

な作用点を有することから、既存の抗 HIV-1 薬耐性株に効果を示すことが期待される。従って、既存の薬剤耐性ウイルスに対する有効性の解析および耐性ウイルス誘導実験による変異パターンの解析を行うことが重要である。

E. 結論

1) Vpr と Imp α の結合を阻害する低分子化合物は単独では主に細胞質内に、わずかに核内にも観察された。一方、化合物の局在は Vpr 発現細胞では Vpr の核内局在と一致していた。さらに、Blue-Native PAGE 法およびゲル濾過法により化合物は Vpr と結合していることが確認された。

2) Vpr と Imp α の結合を阻害する低分子化合物は Vpr に結合することで、Vpr の核移行能、Apoptosis 誘導能を阻害し、さらにマクロファージにおけるウイルス複製を阻害した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hashizume C, Kuramitsu M, Zhang X, Kurosawa T, Kamata M, Aida Y. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with spliceosomal protein SAP145 to mediate cellular pre-mRNA splicing inhibition *Microbes and Infection* 9: 490-497, 2007.

2) Nitahara-Kasahara Y, Kamata M, Yamamoto T, Zhang X, Miyamoto Y, Muneta K, Iijima S, Yoneda Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Aida Nobel nuclear import of Vpr promoted by importin alpha is crucial for human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages *J. Virol.* 81: 5284-5293, 2007.

3) 間陽子 レトロウイルスの核移行 蛋白質核酸酵素 52:1214-1220, 2007.

2. 学会発表

1) Go Matsuda, and Yoko Aida The nuclear export of NCp7 of human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) *Sixth International NC Symposium*

2) Go Matsuda, and Yoko Aida Characterization of the nucleolar localization and nuclear export of HIV-1 nucleocapsid

protein (NCp7) *RIKEN International Symposium on Chemical Biology 2007*

3) 鈴木辰徳、間陽子 HIV-1 Vpr に結合する低分子化合物のアポトーシス及び G2arrest への影響 *第 55 回日本ウイルス学会学術集会*

4) 野中瑞穂、橋本祥江、山本典生、間陽子 HIV-1 Vpr の C 末欠変異体 C81 および野生型 Vpr によって誘導されるヒト癌細胞に対するアポトーシスの解析 *第 55 回日本ウイルス学会学術集会*

5) 松田剛、山尾尚子、滝沢翔太、北原玄太、間陽子 HIV-1 Vpr の C 末は細胞内局在を制御する *第 55 回日本ウイルス学会学術集会*

6) 鈴木辰徳、間陽子 HIV-1 Vpr の核移行を阻害する低分子化合物の Vpr の他の機能への効果 *第 21 回日本エイズ学会学術集会*

7) 野中瑞穂、橋本祥江、山本典生、間陽子 ヒト癌細胞に対する HIV-1 Vpr の C 末欠変異体 C81 のアポトーシス効果 *第 21 回日本エイズ学会学術集会*

8) 松田剛、北原玄太、山尾尚子、滝沢翔太、間陽子 ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) Vpr の核局在機構の解明 *第 21 回日本エイズ学会学術集会*

9) 松田剛、間陽子 ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) nucleocapsid protein(NCp7) の核外移行への Exportin-5 の関与 *第 21 回日本エイズ学会学術集会*

10) 間陽子、鈴木辰徳、松田剛、北原玄太、野中瑞穂、上田敦史、橋本祥江、笠原優子 アダプター分子 Importin alpha を介したヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) Vpr の新規核移行機序 *第 30 回日本分子生物学会年会*

10) 松田剛、間陽子 ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) nucleocapsid protein(NCp7)の Exportin-5 を介した核外移行 *第 30 回日本分子生物学会年会*

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。) なし。

分担研究報告書

APOBEC3Gの調節過程を標的とする新たなHIV複製制御法の研究

分担研究者 高折晃史 京都大学医学研究科 血液・腫瘍内科学 助教

研究要旨 APOBEC3G/Vif分子の機能調節に関し、①PKAによるリン酸化がAPOBEC3Gの抗HIV-1活性を制御していること、②MDM2はVifのE3リガーゼであり、Vifの分解を介してHIV-1複製を負に制御していること、が明らかになった。今後、そのより詳細な分子機構の解明を目指し、さらに、これらの科学情報に立脚した新しいHIV複製制御法を提案したい。

A. 研究目的

本研究では、抗HIV-1宿主因子APOBEC3Gとそれに拮抗するHIV-1 Vif蛋白によるHIV-1の複製制御に関し、これら分子の機能調節に焦点を当てて研究をすすめる。また、得られた科学情報をもとに、新たなHIV-1複製制御法を提案する。

B. 研究方法

APOBEC3Gは新規に同定された抗HIV-1宿主因子であり、一方HIV-1 Vifは本分子をユビキチン-プロテアソーム系を用いて分解、中和することによりHIV-1複製を助けている。このAPOBEC3G/VifシステムによるHIV-1複製制御に関して、これら分子の機能調節、特に翻訳後修飾に焦点をあてて、主には、下記の2点に関し研究を進めた。

- 1) リン酸化によるAPOBEC3Gの機能調節
- 2) ユビキチン化によるVifの機能調節

(倫理面への配慮)
特に存在しない。

C. 研究結果

(1) リン酸化によるAPOBEC3Gの機能調節 : APOBEC3蛋白ファミリーに属するAIDは、Protein Kinase A(PKA)によるリン酸化によりその機能調節がなされていることが近年報告された(Basu et al. Nature 2005, Pasqualucci et al. PNAS 2006)。APOBEC3Gも同様にPKAリン酸化モチーフを有していることから、PKAによるリン酸化がその機能

に与える影響に関して検討した。

①in vitro およびin vivo キナーゼアッセイを用いて、PKAがAPOBEC3GのT32をリン酸化することを示した。

②このリン酸化により、APOBEC3GはVifによる分解中和に対して抵抗性になり、結果、野生型HIV-1に対する抗ウイルス活性が増強されることを示した。

以上より、PKAによるリン酸化がAPOBEC3Gの抗HIV-1活性を制御していることが明らかになった。

(2) ユビキチン化によるVifの機能調節 : Vifは、細胞内のCullin5、ElonginB/Cと結合してVif-BC-Cul5複合体を形成し、E3リガーゼ複合体の基質認識サブユニットとしてAPOBEC3Gをユビキチン化し分解する。一方、Vif自身も細胞内においてユビキチン化を受け、急速に分解されているが、その機序は不明であった。そこで、我々は、Vifをユビキチン化するE3リガーゼの同定を試みた。①データベースサーチよりその候補としてMDM2を同定した。まずMDM2は、Vifの細胞内レベルを特異的に低下させるが、それは、プロテアソーム依存性分解であることを示した。

②次に、MDM2は、Vifと直接結合し、その結合部位は、中央部の酸性ドメインであることを示した。

③in vitro およびin vivo ユビキチンアッセイを用いて、MDM2がVifをユビキチン化することを示した。

④最後に、HIV-1感染に及ぼす影響を検討し

た。MDM2 の共発現は、Vif 分解を介して APOBEC3G のウイルス粒子中の取り込みを促進し、結果、ウイルスの感染性を低下させた。

またマクロファージを用い、MDM2 をノックダウンすると HIV-1 複製が促進した。

以上より MDM2 は Vif の分解を介して HIV-1 複製を負に制御していることが明らかになった。

D. 考察

APOBEC3G/Vif に関する研究は、近年の抗 HIV-1 宿主因子に関する研究の先陣をきるものであり、その科学的な意義はきわめて高い。また、APOBEC3 蛋白による広範な抗ウイルス作用は、新たな抗ウイルス自然免疫の概念をも創出した。APOBEC3G の抗ウイルス活性機構、および Vif による APOBEC3G 中和機構に関しても多くの知見が集積されたが、いまだその詳細な分子機構、とりわけ各分子の機能調節機構に関しては未知な部分が多く残っている。これらの調節機構の解明は、新たな HIV-1 複製制御法、ひいては、新規抗 HIV-1 薬の開発へとつながると考えられる。

今年度、我々は、リン酸化による APOBEC3G の抗ウイルス活性調節、ユビキチン化による Vif 分解のメカニズムを明らかにしたが、これらは、今後、新たな HIV-1 複製制御法の開発へ向けた科学情報を提供できるものとする。今後、これらを標的とした薬剤開発の可能性についても検討を加えていきたいと考えている。

E. 結論

APOBEC3G/Vif 分子の機能調節に関する研究が順調に進んだ。残り 2 年間の研究で、より詳細な分子機構の解明を目指したい。さらに、これらの科学情報に立脚した新しい HIV 複製制御法を提案したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Chiemi Noguchi, Nobuhiko Hiraga, Nami

Mori, Masataka Tsuge, Michio Imamura, Shoichi Takahashi, Yoshifumi Fujimoto, Hidenori Ochi, Hiromi Abe, Toshiro Maekawa, Hiromi Yatsuji, Kotaro Shirakawa, Akifumi Takaori-Kondo, and Kazuaki Chayama: Dual Effect of APOBEC3G on Hepatitis B Virus. *J Gen Virol* 88(Pt2):432-440, 2007.

2) Taisuke Izumi, Kotaro Shirakawa, and Akifumi Takaori-Kondo: Cytidine deaminases as a weapon against retroviruses and a new target for antiviral therapy. *Mini-Reviews in Medical Chemistry* in press.

3) 泉 泰輔、高折 晃史：シチジンデアミナーゼ APOBEC の抗ウイルス作用とそれからのエスケープ。「臨床免疫・アレルギー科」第 47 巻 第 1 号 81 項～88 項、2007 年

4) 高折 晃史：抗 HIV-1 宿主因子 APOBEC3G。「Confronting HIV2007」第 31 巻 8 項～10 項、2007 年

2. 学会発表

1) Taisuke Izumi, Akifumi Takaori-kondo, Kotaro Shirakawa, and Takashi Uchiyama: Induction of ubiquitination and degradation of HIV-1 Vif by MDM2. The 2007 meeting on RETROVIRUSES, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, May 22-27, 2007.

2) Kotaro Shirakawa, Akifumi Takaori-kondo, Taisuke Izumi, and Takashi Uchiyama: Protein Kinase A-mediated phosphorylation regulates the antiviral activity of APOBEC3G. The 2007 meeting on RETROVIRUSES, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, May 22-27, 2007.

3) Akifumi Takaori-kondo, Taisuke Izumi, Kotaro Shirakawa, and Takashi Uchiyama: MDM2 promotes the ubiquitination and degradation of HIV-1 Vif. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, Japan, September 1-5, 2007.

4) Akifumi Takaori-kondo: Escape of retroviruses from antiviral host defense by APOBEC3. The 8th AIDS Seminar in Kumamoto, Aso Prince Hotel, Kumamoto, Japan, September 13-14, 2007. (Invitation)

5) 高折 晃史：教育講演 04「APOBEC3G/Vif による HIV-1 の複製制御」第 21 回日本エイズ学会学術集会、広島、平成 19 年 11 月 28 日～30 日(Invitation)

6) 高折 晃史 : シンポジウム 13 HIV 増殖とその制御分子「抗 HIV-1 宿主因子 APOBEC3G と HIV-1 Vif」第 21 回日本エイズ学会学術集会、広島、平成 19 年 11 月 28 日～30 日(Invitation)

7) 泉 泰輔、高折 晃史、白川 康太郎、井尾 克宏、松井 道志、内山 卓 : MDM2 は HIV-1 Vif をユビキチン化依存性に分解する。第 21 回日本エイズ学会学術集会、広島、平成 19 年 11 月 28 日～30 日

8) 白川 康太郎、高折 晃史、泉 泰輔、松井 道志、井尾 克宏、内山 卓 : Protein

Kinase A による APOBEC3G のリン酸化と機能調節。第 21 回日本エイズ学会学術集会、広島、平成 19 年 11 月 28 日～30 日

9) 高折 晃史 : HIV-1 複製と宿主因子。第 10 回リサーチフォーラム『ウイルスとヒト』、京都、平成 19 年 12 月 22 日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし。

HIV-1 GagPol 蛋白の細胞内輸送

分担研究者 森川裕子（北里大学 生命科学研究所）

研究要旨

HIV-1 (NL43) の Gag 蛋白に FLAG タグを、GagPol 融合蛋白に HA タグを付加した分子クローンを作製し、GagPol 蛋白の細胞内輸送とその活性化すなわち PR による切断成熟を調べた。いずれのタグを付加した場合でも細胞内蛋白発現量や産生 HIV 粒子量に差はなかった。この FLAG/HA ダブルタグ分子クローンをを用いて調べたところ、Gag と GagPol 蛋白の両者が共発現する場合には、いずれの蛋白もはじめは diffuse に細胞質に散在し時間経過とともに形質膜へ局在が変化した。Gag 及び GagPol 蛋白のプロセッシングはその形質膜で観察された。ところが、in frame で GagPol 蛋白のみを発現するフレームシフトシグナル欠損の分子クローンでは、GagPol 蛋白は膜親和性を示さず、その局在も時間が経過しても diffuse に細胞質に散在するままであった。そこで、この GagPol 蛋白単独発現分子クローンと Gag 蛋白単独発現分子クローンを 1:10 の分子比で共発現させたところ、GagPol 蛋白の局在が細胞質に diffuse に散在するパターンから形質膜に局在するパターンへと変化し、膜面分に分画されることが判明した。これらの結果から、GagPol 蛋白の細胞内輸送（形質膜ターゲティング）と膜結合は Gag 蛋白に依存することが示唆された。

A. 研究目的

HIV の構造蛋白である Gag 蛋白及び GagPol 蛋白はいずれも HIV unspliced mRNA より合成される。Gag 蛋白は、cytosol での蛋白合成後、膜に targeting し、多量体形成により Gag 粒子を形成して出芽する。一方、GagPol 蛋白はこの翻訳時におこるフレームシフトにより Gag:Gag-Pol=10-20:1 の分子比で合成され、粒子に incorporate する。Pol 蛋白は HIV 酵素群すなわちプロテアーゼ、逆転写酵素（+RNaseH）、インテグラーゼを有する領域であり、GagPol 蛋白の粒子への incorporation は HIV の複製に絶対不可欠である。プロテアーゼが粒子の成熟すなわち感染性獲得に必須であることは非常に良く知られているものの、GagPol 蛋白は、1) Gag 蛋白に比べその分子数が少ない、2) その蛋白分子のアミノ末端半分は Gag 蛋白と同一なため区別しにくい等の点から、細胞内輸送や粒子形成過程における解析対象にされてこなかった。本研究ではその GagPol 蛋白の分子動態について基礎情報を得るとともに、GagPol に着目した HIV 制御法や新規標的を検討する。

B. 研究方法

1) DNA の構築

HIV-1 の発現には HIV-1 cDNA クローン pNL43 株 (WT)、プロテアーゼ触媒中心のアミノ酸を置換 (D25N) したクローン (PR(-))、及び、Gag 蛋白のみを発現する pol 領域欠損のクローン (Δ pol)、フレームシフトシグナルを欠損させ gag と pol 遺伝子を in frame でつないだ GagPol 融合蛋白のみを発現するクローン (FS) をベースとして用いた。これらの分子クローンの gag 遺伝子の p6 領域に in frame で FLAG タグを、pol 遺伝子のインテグラーゼ末端に in frame で HA タグを挿入した。

2) Transfection と感染

Lipofectamine2000 (Invitrogen 社) を用いて HeLa 細胞に上記の DNA を transfection した。HIV 感染には Jurkat 細胞を用いた。

3) 産生 HIV 粒子の検出

細胞培養上清中の HIV-1 p24CA 量を ELISA キット (Zeptomatrix 社) で定量した。また、この培養上清を filter でろ過し 20% sucrose cushion を用いてウイルス粒子を濃縮した後、Western blotting を行った。

4) Western blotting

Gag 蛋白の検出には抗 p17MA、抗 p24CA、抗 FLAG 抗体を、GagPol 蛋白の検出には抗 RT、抗 HA 抗体を用いた。

5) membrane floatation 実験

発現細胞を超音波破碎し、その遠心上清を膜粗画分として membrane floatation 実験に用いた。floatation 溶媒には 70%/65%/10% 蔗糖の step gradient を用いた。分画後、Western blotting で抗原を検出した。

6) 共焦点レーザー顕微鏡

Transfection 6, 12, 24 時間後に細胞を 3.7% パラホルムアルデヒドで固定し、0.1% Triton X-100 で処理した後、抗 p17MA、抗 FLAG、抗 HA 抗体で染色した。核染色には TOPRO-3 を用いた。

(倫理面への配慮)

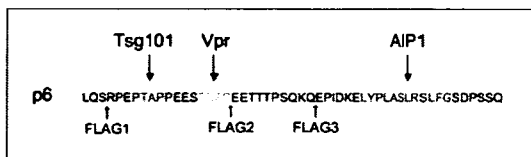
本研究では HIV 患者からの臨床材料を用いた実験を含まないため、生命倫理に対する措置を講じなかった。実験遂行上の安全対策は、遺伝子組換え実験については二種省令・二種告示に従った。

C. 研究結果

1) FLAG/HA タグの挿入

HIV の Gag 蛋白と GagPol 融合蛋白を識別する目的で、Gag 蛋白に FLAG タグを、GagPol 蛋白に HA タグを付加した分子クローンをそれぞれ作製した。FLAG タグ挿入部位として、Gag 蛋白に存在し GagPol 蛋白に存在しない領域すなわち p6 領域に、この領域内に存在する TSG101, Vpr, ALIX/AIP1 結合領域を避けて3カ所を選んだ(図1)。一方、HA タグは GagPol 融合蛋白のカルボキシル末端に付加した。これらの分子クローンから FLAG/HA ダブルタグの分子クローンをさらに作製した。

図1. p6へのFLAGタグ挿入部位

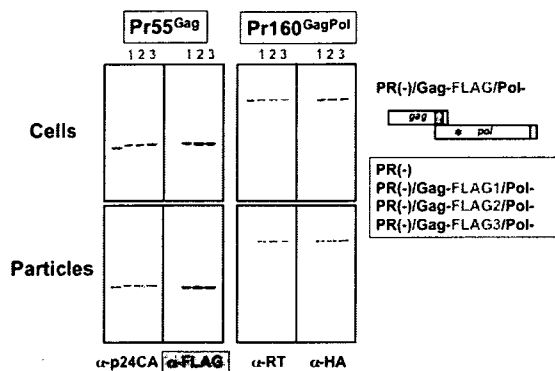


2) 細胞内 HIV 蛋白発現と粒子産生

上記の FLAG/HA ダブルタグ分子クローン

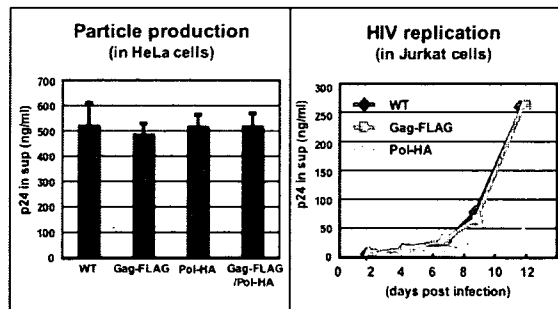
を HeLa 細胞に transfection し、24 時間後の細胞内 HIV 蛋白発現と放出 HIV 粒子を Western blotting で調べた。いずれのタグ付加の場合でも HIV 構造蛋白の細胞内発現量や産生 HIV 粒子量に差は認められなかった(図2)。

図2. FLAG/HAタグ付加HIV分子クローンの蛋白発現と粒子産生



ELISA で定量したところ、放出された HIV 粒子量はほぼ同量であった(図3左)。産生された HIV 粒子(一定量)を Jurkat 細胞に接種し、この FLAG タグ及び HA タグ分子クローンの感染性を調べたところ、Gag 蛋白 p6 領域へのタグ付加は HIV 複製に影響を与えないが、Pol 蛋白インテグラーゼへのタグ付加では HIV 増殖が顕著に遅延することが判明した(図3右)。

図3. FLAG/HAタグ付加HIV分子クローンの粒子産生と感染性

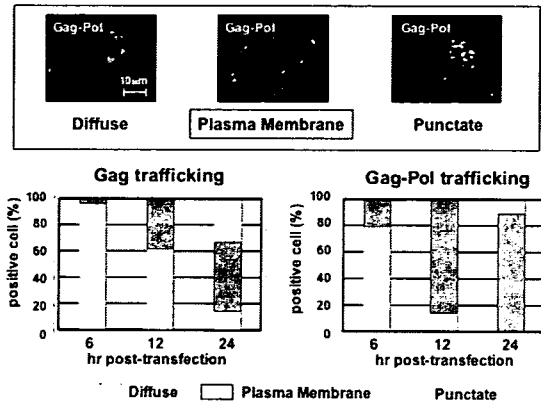


3) Gag 及び GagPol 蛋白の細胞内輸送

FLAG/HA ダブルタグ分子クローン (PR(-)のもの)を HeLa 細胞に transfection し、Gag と GagPol 蛋白の局在を継時的(6, 12, 24 時間後)に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Gag 及び GagPol 蛋白の検出には抗 FLAG 及び抗 HA 抗体をそれぞれ用いた。Gag と GagPol 蛋白はいずれも6時間ではdiffuseに細胞質に散在したが、時間経過とともに局在が変化

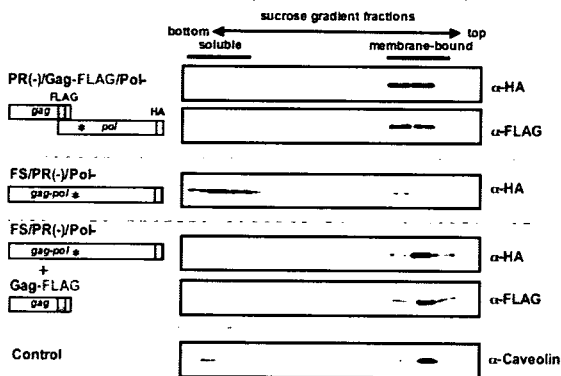
し 24 時間では大部分のものが形質膜に局在した (図 4)。

図 4. Gag及びGagPol蛋白の細胞内局在変化



また Gag と GagPol 蛋白の共局在が観察された。24 時間の発現細胞を破碎し membrane floatation 法で調べたところ、Gag 及び GagPol 蛋白はいずれも膜結合画分に分画された (図 5)。

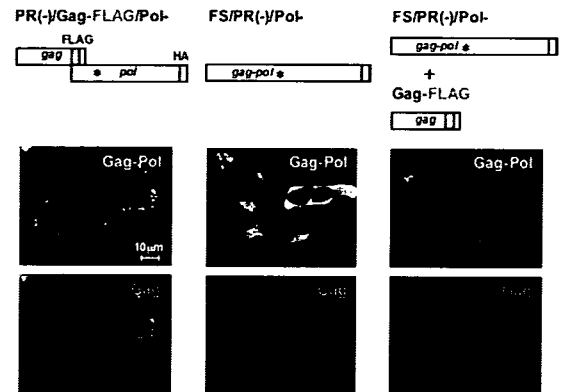
図 5. Gag及びGagPol蛋白の膜親和性



Gag 蛋白はその単独発現で細胞質から形質膜にターゲティングする。本研究で明らかにした GagPol 蛋白の形質膜ターゲティングが Gag 蛋白に依存したものなのかを明らかにするため、フレームシフトシグナルを欠損させ GagPol 蛋白のみを発現する in frame 分子クローン (FS/PR(-)) を transfection し、同様に、GagPol 蛋白の局在を継時的に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。驚いたことに、GagPol 蛋白は 48 時間後でも細胞質に diffuse に散在するままであり、形質膜への局在を示さなかった (図 6)。これを membrane

floatation 法で調べたところ、GagPol 蛋白単独発現では膜親和性を示さないことが確認された (図 5)。

図 6. Gag発現によるGagPol蛋白の細胞内局在変化

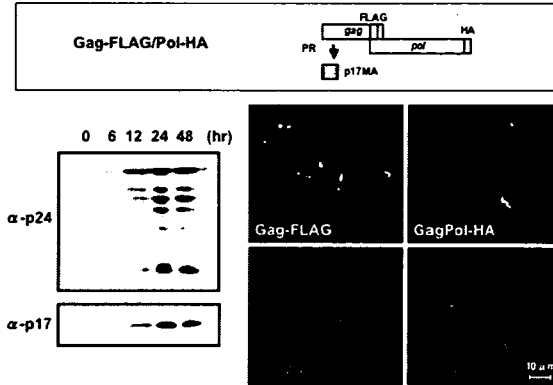


次に、この GagPol 蛋白単独発現の分子クローン (FS/PR(-)) と Gag 蛋白単独発現分子クローン (Δpol) を 1:10 の DNA 分子比で transfection し共発現させた。共焦点顕微鏡で観察したところ、GagPol 蛋白の局在が細胞質に diffuse に散在するパターンから形質膜に局在するパターンへと変化した (図 6)。membrane floatation 法で調べたところ、この共発現細胞の GagPol 蛋白は Gag 蛋白とともに膜画分に分画されることが判明した。

4) プロテアーゼによる Gag 蛋白のプロセッシング

プロテアーゼによる Gag 蛋白のプロセッシングを解析した。WT の分子クローンを transfection し、その蛋白発現とプロセッシングを継時的に Western blotting で調べた。Gag 及び GagPol 蛋白の発現量は 6 時間では非常に少なかったが、継時的に増加し 24 時間後にプラトーに達した。プロセッシングは 24 時間後に観察された。(図 7 左)。これを切断された断片しか認識しない抗 p17MA 抗体を用いて染色し共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、その抗原はもっぱら形質膜に認められたことから、Gag 蛋白プロセッシングは形質膜ターゲティングに伴って起こると考えられた (図 7 右)。

図7. Gag蛋白プロセシング産物の細胞内局在



D. 考察

Gag蛋白アミノ末端グリシンのミリストイル化はGag蛋白の膜結合、延いては粒子産生に必須であることがよく知られている。しかし、GagPol蛋白の粒子incorporationにはそれ自身のミリストイル化を必要としないことから、Gag-GagPol相互作用が示唆されていた。本研究では、このGag-GagPol相互作用の可能性を支持するように、GagPol蛋白の形質膜輸送と膜結合がGag蛋白に依存することを明らかにした。

本研究では、Gag蛋白が存在しない条件ではGagPol蛋白は細胞質にdiffuseに散在し、形質膜への局在を示さないが、Gag蛋白が存在すると、GagPol蛋白の形質膜ターゲティングが観察された。preliminaryな結果ではあるが、WTの分子クローンのGagPol蛋白は、形質膜上で凝集したようなpunctateな像を示し、GagPol蛋白のpunctateな形質膜局在はGag:GagPol=10:1の共発現の場合に観察され、1:1の場合には異なった。形質膜上のpunctateな像は恐らく粒子になりつつある高度な多量体に相当すると思われるが、形質膜ターゲティングだけでなくこうした多量体形成にもGagとGagPolの比率が影響を与える可能性が考えられた。

プロテアーゼは2量体を形成して触媒活性を示すと考えられている。本研究では、プロテアーゼによるGag蛋白プロセシングが形質膜ターゲティングに伴って、あるいはその後におこることを明らかにした。これはGagPol蛋白がその細胞内輸送過程では2量体を形成せず、あるいは、2量体を形成したとしてもその触媒活性は抑制されている可

能性を示唆する。プロテアーゼ阻害剤はこのGagPol蛋白の細胞内分子動態やプロセシングにどのような変化を与えるのかを知る上で、本研究は基礎情報を提供できると思われる。

E. 結論

Gag-Pol蛋白の形質膜輸送はGag蛋白に依存し、プロテアーゼによるGag蛋白プロセシングはその形質膜ターゲティングに伴って起こることが判明した。

F. 知的所有権の取得状況 なし

G. 研究発表

論文発表

1. Y. Morikawa, T. Goto, D. Yasuoka, F. Momose, & T. Matano
Defect of human immunodeficiency virus type 2 Gag assembly in *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Virol. 81: 9911-9921 (2007)
2. F. Momose, Y. Kikuchi, K. Komase, & Y. Morikawa
Visualization of microtubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein.
Microbes Infect. 9: 1422-1433 (2007)
3. A. Ryo, N. Tsurutani, K. Ohba, R. Kimura, J. Komano, M. Nishi, H. Soeda, S. Hattori, K. Perrem, M. Yamamoto, J. Chiba, J. Mimaya, K. Yoshimura, S. Matsushita, M. Honda, A. Yoshimura, T. Sawasaki, I. Aoki, Y. Morikawa, & N. Yamamoto
SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 294-299 (2008)
4. 森川裕子、鶴谷直美
HIVの粒子形成と成熟機構
蛋白質核酸酵素 52: 1181-1186 (2007)

学会発表

1. E. Urano, S. Shimizu, M. Hamatake, Y. Morikawa, & J. Komano.
Upregulating expression of cyclin K/CPR4 limits the replication of HIV-1.
CSH Meeting、2007年、米国
2. 浦野恵美子、清水佐紀、濱武牧子、森川裕子、高橋直子、深澤秀輔、山本直樹、駒野淳
Cyclin K/CPR4によるHIV-1複製抑制とそのメカニズムの解析
第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌
3. 大倉喬、菊池雄士、駒瀬勝啓、百瀬文隆、森川裕子
H5N1型高病原性トリインフルエンザウイルスHAに結合する中和モノクローナル抗体のエピトープ解析
第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌
4. 駒野淳、浦野恵美子、巖馬華、中原徹、堤浩、宮内浩典、森川裕子、玉村啓和、杉浦互、山本直樹
HIV-1インテグラーゼ阻害活性を有する6アミノ酸モチーフの同定とその抗ウイルス活性
第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌
5. 須山真理、佐野浩二、森川裕子
HIV潜伏感染細胞からのウイルス産生機構
第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌
6. 富田有里子、櫻木小百合、森川裕子、河岡義裕
Gag出芽機構に関与する宿主因子の網羅的解析-出芽酵母を利用した遺伝学的アプローチ
第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌
7. 原口日和、森川裕子
HIV-1 Gag-Pol蛋白の細胞内輸送
第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌
8. 百瀬文隆、菊池雄士、駒瀬勝啓、森川裕子
新規抗インフルエンザウイルスNPモノクローナル抗体によるRNP複合体の可視化
第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌
9. 水越文徳、山本拓也、立川(川名)愛、岩本愛吉、森川裕子、横田(恒次)恭子
抗原の糖鎖による樹状細胞のcross-presentationの影響
第21回日本エイズ学会、2007年、広島
10. 大倉喬、菊池雄二、駒瀬勝啓、百瀬文隆、

森川裕子

- 高病原性H5N1トリインフルエンザウイルスHAに結合する中和モノクローナル抗体のエピトープ解析とscFvの作製
第30回日本分子生物学会/第80回日本生化学会、2007年、横浜
11. 奥長浩之、鶴谷直美、森川裕子
エンドソーム分子HRSによるヒト免疫不全ウイルスのGag輸送制御機能の解析
第30回日本分子生物学会/第80回日本生化学会、2007年、横浜
 12. Komano Jun、浦野恵美子、奥長浩之、森川裕子
Co-chaperonineタンパク質DNA J/HSP40 familyによるHIV-1複製抑制
第30回日本分子生物学会/第80回日本生化学会、2007年、横浜
 13. 原口日和、森川裕子
ヒト免疫不全ウイルスGag-Pol蛋白の細胞内輸送制御機構
第30回日本分子生物学会/第80回日本生化学会、2007年、横浜
 14. 百瀬文隆、菊池雄士、駒瀬勝啓、森川裕子
微小管依存的なインフルエンザウイルス子孫vRNP複合体輸送の可視化
第30回日本分子生物学会/第80回日本生化学会、2007年、横浜

分担研究報告書

HIV Vif 機能の調節過程を標的とする新たな HIV 複製制御法の研究

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 教授

研究要旨 HIV-1 の病原性発現機構解析システムを確立するため、サル細胞での複製・増殖に最適化したウイルスクローンの分子構築を目指し以下の実験を行なった。プロトタイプのサル指向性 HIV-1 クローン NL-DT5R(X4 ウイルス)とその R5 ウイルスバージョン NL-DT5R5-1 とを用い、増殖効率を指標としてサル細胞 HSC-F での馴化を試みた。ウイルス感染細胞の長期培養により増殖効率の著しく向上したウイルスが出現した。これらのウイルスが感染した HSC-F 細胞のプロウイルスゲノムを PCR 法で二つに分けて増幅し NL-DT5R に挿入して完全長の分子ウイルスクローンを得た。これらの中から HSC-F 細胞において親株である NL-DT5R/NL-DT5R5-1 より増殖効率が優れたものを複数選択し、それぞれ MN4/MN5 クローンと命名した。これらのクローンは増殖効率だけでなく HSC-F 細胞に対する CPE 惹起能も格段に増強されていた。増殖効率が最も著しく向上したクローンのゲノムシーケンスを決定したところ、親株からの変異は LTR と *gag*(MA)、*pol*、*vif*、*vpr*、*env* および *nef* 遺伝子に少数認められたのみであった。MN4/MN5 クローンに共通して見られる変異の存在する領域は LTR、*pol*(IN)、*vif*(アミノ酸置換を伴わない変異)および *env*(SU)であった。現在、これらの変異がウイルス複製効率の向上にどの程度寄与しているのかを解析している。

A. 研究目的

我々が世界に先駆けて構築したプロトタイプサル指向性 HIV-1(NL-DT5R)は SIVmac239 の *vif* 遺伝子全部と *gag* 遺伝子のごく一部とを持つ。NL-DT5R は種々のサル細胞(カニクイザル由来 HSC-F 細胞、ブタオザル、アカゲザルおよびカニクイザル由来 PBMC)だけでなく、ブタオザル個体にも感染・増殖した(PNAS 103:16959-16964, 2006; J Virol 81:11549-11552, 2007; 未発表データ)。しかし、NL-DT5R はサル病原性標準株である SIVmac239 よりサル細胞での増殖効率が悪く(PNAS 103:16959-16964, 2006)、また、ブタオザル感染個体でのウイルス血症も一過性であった(J Virol 81:11549-11552, 2007)。本年度は、HIV-1/マカクザル感染システムの確立を目指し、NL-DT5R のゲノムを改変・修正してウイルス学的性状を改善する

ための基礎研究を行なった。

B. 研究方法

1. NL-DT5R(X4 ウイルス)ゲノムの改変とその R5 ウイルスバージョン NL-DT5R5-1(SF162 の *env* 遺伝子を持つ)の構築は常法に従って行なった。感染細胞からの PCR 法による分子ウイルスクローンの構築も既報の通りである(PNAS 103:16959-16964, 2006)。
2. トランスフェクションとウイルス感染実験には、それぞれ 293T 細胞と HSC-F 細胞を用いた。293T 細胞は 10%FCS 加 MEM 培地で、HSC-F 細胞は 10%FCS 加 RPMI1640 培地で維持し、感染実験は IL-2 存在下で行なった。トランスフェクションにはリン

酸カルシウム法を用いた。ウイルス量は培養上清中の逆転写酵素(RT)活性により定量した。

3. ウイルスゲノムのシーケンスはアプライドバイオシステムのサイクルシーケンスキットを用いて決定した。

(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. 遺伝子工学的手法を用いてNL-DT5Rゲノムを様々に改変し、*gag*あるいは*vif*に変異・組換えを持つウイルスクローンをそれぞれ26種類および9種類作製した。これら全てのクローンにつき、293T細胞へのトランスフェクションでウイルスサンプルを調製し、HSC-F細胞での感染・増殖効率を検討した。しかし、全てのクローンが親株NL-DT5Rよりも増殖が遅いか増殖不能のいずれかであった。NL-DT5Rを親株とするR5ウイルスNL-DT5R5-1もCPE惹起能は高いが増殖効率は非常に悪かった。
2. 上記の結果に基づき、NL-DT5RおよびNL-DT5R5-1を用いてHSC-F細胞でのウイルス馴化を試みた。ウイルス感染細胞の培養上清中にRTが検出されなくなつてから新たにHSC-F細胞を加えた。この処理により産生されてくるウイルスをストックし(感染開始から約二ヶ月後)、HSC-F細胞での増殖効率を検討した。二つのウイルスサンプルともNL-DT5R(オリジナル)より著しく、かつ、同程度に増殖効率が向上しており、細胞馴化が起きていることが強く示唆された。
3. “馴化型”ウイルスが存在する感染細胞のゲノムからPCR法にてウイルスゲノムを分子クローン化した。効率良く生物活性のあるクローンを取得するため、ウイルスゲノムを二つにわけて増幅し、かつ、得られたDNAを元のNL-DT5Rに挿入した。ウイルスゲノムの3プライム側がX4ウイ

ルス由来のクローンをMN4、R5ウイルス由来のクローンをMN5と命名した。各クローンのHSC-F細胞における増殖速度を比較検討した結果、NL-DT5Rより著しく早いクローンがそれぞれ複数得られた。これらはHSC-F細胞におけるCPEの出現も早くかつ増強されていた。

4. 最も増殖効率の良いクローンのゲノムシーケンスを決定した。NL-DT5Rについての報告(PNAS 103:16959-16964, 2006)と同様に、親株からの変異はLTRと*gag*(MA)、*pol*、*vif*、*vpr*、*env*および*nef*遺伝子に少数認められたのみであった。MN4/MN5クローンに共通して見られる変異の存在する領域(同一の変異ではない)はLTR、*pol*(IN)、*vif*(アミノ酸置換を伴わない変異)および*env*(SU)であった。

D. 考察

HIV-1の基礎・臨床研究を格段に進展させるためには、SIVやSHIVではなくHIV-1そのものを用いたサル感染・発症モデルが必要である。このシステムが確立できれば、長い間不可能であった(1)HIV-1の病原性発現機構の解析、(2)分子・細胞レベルでは不明の点の多いHIV-1アクセサリー蛋白質の個体内機能の解析、(3)HIV-1感染症の制御に繋がる新薬/ワクチンの評価・開発研究が実現可能となる。本研究で得られたHIV-1の分子クローンMN4/MN5はこの目標の基礎となりえる。

E. 結論

本研究により、プロトタイプサル指向性HIV-1(NL-DT5Rクローン)より増殖効率等で格段に優れたMN4/MN5分子クローンが得られた。サル細胞での増殖効率の上昇にはウイルスゲノムの5プライムおよび3プライム側の領域が共に関わっていると考えられる。クローン間で共通な変異領域としてはLTR、IN、SUおよびVifがあり、サル細胞での馴化に

関連して特に注目される。我々が新しく得た分子クローンに関して、当面、次の事柄が課題となる。

1. MN4/MN5 に認められた変異のうちどの変異がサル細胞での増殖効率に貢献しているか。有意義な変異が多数見つければ、更なるウイルスゲノム改変に有力な情報となる。
2. サル細胞でのみ有意義な変異があるか否か。もしあれば、分子機構を解明するための実験を行なう。
3. ごく近い将来のサル感染実験に備えて、得られたクローンが X4 あるいは R5 ウイルスであることを確認・実証する。
4. MN4/MN5 の CA に P120Q 変異を導入する。この変異は TRIM5 α によるウイルス複製の抑制の解除に関連して阪大微研の塩田教授らにより報告されたものである (J Virol 81:7280-7285, 2007)。
5. MN4/MN5 クローンのサル PBMC (ブタオザル、由来) での増殖能を検討する。これに基づきサル個体感染実験 (ビルマ産アカゲザル、インド産アカゲザルおよびカニクイザル。使用が可能となればブタオザル) を開始する。これらの実験は、京大ウイルス研の五十嵐教授、医薬基盤研の明里博士、東大医科研の俣野教授らとの共同研究で行なう。
6. マーカー遺伝子の挿入によりウイルスの可視化を試みる。

研究期間内のできるだけ早い時期に上記課題を遂行し、「考察」の項で述べた目標を達成すべく全力で取り組む。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Piroozmand, A., Yamamoto, Y.,

Khamsri, B., Fujita, M., Uchiyama, T., and Adachi, A. 2007. Generation and characterization of APOBEC3G-positive 293T cells for HIV-1 Vif study. *Journal of Medical Investigation* 54: 154-158.

- 2) Igarashi, T., Iyengar, R., Byrum, R.A., Buckler-White, A., Dewar, R.L., Buckler, C.E., Lane, H.C., Kamada, K., Adachi, A., and Martin, M.A. 2007. An HIV-1 derivative with 7% SIV genetic content is able to establish infections in pig-tailed macaques. *Journal of Virology* 81: 11549-11552.

- 3) 足立昭夫、鎌田和弥、八町和樹、山下知輝、内山恒夫、野間口雅子. 2007. HIV-1 の病原性とアクセサリ遺伝子. *蛋白質核酸酵素*, 52 : 1261-1267.

- 4) Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2008. Species barrier of HIV-1 and its jumping by virus engineering. *Reviews in Medical Virology* (Invited).

- 5) Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2008. Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes and Infection* (Invited).

2. 学会発表

- 1) Akio Adachi, Kazuya Kamada, Boonruang Khamsri, Kazuki Hatcho, Naoya Doi, Tomoki Yamashita, Tsuneo Uchiyama and Masako Nomaguchi. Generation and characterization of monkey-tropic HIV-1: evasion from antiviral factors. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007, Awaji, Japan.

- 2) 山下知輝、八町和樹、鎌田和弥、Boonruang Khamsri、野間口雅子、足立昭夫. HIV-1 Vif と宿主因子 APOBEC3F との結合機能部位の解析. 第 55 回日本ウイルス学会、2007 年、札幌市.

- 3) 八町和樹、鎌田和弥、山下知輝、Boonruang Khamsri、土肥直哉、野間口雅子、足立昭夫. HIV-1 Vif 種特異性決定領域の解析とサル感染性 HIV-1 作製への応用. 第 55 回日本ウイルス学会、2007 年、札幌市.

- 4) 足立昭夫、鎌田和弥、八町和樹、土肥直

哉、Boonruang Khamsri、山下知輝、野間口雅子。HIV-1 DT クローンの細胞および個体レベルでの増殖能。第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌市。

5) 野間口雅子、足立昭夫。粒子放出能に関するVpuの点変異体解析。第21回日本エイズ学会、2007年、広島市。

6) 足立昭夫。HIV-1の種特異的増殖。第21回日本エイズ学会教育講演、2007年、広島市。

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。

Ⅲ. 協力研究報告書

協力研究報告書

HIV ゲノム二量体化と組換えに関する解析

研究協力者 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 助教

研究要旨 HIVゲノム二量体化の効果的な検出およびHIVゲノム組換え効率の定量化のための独自のシステムの構築とそれを用いての解析を試みた。その結果現在までに以下の成果を上げた。

1, 異なる二量体化シグナルを持つ二株のウイルス間のゲノム組換えを迅速に計測するシステムを構築した。このシステム上で、マウス CD52 分子を新規ベクター感染マーカーとして実用化することに成功した。

2, HIVゲノム組換えが起きるために必要な、2本のRNA上の相同配列間の様々な条件を解析した。

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ゲノム二量体化及びゲノム組換えの機序の解明は、遺伝的多様性を主要な生き残り戦略としている HIVの制圧の端緒となり、ワクチン開発を実施する科学的基盤を提供する。本研究で研究協力者は、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。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(mCDs)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。別途開発した1ベクターによる組換え効率検出システムでは、遺伝子フレーム内に組換えマーカーとして一部配列を重複させたGFP(GFFP)と、感染マーカーとしてmCDをベクターに挿入し、GFPの重複間の組換えによって起きるGFPの再構成を検出した。

これらのベクターを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mCDsおよびGFPの発現率をFACS解析した。mCDs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

(1) 複数の HIV-1 の感染を同時にモニターする目的で HIV-1 感染性クローンの vpr 領域に様々なマーカー遺伝子を導入したが、HSA 以外の分子ではウイルス粒子産生が極端に阻害されて実用化不可能であった。そこで表面マーカーの候補としてマウスの CD 分子を探索した結果、mCD52 が分子量、遺伝子長、抗体の存在から有用と考えられた。DNA 合成によって mCD52 遺伝子を作成し、vpr 領域に組み込んで発現させたところ良好な発現を観察した。このウイルスをヒト由来細胞系に感染させることでウイルス感染をモニターすることが出来、抗体と蛍光物質の組み合わせで最大 4 種類のマーカー (GFP, HSA, Tyh-1.2, mCD52) を同時にサイトメーターにて観察することが可能となった。

(2) HIV ゲノム組換えの必要条件検索において、相同配列長による組換えへの影響を検討した。GFP の重複長を 30 から 250 塩基まで段階的に変えた一連の変異体の感染実験において、単位長さあたりの組換え効率は重複長に従い上昇し 60 塩基でプラトーに達した。重複部分の相同性を変化させると、わずか 10% の相同性低下によって劇的な組換え効率の低下が観察された。また、重複配列間に挿入する RNA スペーサーを複数種用いることで自由エネルギーを変化させても、組換え効率は大きく増減した。

D. 考察

(1) ウイルス感染モニター用のマーカーはサイトメーター解析が日常的となってきた今日では有用なツールである。しかしウイルスそのものの性質や細胞の活性になるべく影響を与えないようなマーカーを選択する必要が求められる場合も多い。今回我々が実用化した mCD52 はゲノム長 225base と小さく、実際に発現している表面分子は翻訳後修飾の結果さらに小さい。遺伝子挿入によるウイルスの活性低下も顕著ではなく、モノクローナル抗体との反応も良好で、実用的なマーカーであると考えられた。

(2) 30 塩基の相同配列を標的にした組換えはほぼ検出限界であり、一方 60 塩基以上の相同配列間では十分な組換えが起きていた。HIV-1 単一ゲノム上の相同配列で最長の領域は、末端の R 配列 (約 100 塩基) を除くと PPT 配列 21 塩基であることから、21 塩基の相同配列間の組換えは防ぎつつ、100 塩基の相同配列間では効率的な組換えが起きる必要があり、今回の結果は合理的なものと言えた。また、文献的に HIV-1 はゲノム 0.8-1kb ごとに一回程度組換えが起るとされており、本実験により算出される組換え効率はこれと良く合致していた。重複配列の塩基相同性を 95% まで下げても組換えに影響しなかったが、90% では劇的に低下し、80% 以下ではほとんど組換えは起こらなくなった。このことは HIV-1 と HIV-2 や SIV の間の組換えは極めて起こりにくいことを意味する。相同性に偏りをつけた場合や、重複配列の間のスペーサーの配列・長さは組換え効率に大きく影響した。このことは主な組換えがマイナス鎖合成時に起きており、逆転写の進行速度やポージングに RNA 鋳型の二次構造が大きく関与するためと考えられる。

E. 結論

HIV サブタイプ間ゲノム組換えを簡便・迅速に概算するシステムを構築し、この中で mCD52 が実用に耐える新規バイオマーカーであることを確認した。今後遺伝子導入のマーカー等として様々な応用が可能であると考えられた。

HIV 逆転写時の組換えに必要な RNA 鎖間の相同配列の条件について、様々な知見を得た。今後 GFP 以外のマーカー遺伝子を用いたり、ベクターへの挿入位置を変えるなどしてデータをより一般則に近づけていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Ohishi M., T. Shioda, and J. I. Sakuragi*. Retro-transduction of virus pseudotyped with glycoprotein of vesicular stomatitis virus. *Virology*. 362: 131-138, 2007.

(2) Sakuragi, J. I*., S. Sakuragi., and T. Shioda. 2007. Minimal region sufficient for genome dimerization in human

immunodeficiency virus type 1 virion and its potential roles in the early step of viral replication. *J. Virol.* 81:7985-92, 2007.

(3) J-i Sakuragi*, S Sakuragi, M Ohishi, and T Shioda. A rapid recombination assay of HIV-1 using murine CD52 as a novel biomarker. *Microbes and Infection*, Available online 9 January 2008.

2. 学会発表

1) HIV-1 ゲノム組換え標的の必要条件 櫻木淳一・櫻木小百合・塩田達雄 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌。

2) HIV-1 のゲノム二量体化とウイルス粒子成熟との相関に関する研究 大石真久・櫻木淳一・塩田達雄 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌。

3) HIV-1ゲノム組換え標的の必要条件に関する解析 櫻木淳一・塩田達雄 第21回日本エイズ学会学術集会、広島。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし。

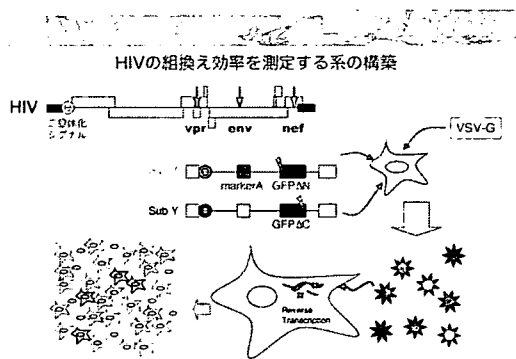


Fig. 1A サブタイプ間ゲノム組換え測定システム

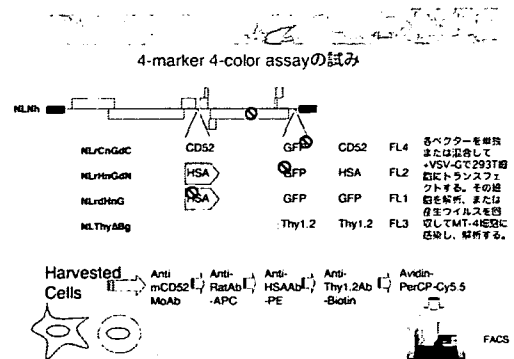


Fig. 1B mCD52 を含む 4 マーカー同時導入・検出の試み

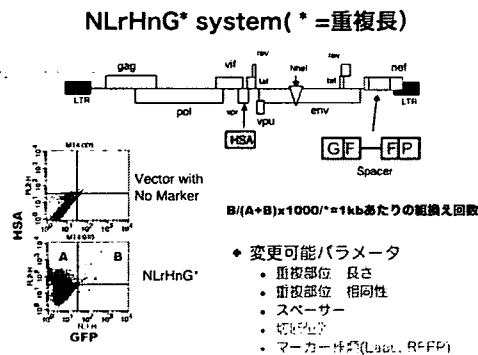


Fig. 2A 組換え必要条件検索システム

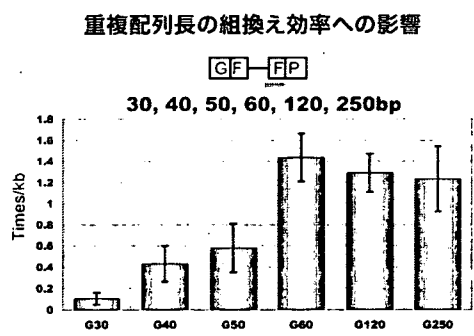


Fig. 2B 重復配列長の組換えへの影響

研究協力報告書

HIV 脱殻過程を標的とする HIV 複製制御法の研究

研究協力者 三隅将吾 熊本大学・大学院医学薬学研究部・薬学生化学 准教授

研究要旨： HIV 粒子のプロテオーム解析により、HIV-1 は少なくともウイルス粒子内に 6 種以上の Capsid (CA) isoform (p24-a, p24-b, p24-c, p24-d, Nicked p24-e, Nicked p24-f) が存在し、p24-a のアミノ末端側に位置する Ser16 は特異的にリン酸化を受けていることを、alkaline phosphatase を用いた脱リン酸化実験により明らかにした。この Ser16 に変異を導入すると、ウイルスの感染性が著しく低下した。このリン酸化 Ser とその隣にある Pro 残基からなる配列は、peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) の一つである Pin1 によって特異的に認識される可能性があるため、CA core と Pin1 との相互作用を pull down assay により確認したところ、実際に CA core と Pin1 の相互作用が確認された。さらに、*in vitro* uncoating assay により Pin1 が CA core の崩壊を促進することを明らかにした。本研究は、タンパク質レベルでウイルス粒子を直接解析することによってはじめて得られる重要な情報である。

A. 研究目的

研究は、HIV のライフサイクルにおいてまだ十分明らかにされていない脱殻素過程を明らかにすることであり、得られた結果をもとに脱殻過程を標的とした新しい HIV 制御法の開発に活かすことを目的としている。なお、本研究は、「薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法に関する基礎研究」（主任研究者：佐藤裕徳先生）の協力研究として行われたものである。

B. 研究方法

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

タンパク質の同定および翻訳後修飾部位の同定は、酵素消化物の MALDI TOF-MS による質量分析及び、データベース検索とともに、ESI-Q-TOF による酵素消化産物

の MS/MS 解析を行った。

2) ウイルス感染価の測定

本実験で用いた WT および変異ウイルスは、MAGIC-5 細胞を用いた感染実験によりその感染価を評価した。また、siRNA を処理し MAGIC-5 細胞内の Pin の発現を低下させた条件下で、WT ウイルスを感染させその感染価を評価した。

3) *in vitro* uncoating assay

Dr. Auevarakul *et al.*, (*Virology* 337 (2005) 93-101) の方法を用いて、CA core を調製し、調製した組換え Pin1 を用いて core 崩壊実験を行った。

C. 実験結果

Ser16 のリン酸化に関して

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 CA isoform が存在することを明らかにした。その内、p24-a (pI 6.71) のアミノ末端 Ser16 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できた。このリン酸化 Ser16 とそれにつづく Pro 残基から構成される phosphorylated Ser-Pro 配列 (図 1) に、CyPA や FK506 結合タンパク質 (FKBP) とは異なるタイプであるパルプリアファミリーに属する PPIase の WW モチーフが結合し、最終的に PPIase 活性によって CA の構造変化が誘導される可能性が示唆され、siRNA 等を用いてウイルス標的細胞内の Pin1 の発現を低下させると、ウイルスの感染価が低下した。この Ser-Pro 配列は CA に集中している。さらに、in vitro uncoating assay によって CA core が組換え Pin1 によって時間依存的に崩壊することをつきとめ、それは Pin1 の酵素活性に依存していることを明らかにした。

Ser-Pro Sequence in Pr55^{gag}



図 1 Ser-Pro 配列

D. 考察

6 種類以上の HIV-1 CA isoform がウイルス粒子内に存在する。これらの isoformのうち、Ser16 が特異的にリン酸化を受けている isoform を同定した。CA のアミノ末端に存在する Ser-Pro 配列の Ser 残基が細胞内の kinase によりリン酸化を受け、この phosphorylated Ser-Pro を特異的に認識する PPIase が CA 六量体のリング内に入り込むことによって Ser-Pro 間の結合の共鳴安定性を効果的に低下させ、最終的にペプチド結合の cis-trans 間の回転バリアを低下させることになり、trans 型のペプチド結合を形成させることになると考えられる。

一般に、X-Pro 配列は、cis 型ペプチド結合を形成する方が安定であると考えられることからすると周辺構造への影響は大きいものと考えられ、CA 六量体の安定性が低下する可能性が示唆される。CA のアミノ末端側 (151 残基付近まで) は六量体の形成には重要なドメインを含んでいることから、PPIase が CA の phosphorylated Ser-Pro 配列へ結合することによって、脱核の際のコアの崩壊のための一つの因子として働いていると示唆された。さらに、CA のアミノ末端側 (151 残基付近まで) の安定性が低下すると必然的に CA のカルボキシル末端の構造の安定性も低下することが予想され、結果的に、六量体リング同士の相互作用が弱くなり最終的に、p24 コアの十分な崩壊が誘導されるのではないかと考えられる。

E. 結論

ウイルス複製過程を明らかにするにはゲノム情報のみでは明らかにできない部分が存在すると思われるので、その際には、タンパク質レベルでウイルス粒子を検討するといった方法が有効な手段になり得ると考えられる。今年度は、実際に CA core を調

製し、その崩壊に Pin1 が寄与していることを明らかにできた。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Endo E, Inatsu A., Hashimoto K., Takamune N, Shoji S. and Misumi S. Human immunodeficiency virus-induced apoptosis of human breast cancer cells via CXCR4 is mediated by the viral envelope protein but does not require CD4. *Curr. HIV Res.*, *in press* (2008)
- 2) Takamune N, Gota K, Misumi S., Tanaka K, Okinaka S, and Shoji S. HIV-1 production is specifically associated with human NMT1 long form in human NMT isozymes. *Microbes and Infection*, *in press* (2007)
- 3) Misumi S., Takamune N, and Shoji S. Immunoreactive cycloimmunogen design based on conformational epitopes derived from human immunodeficiency virus type 1 coreceptors: cyclic dodecapeptides mimic undecapeptidyl arches of extracellular loop-2 in chemokine receptor and inhibit human immunodeficiency virus type 1 infection. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* (2007) 7, 141-152

口頭発表

- 1) HIV-1 は脱殻過程に Peptidyl-prolyl

Isomerase Pin1 を要求する 井上睦美、三隅将吾、高宗暢暁、庄司省三 第55回日本ウイルス学会誌 P.305 (2007)

- 2) CA の Ser16-Pro17 モチーフは、peptidyl-prolyl Isomerase Pin1 との相互作用を介した脱殻に必須である。BMB2007 講演要旨集 p.852 (2007)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし。