合わせによって様々であった。ゲノム二量体化効率と組換え効率の間にはほぼ完全な一致が見られた。

### A. 研究目的

HIV-1 を含むレトロウイルスのポジティブ一本鎖 RNA ゲノムはウイルス粒子内で非共有的に結合して二量体を形成している。これは遺伝子組換えによって子孫に遺伝的多様性をもたらし、また片方のゲノムが傷ついていた時の補償をすることで、生き残りに有利な状況を作り出していると解釈されている。したがって HIV ゲノム二量体化の機序の解明は、遺伝的多様性を主要な生き残り戦略としている HIV の制圧に向けた糸口を示しうる。本研究で分担研究者は、粒子内 HIV-1 ゲノム二量体化をパッケージングと独立した形でとらえて解析することのできる実験系および HIV ゲノム組換え効率を

定量できる系を独自に構築した。これらを用いて二量体化シグナル(DLS)のウイルス増殖における役割、およびサブタイプ間ゲノムヘテロ二量体化およびゲノム組換えの解析を行った。

### B. 研究方法

HIV-1 プロウイルス型プラスミド pNL43 を母体としてすべての変異体を作成した。ゲノムの転写開始点から約 500 塩基分の DNA 断片を切り出し、polyA 付加シグナルとプライマー結合領域 (PBS) を不活化する変異を導入した ( $\Delta P$ 断片)。pNL43 の Env 領域に  $\Delta P$ 断片を挿入した変異体 pDDNBA を作成した。pDDNBA を母体として 5'側あ

るいは 3'側のパッケージングシグナル／二量体化シグナル(E/DLS)に様々な変異を導入した一連の変異体を作成した。

HIV-1 各サブタイプの感染性 DNA クローンもしくは分離株の分与を受け、クローン DNA やウイルス感染細胞 DNA より PCR にて各サブタイプの E/DLS をクローニングし、pNL43 とのキメラを作成した。

マウスの表面抗原遺伝子および緑色蛍光蛋白 (GFP) を pNL43 の非必須遺伝子領域に組み込んだ組換えウイルスを作成した。これとサブタイプキメラクローンを組み換えてマーカー付きキメラウイルスクローンを多数作成した。GFP は N 末あるいは C 末に変異を導入したものを用いて、この二変異体間で組換えが起こった場合のみ蛍光励起される GFP が発現するようにした。

複数のキメラウイルスクローンを 293T 細胞に VSV-G 発現ベクターとコトランスフェクトし、産生ウイルスの感染により発現するマーカーおよび GFP の発現率を FACS 解析した。マーカーの発現率から組換えの理論的発現率を算出し、実際の GFP 発現率との比較により組換え効率を測定した。

ウイルスの精製・感染・ノザンハイブリダイゼーション・RNase プロテクション・定量 PCR は定法に従って行った。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮を必要とする研究は行っていない。

### C. 研究結果

これまでの解析により決定した HIV-1 の *in vivo* DLS 必要十分領域はわずか 144 塩基であった。この RNA 領域が取りうる二次構造としてステムが 4 つ並ぶ SL4 構造、クローバーリーフ様の環状構

造になる BMH 型、長いステムが形成される LDI 型などが考えられている。 *in vitro* の解析から RNA の二量体形成時は BMH 型であるという説があるため、点変異を導入して強制的に BMH 型のみ、あるいは SL4 型のみをとるようにした変異体を複数作成して二量体形成効率を *in vivo* 解析した。その結果どちらの変異体でも二量体形成効率は著しく低く、我々の解析系では従来示唆されている二次構造のいずれかを取っているという証拠は得られなかった。また、粒子中ゲノムの約半量が単量体を形成する変異ウイルスの一過性感染実験では、細胞内での逆転写反応中の特にマイナス鎖伸長反応が著しく低下しており、ゲノム二量体化の低下が逆転写にも影響を及ぼすことが確認された。

現在 HIV-1 のサブタイプは 10 種類以上報告されており、それらの組換え体も多数報告されている。HIV ゲノムの易変異性はウイルス病原性や進化に深く関与しており、ゲノムの二量体形成と逆転写時の相同組換えはその一端を担っていると考えられている。我々の実験系は本来観察することが非常に困難な、異なる株間のヘテロゲノム二量体化を単純化して捉えることが可能であり、ウイルスの変異や進化を理解する上で重要な知見を得られると期待された。サブタイプ間の二量体化効率をパネル化したのが、ウイルスの遺伝的近縁さと効率の間に相関は見られなかった。二量体化に大きな役割を果たすと考えられている DLS 内の SL1 部のみを異なるサブタイプに交換した変異体を作成した結果、二量体化の主要な表現型は SL1 部の塩基配列の相同性に依存しており、ゲノム組換え効率とほぼ完全な相関が得られることが明らかとなった。一方で SL1 の塩基配列が大きく異なるサブタイプの組み合わせでも効率良い

ヘテロ二量体化が起きる場合もあり、一義的に SL1 に依存しない二量体化の可能性も示唆していた。

#### D. 考察

研究分担者が同定した HIV-1 の粒子内で働く DLS の必要十分領域 144 塩基のとりうる二次構造の検討においては明確な結論が得られなかった。これは塩基点置換変異導入により予期できない構造変化が起きたことを反映しているのかも知れない。わずか 3 - 4 塩基の変異によって二量体化能がほぼ失われたことから、DLS の両端はその構造保持に決定的な役割を果たしていると考えられる。単量体ゲノムを持った変異体ウイルスの逆転写ステップに見られた大きな効率低下は、HIV にとって DLS あるいはゲノム二量体化が感染初期にも重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

またサブタイプヘテロゲノム二量体化および組換え実験の結果からは、ゲノム組換えと二量体化効率には完全な相関が存在し、DLS 内の SL1 領域が決定的な役割を果たしていることが明らかとなった。しかし他のサブタイプ解析の結果から、二量体化効率に重要な SL1 外の領域の存在も示唆され、興味深い。

#### E. 結論

以下のことが現在までに明らかになった。

1, HIV 粒子内で実際に働く DLS の必要十分領域の二次構造が BMH 型であるとの証拠は得られなかった。ゲノム二量体化が不十分な変異体ではウイルスゲノムの逆転写ステップに障害が見いだされ、ゲノム二量体化がウイルス感染の後期のみならず初期過程でも重要な役割を担っている可能性が示唆された。

2, HIV の様々なサブタイプ間のゲノムヘテロ二量体化効率は組み合わせによって様々であった。ゲノム二量体化効率と組換え効率とともに DLS 内の SL1 とい

う極めて狭い領域に決定されていた。

#### F. 研究発表

##### 1, 論文発表

1. Sakuragi S, Sakuragi J. I., Morikawa Y, and Shioda T. 2006. Development of a rapid and convenient method for the quantification of HIV-1 budding. *Microbes Infect.* 8: 1875-81

2. Ohishi M., T. Shioda, and J. I. Sakuragi\*. 2007. Retro-transduction of virus pseudotyped with glycoprotein of vesicular stomatitis virus. *Virology*. in press.

##### 2, 学会発表

1. J.-i. Sakuragi. Genome dimerization of HIV-1 and its roles for viral replication. Osaka University COE – Institut Pasteur Joint Youth Meeting on Infectious Diseases and Immunology. Osaka, Japan.

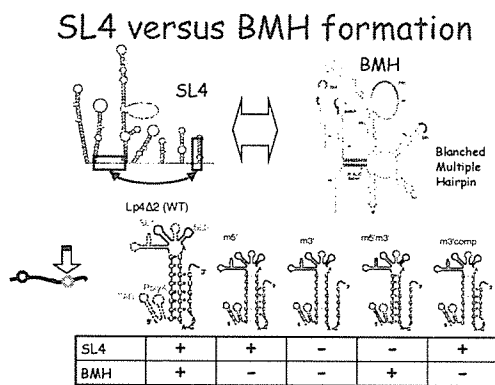
2. Minimal region sufficient for genome dimerization in human immunodeficiency virus type 1 virion and its potential roles in the early step of viral replication. Jun-ichi Sakuragi, Sayuri Sakuragi, and Tatsuo Shioda. Cold Spring Harbor Laboratory Retrovirus meeting. NY, USA.

3. J.-i. Sakuragi. HIV-1 genome RNA dimerization and viral life cycle. 2006 International CVRDC-RIMD Joint Symposium. Geangju, Korea.

4. HIV-1 サブタイプ間組換え体生成機構の解析 櫻木淳一、櫻木小百合、塩田達雄 第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋

5. ウイルスゲノム二量体化の感染初期に及ぼす影響 櫻木淳一 第20回日本エイズ学会学術集会、東京

G. 知的所有権の取得状況  
なし



SL4 or BMH formation was not confirmed in this system.

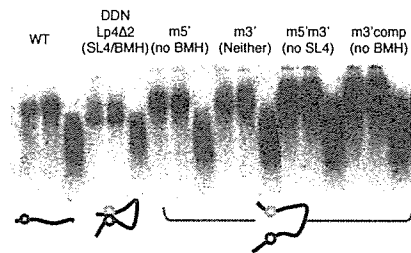
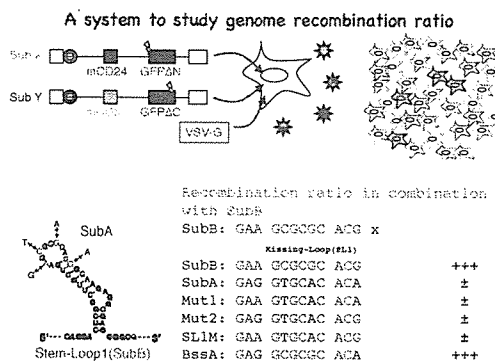


Fig.1A DLS 二次構造の検証用変異体

B 解析結果



Complete Coincidence of dimerization efficiency and recombination frequency

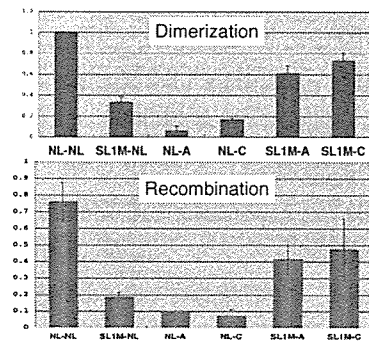


Fig.2A サブタイプ間組換え効率の測定系と組換えへのSL1の重要性

B ヘテロゲノム二量体化とサブタイプ間組換え効率の完全な相関



研究要旨 HIV-1 の逆転写、ゲノム組換えにおける宿主 topoisomerase I の解析を通じて、出芽における Gag 蛋白の酸化を見出した。ウイルス粒子形成において、Gag タンパク質間にジスルフィド結合が生じ、Pr55Gag dimer による multimer が形成された。酸化を低下させる Gag ミュータントウイルスは感染性が 10 倍程度低下した。Gag のジスルフィド結合による構造を Trim5 $\alpha$  は認識していることも示唆された。Gag の酸化は感染性において重要な役割を担い、粒子中の genomic RNA へのニック形成などを通じ組換え、変異発生のメカニズムに大きく関与すると考えられた。

#### A. 研究目的

Topoisomerase I は逆転写酵素の途中停止およびテンプレート乗換えを阻害していることを見出した。さらに topoisomerase I と Gag の結合を示すことができた。また topoisomerase I を過剰に発現させることで Gag のプロセッシングと出芽が抑制され、topoisomerase I のシスチンを減少させるとプロセッシングと出芽が回復した。

以上より、出芽時における Gag の酸化を想定した。Gag の酸化を抑制させると粒子中 genome RNA のニックが減少することからも、Gag の酸化は組換え、変異に大きく影響すると考え、解析を進めた。

#### B. 研究方法

(ア) Topoisomerase I の HIV-1 Gag 蛋白への影響を調べるため、293T 細胞へ pNL43 及び topoisomerase I (Wt topol) 発現ベクターまたはシスチンをアラニンに置換したミュータントベクターをトランスフェクションした。細胞蛋白または上清の粒子を抗 P24 抗体によるウェスタンブロットで解析した。

(イ) HIV-1 粒子中の Gag 蛋白質の酸化を解析するため、還元状態を変えてウェスタンブロットによって解析した。

(ウ) 高分子量 Gag 蛋白が DTT 処理によって

消失するかどうかを調べた。

(エ) 高分子量複合体に、他のウイルス性因子が関与しているかを検証するため、Gag 蛋白質のみを発現するベクターを作成した。Gag 発現細胞の培養上清から、ウイルス様粒子を回収し、解析を行った。

(オ) コア構造保護に SS 結合が関与しているのか検証するため、精製した HIV-1 コアを RNase A 処理し、ゲノム RNA のコピー数を測定し、還元による影響を評価した。

(カ) Gag 多量体形成に重要な Cys 残基を同定するため、Gag 蛋白質内の p17MA 及び p24CA に存在する 4 箇所の Cys を Ala に置換した変異体を作成した。

(キ) Gag 多量体の生物学的意義を解析するため、各 Cys 変異体の感染性を評価した。また、多量体形成能の低い C57A 変異体についてはウイルス粒子の形態を観察した。

(ク) 標的細胞に aphidicolin 処理、APOBEC3G、Trim5 $\alpha$  遺伝子発現を施し、シスチンミュータントウイルスの感染性を調べた。酸化による multimer 形成と作用点が重なる要因を探索した。

(倫理面への配慮)

本研究では特に臨床試料を使用していない。

### C. 研究結果

(ア) Topoisomerase I の過剰発現により、プロセシングと出芽が抑制されたが、システインを減少させたミュータントを発現させると、どちらも回復した (図 1)。

(イ) 還元作用の強い泳動条件では、主に 55、41、24kDa のバンドが検出された。中等度の還元下で、高分子量のラダーバンドを検出した。非還元条件では、全体的にスミアになり、バンドの判別が困難であった (図 2)。

(ウ) 精製ウイルス粒子を、37°C で 0 から 30 分間、100mM DTT で処理すると、DTT の処理時間に依存して、高分子量のバンドが消失していくことが確認された。一方、DTT 未処理群では、時間による高分子量複合体に大きな影響は見られなかった。高分子量のラダーバンドは、酸化された Gag 蛋白質を含む複合体であることが示された。

(エ) Gag ウイルス様粒子とウイルス粒子のパターンを比較したところ、高分子量のラダーバンドについては大きな違いは認められなかった。このことから、Gag 蛋白質以外のウイルス性因子は関与していないことが示唆された。また、高分子量複合体の分子量推定値から、Gag 蛋白質の多量体の可能性が示唆された。

(オ) RNase A 存在下において、還元剤 GSH 処理によりゲノム RNA の量が大きく減少した。また DTT 処理でも有意な減少が認められた。一方、超音波処理及び RNase A 非存在下では有意な差は認められなかった。以上の結果から、Gag 多量体を破壊する還元剤の存在下で RNase A がゲノム RNA を分解することが示され、このことから Gag の酸化がコア構造に

深く関与していることが示唆された。

(カ) 各 Cys 変異体について解析した結果、C57A 及び C87A 変異体ではウイルス粒子中の多量体が著しく減少していることが確認された。さらに詳細に検証するため非還元条件で解析した結果、特に C57A 変異体において多量体の形成不全が認められた。以上の結果から、p17MA に存在する Cys 残基、特に C57A が多量体形成に重要であることが強く示唆された。

(キ) 各 Cys 変異体を p24CA 量で補正した後、293T 細胞に感染させた。ウイルスゲノムに組み込まれた Luciferase の活性を測定して感染性を評価した。Wt に比べて、C57A 変異体では感染性が有意に減少することが示された。C87A についても感染性は 60%程度に減少が認められた。wt と C57A のウイルス粒子形態。C57A 変異体は粒子の大きさ、形態、コアの形成に wt との大きな違いは認められなかった。

(ク) Gag ミュータントの感染性へ、標的細胞の Aphidicolin 処理、APOBEC3G 発現、African green monkey 由来の Trim5 $\alpha$ 発現によって影響を示したのは Trim5 $\alpha$ だけであった。Trim5 $\alpha$ によって multimer が認識されることが示唆された。

### D. 考察

Topoisomerase I は HIV-1 Gag と細胞質で結合する結果を得ていたが、過剰発現による実験によってさらに Gag 蛋白質の酸化が出芽に重要であることを示唆した。Gag タンパク質間にジスルフィド結合が形成され Pr55Gag の dimer による multimer が出芽時に生じることが示唆された。Gag にはよく保存されたシステインが存在し、粒子形成において重要な役割を担っていると考えられた。酸化が低下する Gag ミュータントでは感染性が低下した。一方、African green monkey の Trim5 $\alpha$ による

Gag の認識には酸化が必要であると考えられた。

Gag の酸化は topoisomerase I などの結合因子のシステインの影響を受けつつ、ウイルス複製において重要な役割を担い、粒子中の genomic RNA へのニック形成を通じ組換え、変異発生のメカニズムにも大きく関与すると考えられた。

#### E. 結論

HIV-1 の逆転写、ゲノム組換えにおける宿主 topoisomerase I の解析を通じて、出芽における Gag 蛋白の酸化を見出した。Gag タンパク質間にジスルフィド結合が生じ、Pr55Gag の dimer による multimer が形成されることが判明した。Gag の酸化は感染性の保持に必要であった。酸化によるコア構造は Trim5 $\alpha$  が認識していることも示唆された。Gag の酸化は粒子中の genomic RNA へのニック形成などを通じ組換え、変異発生のメカニズムにも大きく関与すると考えられた。

F. 健康危険情報  
特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

**Takahashi, H., Maeda, M., Sawa, H., Hasegawa, H., Moriyama, M., Sata, T., Hall, W.W., and Kurata, T.** Dicer and positive charge of proteins decrease the stability of RNA containing the AU-rich element of GM-CSF. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 807-814, 2006.

**Hasegawa, H., Sawa, H., Lewis, M.J., Orba, Y., Sheehy, N., Yamamoto, Y., Ichinohe, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Katano, H., Takahashi, H., Matsuda, J., Sata, T., Kurata, T., Nagashima, K., and Hall, W.W.** Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice

transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med* **12**(4): 466-472, 2006.

**Maeda, M., Sawa, H., Tobiume, M., Tokunaga, K., Hasegawa, H., Ichinohe, T., Sata, T., Moriyama, M., Hall, W.W., Kurata, K., and Takahashi, H.** Tristetraprolin inhibits HIV-1 production by binding to genomic RNA. *Microbes and Infection* **8**, 2647-2656, 2006.

#### 2. 学会発表

北川善紀 前田才恵 佐多徹太郎 高橋秀宗. HIV-1 出芽以降における Gag 蛋白のジスルフィド結合形成. 第 54 回日本ウイルス学会 2006

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案特許 特になし
3. その他 特になし

図1 293T 細胞へ pNL43 及び topoisomerase I (Wt topol) 発現ベクターまたはシステインをアラニンに置換したミュータントベクター(Cys-mutant1, 2)をトランスフェクションした。細胞蛋白または上清粒子を抗 P24 抗体によるウェスタンブロットで解析した。

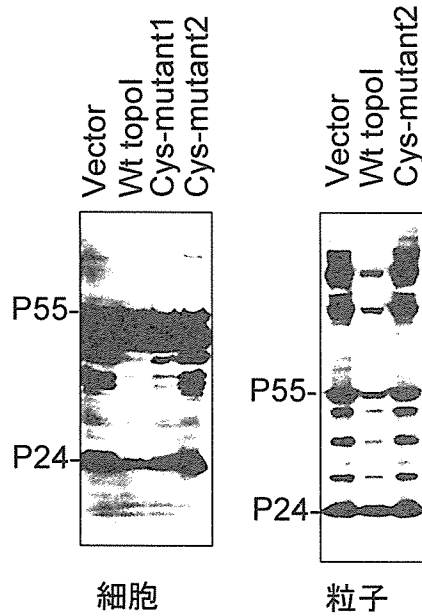


図2 HIV-1 粒子を還元状態を変えて抗 P24 抗体を用い、ウェスタンブロットによって解析した。

