

B. 研究方法

1) HIV-2 GH123 株のカプシドタンパク質の 120 番目、158 番目、および 178 番目に変異を導入し、ヒト TRIM5 α を過剰発現させたヒト T 細胞株 MT4 におけるウイルス増殖を検討した。また、感染症研究所佐藤祐徳博士、横山勝博士との共同研究により、HIV-1 のカプシドタンパク質の結晶構造を鋳型として HIV-2 のカプシドタンパク質の三次元構造を構築し、120 番目、158 番目、および 178 番目のアミノ酸の変化の三次元構造への影響を検討した。

2) 多型 Gly110Arg を持つ TRIM5 α の機能解析は、ヒト TRIM5 α の微弱な抗 HIV-1 活性を増幅して信頼性の高い結果を得るため、Gly110Arg を持つヒト TRIM5 α を作成するとともに、ヒト TRIM5 α の RING、B-box-2 ならびに coiled-coil 領域とアフリカミドリザル TRIM5 α の SPRY 領域を組み合わせたキメラ TRIM5 α を作成し、Gly110Arg の多型を持つキメラ TRIM5 α と多型を持たないキメラ TRIM5 α を発現するセンダイウイルスベクターを作成した。また、多型 G176del を持ち RING ドメインのみを発現するヒト TRIM5 α を作成し、その変異 TRIM5 α を発現するセンダイウイルスベクターを作成した。そして、それぞれのセンダイウイルスベクターを感染させた MT4 細胞において、HIV-1 ならびに HIV-2 の増殖を検討した。

(倫理面への配慮)

HIV-1 感染者ならびに非感染者の検体を使用するにあたって、検体の提供者には遺伝子解析を行うことを含めて十分に説明を行い、書面による同意を得られた場合のみを解析の対象とし、検体は匿名化して個人情報特定できないようにして扱った。

C. 研究結果

1) HIV-2 のカプシドタンパク質の 120 番目のアミノ酸はウイルスの TRIM5 α に対する感受性に大きく影響する。昨年度、西アフリカのギニアビサウの HIV-2 感染者コホートの 69 名の感染者の血中の HIV-2 のカプシドタンパク質遺伝子の塩基配列を検討したところ、120 番目のアミノ酸がプロリンでヒト TRIM5 α に感受性と考えられる HIV-2 に感染した感染者の血

中の HIV-2 量は、120 番目のアミノ酸がアラニンもしくはグルタミンでヒト TRIM5 α に耐性と考えられる HIV-2 に感染した感染者の HIV-2 量よりも有意に低下していた。120 番目のアミノ酸以外にも、158 番目と 178 番目のアミノ酸変異が血中ウイルス量の違いと相関しており、いずれもプロリンでは血中ウイルス量が低く、158 番目がセリン、178 番目がアラニンでは血中ウイルス量が高かった。そこで、HIV-2 GH123 株のカプシドタンパク質の 120 番目のプロリンをアラニンに、158 番目のプロリンをセリンに、178 番目のプロリンをアラニンに置換した変異体を作成し、ヒト TRIM5 α を過剰発現させた MT4 細胞におけるウイルス増殖を検討した。その結果、3 カ所に変異を持つウイルスは、120 番目のみアラニンに置換したウイルスよりもヒト TRIM5 α に対する耐性が強くなっており、これら 158 番目と 178 番目の 2 カ所のアミノ酸変異もヒト TRIM5 α 感受性に影響することが明らかになった。

HIV-1 のカプシドタンパク質の結晶構造を鋳型として HIV-2 のカプシドタンパク質の三次元構造を構築し、158 番目および 178 番目のアミノ酸の変化の三次元構造への影響を検討した。その結果、158 番目と 178 番目がプロリンからそれぞれセリン、アラニンに変化すると、カプシドタンパク質の二量体の結合エネルギーの絶対値が上昇することが明らかになった。

2) ヒト TRIM5 α の微弱な抗 HIV-1 活性を増幅して信頼性の高い結果を得るため、ヒト TRIM5 α の RING、B-box-2 ならびに coiled-coil 領域とアフリカミドリザル TRIM5 α の SPRY 領域とを組み合わせたキメラ TRIM5 α を作成し、多型 Gly110Arg を持つキメラ TRIM5 α と持たないキメラ TRIM5 α との間で抗 HIV-1 効果を比較した。その結果、多型 Gly110Arg を持つキメラ TRIM5 α は、多型を持たないキメラ TRIM5 α よりも HIV-1 ならびに HIV-2 感染阻害効果が低下していることが明らかになった。HIV-2 感染阻害効果の低下については、キメラではないヒト TRIM5 α においても観察された。

一方、G176del を持つ TRIM5 α のみでは当然ながら抗 HIV 作用は全く検出されなかったが、野生型 TRIM5 α を同時に発現させたところ、野

野生型 TRIM5 α の抗 HIV 作用が増強された。細胞内での発現量を検討したところ、G176del を持つ TRIM5 α は微量にしか検出されなかったのに対し、同時に発現させた野生型 TRIM5 α の発現量が G176del を持つ TRIM5 α 存在下では明らかに増加していた。

D. 考察

1) 本研究により、西アフリカの HIV-2 感染者コホートにおいて血中ウイルス量の個人差と相関していた 3 か所のアミノ酸変異は、いずれもヒト TRIM5 α に対する感受性に影響していることが明らかになった。また、三次元構造のホモロジーモデリングの結果から、今回検討した 158 番目と 178 番目のアミノ酸変異は、カプシド二量体の結合エネルギーの絶対値を上昇させることが明らかになった。カプシド二量体の結合エネルギーの上昇によりウイルスのカプシド構造がより強固になることが予想され、TRIM5 α によるウイルスカプシド崩壊により抵抗性を示すことになる、と考えられる。

2) ヒト TRIM5 α の一塩基多型 Gly110Arg は TRIM5 α の活性中心の一つと考えられる B-box ドメイン内の 16 番目のグリシンがアルギニンに置換する多型で、亜鉛イオンを配位する 15 番目のアスパラギン酸に隣接している。日本人 HIV-1 感染者 190 名の中 10 名のヘテロ接合を認めたが、299 名の HIV-1 非感染者では全くこの変異は検出されなかった($P < 0.0001$)。この変異により実際に TRIM5 α の抗 HIV-1 および抗 HIV-2 作用が減弱することから、Gly110Arg の変異を持つヒト TRIM5 α は HIV-1 感染感受性を上昇させるものと考えられる。

一方、G176del を持つ TRIM5 α は、299 名の HIV-1 非感染者中に 3 名のヘテロ接合を認めたが、190 名の HIV-1 感染者には認められなかった。頻度が著しく低いためにこの差は統計学的には有意ではないが ($P = 0.29$)、この多型を持つ TRIM5 α を野生型 TRIM5 α と同時に発現させたところ、野生型 TRIM5 α の抗 HIV 作用が増強されたことから、G176del は Gly110Arg とは逆に HIV-1 感染抵抗性を付与する可能性が考えられる。細胞内での発現量を検討したところ、G176del を持つ TRIM5 α はごく微量にしか検出

されなかったが、同時に発現させた野生型 TRIM5 α の発現量が G176del を持つ TRIM5 α 存在下では明らかに増加していた。G176del を持つ TRIM5 α は自身のターンオーバーが早いために野生型 TRIM5 α の分解を遅らせ、抗 HIV-1 作用を増強するのかも知れない。

E. 結論

1) 昨年度、西アフリカの HIV-2 感染者コホートで血中ウイルス量の個人差と相関していたカプシドタンパク質の 158 番目と 178 番目のアミノ酸は、ウイルスのヒト TRIM5 α 感受性を変化させることにより、感染者体内での HIV-2 増殖に影響することが明らかになった。

2) ヒト TRIM5 α の遺伝子多型 Gly110Arg は HIV-1 感染感受性を上昇させ、G176del は逆に感染抵抗性を付与する可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
- 1) Kono K, Song H, Shingai Y, Shioda T, Nakayama EE. Comparison of anti-viral activity of rhesus monkey and cynomolgus monkey TRIM5 α s against human immunodeficiency virus type 2 infection. *Virology*. 2008; 373(2):447-56.
- 2) Sakuragi J, Sakuragi S, Ohishi M, Shioda T. A rapid recombination assay of HIV-1 using murine CD52 as a novel biomarker. *Microbes Infect*. 2008; 10(4):396-404.
- 3) Nakayama EE, Shingai Y, Kono K, Shioda T. TRIM5 α -independent anti-human immunodeficiency virus type 1 activity mediated by cyclophilin A in Old World monkey cells. *Virology*. 2008; 375(2):514-20.
- 4) Maegawa H, Nakayama EE, Kuroishi A, Shioda T. Silencing of tripartite motif protein (TRIM) 5 α mediated anti-HIV-1 activity by truncated mutant of TRIM5 α . *J Virol Methods*. 2008; 151(2):249-56.
- 5) Sugimoto C, Nakayama EE, Shioda T,

- Villinger F, Ansari AA, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y, Mori K. Impact of Glycosylation on Antigenicity of Simian Immunodeficiency Virus SIV239: Induction of Rapid V1/V2 Specific Non-neutralizing Antibody and Delayed Neutralizing Antibody Following Infection with an Attenuated Deglycosylated SIV239 Mutant. *Journal of General Virology*. 2008;89(Pt 2):554-66.
- 6) Hosoya N, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Shioda T, Odawara T, Nakamura T, Kitamura Y, Kano M, Kato A, Hasegawa M, Nagai Y, Iwamoto A. Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors to transduce HIV-1 genes into human dendritic cells. *Journal of Medical Virology*. 2008;80:373-82.
- 7) Nuanjun Wichukhinda, Emi E Nakayama, Archawin Rojanawiwat, Panita Pathipvanich, Wattana Auwanit, Suthon Vongsheree, Koya Ariyoshi, Pathom Sawanpanyalert, and Tatsuo Shioda. Effects of CCR2 and CCR5 polymorphisms on HIV-1 infection in Thai females. *Journal of AIDS*. 2008;47:293-97.
2. 学会発表
- 1) 塩田達雄 Gag と相互作用する細胞因子 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山。
- 2) 櫻木淳一・櫻木小百合・大石真久・塩田達雄 レトロウイルスゲノム二量体化とウイルスゲノム組替えの厳密な相関 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山。
- 3) 前川彦一郎・中山英美・黒石歩・塩田達雄 ドメイン欠失 TRIM5 α 変異体による TRIM5 α の HIV-1 抵抗性の解除 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山。
- 4) 中山英美・塩田達雄 カプシド変異とウイルス増殖 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山。
- 5) 河野健・塩田達雄・中山英美 HIV-2 感染阻害におけるアカゲザル、カニクイザル TRIM5 α の違い 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山。
- 6) 中山英美・Song Haihan・塩田達雄 カプシド変異とウイルス増殖 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪。
- 7) 河野健・塩田達雄・中山英美 HIV-2 感染阻害におけるアカゲザル、カニクイザル TRIM5 α の違い 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪。
- 8) 櫻木淳一・櫻木小百合・大石真久・塩田達雄 HIV-1 ゲノム二量体化とウイルスゲノム組替えの厳密な相関 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪。
- 9) 大石真久・塩田達雄・櫻木淳一 HIV-1 Gag 前駆体プロセシングのゲノム二量体化への影響 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪。
- 10) 前川彦一郎・中山英美・黒石歩・塩田達雄 ドメイン欠失 TRIM5 α 変異体による TRIM5 α の HIV-1 抵抗性の解除 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪。
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

8. HIV-1 感染に伴うゲノム DNA 二重鎖切断の分子機構と潜伏感染細胞からのウイルス再産生における自然免疫シグナル伝達の関与

研究分担者 石坂 幸人 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部 部長

研究要旨 本研究では潜伏感染状態で重要な役割を示すマクロファージへの感染に着目し、その初期感染機構及び潜伏感染状態からのウイルス再産生機序を研究対象としている。特に、HIV-1 感染に伴って誘導されるゲノム DNA 二重鎖切断のウイルス感染における意義を明らかにすることを試みた。DNA 損傷は、静止マクロファージへのウイルス感染に対して重要な役割を示すことまた、DNA 損傷部位にウイルス DNA が挿入されることを明らかにした。さらに DNA 損傷部位に挿入されたプロウイルス DNA の解析の結果、DNA 損傷部位への挿入には、インテグラーゼによる末端修飾を必ずしも必要としない可能性が示唆された。一方、アクセサリ遺伝子産物 Vpr による潜伏感染状態からのウイルス産生再活性化には IL-6 産生が誘導され、その際 Toll-like 受容体 4 及びそのアダプター分子である MyD88 を必要とすることを明らかにした。本研究によりマクロファージを巡る感染病態が明確になり、新たな抗エイズ療法の糸口が得られるものと期待される。

A. 研究目的

Antiretroviral therapy が導入され、HIV-1 陽性症例の予後が劇的に改善された。しかし近年の研究からウイルスを体内から駆逐することは困難であることが分かり、潜伏感染状態で重要な役割を担う単球/マクロファージ (Mφ) 系細胞へのウイルス感染機序と潜伏感染細胞からのウイルス産生再活性化機序を理解することが重要となっている。

近年、ウイルス感染の際にゲノム DNA 二重鎖切断 (DSB: DNA double-strand breaks) が誘導されること、また DSB によって惹起される細胞側のシグナルを遮断することで、ウイルス感染が阻害されることが報告された。研究分担者はウイルス感染の際に DSB が惹起されることを見出すとともに、アクセサリ遺伝子産物 Vpr が DSB を強く誘導することを早期から明らかにして来た。Vpr は Mφ へのウイルス感染の際に重要な役割を担っていることが知られているがその具体的な役割は明確になっていない。一つの可能性として、DSB が静止マクロファージへのウイルス感染効率の上昇に寄与している事が考えられ、この可能性を明らかにすることを本研究の第一目標としている。

一方、平成 18 年度の研究成果として、HIV-1 感染患者血液中に nM オーダーの Vpr が存在することを報告した。そして、同程度の濃度のリコンビナント Vpr 蛋白質(以下 rVpr)を潜伏感染細胞である U1 細胞に添加するとヒト末梢血単核球細胞(以下 PBMC)依存的にウイルス再産生が誘導されることが分かった。さらに、この現象が Mφ からの IL-6 産生を介して誘導されることを見いだした。この知見を背景に今年度は IL-6 の産生機序を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

1) X-線照射によるウイルス感染効率の上昇

DSB の感染における役割を明らかにするため、ウイルス感染と並行して、2.5 Gy の X 線照射を行った。感染 2 日後の Mφ から DNA を抽出し、Alu-PCR 法による解析に供した。また、DSB により惹起される細胞内シグナルの関与を明らかにする目的で、DNA 損傷シグナルの最も上流で機能する ATM (Ataxia telangiectasia mutated) に対する阻害剤 (KU55933) を添加し、X-線照射後の挿入効率の上昇に与える影響を調べた。また、DSB の意義を明らかにするため、Mφ と培養細胞株に対する作用を比較した。

2) DSB サイトが持つウイルス DNA のゲノム挿入過程における役割

DSB サイトのウイルス挿入における役割を調べるため、酵母由来 18 塩基を認識する制限酵素サイトと制限酵素を組み合わせたウイルス感染システムを構築した。使用した制限酵素サイトは *SceI* で、ヒトゲノム中には存在しないことが知られている。まず、ヒト単球性白血病細胞株である THP-1 に *SceI* サイトを含むプラスミド DNA を導入し、ゲノムに組み込まれた細胞株(THP1/*SceI*)を得た。フォルボールエステルである PMA を処理する事で THP-1/*SceI* を静止 M ϕ 様細胞にした後、アデノウイルスを用いて *SceI* を強制的に発現させるのと並行して HIV-1 ウイルスを感染させた。感染後の細胞由来 DNA について nested-qPCR を行い、*SceI* サイト近傍に組み込まれたウイルス DNA のコピー数を半定量した。DNA コピー数の検定は Taqman probe とリアルタイム PCR (ABI 社製) を使用して行った。また、独立して複数回の感染実験を行い、プロウイルス DNA とゲノム DNA との境界点 (以下ブレイクポイント) を含む DNA を PCR 増幅し、クローニング後シーケンス解析を行った。

3) rVpr による IL-6 産生機序の解明

rVpr はグルタチン S トランスフェラーゼ (GST) 融合蛋白質としてバクテリアで発現させた後、グルタチンビーズを用いて精製した。Triton X-100 入りのバッファーで洗浄した後、プロテアーゼを作用させ、rVpr 単体を回収した。その後、Vpr に対する単クローン抗体(クローン 8D1)を用いてアフィニティー精製を行った。カラムに吸着させた後、医療用蒸留水を用いて作成したバッファーで十分に洗浄することで大腸菌由来エンドトキシンを排除した。pH2.5 の溶出バッファーを用いて rVpr をカラムから溶出し、速やかに pH8.5 のバッファーで検体を中和した。精製 rVpr の濃度は自身が作成した ELISA キットで測定した。PBMC はリンフォブレップで調整後、MACS ビーズ (Miltenyi 社製) を用いた CD14 陽性細胞に対するネガティブ選別法にて単球細胞を調整した。rVpr によって誘導される IL-6 mRNA 量

は定量的 PCR 法により行った。コントロールとして β -actin mRNA を用いた。siRNA は Lipofectamine 2000 を用いて導入し、発現の低下をウエスタン解析で検定した後、IL-6 発現誘導実験に供した。

C. 研究結果

1) X-線照射によるウイルス感染効率の上昇

X-線照射を施すことで、ウイルス DNA のゲノムへの挿入頻度は 30 倍以上増加した。X-線照射によるウイルス DNA コピー数の増加は、静止マクロファージでのみ観察され、分裂細胞である HT1080 (ヒト線維肉腫細胞株) では DSB の効果は全く認められなかった。そして、静止マクロファージでの DSB によるウイルスコピー数の増加は、感染後 5 時間目の X-線照射で最も顕著に認められ、感染後 3 時間または 7 時間での照射では効果が弱かった。さらに、ATM 阻害剤をこの系に添加すると、挿入効率の上昇は完全に抑制された。

2) DSB サイトへのウイルス DNA の挿入

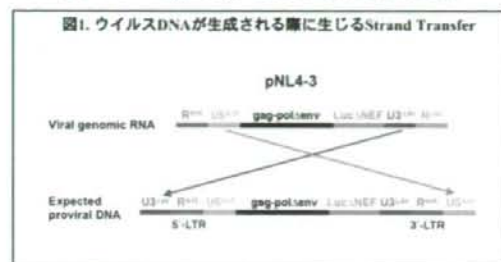
HIV-1 を感染させる際に *SceI* を作用させることにより、ゲノム中の *SceI* サイトまたはその近傍へのウイルス DNA の頻度が上昇した。コントロールとして使用した LacZ 発現ウイルス感染群と比較して、有意に挿入頻度の違いが検出された。

次に *SceI* 部位にウイルス DNA が挿入されることを検証するため、ブレイクポイントを挟む形で設定したプライマーを用いて感染細胞由来 DNA から PCR にて DNA を増幅した。その結果、*SceI* アデノを感染させた群 12 検体中 10 個に増幅が認められ、LacZ アデノ感染群では認められなかった。この際、KU55933 を添加すると増幅される検体数は 2 個に減少し、ATM 依存的に DSB サイトにウイルス DNA が挿入されることが示された。

さらに組み込まれた DNA をクローニングし、塩基配列を決定したところ、確かに *SceI* サイト内にウイルス DNA が挿入されていることが確認された。

本研究で使用しているウイルス DNA は pNL4-3 であり、5' 側に NY5 株、3' 側に LAV 株由来ウイルスゲノムを有するキメラの構造

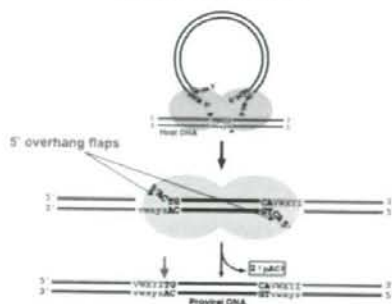
を有する。逆転写酵素によってウイルス DNA が産生される際、strand-transfer という現象が生じ、最終的に生成されるウイルス DNA は 5' 側に LAV、3' 側に NY5 株の配列になることが知られている(図 1)。SceI に挿入されたプロ



ウイルス DNA の塩基配列を解析したところ 5' 側に LAV 株、3' 側に NY5 株に由来する塩基配列を認め、通常の如く strand-transfer を経てウイルス DNA が生成され、これが SceI 部位に挿入されていることが分かった。

一方、ウイルス DNA はインテグラーゼ(以下 IN: integrase) の機能によって「processing-joining-repair」の 3 つからなる修飾を受けながらゲノムに挿入される。この過程でウイルス DNA の 5' 末端の 2 塩基は「joining」のステップで 5' -overhang flap が形成され、結果として除去される(図 2)。

図2. ゲノムへの挿入ステップでウイルスDNAの5'末端はINによって除去される



即ち、ウイルス DNA は合成初期に 5' 末端に認められる 2 つの塩基(アデニンとシトシン、以下 AC)は、途中で削られ、ゲノムには欠失した形で組み込まれることになる。

SceI に挿入されたプロウイルス DNA の 5' 末端を解析すると、10 個中 8 個のクローンで AC が温存されていることが分かった。即ち、DSB サイトには IN の catalytic activity の作用を受けることなくウイルス DNA が挿入される可

能性が示唆された。

3) rVpr による IL-6 産生機序の解明

平成 19 年度の解析で、rVpr による IL-6 産生には MAP キナーゼや IKK が関与していること、さらに自然免疫受容体 (Toll-like 受容体、以下 TLR) の下流で機能するアダプター分子、MyD88 が関与していることが明らかになった。今年度、さらに TLR4 の siRNA を用いてノックダウンすると、rVpr 誘発 IL-6 産生が顕著に阻害されることを見いだした。また、rVpr によってミトコンドリア膜電位の低下が誘導されること、活性酸素のスカベンジャーである N-acetyl cysteine(NAC)の添加によって IL-6 産生が抑制されることを見いだした。

D. 考察

1) DNA 損傷とウイルス感染

DNA 損傷シグナルとウイルス感染の関連性については、現在のところ一定の見解が得られていない。DSB シグナルがウイルス感染に重要であるとする報告(Nat. Cell Biol.7, 493, 2005; PNAS 100, 4778, 2003) と、必要でないとする報告 (J. Virol. 79, 1389, 2005; J. Virol. 79, 2973, 2005) に二分されている。今回、健康人由来 Mφ に X-線照射を施すことによってウイルス DNA の挿入頻度が顕著に増加することが明らかになった。一方、分裂細胞では DSB の効果は全く検出されず、DNA 損傷のウイルス感染における意義は、専ら静止細胞でのみ認められる現象であることが示唆された。今回の解析では Mφのみを使用したが、静止細胞に対する影響を考慮した場合、T 細胞に対する DSB の作用も解析する必要性が考えられる。

静止 Mφ を使用したモデル実験により、DSB サイトにウイルス DNA が挿入されることが証明され、DSB サイトはウイルス DNA がゲノムへ組み込まれる際のプラットフォームとして機能することが示唆される。また、X-線照射のウイルス感染に対する効果は感染後 5 時間で最も顕著に認められた。ウイルス感染した後、合成されたウイルス DNA は感染後 6 時間目位から核の周囲に認められるようになり、ついで核内に認められるようになる。DSB のウイルス感染における効果が感染後の特定の時間に

集中して認められることは、DSB が未知の宿主因子を活性化し、ウイルス DNA を積極的に DSB サイトにリクルートする可能性が考えられる。この機序については現在のところ全く未知であるが、今後の重要な課題である。

一方、SceI サイトに挿入されたプロウイルス DNA の解析から、一般にウイルス DNA が合成の過程で生じる strand-transfer は DSB 依存的に挿入される DNA の場合でも生じていることが分かった。しかし、SceI サイトに挿入されたウイルス DNA の多くは、IN 作用によって誘導されるウイルス DNA^{5'} 末端の AC の除去を受けていない事が判明し、DSB サイトへのウイルス DNA の挿入は、IN 非依存的である可能性が示唆された。この事を検証するため、IN の catalytic activity を欠失した D64V 変異体 (IN の 64 番目のアスパラギン酸がバリンに置換した変異体) を用いた実験を計画している。

DSB サイトへの外来性遺伝子の挿入については、アデノ随伴ウイルスや肝炎ウイルス DNA (Nat. Genet. 36, 767, 2004; PNAS 101, 11135, 2004) を用いた解析が行われている。即ち、これらの報告と今回の解析結果は、DNA の種類に関係なく、外来性 DNA を DSB サイトに挿入させる宿主細胞機能の存在を示唆する。Vpr は、Mφ に DSB を誘発することで、細胞内シグナルを惹起し、効率良くウイルス DNA をゲノムに組み込ませている可能性が示唆される。一方、分裂細胞では DNA 複製の過程で自然にゲノム中に「切れ目」が生じるため、改めて DSB を誘発する必要は無い。その理由から、Vpr は分裂細胞に対して何ら機能性を示さないものと想定される。

今年度、潜伏感染細胞からのウイルスの再産生機序に関する解析をさらに進めた。即ち、TLR4 をノックダウンすることで rVpr による IL-6 産生が著明に阻害されたことから、Vpr が自然免疫に関与する Toll-like 受容体を標的としている可能性が強く示唆された。これまで、Vpr に関して膨大な解析が行われているが、その受容体に関する報告は全く無い。逆に Vpr の機能には、細胞側受容体は必要ないとする報告も散見される。そこで、rVpr の TLR4 に対する結合性を明らかにする目的で、TLR4 のリコンビナント蛋白質を調製し、ピアコアを用い

て rVpr との結合性を解析した。その結果、明らかな結合性は認められなかった。NAC により Vpr 誘発 IL-6 産生が阻害されることから、活性酸素-TLR4-IL-6 産生のシグナルを想定し、活性酸素の産生と TLR4 活性化をつなぐ分子を現在同定中である。

E. 結論

ウイルス DNA の染色体へのインテグレーションの過程に DSB と DSB 誘発細胞内シグナルが「正」の因子として作用していることが明らかになった。今後、その機序を明らかにする。一方、潜伏感染細胞からのウイルス産生誘導に関する IL-6 産生は活性酸素産生と自然免疫シグナルに関与する受容体の機能が重要な役割を担っていることが強く示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitayama H., Miura Y., Ando Y., Hoshino S., Ishizaka Y., and Koyanagi Y. Human Immunodeficiency Virus Type-1 Vpr Inhibits Axonal outgrowth through induction of mitochondrial dysfunction. *J. Virol.* 82(5), 2528-2542, 2008.
- 2) Matsuyama S, Mimura H, Katagishi K, Yumoto H, Handa S, Fuji M, Sano Y, Shimura M, Yabashi M, Nishio, K, Tamasaku K, Ishizaka Y, Yamauchi K. Trace element mapping using a high-resolution scanning X-ray fluorescence microscope equipped with a Kirkpatrick-Baez mirror system. *Surf. Interface Anal.* 40:1042-1045, 2008.

2. 学会発表

- 1) 志村まり、豊田雄介、木ノ本正信、徳永研三、依田欣哉、柳田充弘 HIV-1 Vpr による姉妹染色体分体の早期分離異常 第 31 回日本分子生物学会、神戸、12 月 (2008)
- 2) 奥平准之、星野重樹、小山芳貴、狩野繁之、石坂幸人 LINE-1 レトロトランスポジション検出法の確立と分子機序の解明 第

- 31回日本分子生物学会、神戸、12月(2008)
- 3) 峯本 譲、中井智嘉子、星野重樹、石坂幸人 HIV-1 アクセサリー遺伝子産物 Vpr のクロマチン局在の意義と機序 第31回日本分子生物学会、神戸、12月(2008)
 - 4) 岩部幸枝、田中恵子、石坂幸人、佐多徹太郎、徳永研三 抗ウイルス宿主因子 BST-2 及びその阻害因子 HIV-1 Vpu の機能解析 第31回日本分子生物学会、神戸、12月(2008)

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願番号 PCT JP2008/054563

発明人；石坂幸人、長谷川正勝、野原 聡

発明の名称：「新規核移行ペプチド」

出願人：国立国際医セ、名糖産業株式会社

出願日；2008/3/6

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

9. ヒト宿主因子 APOBEC3G の HIV-1 感染病態制御と HIV-1 Vif による回避機構の解明

研究分担者 徳永 研三 国立感染症研究所感染病理部 主任研究官

研究協力者 岩部 幸枝 (国立感染症研究所感染病理部エイズ予防財団 RR)

研究要旨 APOBEC3G の活性を相殺する HIV-1 Vif は、サブタイプにより遺伝子多様性があることから、昨年度までに、我々はその生物学的活性の違いを検討した。その結果、Vif の抗 APOBEC3G 活性はサブタイプ間で異なり、特にサブタイプ C 由来 Vif (C-Vif) が高い抗 APOBEC3G 活性を持つこと、更に vif 遺伝子の組換え実験の結果、C-Vif の N 末に責任領域があることを見出した。そこで本年度は、C-Vif 蛋白の高い抗 APOBEC3G 活性が、どのようなメカニズムによって規定されているかを検討した。その結果、C-Vif の N 末領域が有する APOBEC3G への強い結合親和性が、高い抗 APOBEC3G 活性を規定していることが明らかになった。また今回 APOBEC3F の抗ウイルス活性についても検証したところ、内在性の発現レベルでの抗 HIV-1 活性において、APOBEC3F の機能的役割は低い可能性が考えられた。

A. 研究目的

ヒトが自然免疫として備えている強力な抗レトロウイルス蛋白 APOBEC3G に対抗する HIV-1 のウイルス蛋白は Virion infectivity factor (Vif) であり、APOBEC3G をプロテアソーム分解あるいは翻訳阻害することにより、逆転写中のウイルスゲノムを守る機能を持っている。現在までの世界レベルでの Vif/APOBEC3G 研究は、殆ど全てがサブタイプ B 由来 Vif のみを用いて行われてきた。この点を重視して一昨年度及び昨年度は、遺伝子レベルで多様性の高いサブタイプ別臨床分離株由来 Vif が、異なる抗 APOBEC3G 活性を示すか否を解析した。その結果、HIV-1 Vif 蛋白の抗 APOBEC3G 活性はサブタイプ間で異なり、特にサブタイプ C 由来 Vif (C-Vif) で特に顕著であったこと、またサブタイプ B・C 間で vif 遺伝子の組換えを行った結果、C-Vif の高活性規定領域が N 末端側にあることを明らかにした。本研究では、N 末に責任領域を有する C-Vif 蛋白の抗 APOBEC3G 活性が、どのようなメカニズムにより規定されて

いるのかについて解明するため、Vif 自身のポリユビキチン化活性、あるいは一部の報告にある Vif の APOBEC3G 翻訳抑制、または APOBEC3G、及び APOBEC3G のプロテアソーム分解に関わる宿主因子 Cullin5、ElonginC とのそれぞれの結合活性、更に細胞内局在性について、B-Vif、C-Vif 及びキメラ Vif 間で比較検討した。また同時に、抗 HIV-1 活性を持つもう一つの APOBEC3 ファミリー蛋白である APOBEC3F に対するこれらサブタイプ別 Vif 蛋白の抑制活性の検証を試みた。

B. 研究方法

i) 発現プラスミド DNA の構築

ヒト CD4 陽性 T リンパ球細胞株 H9 及び Molt-4 より、RNAqueous Kit (アンピオン社) を用いてトータル RNA を単離した。Titan One Tube RT-PCR Kit (ロシュ社) を用いて、H9 RNA を鋳型に ElonginC 遺伝子の、また Molt-4 RNA を鋳型に Cullin5 遺伝子の、cDNA 合成及び PCR 増幅を行った。更にその PCR 産物を Expand

High Fidelity DNA Polymerase (ロシユ社) によって再増幅した後、KpnI/XhoI (ElonginC) または BsiWI/XhoI (Cullin5) で制限酵素処理を行い、ElonginC フラグメントは、予め3回反復ヘマグルチニン (HA)・タグを付加した pCAGGS に、Cullin5 は T7 エピトープ (T7e) タグを付加した pCAGGS に挿入して、HA-ElonginC 発現ベクター及び T7e-Cullin5 発現ベクターを作製した。また APOBEC3G の T7e タグ付き発現ベクターも構築した。作製した各発現ベクターの遺伝子配列は ABI3130 シークエンサー (ABI 社) により確認した。HA タグ付き APOBEC3G・APOBEC3F 発現ベクター、Flag タグ付き Vif-RRE 発現ベクター (キメラを含む)、及び Rev 発現ベクターについては昨年度に作製済みのものを用いた。HA タグ付きユビキチン発現ベクターは九州大学大学院薬学研究院細胞生物分野の藤田英明博士により分与された。

ii) *in vivo* ポリユビキチネーションアッセイ

Flag タグ付き野生型及びキメラ Vif-RRE 発現ベクター、Rev 発現ベクター、そして HA タグ付きユビキチン発現ベクターを FuGENE 6 (ロシユ社) を用いて 7×10^5 個の 293T 細胞にトランスフェクションした。42 時間後に MG-132 を添加、その6時間後に細胞を PBS で洗浄、細胞溶解液を加えて遠心した上清にプロテイン A アガロースビーズ (Sigma) を加え、4°C、1 時間インキュベーションした。その上清に抗 Flag M2 アフィニティゲル (シグマ社) を加え、4°C、1 時間インキュベーション、細胞溶解液により 5 回洗浄、SDS サンプルバッファーを加えたものを、ウエスタンブロッティング用サンプルとした。98°C で 5 分間ボイルした後、12.5% の SDS ポリアクリルアミドゲルにアプライして電気泳動を行った。泳動後のゲルをニトロセルロース膜に転写後、膜を抗 HA ポリクローナル抗体 (シグマ社) で一次抗体処理、次にペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体で二次抗体処理して、ECL (GE ヘルスクエア社) により化学発光を行い、LAS3000 イメージアナライザー (富士フィルム社) で、ユビキチン化 Vif 蛋白をそれぞれ検出した。

iii) *in vitro* トランスレーション

TNT T7 Quick Coupled Transcription/

Translation Systems (プロメガ社) と Transcend tRNA (プロメガ社) により、まず Flag タグ付き野生型及びキメラ Vif-RRE 発現ベクターを用いて、90 分間の *in vitro* トランスレーションを行った。合成された Vif 蛋白を、HA タグ付き APOBEC3G 発現ベクターを用いた次の反応液に加えて 45-90 分間の *in vitro* トランスレーションを行った。合成された蛋白を SDS-PAGE により分離した後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで処理して、ECL により化学発光を行い、LAS3000 にて、*in vitro* 合成蛋白をそれぞれ検出した。

iv) 免疫沈降法

HA-ElonginC 発現ベクター + T7e-Cullin5 発現ベクター、あるいは T7e-APOBEC3G を、Flag タグ付き野生型及びキメラ Vif-RRE 発現ベクターと Rev 発現ベクターと共に、FuGENE 6 を用いて 7×10^5 個の 293T 細胞にトランスフェクションした。42 時間後に MG-132 を添加、その6時間後に細胞を PBS で洗浄、細胞溶解液を加えて遠心した上清にプロテイン A アガロースビーズを加え、4°C、1 時間インキュベーションによるプレクリアを行った。その上清に抗 Flag M2 アフィニティゲルを加え、4°C、1 時間インキュベーション、細胞溶解液により 5 回洗浄、SDS サンプルバッファーを加えたものを、ウエスタンブロッティング用サンプルとした。98°C で 5 分間ボイルした後、12.5% の SDS ポリアクリルアミドゲルにアプライして電気泳動を行った。泳動後のゲルをニトロセルロース膜に転写後、膜を抗 HA ポリクローナル抗体、または抗 T7e 抗体 (Novagen 社) で一次抗体処理、次にペルオキシダーゼ標識抗ウサギまたは抗マウス抗体で二次抗体処理して、ECL により化学発光を行い、LAS3000 にてそれぞれ検出した。

v) 間接蛍光抗体法

直径 13mm のグラスカバースリップ (ヌンク社) 上の HeLa 細胞に、FuGENE 6 を用いて Flag タグ付き野生型及びキメラ Vif-RRE 発現ベクター及び Rev 発現ベクターをトランスフェクションした。24 時間後に 4% パラフォルムアルデヒド固定、0.2% Triton X-100 処理後、抗 Flag M2 モノクローナル抗体 (シグマ社) で一次抗体処理、Cy3 標識抗マウス抗体 (Jackson

Immunoresearch Laboratory 社) で二次抗体処理して、FV-1000 共焦点顕微鏡 (オリンパス社) により観察した。

vi) リアルタイム RT-PCR

APOBEC3G または APOBEC3F 発現ベクター、Vif 発現ベクター、水疱性口炎ウイルス G 蛋白 (VSV-G) 発現ベクター-pHIT/G、そして、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として有する *vifenv* 変異 HIV-1 プロウイルス DNA pNL-Luc-E(-)F(-) を、FuGENE6 を用いて 7×10^5 個の 293T 細胞にトランスフェクションした。RNAqueous Kit (アンピオン社) を用いて、この 293T 及び 3 人のドナー由来の末梢血リンパ球よりトータル RNA を単離、TURBO DNA-free (アンピオン社) により余剰の DNA を消化した。各トータル RNA と以下のプライマーとプローブ、QuantiTect Multiplex RT-PCR (キアゲン社) を用いて ABI 7900HT (ABI 社) による Real-time RT-PCR で APOBEC3G 及び APOBEC3F の mRNA 発現を検討した。APOBEC3G、センス、5'-GGC CGA GGA CCC GAA GG -3'/ アンチセンス、5'-TTC TGA CAC AGG CTG CGA AG-3'; プローブ、6-carboxy-fluorescein (FAM)-5'-CCC TGA CCA TCT TCG TTG CCC GCC-3'-black hole quencher 1 (BHQ1): APOBEC3F、センス、5'-TGC CTT GGT ACA AAT TCG ATG AC-3' / アンチセンス、5'-AGT GGA AGT AGA ATA TGT GTG GAT AC-3'; プローブ、FAM-5'-ATT CCT GCA CCG CAC GCT AAA GGA GA-3'-BHQ1。またハウスキーピング遺伝子である Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) の mRNA の定量により APOBEC3G 及び APOBEC3F の mRNA コピー数を標準化した。プライマーとプローブは以下の通り。センス; 5'-GAT GCT GGC GCT GAG TAC G-3'/ アンチセンス; 5'-GCA GAG ATG ATG ACC CTT TTG G-3'、プローブ; TETTM-5'-TGG AGT CCA CTG GCG TCT TCA CCA CC-3'-BHQ1。

vii) ウイルス感染性アッセイ

vi) の実験でトランスフェクションした 293T 細胞を、16 時間後に PBS で洗浄して、フレッシュな培養液を加え、その 32 時間後に余剰の DNA を除去する為に培養上清中に DNase 75 U/ml 及び MgCl₂ 10 mM を添加して、30 分

インキュベート、培養上清を感染実験用に回収した。HIV-1 レポーターウイルスの培養上清を一部分注して、p24 ELISA Kit (レトロテック社) によりウイルスの定量を行った。ウイルス量を 1 ng p24 量のウイルスを均一化した後、 1.75×10^4 個/ウェルで 96 ウェルプレートに蒔いた 293T 細胞に感染させた。48 時間後に 100 μ l のライシスバッファー (プロメガス社) を加えて細胞を溶解した。そのうちの 20 μ l を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、感染性を定量化した。

C. 研究結果

1. Vif 蛋白の強い抗 APOBEC3G 活性を規定する機能の同定

1) Vif 蛋白のポリユビキチネーション活性の比較検討

昨年度明らかにした、N 末にある C-Vif の抗 APOBEC3G 活性規定領域が B-Vif より強い活性を示すのは、どういった機能の促進によるものかを検討する為に、まず我々は、C-Vif の N 末でリジン残基が一つ多いことがユビキチン化活性の上昇に繋がっている可能性を考え、ポリユビキチネーションアッセイを行った。ユビ

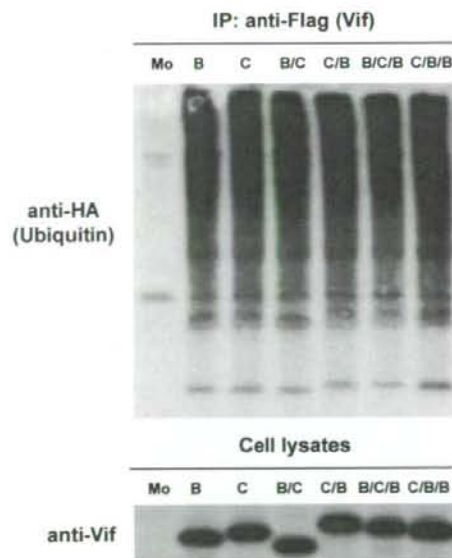


図1. Vif蛋白のポリユビキチネーション活性

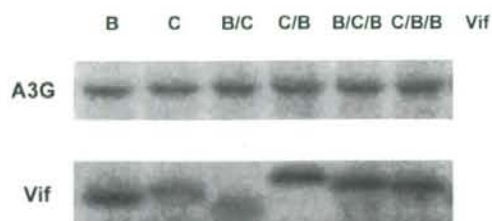


図2. Vif蛋白のAPOBEC3G 翻訳阻害効果

キチン発現ベクターを、Flag タグ付き野生型及びキメラ Vif-RRE 発現ベクターと Rev 発現ベクターと共に 293T 細胞にトランスフェクションした後、抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降反応を行い、Vif 蛋白と共沈したユビキチンに対する抗体を用いたウエスタンブロット法により、Vif のユビキチン化を比較した。図 1 に示すように、B-Vif、C-Vif、キメラ Vif 蛋白全てが同程度のユビキチン化を示すことから、ユビキチン化の程度が C-Vif の高活性を規定するのではないことが分かった。

2) Vif 蛋白による APOBEC3G の翻訳阻害効果の検証

次に、以前の論文で、Vif 蛋白は APOBEC3G を翻訳段階で抑えることが報告されている (Stopak, et al. Mol. Cell 12: 591-601, 2003) ことから、C-Vif が B-Vif 蛋白に比べて APOBEC3G への強い抑制効果を示すか否かを、*in vitro* トランスレーションにより検証した。まず予め Vif 発現ベクターを用いて *in vitro* の翻訳を行い、

APOBEC3G 発現ベクターによる *in vitro* 翻訳を行う際に、作製した Vif 蛋白を添加し、APOBEC3G の翻訳効率を比較した。B-Vif、C-Vif、キメラ Vif 蛋白、及び陰性対照全てにおいて同程度の APOBEC3G の翻訳が認められた (図 2) ことから、Vif 蛋白は APOBEC3G 翻訳に影響しないことが明らかになった。

3) Vif 蛋白のユビキチンライゲース複合体構成蛋白との結合親和性比較

Vif 蛋白は、APOBEC3G のプロテアソーム分解において、ユビキチンライゲース複合体を形成するが、その際に Vif 自身は、APOBEC3G との直接結合以外に、Cullin5 及び ElonginC と結合することが知られている (図 3 右)。それぞれのユビキチンライゲース複合体構成蛋白との結合親和性において、C-Vif が B-Vif と異なるか否かを検討するために、B-Vif、C-Vif、またはキメラ Vif-RRE 発現ベクターと Rev 発現ベクターと共に、Cullin5 及び ElonginC 発現ベクターを、293T 細胞にコトランスフェクションして、48 時間後にその細胞溶解液を用いて免疫沈降反応を行った。B-Vif、C-Vif、キメラ Vif 蛋白全て、Cullin5 蛋白 (図 3 左上) 及び ElonginC (図 3 左下) と同程度の結合レベルを示した。従って、C-Vif の高活性を規定するのは、ユビキチンライゲース複合体構成蛋白との結合親和性ではないことが明らかになった。

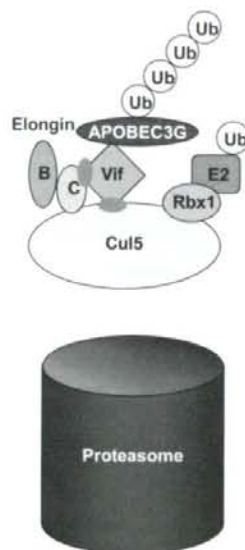
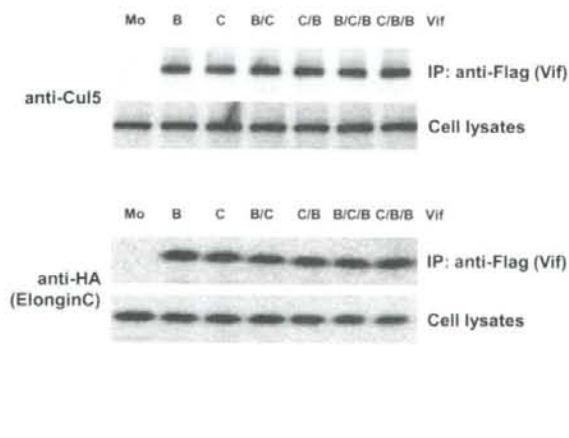


図3. Vif 蛋白のユビキチンライゲース複合体構成蛋白との結合親和性

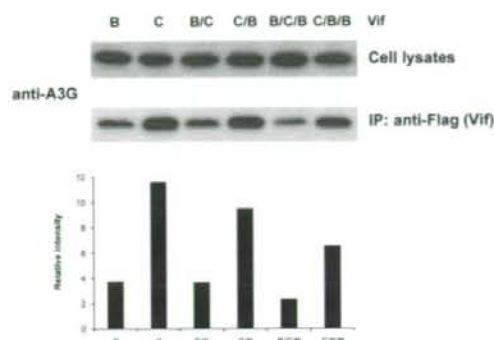


図4. Vif蛋白のAPOBEC3Gとの結合親和性

4) Vif 蛋白の APOBEC3G との結合親和性比較

B-Vif、C-Vif、キメラ Vif 蛋白全てが、ユビキチンライゲース複合体構成蛋白、Cullin5 及び ElonginC との同レベルの結合親和性を示したことから、最後に Vif 蛋白と APOBEC3G 蛋白そのものとの結合親和性の比較を試みるため、研究結果 3) で行った実験と同様、Vif 発現ベクターと APOBEC3G 発現ベクターのコトランスフェクション後の免疫沈降法により解析した。図 4 に見られるように、C-Vif 及び C-Vif の N 末を有するキメラ Vif は、その高い抗 APOBEC3G 活性とほぼパラレルに、APOBEC3G に対する強い結合親和性を示した。

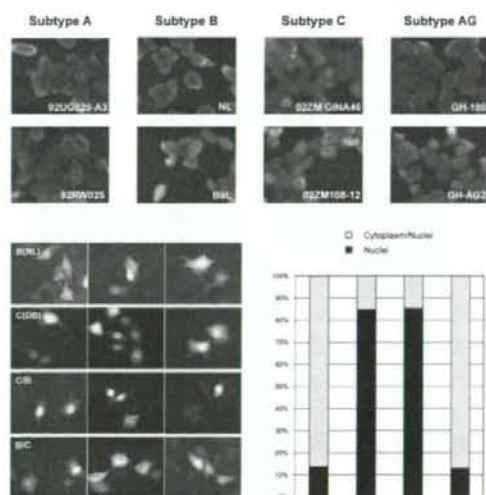


図5. Vif蛋白の細胞内局在性

この結果より、C-Vif の N 末が B-Vif のそれに比べて、APOBEC3G への強い結合力を有することが、抗 APOBEC3G 活性の増強に繋がっていることが明らかになった。

5) Vif 蛋白の細胞内局在性

これまでに、Vif は細胞質に局在することが複数のグループにより報告されてきたが、それらはどれもサブタイプ B 由来の Vif のみで行われてきた実験結果である。今回我々は、Non-B サブタイプ由来 Vif、特に抗 APOBEC3G 活性の強い C-Vif が、異なる細胞内局在性を示すかについて調べるため、まず、サブタイプ A、B、C、及び CRF_02AG それぞれの代表 2 株ずつに由来する Vif 発現ベクターの HeLa 細胞へのトランスフェクションを行い、間接蛍光抗体法により検証した。その結果、A 及び CRF_02AG 由来 Vif は、B-Vif 同様、主に細胞質に局在する一方で、C-Vif のみで例外的に核内に局在する像が観察された (図 5 上)。次にキメラ Vif 蛋白発現ベクターを用いて同様の実験を行ったところ、実際に、B-Vif の N 末を有するキメラ Vif 蛋白は、B-Vif と同様、細胞質局在を示したのに対し、C-Vif の抗 APOBEC3G 活性を規定している C-Vif の N 末を有するキメラ Vif 蛋白は、C-Vif と同じく核局在を示した (図 5 下)。このことから C-Vif の高い抗 APOBEC3G 活性は、その核局在性と相関する可能性が示唆された。

6) APOBEC3F の内在性レベルの発現における抗ウイルス活性の検証

APOBEC3G と同じく抗 HIV-1 活性を有する APOBEC3 ファミリー蛋白に、APOBEC3F があるが、サブタイプ別 Vif 蛋白の APOBEC3F に対する抑制活性はどうであるかについて、検証を試みた。昨年度までに報告した通り、これまでのウイルス感染性アッセイ系においては、発現ベクターを用いた全ての発現レベルは過剰発現ではなく、Vif 発現の場合は、全長プロウイルス DNA のトランスフェクションにより physiological に発現する Vif の発現量での感染性レベルと、Vif 発現ベクターを段階希釈してトランスフェクションして発現した時の感染性レベルの比較に基づいて (図 6 上)、また APOBEC3G の発現レベルの場合は、3 人のドナー由来の末梢血リンパ球における内在性の

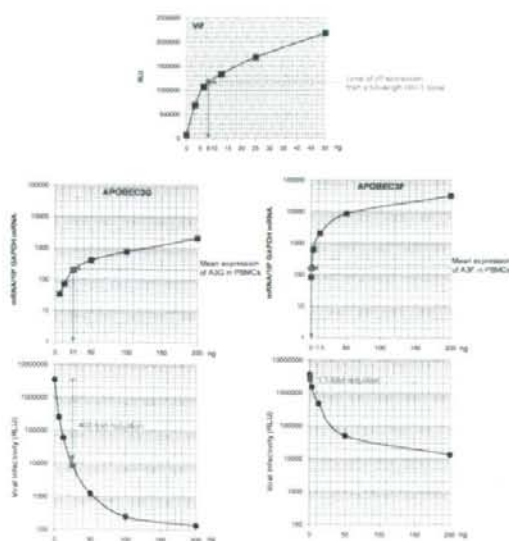


図6. 内在性発現レベルでの APOBEC3G・3F の抗ウイルス活性

発現レベルと、段階希釈して 293T 細胞にトランスフェクションした APOBEC3G 発現ベクターからの発現レベルを、リアルタイム RT-PCR により定量比較して決定したコピー数に基づき (図 6 中央左)、用いるプラスミド DNA 量を決定してきた。今回 APOBEC3F についても同様に、3 人のドナー由来の末梢血リンパ球における内在性の発現レベルをリアルタイム RT-PCR にて測定、プラスミド DNA 量を算出した (図 6 中央右)。次にそのプラスミド量における Vif マイナスの HIV-1 に対する感染性の抑制レベルを検討したところ、APOBEC3G では 400 倍以上の感染抑制を示す (図 6 左下) のに対し、APOBEC3F では、わずか 1.5 倍の抑制レベルであった (図 6 右下)。APOBEC3G に比べて極めて低い感染抑制効果であるがゆえに、実際、APOBEC3F 発現下において、各サブタイプ由来 Vif 蛋白を発現させた場合でも、感染性に殆ど差は認められなかった (データ省略)。

D. 考察

最終年度である本年度は、昨年度までに明らかになった、N 末に責任領域を有する C-Vif の高い抗 APOBEC3G 活性が、どの様なメカニズムにより規定されているかについて検討した。

まず、B-Vif、C-Vif、及び B・C 間で組換えたキメラ Vif 蛋白の Vif 自身のポリユビキチン

化活性をポリユビキチン化アッセイにより、また、APOBEC3G 翻訳レベルへの影響を *in vitro* translation により、それぞれ検討したところ、どちらも差異は認められなかった。後者については、どの Vif 蛋白発現下においても、対照として GFP 発現ベクターを用いた *in vitro* 翻訳産物を APOBEC3G の翻訳反応に加えた場合 (データ省略) と比較して、APOBEC3G の翻訳レベルは同程度であった。更に、前出の Stopak らによる論文以降、それをサポートする報告がないことから、Vif はそもそも APOBEC3G の翻訳を阻害しない可能性が考えられた。

次に、各 Vif 蛋白と、ユビキチンライゲース複合体構成蛋白である Cullin5、及び ElonginC との相互作用について、それぞれプロテアソーム阻害剤を用いて免疫沈降法を行った結果、Cullin5 および ElonginC と各 Vif 蛋白は同程度に結合していた。実際、Cullin5 と ElonginC との結合に関わる領域は、Vif 蛋白の SOCS-box (SLQ x LA モチーフ) 及び Zinc 結合 HxCx17-18Cx3-5H モチーフ/LPx4L モチーフで、いずれも C 末端側に位置するため、N 末端側にその高い抗 APOBEC3G 活性が規定される C-Vif または、C-Vif の N 末を有するキメラ Vif が、Cullin5 及び ElonginC に対して、B-Vif と同レベルで結合することは矛盾しない。

一方で、APOBEC3G との直接的な相互作用については、C-Vif 及び C-Vif の N 末を有するキメラ Vif で増強されていることが判明し、N 末に責任領域を有する C-Vif の高い抗 APOBEC3G 活性は、その APOBEC3G への結合親和性の強さにより規定されることが明らかになった。実際、近年明らかになってきた Vif の APOBEC3G 結合領域は、N 末に複数存在していることから、この領域の C-Vif におけるアミノ酸の違いが、APOBEC3G への結合親和性を増強している可能性は十分考えられる。

更に、各 Vif 蛋白の細胞内局在性を間接蛍光抗体法にて解析したところ、B-Vif ではこれまで報告されてきた様な細胞質局在性が認められるのに対し、C-Vif 及び C/B-Vif では、一部の臨床分離株由来 Vif で報告されている核移行シグナルを持たないに関わらず、核局在が認められた。APOBEC3G は細胞質蛋白であり、当然、Vif が APOBEC3G と邂逅して不活化 (プ

ロテアソーム分解)する場所も細胞質である為、高い抗 APOBEC3G 活性を有する C-Vif 蛋白が核移行能を持つこと自体、矛盾した性質の様に考えられる。一方で、昨年、Vif がブレインテグレーション複合体に含まれ、逆転写効率を高めていることが報告 (Carr et al. *Virology* 372:147-156, 2008) されたことから、この機能に C-Vif の核移行能が寄与している可能性が考えられた。そこで、APOBEC3G 非存在下で、B-Vif または C-Vif (対照として空ベクター) を過剰発現させて、VSV-G シールドウイルスを作製した時の感染性比較を行ったところ、この条件下での感染レベルは Vif の有無に依らないことが判った。従って、ウイルス粒子中に取り込まれた Vif が、感染後に逆転写に貢献している可能性は低い、と我々は結論付けた。

これまでの結果より、C-Vif の高い抗 APOBEC3G 活性能は、APOBEC3G への強い結合力に起因していることが明らかになると共に、Vif の抗 APOBEC3G 活性と細胞内局在性との相関性が示唆された。現在、C-Vif 蛋白の核移行能が APOBEC3G 機能抑制の増強にどの様に関与するかについて更に解析を進めている。

最後に、内在性の発現レベルにおける APOBEC3F の抗 HIV-1 活性を検証すべく、APOBEC3F 発現ベクターを段階希釈して 293T 細胞にトランスフェクションした時のコピー数を、3 人のドナー由来の末梢血リンパ球における内在性の発現レベルと比較し、その時のプラスミド量における Vif マイナス HIV-1 の感染抑制レベルを検討した。その結果、APOBEC3G はその内在性発現レベルにおいて 400 倍以上の感染抑制を示すに対し、APOBEC3F のそれはわずか 1.5 倍であった。この結果から、*in vivo* での発現レベルにおける HIV-1 への感染抑制において、APOBEC3F は APOBEC3G ほどの機能的役割を果たしていない可能性が示唆された。

E. 結論

1) B-Vif、C-Vif および B・C キメラ Vif 蛋白間で、ポリユビキチン化活性、APOBEC3G 翻訳レベル、及びユビキチンライゲース複合体構成蛋白 Cullin5、ElonginC との相互作用におけ

る差異は認められなかった。

2) N 末に責任領域を有する C-Vif の高い抗 APOBEC3G 活性は、その APOBEC3G への結合親和性の強さにより規定されることが分かった。

3) C-Vif の高い抗 APOBEC3G 活性とその核局在性との相関性が示唆された。その生物学的意義については現時点で不明である。

4) 内在性の発現レベルにおける APOBEC3F の抗ウイルス活性は、APOBEC3G のそれと比較して非常に低いことから、*in vivo* での HIV-1 への感染抑制において、APOBEC3F の機能的役割は低い可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitagawa, Y., Kameoka, M., Shoji-Kawata, S., Iwabu, Y., Mizuta, H., Tokunaga, K., Fujino, M., Natori, Y., Yura, Y. and Ikuta, K. Inhibitory function of adapter-related protein complex 2 alpha 1 subunit in the process of nuclear translocation of human immunodeficiency virus type 1 genome. *Virology* 373:171-180, 2008.
- 2) Utachee, P., Jinnopat, P., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Chandimal de Silva, U., Nakamura, S., Siripanyaphinyo, U., Wichukchinda, N., Tokunaga, K., Yasunaga, T., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K., Auwanit, W., and Kameoka, M. Genotypic Characterization of CRF01_AE env Genes Derived from Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients Residing in Central Thailand. *AIDS Res. Hum. Retroviruses in press.*
- 3) Utachee, P., Jinnopat, P., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Chandimal de Silva, U., Nakamura, S., Siripanyaphinyo, U., Wichukchinda, N., Tokunaga, K., Yasunaga, T., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K.,

Auwanit, W., and Kameoka, M. Phenotypic studies on recombinant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) containing CRF01_AE env gene derived from HIV-1-infected patient residing in central Thailand. *Microbes Infect.* *in press*.

2. 学会発表

- 1) Nakai-Murakami Chikako, Yuzuru Minemoto, Kenzo Tokunaga, Mitsuru Konishi, Tetsutaro Sata, Yukihito Ishizaka: An association between HIV-1 Vpr and Snf2h, a chromatin remodeling factor, facilitates viral integration into pericentromeric heterochromatin. 第9回熊本エイズセミナー(熊本) 2008.9.
- 2) 亀岡正典、Piyamat Jinnopat、Panasda Isarangkura-na-ayuthaya、Piraporn Utachee、北川友紀子、Udayanga Chandimal de Silva、Uamporn Siripanyaphinyo、亀岡陽子、徳永研三、Pathom Sawanpanyalert、Wattana Auwanit、生田和良: CRF01_AE型 Gagがプロテアーゼ阻害剤に対するウイルスの薬剤感受性を低下させる分子機構について。第56回日本ウイルス学会総会(岡山) 2008. 10.
- 3) Piraporn Utachee、Piyamat Jinnopat、Panasda Isarangkura-na-ayuthaya、Udayanga Chandimal de Silva、中村昇太、Uamporn Siripanyaphinyo、Nuanjun Wichukchinda、徳永研三、安永照雄、Pathom Sawanpanyalert、生田和良、Wattana Auwanit、亀岡正典: Genotypic and phenotypic studies on CRF01_AE env clones derived from HIV-1-infected patients residing in Thailand. 第56回日本ウイルス学会総会(岡山) 2008. 10.
- 4) 岩部幸枝、田中恵子、石坂幸人、佐多徹太郎、徳永研三: ウイルス放出抑制因子 BST-2とその機能を阻害する HIV-1 Vpu 蛋白の相互作用。第56回日本ウイルス学会総会(岡山) 2008. 10.
- 5) 岩部幸枝、藤田英明、木ノ本正信、巽正志、Juan Fernando Arias、志村まり、石坂幸人、生田和良、佐多徹太郎、徳永研三: HIV-1 Vifの抗 APOBEC3G 活性と細胞内局在性との相関性。第56回日本ウイルス学会総会(岡山) 2008. 10.
- 6) 岩部幸枝、田中恵子、石坂幸人、佐多徹太郎、徳永研三: 抗ウイルス宿主因子 BST-2及びその阻害因子 HIV-1 Vpuの機能解析。第31回日本分子生物学会(神戸) 2008. 12.
- 7) 志村まり、豊田雄介、木ノ本正信、徳永研三、依田欣哉、柳田充弘、佐多徹太郎、石坂幸人: HIV-1 Vprによる姉妹染色分体の早期分離異常。第31回日本分子生物学会(神戸) 2008. 12.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

10. HIV-1の粒子形成を司る宿主因子の同定とその分子機構の解析

研究分担者 梁 明秀 国立感染症研究所エイズ研究センター グループ長

研究要旨 HIV感染症の成立には宿主タンパク質とHIVタンパク質間の物理的かつ機能的な相互作用が必須であり、その相互作用はウイルスの増殖・生活環、および病原性発現機構に重要な役割を果たす。今回我々はヒト全長cDNAライブラリーおよび無細胞タンパク質合成系の技術を用いて、HIV-1Gagタンパク質と機能的に相互作用する宿主因子の同定を試みた。その結果BCA2/Rabring7が新規のGag結合タンパク質であることを見出した。BCA2/Rabring7はHIV-1抑制因子であるtetherin/BST-2/CD317の細胞内ドメインに結合し、tetherinと協調して細胞膜に繫留されたHIV粒子の細胞内への取り込みと分解を促進することが明らかになった。

A. 研究目的

HIVをはじめとするウイルスは宿主のメンブレントラフィックや細胞骨格介した細胞内輸送系を利用して、細胞内に侵入をしたり細胞から出芽したりするものが多数あることが知られている。また、この事実はウイルスが感染した細胞であっても、ウイルス粒子タンパク質の細胞内輸送系や出芽系を妨害することにより、ウイルスの複製や病原性が抑制される可能性を示唆するものである。したがって細胞内におけるウイルスタンパク質トラフィックや安定化の研究は、基礎生物学の研究であると同時に、AIDSを含めた多くのウイルス関連疾患の病態を理解し、その治療法の確立にも繋がる医学・生命科学研究でもある。本研究課題ではHIVの粒子形成に関与する宿主因子を同定し、HIV粒子形成の分子機構を解明するとともに、新規の治療標的を明らかにすることを目的とする。HIV-1タンパク質と機能的に相互作用する宿主因子について、小麦胚芽を用いた無細胞タンパク質合成系および化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティーホモジニアスアッセイを用いて同定する。

B. 研究方法

HIV-1粒子タンパク質(Gagタンパク質)と

機能的相互作用する宿主因子を無細胞タンパク質合成系および化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティーホモジニアスアッセイを用いて同定する。同定後は、当該因子とHIV-1複製や病態との関連について、細胞株または動物モデル個体を用いて検証する。また、高感度質量分析計を用いて、細胞内における相互作用の有無や役割について考察する。機能的な意義が確認された因子については、本アッセイ系をプラットフォームにして、HIV-1宿主因子複合体の形成を特異的に抑制する阻害分子・薬剤のスクリーニングを行う。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所研究等倫理規程を遵守し、倫理委員会の承認の下に研究を進める。また、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律、病原体取扱規程等を遵守する。具体的には、国立感染症研究所病原体安全管理規程及び病原体移動ガイドラインに従い、バイオリスク管理委員会の承認の元の実験を行う。

C. 研究結果

最近我々は上記の手法を用いて、HIV-1Gagと直接相互作用し、HIV感染細胞において成熟

HIV 粒子の形成を負に制御する宿主因子として BCA2/ Rabring7 を新たに同定した。BCA2 はメンブレントラフィック関連ユビキチンリガーゼであり、Rab7 と協調して細胞膜上の EGFR などの増殖因子受容体の細胞内への取り込みとライソソームでの分解を制御する因子であることが知られている。vpu 依存性の HIV 粒子放出能を持つ細胞 (tetherin 陽性細胞) では BCA2 を過剰発現させると粒子産生が減弱したが、vpu 非依存性の HIV 粒子放出能を持つ細胞 (tetherin 陰性細胞) ではその抑制効果が認められなかった。一方で、vpu 非依存性の HIV 粒子放出法を持つ HOS 細胞に tetherin を比較的低いレベルで発現させると、BCA2 はウイルス粒子形成を有意に阻害した。また、vpu 依存性の HIV 粒子放出能を持つ HeLa 細胞で BCA2 を siRNA によりノックダウンすると、ウイルス放出が促進された。また BCA2 を強制発現した HeLa 細胞にライソソーム阻害剤を添加すると、ウイルス粒子放出は抑制されたままであったが、細胞内の Gag タンパク質量は著しく増加した。また、共沈実験で BCA2-tetherin-Gag の結合が確認され、蛍光免疫染色により細胞膜上での共局在が観察された。以上の結果から、BCA2 は tetherin と協調して、細胞膜上で繫留された未放出ウイルス粒子の細胞内への取り込みと、ライソソームへのターゲティングおよび分解を促進することが示唆された。実際に、BCA2 の細胞内局在は Gag 依存的な変化することが観察され、tetherin によって繫留された未放出ウイルス粒子の後始末に BCA2 が関わる可能性が高く、細胞内ウイルス動態を制御する新たな宿主因子である可能性が示唆された。

D. 考察

以前より $\text{INF}\alpha$ が HIV-1 の出芽を阻害し、その効果は vpu により拮抗阻害されることが知られていた。実際に vpu を欠損した HIV-1 は $\text{INF}\alpha$ により顕著に複製が抑制される。電子顕微鏡による観察では、ウイルス産生が抑制されている細胞表面に、ぶどうの房状に成熟/未成熟ウイルス粒子が融合したり、細胞の表面に吸着した像が見られていた。最近の報告により、

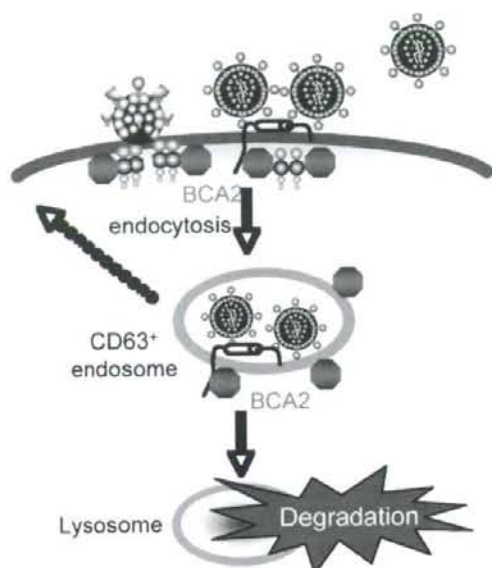


図1. BCA2によるHIV粒子抑制機構

この細胞表面上でウイルス粒子を繋ぎ止める責任因子として、tetherin/CD317/BST-2 が同定された。Tetherin は $\text{INF}\alpha$ により発現が誘導される宿主因子で、通常はゴルジ体の膜上に局在しているが、HIV 感染に伴って細胞膜に移行してウイルス粒子を繫留する。一方で vpu は tetherin に結合し、tetherin の細胞膜への移送を阻害することで、ウイルス粒子の放出を促進する。Tetherin により繫留されたウイルス粒子はやがて宿主細胞のエンドサイトーシス機構で取り込まれ、細胞内のタンパク質分解系により消化されることが知られていたが、その詳細な分子機構や、それに関わる他の宿主因子については全く不明であった。本研究における我々の新規宿主因子 BCA2 発見は、繫留された未放出ウイルス粒子が宿主細胞によりいかに“処理”されるかについて、詳細な分子機構を初めて提示したことになり、ウイルス粒子の細胞内動態の新しいシナリオを加えるものとして注目される。

E. 結論

HIV 粒子形成の深く関与する新規の宿主因子として BCA2/ Rabring7 を同定した。BCA2 は新規の tetherin 結合タンパク質であり、かつ重要な restriction factor である可能性が高く、

今後のより詳細な機能解析が期待される。また、成熟 HIV 粒子の形成を阻止する有力な宿主因子である可能性があり、宿主因子を標的とした新しい抗ウイルス薬のターゲットとして、HIV 感染患者の発症予防や薬剤耐性患者に対する重症化防止に役立つ可能性がある。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. 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 U S A. 2008, 105(1):294-9.

2. 学会発表

- 1) 西真由子、山本直樹、青木一郎、梁明秀：SOCS1 は HIV-1 Gag タンパク質の細胞内輸送を促進する 第 27 回分子病理学研究会 平成 20 年 8 月 2~3 日、湘南国際村センター
- 2) Kenji Ohba, Akihide Ryo, Kazuo Terashima, Naoki Yamamoto : Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. 第 8 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、平成 20 年 9 月 7 日~11 日、兵庫県立淡路夢舞台国際会議場
- 3) Akihide Ryo, Naoki Yamamoto : Identification of host factors required for HIV-1 Gag trafficking. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Sep.18-19, 2008, Aso Resort Grand Vrio Hotel. (第 9 回熊本エイズセミナー、平成 20 年 9 月 18~19 日、阿蘇リゾート グランヴィリオホテル)
- 4) Kenji Ohba, Akihide Ryo, Kazuo Terashima,

Naoki Yamamoto : Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Sep.18-19, 2008, Aso Resort Grand Vrio Hotel. (第 9 回熊本エイズセミナー、平成 20 年 9 月 18~19 日、阿蘇リゾート グランヴィリオホテル)

- 5) Shoukichi Takahama, Akihide Ryo : Atypical protein kinase C (aPKC), a cell polarity regulating kinase, phosphorylates HIV-1 Gag. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Sep.18-19, 2008, Aso Resort Grand Vrio Hotel. (第 9 回熊本エイズセミナー、平成 20 年 9 月 18~19 日、阿蘇リゾート グランヴィリオホテル)
- 6) Akihide Ryo : Use of Cell-Free Protein Synthesis System in HIV/AIDS Research. PIM(Protein Island Matsuyama) International Symposium 2008, Sep. 25-27, 2008, Matsuyama. Sep. 26 The 6th Matsuyama International Symposium on Cell-free Sciences (第 6 回無細胞化学松山国際シンポジウム、松山全日空ホテル本館 4 階ダイヤモンドホールルーム)
- 7) Akihide Ryo : Detection and Identification of HIV-1 resistance and crucial host factors by cell-free protein production system. 4th International Infection Control Conference of Theodore Bilharz Research Institute (TBRI), Nov. 10-13, 2008, TBRI, Giza, Egypt.
- 8) 正岡崇志、梁明秀、巽正志、杉浦互、森下了、澤崎達也、山本直樹：酵素活性を指標とした新規 HIV プロテアーゼ薬剤耐性検査法の開発 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会 平成 20 年 11 月 26~28 日、大阪国際交流センター
- 9) 梁明秀、山本直樹：無細胞タンパク質合成系を用いた HIV/AIDS 研究の新たな展開 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会シンポジウム 7「実験室からの発信」平成 20 年 11 月 26~28 日、大阪国際交流センター
- 10) 宮川敬、梁明秀、大庭賢二、村上努、山本直樹：RING フィンガー蛋白質 BCA2 は

HIV-1 粒子産生を阻害する 第 22 回日本
エイズ学会学術集会・総会 平成 20 年 11
月 26～28 日、大阪国際交流センター

- 11) 仲宗根正、網康至、梁明秀、山本直樹：ウ
イルス曝露非感染サルモデル開発の試み
第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会
平成 20 年 11 月 26～28 日、大阪国際交流
センター

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし