

分担研究報告書：9. HIV インテグラーゼ機能制御の研究

HIV-1 ゲノムの逆転写および組み込み過程の新規制御機構

研究分担者：増田貴夫 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・免疫治療学分野・准教授  
研究協力者：西辻裕紀 (エイズ予防財団・リサーチレジデント)

**研究要旨** 本研究では、インテグラーゼの新規機能を探る為の、インテグラーゼと相互作用する宿主因子の機能解析から、作用点今後予想されるインテグラーゼ阻害剤に対する耐性変異の対処法のひとつとして、新規作用点を持つ薬剤開発に向けた基礎研究を展開することを目的とする。我々はこれまでに、HIV-1 インテグラーゼに結合し、逆転写過程をサポートする宿主因子 Gemin2 を同定し報告した。本研究では、インテグラーゼの Gemin2 との相互作用に関与するドメインの同定を種々の長さのインテグラーゼレコンビナント蛋白を用いて検討した。その結果、Gemin2 との結合に必要とされる、インテグラーゼの必須アミノ酸残基を中央領域およびC末端領域に見出した。また、これらの必須アミノ酸残基を含むペプチドは、インテグラーゼと Gemin2 の結合を阻害し、HIV-1 感染も阻害した。

**A. 研究目的** インテグラーゼの新たな機能作用点の解明は、今後予想される薬剤耐性変異の対処法としても重要課題といえる。本研究では、新規作用点を持つ薬剤開発に向けた基礎研究を展開することを目的とする。我々が同定した Gemin2 とインテグラーゼの相互作用様式を明らかにし、新規抗 HIV

**B. 研究方法** 1) His-タグを付加させた種々の長さのインテグラーゼレコンビナント蛋白を大腸菌にて発現させ、精製した。レコンビナント Gemin2 は GST-融合蛋白を大腸菌に発現させ、プレジジョン酵素により GST を切断させ精製した。2) 1) で調整した、各種インテグラーゼと Gemin2 相互作用をニッケルカラムを用いたブルダウンアッセイにより評価した。

3) 2) の結果より得られた情報をもとにアミノ酸点変異体を作製し、インテグラーゼと Gemin2 の相互作用への影響を評価した。

4) 3) の結果候補アミノ酸残基を含むペプチドを合成し、Gemin2 との直接結合能を評価した。5) 4) で合成したペプチドのインテグラーゼと Gemin2 との結合阻害活性および HIV-1 複製への影響も評価した。

(倫理面への配慮)  
該当事項無し。

**C. 研究結果** 1) Gemin2 との結合に関与する HIV-1 インテグラーゼ配列が中央部 (60-80) および C 末端領域 (230-260) に 2 カ所存在することを明らかにした (図 1)。

2) 点変異体を用いた解析結果から、インテグラーゼ内の Gemin2 との結合に必須なアミノ酸残基を同定した (図 2)。

3) 合成ペプチド (IN60-80) は、直接 Gemin2 と結合しうることが確認された (図 3)。

4) 合成ペプチド (IN60-80) は、インテグラーゼと Gemin2 の相互作用を効率よく阻害した (図 4)。

5) 合成ペプチド (IN60-80) は、ウイルス複製を阻害した (図 5)。

**D. 考察** インテグラーゼにおける Gemin2 相互作用に必須のアミノ酸を同定した。この領域を含むペプチドは、インテグラーゼと Gemin2 との結合を阻害し、かつウイルス複製も逆転写過程を阻害した。本研究結果より、インテグラーゼとける Gemin2 相互作用は HIV-1 複製において必須であることを明確に示すことができた。本研究結果は、インテグラーゼと宿主因子の相互作用を阻害することで、新規作用点をもつ HIV-1 阻害剤の開発における基盤となるものと考えられる。

E. 結論 Gemin2 との相互作用における HIV-1 インテグラーゼの責任アミノ酸を同定した。これらのアミノ酸を含む合成ペプチドはインテグラーゼと Gemin2 の相互作用を阻害しかつ HIV-1 感染も阻害した。インテグラーゼと Gemin2 の相互作用は HIV-1 感染に重要であることを確認し、新規阻害剤開発にも応用可能である。

#### F. 健康危険情報

特記すべきこと無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 増田貴夫 インテグラーゼと相互作用する宿主因子と HIV-1 複製制御. *The Journal of AIDS Research* 10:3-9, 2008.

2) Saitoh, Y., N. Yamamoto, M. Z. Dewan, H. Sugimoto, V. J. Martinez Bruyn, Y. Iwasaki, K. Matsubara, X. Qi, T. Saitoh, I. Imoto, J. Inazawa, A. Utsunomiya, T. Watanabe, T. Masuda, N. Yamamoto, and S. Yamaoka. Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood* 111:5118-29, 2008.

##### 2. 学会発表

1) Masuda T. Interaction of HIV-1 integrase with Gemin2 stimulates reverse transcription. 日米エイズ部会 2008 (東京)

2) Masuda T. Functional evaluation of the interaction between HIV-1 integrase and its interactor Gemin2. The 3rd International Conference on Retroviral Integrase 2008 (MA, USA)

3) 西辻裕紀, 高津哲, 多々良恵美, 神奈木真理, 増田貴夫. HIV-1 インテグラーゼと宿主因子 Gemin2 との結合は HIV-1 複製に重要である. 第 56 回日本ウイルス学会 2008 (岡山)

4) 多々良恵美, 西辻裕紀, 高森絢子, 清水由紀子, 長谷川温彦, 神奈木真理, 増田貴夫. Gemin2 アイソフォームの発現プロファイルと HIV-1 複製. 第 56 回日本ウイルス学会 2008 (岡山)

5) 高津哲, 西辻裕紀, 佐藤洋子, 多々良恵美, 神奈木真理, 増田貴夫. HIV-1 インテグラーゼの核局在を規定するシス配列および宿主因子. 第 56 回日本ウイルス学会 2008 (岡山)

6) 林隆也, 古川裕之, 西辻裕紀, 長谷川温彦, 増田貴夫, 神奈木真理. DAI (ZBP1/DLM1) が HIV-1 感染に与える影響. 第 56 回日本ウイルス学会 2008 (岡山)

7) 小櫃冨未, 西辻裕紀, 中濱健一, 森田育男, 長谷川温彦, 増田貴夫, 神奈木真理. SARS コロナウイルス 3a/X1 蛋白による破骨細胞分化の促進. 第 56 回日本ウイルス学会 2008 (岡山)

8) 金原秀一, 長谷川温彦, 古川裕之, 西辻裕紀, 増田貴夫, 神奈木真理. Type-I interferon による HTLV-I 発現の抑制. 第 56 回日本ウイルス学会 2008 (岡山)

9) 三浦ふみ, 金原秀一, 長谷川温彦, 増田貴夫, 神奈木真理. HTLV-1 感染マウスの腸管における HTLV-1 感染の検討. 第 56 回日本ウイルス学会 2008 (岡山)

10) 石井雄一, 西垣一男, 長谷川温彦, 林隆也, 増田貴夫, 神奈木真理. SARS コロナウイルスアクセサリ蛋白 3a/X1 および 7a/X4 トランスジェニックマウスの作製. 第 56 回日本ウイルス学会 2008 (岡山)

11) 西辻裕紀, 高津哲, 多々良恵美, 神奈木真理, 増田貴夫. HIV-1 インテグラーゼと宿主因子 Gemin2 との結合は HIV-1 複製に重要である. 第 22 回日本エイズ学会 2008 (大阪)

12) 林隆也, 古川裕之, 西辻裕紀, 長谷川温彦, 増田貴夫, 神奈木真理. DAI (ZBP1/DLM1) が HIV-1 感染に与える影響. 第 22 回日本エイズ学会 2008 (大阪)

12) 山元誠司, 大川克也, 増田貴夫, 小柳義夫, 鈴木陽一 TAP-MS 法によるインテグラーゼ結合因子 Huw1 の同定とその解析. 第 22 回日本エイズ学会 2008 (大阪)

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

1) 出願中: インテグラーゼ N-末端領域を標的としたウイルス感染阻害剤 (特願 2006-239627)

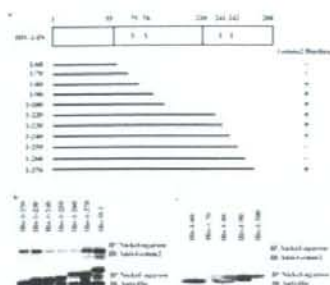


図1 インテグラーゼ変異体と Gemin2 相互作用

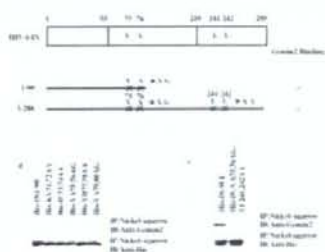


図2 インテグラーゼ点変異体と Gemin2 相互作用

IN60-80 : NH<sub>2</sub>-IWQLDCHTEGKVLVAVHVA-COOH  
 IN154-174 : NH<sub>2</sub>-MFKELKIHQVDRQAEILKT-COOH  
 IN231-251 : NH<sub>2</sub>-RDPYWKGPALKLWKGGGAVL-COOH



図3 合成ペプチドと Gemin2 相互作用

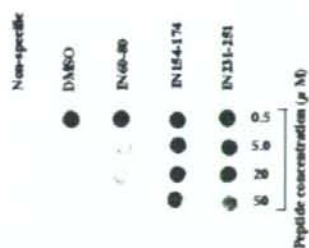


図4 合成ペプチドによるインテグラーゼと Gemin2 相互作用阻害

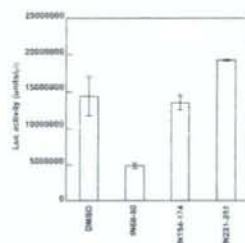


図5 合成ペプチドによる HIV-1 複製阻害効果

歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis*によるクロマチンリモデリングを介する  
潜伏感染HIV-1の再活性化機構

研究分担者: 岡本 尚 (名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学)

研究協力者: 今井健一 (同上)

**研究要旨:** HIV 潜伏感染の再活性化機構が明らかとなれば AIDS の発症と進展を予防できる可能性があるが、そのメカニズムは未だに不明である。我々は、成人の多くが罹患している歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* が代謝産物・酪酸を介して、ヒストンアセチル化を促進し HIV LTR のクロマチン構造を「非活性化型」から「活性化型」に変換することにより、潜伏感染 HIV を再活性化することを見出した。酪酸産生菌は腸管や膣にも認められることから、この結果はある種の細菌感染症を予防することで、AIDS の発症と進展を阻止できる可能性を示唆しているとともに、新たな AIDS の予防・治療対策、また啓蒙のための重要な視点を提供する。(Imai K *et al.*: *J. Immunol.*, 2009 印刷中)

#### A. 研究目的

細胞増殖や分化・発生等の高次生命現象において、ゲノム情報に規定されないエピジェネティクスな制御機構が明らかになってきた。なかでも、ヒストンタンパク質はエピジェネティクスの中心的役割を担うクロマチン構造の重要な構成因子であり、ヒストンの N 末端はアセチル化やメチル化などの様々な化学修飾を受け、ダイナミックに遺伝子発現を制御している。エイズウイルスの複製、特に細胞内に潜伏感染しているプロウイルスからの複製においても、クロマチンレベルでのエピジェネティクスな制御が働いている。最近、筆者らを含むいくつかのグループが HIV の潜伏感染成立と維持において、ヒストンの脱アセチル化が重要な役割を演じていることを報告した。Jiang ら(*J Virol* 81: 10914, 2007)は Spl/c-Myc が、また Williams ら(*EMBO J* 25: 139, 2006)は NF- $\kappa$ B p50 が HIV LTR 上に HDAC (ヒストン脱アセチル化酵素) をリクルートすることを示した。われわれは、HIV 潜伏感染の維持に転写因子 AP-4 がクロマチンレベルで関与していることを明らかにした(*J Biol Chem* 2006, 281, 12495)。また、完全な遺伝子発現の抑制には、ヒストンの脱アセチル化と共にメチル化が重要であることが報告されているが、ある種のヒストンメチル化酵素が、HIV 潜伏感染の成立にかかわっていることを見出している。その特異的な阻害剤は潜伏感染細胞からの HIV の複製を強く誘導する(論文投稿中)。他方、潜伏感染を破綻に導く NF- $\kappa$ B 活性化シグナルに関しても研究を進め、前年度は NF- $\kappa$ B の活性を調

節している新たな制御因子 AKIP1 の機能を報告した(*J Biol Chem* 283, 7834, 2008)。

しかし、HIV の潜伏感染の破綻がいつまたはどのような状況で起こるかに至っては明確な見解がない。AIDS 患者において様々な日和見感染が合併することが知られているが、一方でわれわれは、逆に AIDS によって進行した他の感染症が HIV の複製に影響を及ぼしているのではないかと推察した。そこで、ある種のグラム陰性菌が butyric acid(酪酸:HDAC 阻害作用を有する)を放出する事実に着目し研究を行った結果、成人の多くが罹患している歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) がヒストンのアセチル化を促進しクロマチン構造を「非活性化型」から「活性化型」に変換することにより潜伏感染 HIV を再活性化することを見出した(*J. Immunol.* 印刷中)。*P. gingivalis* 菌体や LPS などの病原因子を添加しても HIV の活性化は起こらなかったが、酪酸を含む培養上清を潜伏感染細胞に添加した結果、強いウイルス複製促進作用が認められた。

本研究結果は、HIV 潜伏感染の破綻がある種の細菌感染症により起こりうることを示しており、ウイルスと細菌の微生物間相互作用の観点からも興味深い。また、酪酸産生菌は腸管や膣といった HIV 感染において極めて重要な部位にも存在することから、細菌感染症がエイズの進展に深く関与していることが示唆される。

(倫理面への配慮)

本研究はすべて培養細胞を用いた実験であり、倫理的規定の対象には該当しない。

## B. 方法と結果

1. *P. gingivalis* が HIV 潜伏感染に及ぼす影響— HIV 潜伏感染細胞株 ACH2 と UI 細胞に、*P. gingivalis* 菌体を作用させても HIV の活性化は認められなかったが、*P. gingivalis* の培養上清を細胞に添加すると量依存的に HIV の複製が強く誘導された。HIV 活性化作用が培養上清中のどの因子に起因するかを調べるために、*P. gingivalis* の種々の病原因子の作用を調べた。その結果、LPS や線毛、プロテアーゼなどのこれまでによく知られている病原因子は HIV の複製を誘導しなかった。また、TNF- $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の中和抗体を用いた実験から、内在性の炎症性サイトカインも培養上清による HIV 活性化に関与していないことがわかった。次に、分子量篩フィルターを用いて培養上清中の分子を分けて実験に用いた結果、分子量 3,000 Da 未満の分画に HIV の活性化を担っている物質が存在することが明らかとなった。

2. HIV の活性化は *P. gingivalis* の放出する酪酸が担っている— HIV の活性化を担っている物質が 3,000 Da 未満という非常に小さな分子であったため、本嫌気性菌の特徴的な代謝産物である短鎖脂肪酸に着目した。ガスクロマトグラフィーにて *P. gingivalis* 培養上清中の種々の短鎖脂肪酸を測定した結果、酢酸やプロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸を検出した。そこで、それぞれの短鎖脂肪酸を潜伏感染細胞に単独で添加した結果、酪酸のみに HIV の活性化作用があることがわかった。詳細な解析により、酪酸産生菌の培養上清のみが潜伏感染細胞を活性化し、培養上清中の酪酸濃度と、HIV を活性化できる酪酸濃度がほぼ一致していた。さらに、培養上清の加熱処理により酪酸を除去すると HIV 活性化作用も同時に消失したことから、*P. gingivalis* による HIV 再活性化作用は培養上清中の酪酸が担っていることが明らかとなった。

3. *P. gingivalis* による HIV LTR の活性化と HIV 潜伏感染細胞のヒストンアセチル化—酪酸が HDAC の活性中心に作用して HDAC 阻害効果を有することが知られていたため、HIV 転写に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイにて検討した。その結果、*P. gingivalis* 培養上清と酪酸のみが濃度依存的に HIV LTR の遺伝子発現を誘導した。以上の結果から、酪酸が HDAC 阻害効果を介して HIV を活性化していることが推察されたので、潜伏感染細胞のヒストン修飾の状態を、アセチル化ヒストン抗体を用いて調べた。*P. gingivalis* 培養上清はヒストン 3 および 4 の

アセチル化を誘導し、HIV 潜伏細胞のクロマチンを構造変換していることがわかった。酪酸を除いた培養上清においてはヒストンのアセチル化は認められなかった。

4. HIV 感染細胞内クロマチン上でのダイナミズム— 実際に *P. gingivalis* 培養上清によって、潜伏感染細胞の HIV LTR 上でクロマチンの構造変換が起こっているか否かを調べるために、種々の抗体を用いて ChIP assay を行った。その結果、未刺激状態では HDAC や抑制因子である AP-4 が HIV LTR 上に認められたが、*P. gingivalis* 培養上清添加により、それらの因子が遊離する一方で、LTR 上でのヒストンのアセチル化と RNAPII の誘導が認められた。以上の結果から、*P. gingivalis* が LTR のヒストンのアセチル化を促進しクロマチン構造を「非活性化型」から「活性化型」に変換することにより、潜伏感染 HIV を再活性化していることが明らかとなった。さらに、クロマチンの構造変換に関与する topoisomerase II の阻害剤 Novobiocin を投与すると、*P. gingivalis* 培養上清による HIV の再活性化作用が認められなくなった。以上より、本作用はクロマチン構造変換を必要とすることが示唆された。

## D. 考察

抗 HIV 薬による AIDS の治療は、耐性ウイルスの出現や重篤な副作用などのため、近年その治療法の限界が明確となってきた。AIDS を撲滅するためには、現行の薬剤療法に加えて潜伏感染細胞からのプロウイルスの発現をより効果的に抑える新しい戦略が必要であると考えられるが、HIV 潜伏感染は不明な点が多く、その前段階として潜伏感染を分子レベルで理解することが必要である。HDAC を介するクロマチンレベルでの潜伏感染維持機構の研究が土台となり、潜伏感染細胞を標的として、HDAC 阻害剤 valproic acid を使用した新たな AIDS 治療法が提案されたが、その賛否は分かれている。HDAC 阻害剤のみならず、その他のクロマチン修飾因子についても、阻害剤の開発が進んでおり、潜伏感染が転写レベルでより明らかとなれば、AIDS 患者における潜伏ウイルスの再活性化を HDAC やメチル化阻害剤を用いて人為的にコントロールできる可能性が期待出来る。さらには、再活性化の機構が明らかとなれば AIDS の発症と進展を予防できるかもしれない。

潜伏感染の成立と維持に関してはその分子機構が明らかになってきたが、潜伏感染の破綻機構に関してはよくわかっていなかった。今回の実験結果は、歯周病の原因菌

である *P. gingivalis* が放出する酪酸が HIV の潜伏感染細胞のクロマチン構造に直接作用し、HIV の再活性化と AIDS 進展に関与している実験的証拠である。また、HIV 潜伏感染の破綻がある種の日和見感染の合併で起こりうることを示した新たな例である。すでに、歯周病の進行度と歯周ポケット内の HIV RNA 量が相関すること、歯周病患者の歯垢や歯周ポケット内には潜伏感染 HIV を再活性化するのに十分な酪酸が存在することが報告されている。他方、*P. gingivalis* を含む歯周病原菌が誘導する TNF- $\alpha$  が糖尿病や早産などの全身疾患に関与していることも示されている。以上の事実は、歯周病が酪酸と TNF- $\alpha$  を介して AIDS 進展に深く関与している可能性を示唆している。歯周病は世界中の多くの成人が罹患しているが、AIDS 患者が多い発展途上国においては口腔衛生状態が悪いためより重度の歯周病患者が存在する。今後、疫学調査等により両疾患の因果関係が明らかになることが期待される。

他方、HIV 感染の初期段階におけるウイルスの爆発的な増殖には腸管粘膜内の細胞に感染した HIV が腸内細菌によって活性化されることが重要であることが示されている。腸管には *Clostridium* や *Fusobacterium* などの酪酸産生菌が存在しており、われわれの研究成果と考え合わせると非常に興味深い。また、膿にも *Peptostreptococcus* 属に含まれる *vaginalis* や *asaccharolyticus* などの酪酸放出菌が存在することが報告されており、HIV の感染経路と考えると、これらの菌が HIV 伝播と活性化に何らかの影響を及ぼしている可能性も推察される。

以上の結果は、ある種の細菌感染症を予防することでエイズの発症と進展を阻止できうる可能性を示唆するとともに、新たな AIDS の予防・治療対策、また啓蒙のための重要な手がかりを含んでいる。

## E. 結論

*P. gingivalis* がヒストンのアセチル化を促進しクロマチン構造を「非活性化型」から「活性化型」に変換することにより、潜伏感染 HIV を再活性化することを見出した。今回の結果は、今後の AIDS の予防・治療対策、また啓蒙のための重要な視点を提供する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Fujimoto K., Chan KH., Takeda K., Lo, KF., Leung RH., and Okamoto T.: Sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay using chemiluminescence for detection of

severe acute respiratory syndrome viral infection. *J. Clin. Microbiol.*, 46: 302-310, 2008.

- 2) Tomoda K., Takahashi N., Hibi Y., Asamitsu K., Ishida H., Kondo T., Fujii, Y. and Okamoto T.: Molecular docking analysis of the protein-protein interaction between RelA-associated inhibitor (RAI) and tumor suppressor protein p53 and its inhibitory effect on p53 action. *Cancer Science*, 99: 615-622, 2008.
- 3) Gao N., Asamitsu K., Hibi Y., Ueno T. and Okamoto T.: AKIP1 enhances NF- $\kappa$ B-dependent gene expression by promoting the nuclear retention and phosphorylation of p65. *J. Biol. Chem.*, 283: 7834-7843, 2008.
- 4) Mitsuhashi S., Kishimoto T., Uraki Y., Okamoto T. and Ubukata M.: Low molecular weight lignin suppresses activation of NF- $\kappa$ B and HIV-1 promoter. *Bioorg. Med. Chem.*, 16: 2645-2650, 2008.
- 5) Mitsuhashi S., Shima H., Li Y., Tanuma N., Okamoto T., Kikuchi K., Ubukata M.: Tautomycin suppresses the TNF $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway via inhibition of IKK activation. *Int J Oncol.* 33: 1027-1035, 2008.
- 6) Jadowsky KJ., Nojima M., Schulte A., Geyer M., Okamoto T. and Fujinaga K.: Dominant negative mutant Cyclin T1 proteins inhibit HIV transcription by specifically degrading Tat. *Retrovirology*, 5: 63-69, 2008.
- 7) Jadowsky KJ., Huang Y., Nojima Geyer M., Okamoto T. and Fujinaga K.: Dominant negative mutant Cyclin T1 proteins inhibit HIV transcription by forming a kinase negative complex with Tat. *J. Gen. Virol.*, 89:2783-2787, 2008
- 8) Asamitsu K., Yamaguchi T., Nakata K., Hibi Y., Victoriano AFB., Imai K., Onozaki K., Kitade Y. and Okamoto T.: Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by blocking I $\kappa$ B kinase with noraristeromycin. *J. Biochem.*, 144: 581-589, 2008
- 9) Rimando MG., Chua MN., Yuson E. d'J., de Castro-Bernas G. and Okamoto T.: Prevalence of gstt1, gstm1 and nqo1 (609C>T) in filipino children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Bioscience Rep.*, 28: 117-124, 2008.
- 10) Teranishi F., Takahashi N., Gao N., Akamo Y., Takeyama H., Manabe T. and Okamoto T.: Phosphoinositide 3-kinase inhibitor (wortmannin) inhibits pancreatic cancer cell motility and migration induced by hyaluronan in vitro and peritoneal metastasis in vivo. *Cancer Science*, 2009 (in press)
- 11) Imai K., Ochiai K. and Okamoto T. Reactivation of latent HIV-1 infection by the periodontopathic bacterium *Porphyromonas gingivalis* involves histone modification. *J. Immunol.* 2009(in press)

### 2. 学会発表

- 1) Takashi Okamoto, Karoi Asamitsu, Atsushi

- Tschiya. Involvement of NF- $\kappa$ B in Autoimmune Rheumatic Diseases. Medical Expo 2008 in APLAR's World 13<sup>th</sup> Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR2008).平成 20 年 9 月 23 日- 27 日
- 2) 土屋篤志、岡本 尚、大塚隆信 関節リウマチ滑膜細胞に対する新規選択的 I $\kappa$ B kinase (IKK) 阻害剤の炎症性サイトカイン産生抑制効果 第 52 回リウマチ学会平成 20 年 4 月 20 日- 23 日
  - 3) 金澤 智、岡本 尚 関節リウマチモデル動物 (DICC マウス) における炎症初期における抗 CCP 抗体価の動態と滑膜細胞の病理組織学的変化 第 29 回日本炎症学会・再生医学会 平成 20 年 7 月 8 日- 10 日
  - 4) 今井健一、落合邦康、岡本 尚 転写因子 AP-4 による HIV 潜伏感染維持と破綻機構の解明 第 50 回歯科基礎医学学術大会平成 20 年 9 月 23 日- 25 日
  - 5) 岡本 尚 転写因子 NF- $\kappa$ B と自己免疫疾患 第 19 回日本シェーグレン症候群研究会 平成 20 年 9 月 20 日
  - 6) 辻 隆裕、神戸光彦、相内 章、岡本 尚、佐多徹太郎、長谷川秀樹 NF- $\kappa$ B 阻害剤を用いたマウス ATL 治療の基礎的検討-Evaluation of Bay65-1942, a nuclear factor kappaB inhibitor, in mouse ATL models.- 第 70 回日本血液学会総会 平成 20 年 10 月 10 日- 12 日
  - 7) 今井健一、落合邦康、岡本 尚 歯周病とエイズの密接な関係- *P.gingivalis* の産生する酪酸がクロマチン修飾を介して HIV-1 転写を活性化させる 第 51 回秋季日本歯周病学会 平成 20 年 10 月 18 日- 19 日
  - 8) 落合邦康、今井健一、岡本 尚 歯周病原細菌の潜伏感染 HIV-1 賦活化におよぼす影響 第 51 回秋季日本歯周病学会学術大会 四日市市文化会館 (三重) 平成 20 年 10 月 18 日- 19 日
  - 9) 土屋篤志、岡本 尚、朝光かおり、今井健一、小林正明、大塚隆信 関節リウマチ滑膜細胞に対する新規選択的 I $\kappa$ B kinase 阻害剤の炎症性サイトカイン産生抑制効果 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会 平成 20 年 10 月 23 日- 24 日
  - 10) Mami E. Cueno, Katsuo Karamatsu, Yasuhiro Yasutomi, Antonio C. Laurena, Takashi Okamoto. Immunogenicity of HIV-1 Tat protein expressed in Tomato. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 平成 20 年 10 月 26 日- 28 日
  - 11) 金澤 智、石谷 閑、石谷 太、松本邦弘、岡本 尚 MAPK 様キナーゼ NLK を介した新たな HIV 転写調節機構について 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 平成 20 年 10 月 26 日- 28 日
  - 12) 今井健一、岡本 尚 グラム陰性嫌気性菌感染症による HIV 転写レベルでの賦活化 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 平成 20 年 10 月 26 日- 28 日
  - 13) Takashi Okamoto, Nan Gao, Yurina Hibi, Kaori Asamitsu. NF- $\kappa$ B サブユニット相互作用因子の同定と抗 NF- $\kappa$ B 療法の新規分子標的の探索 第 67 回日本癌学会総会 平成 20 年 10 月 28 日- 30 日
  - 14) Mami E. Cueno, Katsuo Karamatsu, Yasuhiro Yasutomi, Antonio C. Laurena, Takashi Okamoto. A molecular mechanism by which Tat affects the growth of Tomato plants. 第 22 回エイズ学会学術集会 平成 20 年 11 月 26 日- 28 日
  - 15) 今井健一、岡本 尚 グラム陰性嫌気性菌感染症によるクロマチン修飾を介する潜伏 HIV の賦活化 第 22 回エイズ学会学術集会 平成 20 年 11 月 26 日- 28 日
  - 16) 朝光かおり、日比悠里名、小林雄祐、岡本 尚 Tat-TAR-PTEFb(Cyclin T1) を標的とした in silico 薬剤スクリーニング 第 22 回エイズ学会学術集会 平成 20 年 11 月 26 日- 28 日
  - 17) 金澤 智、岡本 尚 MAPK 様キナーゼ NLK による HIV 転写を抑制する調節機構について 第 22 回エイズ学会学術集会 平成 20 年 11 月 26 日- 28 日
  - 18) Mami E. Cueno, Antonio C. Laurena, Takashi Okamoto. Effects of HIV-1 Tat Expression in Tomato plant. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本化学学会大会合同大会 平成 20 年 12 月 9 日- 12 日
  - 19) 今井健一、戸上博昭、岡本 尚 クロマチンリモデリングを介するグラム陰性嫌気性菌感染症による潜伏 HIV の賦活化 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本化学学会大会 平成 20 年 12 月 9 日- 12 日
  - 20) Gao Nan, Kaori Asamitsu, Yurina Hibi, Takashi Okamoto. AKIP1 Enhances NF- $\kappa$ B Activation and Determines the Role of PKA in NF- $\kappa$ B Signaling. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本化学学会大会合同大会 平成 20 年 12 月 9 日- 12 日
  - 21) 朝光かおり、日比悠里名、小林雄祐、岡本 尚 Tat-TAR-PTEFb(Cyclin T1) を標的とした in silico 薬剤スクリーニング 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本化学学会大会合同大会 平成 20 年 12 月 9 日- 12 日
  - 22) 金澤 智、岡本 尚 関節リウマチモデルマウス(DICC マウス)における炎症初期における滑膜細胞について 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本化学学会大会 合同大会 平成 20 年 12 月 9 日- 12 日
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)**
- 1) NF- $\kappa$ B 阻害剤及びそれを含有する医薬組成物 (特開 2007-99702) 発明者: 岡本 尚、北出幸夫
  - 2) Tat 阻害剤 (仮称) (出願準備中) 発明者: 岡本 尚、朝光かおり、日比悠里名

HIV-1Vpr 機能の調節過程を標的とする新たな HIV-1 制御法の研究

研究分担者 間陽子 独立行政法人理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニットリーダー

**研究要旨** HIV-1Vpr は HIV-1 ゲノムの核移行、細胞周期の G2 期 arrest および apoptosis を引き起こしウイルス複製およびエイズ発症に大きく関与する。これまで、Vpr は核輸送アダプター因子 Importin  $\alpha$  (Imp $\alpha$ ) との結合を介して核移行する新規核移行能を有すること、Vpr と Imp $\alpha$  の結合がマクロファージへのウイルス複製に必須であることを報告してきた。さらに、Vpr と Imp $\alpha$  との結合を阻害する低分子化合物を同定し、その化合物が Vpr の *in vitro* での核移行およびマクロファージにおけるウイルス複製をも阻害することを報告した。

本研究では、本化合物がウイルス複製を核移行過程で Vpr 依存的に阻害することを立証した。また、Vpr の機能の中でアポトーシスを阻害するが、G2 期停止能、Vpr のウイルス粒子への取り込みおよび安定性には影響しないこと、一般的な細胞周期、核移行およびアクチノマイシン誘導性 apoptosis に影響しないことを明らかにした。さらに、HIV-1 の株間で高度に保存された Vpr の領域を標的としているため、現在の HAART 法の問題点である耐性ウイルスの出現を軽減できることが考えられた。最後に本化合物は PET プローブおよび蛍光標識プローブを用いた *in vitro* および *in vivo* イメージングにより、細胞内への浸透性、安定性、局在性、さらに固体での動態が良好であることが明らかとなった。

**A. 研究目的**

HIV-1 の特徴の一つが他のレトロウイルスとは異なりマクロファージなどの非分裂細胞に感染できる点である。それは、HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr が Pre-integration complex (PIC) を核内に移行させるためと考えられる。

最近我々は Vpr が核輸送アダプター Imp $\alpha$  のみを介して核移行する新規核移行機序を有することを発見した。immunodepletion および siRNA を用いて Vpr の核移行に Imp $\alpha$  が必須である事、Imp $\alpha$  との結合能が消失した Vpr 変異体は核移行能を失い、それを組み込んだウイルスは複製が阻害されることを見出した。以上の結果は、Vpr と Imp $\alpha$  の結合が核移行とウイルス複製に必須であること、そして、その結合を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発への可能性を強く示唆している。

そこで、Vpr と Imp $\alpha$  との結合を阻害する低分子化合物の検索を行ったところ、Vpr と Imp $\alpha$  の結合を阻害する低分子化合物 49

種を選択した。その内 11 種の化合物が、Glutathione S Transferase (GST) pull down 法において Vpr と Imp $\alpha$  の結合を、2 種類が *in vitro* 核移行解析において Vpr の核移行を、1 種類がマクロファージにおけるウイルス感染を阻害した。

本研究では、HIV-1 感染を阻害する低分子化合物の薬理機構を調べることを目的とした。また、H 化合物の Vpr との結合、細胞内動態および体内動態および Vpr の核移行以外の機能への効果を解析した。

**B. 研究方法**

1. **マクロファージの準備**：健康人由来の血液から末梢血単核球 (PBMCs) を分画し、抗-CD14抗体ビーズを用いて CD14 陽性細胞である単球を分離し、Macrophage colony stimulation factor (M-CSF) を加えて 1 週間培養し、最終分化マクロファージとした。
2. **Real time PCR 法**：マクロファージに vesicular stomatitis virus G (VSV-G)



pseudotyped reporter virus NL-Luc-Env-Vpr<sup>+</sup>あるいはNL-Luc-Env-Vpr<sup>-</sup>を感染させsingle round assayを行い、24時間後、genomic DNAを抽出し、2-Long terminal repeat form(2LTR form)およびtotal DNA量を検出した。

3. セファロースビーズを用いた化合物と蛋白質の結合実験：光親和性標識されたビーズにUV照射により、化合物を結合させる。大腸菌で発現・精製したGSTとGreen Fluorescence protein (GFP)融合変位型Vpr (N17C74および $\alpha$ H1ドメイン)、GST融合Importin $\alpha$ 、GST・GFPを混合し、遠心により化合物に結合した蛋白を沈殿させ、SDS-PAGEにより泳動後にCoomassie Brilliant Blue (CBB) 染色により検出した。
4. Vprの機能解析：Flag-vpr/pME18neoベクターをHeLa細胞へ導入し、低分子化合物によるVprのアポトーシス誘導能への影響をcaspase-3の活性を指標として、G2期arrestへの影響をflow cytometry法により解析した。
5. Wu-Kabat indexによる多様性解析：HIV-1データベースから収集した1227種類のウイルス株のVprの各アミノ酸配列の多様度をWu-Kabat法により計算した。
6. Positron Emission Tomography (PET) イメージングによる動態解析：高速メチルカルコ反応により化合物に放射性炭素を導入し、健康なラットに投与し、体内動態解析した。
7. 蛍光標識プローブによる細胞内動態解析：化合物の1つの官能基に、蛍光色素 (fluorescein) を共有結合させて合成し、蛍光化合物を細胞に添加して培養後、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来臨床材料を用いていない。

### C. 研究結果

Vpr は核移行能以外にアポトーシス誘導能および G2 期停止能などを惹起する多機能性タンパク質である。そこで、Vpr の核移行能を阻害する H 化合物の核移行以外の Vpr の機能への影響を調べた。アポトーシス能

は、HeLa 細胞に Vpr 発現プラスミドを導入し、6 時間後に化合物を加え、24 時間後の caspase-3 の活性を指標として評価した。その結果、H 化合物は濃度依存的に caspase-3 活性の減少を誘導した。次に、細胞周期の G2 期停止能への影響を解析した。H 化合物を Vpr 発現プラスミド導入 6 時間後に加え、さらに 48 時間培養後に HeLa 細胞を回収し flow cytometry 法を行った。いずれの濃度においても H 化合物は Vpr による G2 期停止に効果を示さなかった。一方、一般的な細胞周期、核移行およびアクチノマイシン誘導性 apoptosis に影響しないことが立証された。

HIV-1 の生活環のなかで、実際に H 化合物は核移行過程を阻害するのかが調べるために、pNL43-luciferase ウイルスを最終分化 macrophage に感染させ、24 時間後、genomic DNA を抽出し、Real time PCR 法を行った。H 化合物の存在化において核移行マーカーである 2LTR form の著しい減少が認められた。即ち、逆転写から核移行の過程を、H 化合物が阻害しているが明らかになった。一方、この阻害効果は Vpr 欠損 pNL43-luciferase ウイルスでは認められないことから、H 化合物は Vpr 依存的にウイルスの複製を阻害することが明らかとなった。

我々は以前に、Vpr の核移行は Vpr に存在する 3 つの  $\alpha$ -Helical ドメイン ( $\alpha$ H1、 $\alpha$ H2 および  $\alpha$ H3) の中で、 $\alpha$ H1 ドメインと Imp $\alpha$  の CAS 結合ドメインとの結合を介して起こることを報告してきた。そこで、化合物と蛋白質の結合実験により、化合物が Vpr あるいは Imp $\alpha$  のどちらと結合するのか、また、結合ドメインを解析した。まず、化合物誘導体を UV でセファロースビーズに結合させ、Vpr と Imp $\alpha$  を加えた後に、遠心により化合物に結合した蛋白を沈降させ、15%SDS-PAGE で電気泳動後に CBB 染色を行った。その結果、誘導体は GST および GFP タグを融合させた Vpr の核移行の最小機能ドメイン N17C74 および  $\alpha$ H1 ドメインに結合した。一方、GST タグ融合 Imp $\alpha$ 、コントロールの GST・GFP とは結合しなかった。以上の結果は、誘導体が予測通り  $\alpha$ H1 ドメインと結合していることを示唆された。

次に、Vpr の複数ある機能の中で、細胞周期停止およびアポトーシスに及ぼす効果を解析した。化合物は $\alpha$ H1 ドメインが機能ドメインである Apoptosis 誘導能を阻害したが、C 末端領域が機能ドメインである G2 アレスト能を阻害しなかった。以上の結果は、化合物が Vpr の $\alpha$ H1 ドメインに結合する結果として、それが担っている機能を阻害して、最終的に感染を阻害することを示唆している。また、化合物は Vpr のウイルス粒子への取り込みおよび安定性には影響しないことが見出された。

最近我々は、HIV-1 データベースから 1227 の変異ウイルスの *vpr* 遺伝子を収集し、多様性の度合いを Wu-Kabat 法で計算した。Vpr に存在する 3 つの  $\alpha$ -Helical ドメインの中で、H 化合物が結合する  $\alpha$ H1 ドメインが、株間で最も良く保存された領域であることが明らかとなった。従って、H 化合物は耐性ウイルス出現を回避できる優れた標的を認識していることが示された。

次に、H 化合物が薬剤に適しているかどうかを調べるために、PET イメージングによる動態解析を行った。化合物に高速メチル化反応を用いて、放射性炭素を導入し、健全なラットに投与し、体内動態解析を行った。この化合物は若干肝臓への吸着が見られたが、特異的な吸着部位はなく腎臓から速やかに排泄された。

さらに、蛍光色素標識プローブの細胞内動態解析を試みた。化合物の 1 つの官能基に、細胞毒性の低い fluorescein を共有結合させて合成した。まず、蛍光化合物が H 化合物と同様に Vpr と Imp $\alpha$  の結合を阻害する活性を維持していることを、GST pull down 法を用いて確認した。次に、 $10\mu\text{M}$  の濃度で HeLa 細胞の培養上清中に加えたところ、添加後 30 分から観察した最大の時間である 30 時間まで、主に細胞内と核膜に観察された。さらに、蛍光蛋白 Red Fluorescence Protein (RFP) 融合 Vpr を HeLa 細胞に発現させ、Vpr が核内に発現した 24 時間後に蛍光化合物を添加して 30 分間培養後に、Vpr の検出を試みた。Vpr 発現細胞における蛍光化合物の局在は Vpr の局在する核に変化していた。以上の結果は特異的に Vpr に結合する蛍光化合物によって、細胞

内に発現した Vpr を検出できることを示唆している。

#### D. 考察

Vpr-Imp $\alpha$  の相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬は、PET プローブおよび蛍光標識プローブを用いた *in vitro* および *in vivo* イメージングにより、細胞内への浸透性、安定性、局在性、さらに固体での動態が良好であることが明らかとなった。この結果は、同定された化合物は最適化研究により、医薬品候補化合物になるうる可能性を強く示唆している。

H 化合物は、セファロースビーズを用いた化合物と蛋白質の結合実験により、HIV-1 の株間で高度に保存された Vpr の領域を標的としていることが明らかとなった。従って、現在の HAART 法の問題点である耐性ウイルスの出現を軽減できることが考えられる。

本研究により、H 化合物は HIV-1 の生活環の中で核移行過程を阻害することが立証された。この結果は、ウイルスの核移行阻害が抗ウイルス薬の標的として有用であることを示している。従って、他の核内で増殖するウイルスの核移行阻害を標的にした抗ウイルス薬開発への応用が期待される。

本研究の第 2 の成果は、低分子化合物による新規 Vpr の検出法の確立である。現在、詳細なウイルスの体内動態は解析されていない。蛍光低分子化合物によるウイルスタンパク質の細胞内検出法の確立は、将来的なウイルスの体内動態解析法の開発への貢献が期待される。

#### E. 結論

(A) Vpr と Imp $\alpha$  の結合を阻害する化合物の性状を調べた。

1) ウイルス複製を核移行過程で Vpr 依存的に阻害することを立証した。

2) Vpr の機能の中でアポトーシス能を阻害するが、G2 期停止能、Vpr のウイルス粒子への取り込みおよび安定性には影響しない。

3) 一般的な細胞周期、核移行およびアクチノマイシン誘導性 apoptosis に影響しない。

い。

4) Imp $\alpha$ ではなく、Vpr と結合した。その結合領域は非常に保存性の高い $\alpha$ H1ドメインであった。従って、化合物は耐性ウイルス出現を回避できる可能性がある。

(B) PETプローブおよび蛍光標識プローブを用いた *in vitro* および *in vivo* イメージングにより、H化合物は細胞内への浸透性、安定性、局在性、さらに固体での動態が良好であることが明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Aida Y and Matsuda G. : Role of Vpr in HIV-1 nuclear import; therapeutic implications, *Current HIV-1 Research*, in press, 2009

2) Zhang X and Aida Y. : HIV-1 Vpr: a novel role in regulating RNA splicing, *Current HIV-1 Research*, in press, 2009

3) 間陽子: ヒト免疫不全ウイルス 1 型 Vpr によるスプライシング制御, *生体の科学*, 59, 380-381, 2008

4) 間陽子: インポーチン  $\alpha$  を介したヒト免疫不全ウイルス 1 型 Vpr の核移行, *生科学*, in press, 2009

5) Suzuki T, Yamamoto N, Nonaka M, Takeshima S-n, Hashimoto Y, Matsuda G,

Matsuyama M, Igarashi T, Miura T, Tanaka R, Kato S and Aida Y.: Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr-Importin  $\alpha$  interactions as a novel HIV-1 therapy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, in press, 2009

### 2. 学会発表

1) 鈴木辰徳、野中瑞穂、橋本よし江、山本典生、間陽子: HIV-1 Vpr に作用する抗 HIV-1 薬の薬理機構とそのケミカルバイオロジーへの応用、**第 56 回日本ウイルス学会学術集会**

2) 北原玄太、松田剛、鈴木辰徳、間陽子: HIV-1 Vpr 核移行活性の定量方法の確立と応用、**第 56 回日本ウイルス学会学術集会**

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。) 特許出願中

出願人: 独立行政法人理化学研究所  
発明者: 間陽子、鈴木辰徳、野中瑞穂、山本典夫

発明の名称: ヒト免疫不全ウイルス感染阻害剤およびエイズの治療薬または予防薬

出願番号: 特願2008-087297号

出願日: 2008年3月28日

HIV 粒子形成における Gag/Pol 蛋白輸送とプロセシングの制御機構

研究分担者 森川裕子 (北里大学 生命科学研究所)

**研究要旨** HIV-1 Gag 蛋白に FLAG タグを、Gag/Pol 蛋白に HA タグを付加した分子クローンを作製し、Gag/Pol 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。Gag/Gag/Pol 蛋白はいずれも細胞質から形質膜へ局在が変化した。ところが Gag/Pol 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 Gag/Pol 蛋白は細胞質に局在するままで膜結合性がなかった。Pol 領域を削除するにつれて膜結合は回復し形質膜に局在するようになった。PR によるプロセシングを調べたところ、プロセシングは形質膜での Gag/Gag/Pol 凝集部位でのみ観察された。次に、NNRTI であるにも拘らず Gag/Gag/Pol 蛋白のプロセシングを促進する活性が報告されているエファビレンツ (EFV) についてその作用機序解析を試みた。EFV を添加すると濃度依存的に HIV 粒子産生量が減少した ( $IC_{50} \leq 0.1 \mu M$ )。細胞内 Gag 蛋白を調べたところプロセシングの促進が観察された。細胞内局在を調べたところ、EFV 存在下では Gag/Gag/Pol 蛋白は形質膜に輸送されているものの凝集像はなく、プロセシング産物である p17MA は形質膜に均一に、その他のプロセシング産物は細胞質に局在していた。これらの膜親和性は弱かった。

**A. 研究目的**

HIV の Gag/Pol 蛋白は、Gag 蛋白の翻訳時におけるフレームシフトにより合成され、粒子に取り込まれる。Pol 蛋白は HIV 酵素群すなわちプロテアーゼ (PR)、逆転写酵素 (RT)、インテグラーゼ (IN) を有する領域であり、Gag/Pol 蛋白の粒子への取り込みは HIV の複製に絶対不可欠である。PR 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。しかし Gag/Pol 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、その細胞内輸送や粒子形成過程を解析することができなかった。本研究ではその Gag/Pol 蛋白の分子動態について基礎情報を得るとともに、Gag/Pol 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 の構築と transfection

HIV-1 cDNA クローン pNL43 株を改変した。gag 遺伝子の p6 領域に in frame で FLAG タグを、pol 遺伝子の IN 末端に in frame で HA タグを挿入した。Gag 蛋白のみを発現する pol 領域欠損のクローン、Gag/Pol 蛋白のみを発現させるよう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 でつないだクローン (FS) を作製した。この FS クローンの

pol 領域末端から domain truncation (IN 領域削除、RT-IN 領域削除) を行なった。これらの分子クローンに対して PR 触媒中心のアミノ酸を置換 (D25N) したクローン (PR(-)) も作製した。Lipofectamine2000 (Invitrogen 社) を用いてこれらの DNA を HeLa 細胞に transfection した。

2) 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。

3) Western blotting

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

4) membrane flotation 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 flotation 実験に用いた。flotation 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。

5) 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 p24CA、抗 RT、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

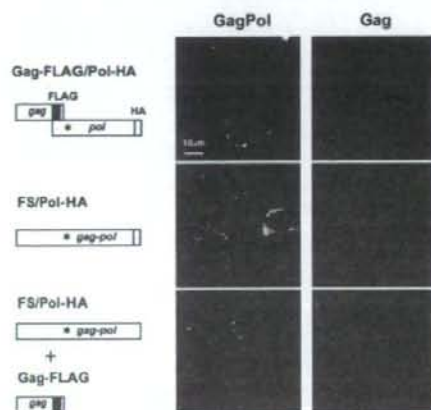
#### 1) FLAG/HA タグの挿入分子クローン

HIV の Gag 蛋白と GagPol 蛋白を識別する目的で、昨年 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作製した。この分子クローンを HeLa 細胞に transfection し、24 時間後の細胞内 HIV 蛋白発現と産生 HIV 粒子量を Western blotting と ELISA で調べたところ、タグなし pNL43 (WT) と差はなかった。

#### 2) Gag 及び GagPol 蛋白の細胞内輸送

FLAG/HA 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 24 時間では形質膜に局在し凝集した像を示した。この凝集像は Gag/GagPol 蛋白の高度な assembly 部位を示唆するものと考えられる。ところが、GagPol 蛋白のみを発現させるよう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 でつないだクローン (FS/PR(-)) では GagPol 蛋白は、細胞質に diffuse に散在するままであり形質膜へ局在しなかった。そこで、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を 1:10 の DNA 分子比で cotransfection 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し凝集するパターンに変化した (図 1)。

図 1. Gag と GagPol 蛋白の細胞内局在



#### 3) Gag 及び GagPol 蛋白の膜結合性

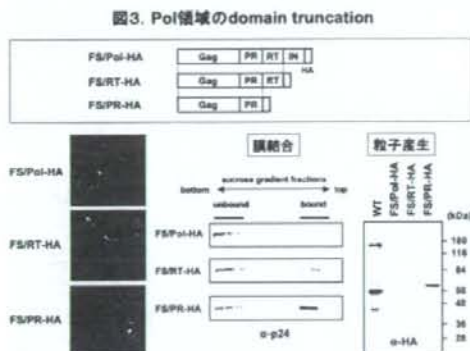
Gag 及び GagPol 蛋白の膜結合性を membrane floatation 法で調べた。FLAG/HA タグ分子クローンの発現細胞では Gag 及び GagPol 蛋白はいずれも膜結合画分に分離された。ところが、FS/PR(-)クローンで GagPol 蛋白を単独発現させると可溶性画分に分離された。この GagPol 蛋白単独発現の分子クローンと Gag 蛋白単独発現分子クローンを 1:10 で cotransfection した共発現細胞では GagPol 蛋白は Gag 蛋白とともに膜画分に分離されることが判明した (図 2)。これらの結果から、GagPol 蛋白はそれ自身には膜結合能がなく、Gag 蛋白と coassembly することにより形質膜に輸送されたと考えられた。

図 2. Gag と GagPol 蛋白の膜親和性



Gag 蛋白には膜結合能があり、GagPol 蛋白には膜結合能がなかった。そこで、この GagPol 蛋白の C 末端から domain を 1 つずつ削除し、

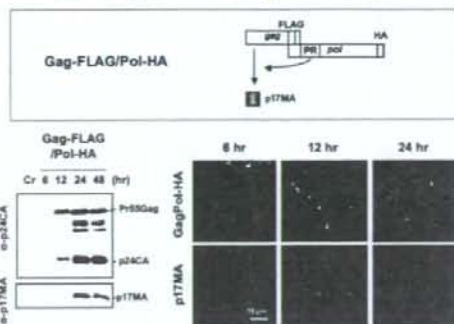
膜結合能と細胞内局在を調べたところ、IN 領域、RT-IN 領域と削除する C 末端領域が大きくなるにつれて膜親和性が回復し、形質膜に局在するようになった。また、粒子産生も回復する傾向が認められた (図3)。



#### 4) PRによるGag蛋白のプロセッシング

PRによるGag蛋白のプロセッシングについて調べた。FLAG/HA タグ分子クローン (PR(+))のものをHeLa細胞に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とGagPol蛋白の発現量は6時間では少なかったが、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12時間後から観察された。このプロセッシングを共焦点顕微鏡で継時的に観察した。検出には切断された成熟型のp17MAとしか反応しない抗p17MA抗体とPol領域C末端に対する抗HA抗体を用いた。6時間ではGagPol蛋白は細胞質に散在しているものの、p17MAは検出できなかった。12時間後になるとGagPol蛋白は形質膜に凝集して観察された。成熟型p17MAはその凝集部位でのみ検出された。24時間後にこの傾向がさらに明らかとなった。これらの結果からGag/GagPol蛋白のプロセッシングは細胞内輸送途中にはおこらず、形質膜でassemblyする過程でおこると考えられた (図4)。

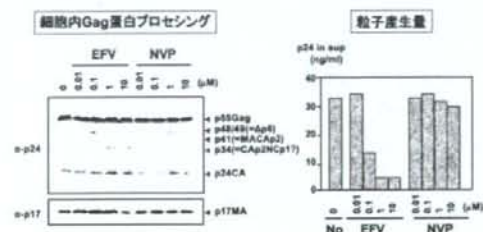
図4. Gagプロセッシング産物の細胞内局在



#### 5) EFVによるGag蛋白プロセッシング促進と粒子産生抑制

NNRTIであるにも拘らずエファビレンツ (EFV)にはGag/GagPol蛋白のプロセッシングを促進する活性が報告されている。これを検証するとともに、その作用機序解析を試みた。FLAG/HA タグ分子クローン (PR(+))のものをHeLa細胞にtransfectionしEFVを添加した。細胞内Gag蛋白を調べたところ、濃度が増加するに従って、プロセッシング反応中間体と考えられるp49/p48 (=MA-CA-p2-NC-p1とMA-CA-p2-NCに相当)やp41 (=MA-CA-p2に相当)が消失し、通常あまり観察されないp34 (=CA-p2-NC-p1)が出現したことから、プロセッシングが促進していると思われた。HIV粒子産生量を調べたところ、濃度依存的な減少が認められた ( $IC_{50} \leq 0.1 \mu M$ )。このような効果はNNRTIであるネビラピンやデルベラジンではほとんど認められなかった (図5)。

図5. EFVによるGag蛋白プロセッシング促進と粒子産生阻害



#### 6) 促進されたプロセッシング産物の細胞内局在と膜親和性

プロセッシング産物の細胞内局在を抗p17MA抗体で調べた。抗p24CA、抗RT、抗HA抗体もあわせて用いた。EFV不添加の細胞ではp17MAは形質膜に凝集して観察された。ところが、EFV添加の細胞ではp17MAは形質膜に均一に分布

し凝集像はなかった。p24CA や Pol 蛋白についても調べたところ、EFV 不添加の細胞ではそれらの蛋白が形質膜に凝集して局在するのに対し、EFV 添加細胞ではそれらが細胞質に diffuse に散在した。

これらの膜親和性を membrane flotation 法により調べたところ、EFV 添加細胞では p17MA, p24CA, RT 蛋白のかなりが可溶性画分に検出された。この傾向は p24CA や RT 蛋白で顕著であった (図6)。これらの結果から、EFV 添加細胞ではプロセッシングが形質膜で均一におこり、切断断片である p24CA や RT 蛋白が形質膜から解離した可能性が考えられた。

図6. プロセッシング産物の細胞内局在と膜親和性



## D. 考察

本研究より GagPol 蛋白について以下のことが明らかになった。1) GagPol 蛋白はそれ単独発現では膜親和性がなく、細胞質に diffuse に散在する。2) Gag 蛋白が共発現すると、GagPol 蛋白は膜親和性を示し形質膜に輸送される。恐らく Gag 蛋白との coassembly によるものと思われる。3) Pol 蛋白領域には Gag 蛋白の膜結合能に抑制的に作用する効果が存在する。

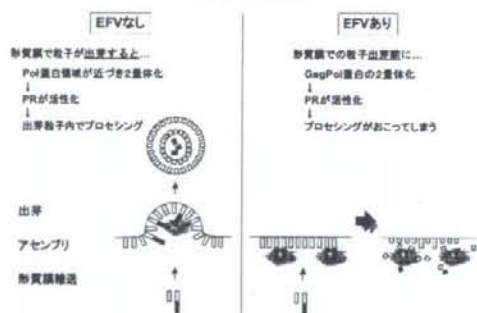
Gag 蛋白の膜結合には N 末端のミリスチル化と塩基性アミノ酸クラスターの両者が必要であることがよく知られている。蛋白 N 末端ミリスチル化は翻訳と共役しておこる反応であり、GagPol 蛋白 N 末端のミリスチル化も既に明らかとなっている。近年、ミリスチル化蛋白におけるミリスチル基の露出が膜親和性を決定することが報告されている。これらを総合的に考えると、GagPol 蛋白自身の膜結合抑制機序について、1) GagPol 蛋白の Pol 蛋白領域が直接 Gag 蛋白 N 末端ミリスチル基をマスクしたとは立体構造的に考えにくい、N 末端ミリスチル基を引っ込めるような効果がある。2) Gag 蛋白 N 末端のミリスチル化

と塩基性アミノ酸クラスターだけでは GagPol 蛋白の膜結合に必要なエネルギーを供給できないという可能性が考えられる。

本研究では、PR によるプロセッシングは Gag/GagPol 蛋白が形質膜へ輸送された後、assembly する過程でおこることが明らかになった。PR は 2 量体を形成して触媒活性を示すと考えられているが、この結果は GagPol 蛋白が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。

本研究により、EFV 添加細胞では p17MA は形質膜に局在するものの凝集像はなく、p24CA や RT 蛋白は細胞質に diffuse に散在することが判明した。EFV の Gag/GagPol 蛋白をプロセッシング促進する活性が細胞内輸送過程で作用したとも考えられなくはないが、予備実験で PR(-) の FLAG/HA タグ分子クローン発現細胞に EFV を添加したところ、Gag/GagPol 蛋白は形質膜に達していたことから、EFV の作用段階が細胞内輸送過程である可能性は低いと思われる。むしろ、Gag/GagPol 蛋白の形質膜到達後で assembly する以前にプロセッシングがおこったと推測される (図7)。

図7. まとめと考察



NNRTI である EFV には RT 蛋白の 2 量体化を促進することが報告されている。本研究で観察された EFV による Gag/GagPol 蛋白プロセッシングの作用機序として、EFV が GagPol 蛋白内の RT 領域に結合し 2 量体化を促進することで同分子内の PR 領域の 2 量体化も促進した可能性が考えられる。これらを明らかにするため、GagPol 蛋白の 2 量体化を解析する必要があると思われる。例えば、酵母 Two-Hybrid 法による 2 量体化の検出、FLAG/HA タグ分子の共沈降、GFP/CFP タグ分子間の FRET などである。

本研究から、形質膜集積前における PR 領域 2 量体化や活性化は粒子産生を減少させる可

能性が示唆された。これは、既存の PI (PR 活性を阻害する) やダルナビル (PR 2 量体化を阻害する) とは逆の作用機序をもつ化合物 (PR の 2 量体化や活性化を促進させる) にも抗 HIV 活性が期待できることを示唆する。換言すれば、PR は、その活性が阻害されてもまた促進されても HIV にとって不利になる分子であり、その脆弱性は抗 HIV 薬の格好の標的であると思われる。

#### E. 結論

HIV の粒子形成過程は、Gag/GagPol 蛋白の形質膜輸送→形質膜での assembly→PR による Gag 蛋白プロセッシングであり、この順序の変更 (EFV による assembly 前のプロセッシング) は粒子産生ができない結果となる。

#### F. 知的所有権の取得状況

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- 1) 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)
- 2) S. Yamayoshi, T. Noda, H. Ebihara, H. Goto, Y. Morikawa, I. S. Lukashovich, G. Neumann, H. Feldmann, & Y. Kawaoka. Ebola virus matrix VP40 protein uses the COPII transport system for its intracellular transport.  
Cell Host Microbe 3: 168-177 (2008).
- 3) E. Urano, S. Shimizu, Y. Futahashi, Makiko Hamatake, Y. Morikawa, N. Takahashi, H. Fukazawa, N. Yamamoto, & J. Komano.  
Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/P-TEFb-dependent LTR transcription.  
AIDS 22: 1081-1083 (2008)
- 4) S. Kawada, T. Goto, H. Haraguchi, A. Ono, & Y. Morikawa.  
Dominant negative inhibition of human immunodeficiency virus particle production by the non-myristoylated form of Gag.  
J. Virol. 82: 4384-4399 (2008)
- 5) E. Urano, T. Aoki, Y. Futahashi, T. Murakami, Y. Morikawa, N. Yamamoto, & J. Komano.  
Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55<sup>Gag</sup> with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production.  
J. Gen. Virol. 86: 3144-3149 (2008)
- 6) E. Urano, Y. Kariya, Y. Futahashi, R. Ichikawa, M. Hamatake, H. Fukazawa, Y. Morikawa, T. Yoshida, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, & J. Komano.  
Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells.  
FEBS Lett 582: 4053-4058 (2008)
- 7) 森川裕子 HIV 粒子形成機構 日本エイズ学会誌 10: 33-40 (2008)

##### 学会発表

- 1) E. Urano, Y. Kariya, Y. Futahashi, M. Hamatake, Y. Morikawa, T. Yoshida, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, & J. Komano.  
Identification of the carboxy-terminal domain of chromatin-associated transcriptional activator bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication.  
CSH Meeting, 2008 年、米国
- 2) H. Haraguchi & Y. Morikawa  
Intracellular trafficking machinery of human immunodeficiency virus Gag-Pol protein.  
第 8 回感染症免疫フォーラム、2008 年、淡路島
- 3) F. Momose, T. Sekimoto, & Y. Morikawa  
Live-cell imaging of influenza viral RNP trafficking.  
第 8 回感染症免疫フォーラム、2008 年、淡路島
- 4) Y. Morikawa & S. Saegusa  
AUP1 regulates HIV particle production.  
第 8 回感染症免疫フォーラム、2008 年、淡路島



島

5) E. Urano, Y. Kariya, M. Hamatake, H. Fukazawa, Y. Morikawa, T. Yoshida, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, & J. Komano.

P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity.

第8回感染症免疫フォーラム、2008年、淡路島

6) 浦野恵美子、奥長浩之、森川裕子、駒野淳 DNA J/ HSP40 Co-chaperonine family による HIV-1 複製抑制

第56回日本ウイルス学会、2008年、岡山

7) 原口日和、森川裕子

HIV-1 Gag-Pol 蛋白の発現比率は粒子産生を制御する

第56回日本ウイルス学会、2008年、岡山

8) 百瀬文隆、関本哲也、森川裕子

インフルエンザウイルス RNP 複合体のプラスミドトランスフェクションによる再構成と核外輸送機構の解析

第56回日本ウイルス学会、2008年、岡山

9) 駒野淳、浦野恵美子、刈屋祐美、二橋悠子、市川玲子、濱武牧子、深澤秀輔、森川裕子、芳田剛、小柳義夫、山本直樹

T 細胞における HIV-1 抵抗性遺伝子のスクリーニング-Brd4 C 末端ドメインの同定とその機構解析

第56回日本ウイルス学会、2008年、岡山

10) 周東翔、原口日和、鴻永博之、森川裕子

非ヌクレオチド系逆転写酵素阻害剤エファピレンツによる HIV 粒子形成阻害機構

第56回日本ウイルス学会、2008年、岡山

11) 関本哲也、百瀬文隆、森川裕子

ライブセルイメージングによるインフルエンザウイルス子孫 RNP 複合体の細胞内輸送機構の解析

56回日本ウイルス学会、2008年、岡山

12) 三枝祥子、森川裕子

宿主因子 AUP1 による HIV の複製制御機構の解析

56回日本ウイルス学会、2008年、岡山

13) 青木徹、清水佐紀、浦野恵美子、濱武牧子、寺嶋一夫、玉村啓和、村上努、森川裕子、山本直樹、駒野淳

HIV-1 Pr55Gag のミリストイル基非依存性ウイルス粒子産生と感染性

第22回日本エイズ学会、2008年、大阪

14) 浦野恵美子、奥長浩之、森川裕子、山本直樹、駒野淳

Inhibition of HIV-1 replication by the co-chaperonine DNA J/ HSP40 protein family  
第22回日本エイズ学会、2008年、大阪

15) 百瀬文隆、関本哲也、森川裕子

インフルエンザウイルス RNP 複合体輸送機構のライブセルイメージング

第31回日本分子生物学会/第81回日本生化学会、2008年、神戸

16) E. Urano, Y. Kariya, M. Hamatake, H. Fukazawa, Y. Morikawa, T. Yoshida, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, & J. Komano.

P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity.

第31回日本分子生物学会/第81回日本生化学会、2008年、神戸

### III. 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、様々なサブタイプ間のヘテロゲノム二量体化効率を定量化した。その結果効率は遺伝的距離に依存せず、二量体化シグナル領域(DLS)の SL1 部分が効率決定に主要な役割を担っていることが明らかとなった。

2、HIV ゲノム組換え効率とゲノム二量体化効率は厳密に一致していた。

### 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化できる系を独自に構築した。これらを用いて様々な HIV-1 サブタイプ間のヘテロゲノム二量体化および組換えウイルス生成機構の解析を行った。

### 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。ウイルスの精製・感染・ノザンハイブリダイゼーションは定法に従って行った。フローサイトメトリー解析は FACScalibur を使用した。

(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

サブタイプの中で遺伝的多様性の大きいグループ N・O・チンパンジー由来 SIVcpz とグループ M とのヘテロゲノム二量体化効率比較から、遺伝的近縁度と二量体化効率は必ずしも相関しないことが明らかとなった。グループ M 内で遺伝的距離がほぼ等しいサブタイプ A・B・C 間のヘテロゲノム二量体化の程度を比較したところ、A-C 間の反応はホモ二量体化(A-A, B-B, C-C)と同等の効率を示したのに対し、A-B, B-C 間のそれは明らかに低下しており、サブタイプの組合せによって二量体形成の効率に差があることが示唆された。変異導入実験の結

果二量体化開始部位 (DIS) が効率決定に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。ゲノム二量体化効率と平行してヘテロゲノム間組換え効率を測定した結果、この二つの効率にほぼ完全な順相関が確認された。

#### D. 考察

HIV-1 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る。ウイルス粒子内でのゲノム二量体化や感染細胞内でのゲノム組換え反応は、従来観察することが困難であった。我々は独自のシステムを構築することによってこれらの解析を可能とし、二つの反応が完全に相関していることを見いだした。これはゲノム二量体化が直接ゲノム組換えを規定するという合理的な機構の存在を示唆している。このことは古くから予想されていたがこれまで直接的な証拠は示されておらず、今回の結果は大きな意義を持つと考えられる。

#### E. 結論

HIV においてゲノム二量体化はゲノムパッケージングや逆転写効率に重要な役割を果たしていることを示唆してきたが、今回の結果によって初めてゲノム二量体効率が

ゲノム組換えに直接的に影響していることが示された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) 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*, 10 (2008) p396-404.

##### 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 56 回日本ウイルス学会学術集会、札幌。
- 2) HIV-1 Gag 前駆体プロセシングのゲノム二量体化への影響 大石真久・塩田達雄・櫻木淳一 第22回日本エイズ学会学術集会、大阪。
- 3) HIV-1ゲノム二量体化とウイルスゲノム組換えの厳密な相関 櫻木淳一・櫻木小百合・大石真久・塩田達雄 第22回日本エイズ学会学術集会、大阪。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし。

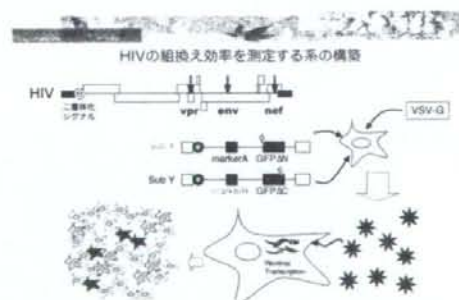


Fig.1 サブタイプ間ゲノム組換え測定系

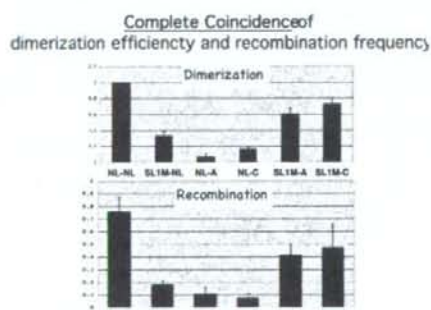


Fig.2 ゲノム二量体化と組換え効率の一致