

4) M. Suyama, E. Daikoku, T. Goto, Kouichi Sano, and Y. Morikawa.

Reactivation from latency displays HIV particle budding at plasma membrane, accompanying CD44 upregulation and recruitment. *Retrovirology* 6: 63 (2009)

5) E. Urano, R. Ichikawa, Y. Morikawa, T. Yoshida, Y. Koyanagi, and J. Komano.

T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. *Vaccine* (2009)

学会発表

1) E. Urano, H. Okunaga, Y. Morikawa, & J. Komano.

Inhibition of HIV-1 replication by the co-chaperone DNAJ/HSP40 protein family. CSH Meeting, 2009年、米国

2) H. Haraguchi & Y. Morikawa

Live-cell imaging of human immunodeficiency virus Gag-Pol trafficking.

第9回感染症免疫フォーラム、2009年、淡路島

3) F. Momose, T. Sekimoto, & Y. Morikawa

Live-cell imaging of the trafficking of influenza viral ribonucleoprotein complexes.

第9回感染症免疫フォーラム、2009年、淡路島

4) T. Ohkura, Y. Kikuchi, K. Komase, F. Momose, & Y. Morikawa.

Epitope analysis of neutralizing monoclonal antibody binding site in avian influenza A H5N1 virus hemagglutinin and construction of its single-chain variable fragment.

第9回感染症免疫フォーラム、2009年、淡路島

5) 原口日和、森川裕子

HIV-1 Gag-Pol 蛋白の膜結合と細胞内トラフィック

第57回日本ウイルス学会、2009年、東京

6) 周東翔、原口日和、百瀬文隆、瀧永博之、森川裕子

非ヌクレオチド系逆転写酵素阻害剤エプアビレンツによる HIV 粒子形成阻害機構

第57回日本ウイルス学会、2009年、東京

7) 星野悠、奥長浩之、森川裕子

HIV-1 の粒子遊離抑制宿主因子 BST-2 はエンドソーム HRS の強発現により優先的に分解される

第57回日本ウイルス学会、2009年、東京

8) 浦野恵美子、市川玲子、森川裕子、芳田

剛、小柳義夫、駒野淳、

T 細胞における HIV-1 抵抗性遺伝子のスクリーニング—SEC14L1a C 末端ドメインの同定とその機構解析

第57回日本ウイルス学会、2009年、東京

9) 福間藍子、阿部真澄、宮澤孝幸、森川裕子、安田二郎

ネコ内在性レトロウイルスの出芽機構の解析

第57回日本ウイルス学会、2009年、東京

10) 鈴木陽一、山元誠司、大川克也、増田貴夫、森川裕子、小柳義夫、

レトロウイルスインテグラーゼ結合性因子 Huw1 の同定と HIV-1 感染における役割

第57回日本ウイルス学会、2009年、東京

11) 百瀬文隆、関本哲也、森川裕子

生細胞観察によるインフルエンザウイルス子孫 RNA ゲノム-タンパク質複合体の細胞内輸送機構の解析

第57回日本ウイルス学会、2009年、東京

12) 大倉喬、菊池雄士、駒瀬勝啓、百瀬文隆、森川裕子

H5N1 亜型トリインフルエンザウイルス HA に対する中和抗体のエピトープ解析とその一本鎖抗体の作製

57回日本ウイルス学会、2009年、東京

13) 浦野恵美子、倉持紀子、供田洋、武部豊、駒野淳、森川裕子

酵母膜結合 Gag-Gag 反応系で同定された HIV-1 アセンブリー阻害剤

第23回日本エイズ学会、2009年、名古屋

14) 山元誠司、大川克也、増田貴夫、森川裕子、小柳義夫、鈴木陽一

HIV-1 インテグラーゼ相互作用因子 Huw1 による HIV-1 の感染抑制

第23回日本エイズ学会、2009年、名古屋

15) Yu Hoshino, H. Okunaga, & Y. Morikawa
Overexpression of HRS induces preferential degradation of BST-2, an anti-HIV-1 host factor.

第32回日本分子生物学会、2009年、横浜

16) E. Urano, R. Ichikawa, Y. Morikawa, T. Yoshida, Y. Koyanagi, & J. Komano.

SEC14-like 1a carboxy-terminal domain negatively regulated the infectivity of human immunodeficiency virus replication.

第32回日本分子生物学会、2009年、横浜

17) F. Momose, T. Sekimoto, & Y. Morikawa

Live-cell imaging of the cytoplasmic trafficking of influenza viral ribonucleoprotein complexes.

第32回日本分子生物学会、2009年

III. 協力研究報告書

協力研究報告書

薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法に関する研究
(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 ゲノム二量体化とウイルス粒子産生時の粒子成熟との相関に関しての解析を試みた。その結果現在までに以下の成果を上げた。

1. 粒子成熟時に切断を受ける Gag 前駆体上の 5 箇所の切断サイトのうち、NC の前後のサイトがゲノム二量体化に重要であった。
2. 粒子の成熟ステップを模倣する一連の変異体を作成して観察した。その結果最初のステップ (p2-NC 間切断) で急速にゲノム二量体化が進行した後、引き続き他サイトの切断によって徐々に均一な二量体として成熟していくことが明らかとなった。
3. ウイルス粒子の形態的变化とゲノム二量体化の進行は完全には一致していなかった。
4. 粒子内 RNA の被逆転写能力は粒子成熟の最初のステップによってほぼ十分に獲得されることが明らかとなった。

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、ウイルス由来プロテアーゼ(PR)によるウイルス粒子成熟と粒子内 HIV-1 ゲノム二量体化の進行の相関に着目した。ウイルス Gag 蛋白前駆体上のプロテアーゼ切断部位に変異を導入した様々な変異体を作成し、分子生物学的手法を用いて解析を行った。

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。

Env 遺伝子内にフレームシフト変異を導入して不活化すると共に、Gag 遺伝子内の 5 箇所の PR 切断部位に様々な組合せで変異を導入した一連の変異体を作成した。これらの分子クローンを 293T 細胞にリン酸カルシウム法でトランスフェクトし、ウイルスを産生した。ウイルスの精製・ノザン・ウェスタンハイブリダイゼーションおよびウイルス内逆転写アッセイは定法に従って行った。透過電子顕微鏡によるウイルス粒子形態観察および計数は大阪医科大学の微生物学研究教室との共同研究にて行われた。

(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

HIV-1 粒子成熟過程とゲノム二量体化との関係については未だ不明な点が多く残されている。粒子成熟は HIV-1 Gag タンパク内の 5 つの切断点がウイルスプロテアーゼによってプロセシングされることによって起こるが、この 5 点の切断速度は順序があり、サイトによって切断速度に大きな差がある

ことが生化学的解析によって明らかとなっている。つまり粒子の成熟過程は斉一なものではなく、いくつかの段階が存在していると考えられる。我々は各点に非切断変異を導入し、またこの変異を組み合わせることで粒子成熟過程が中断する一連の変異体を作成した。これらの変異体を用いて、粒子成熟過程におけるゲノム二量体化/粒子形態の変化についての観察を行った。

単変異体の観察から、ヌクレオカプシド (NC)末端の切断はN/C末どちらも安定なゲノム二量体形成に影響を及ぼすことが明らかとなった。

粒子成熟過程では Gag の最初の切断点である p2-NC の切断によりゲノム二量体の安定化が一気に起き、引き続いて起こる他点の切断によって均一で安定した二量体が完成することが示唆された。

量論的解析からは、p2-NC の切断による二量体安定化には閾値が存在しない可能性が示された。

電子顕微鏡像による粒子形態観察の結果、ゲノム二量体化にはウイルスコアの形成は必要なく、粒子成熟に伴う形態変化とゲノム二量体化の間に必ずしも明確な同期は見られなかった。

ウイルス内逆転写能測定の結果、どの変異体粒子内にも十分な活性を持った逆転写酵素が存在するにもかかわらず、p2-NC の切断があって初めてウイルスゲノムの逆転写が高いレベルで検出されることが明らかとなった。

D. 考察

正常なゲノム二量体化はウイルスが感染能を獲得するために必須の過程であると考えられる。今回の解析によりこの二つの多段階のステップは同期しつつ進行するものの、多くの転換点は互いに異なるという興味深い知見が得られた。

p2-NC の切断による二量体安定化については、二量体結合領域とは別にゲノム上に二量体を安定化するサイトが存在し、そこに NC が結合するか否かによって二量体の安定性が規定されているというモデルが考えられた。

成熟過程のかなり早い段階でウイルス内でゲノムは逆転写の鋳型として機能しうることも示されたが、実際の粒子の細胞に対する感染能とは一致していない。このことは粒子成熟と脱殻や Trim などの細胞性因子との関連を示唆するものとも考えられ、今後の検討課題になりうるものであった。

E. 結論

HIV ゲノム二量体化とウイルス粒子産生時の粒子成熟との相関に関する解析を試み、ウイルス粒子がゲノム二量体化によって感染能を獲得するプロセスについての様々な新知見を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5alpha depends on combination of host and virus. H. Maegawa, T. Miyamoto, J.-i. Sakuragi, T. Shioda, and E. E. Nakayama. *Virology*, in press.

2. 学会発表

1) HIV-1 ゲノム二量体化と粒子成熟ステップの相関 櫻木淳一・大石真久・中野隆史・櫻木小百合・佐野浩一・塩田達雄 第57回日本ウイルス学会学術集会、ワークショップ、東京。

2) HIV-1ゲノム二量体化と粒子成熟ステップの相関 櫻木淳一・大石真久・中野隆史・櫻木小百合・佐野浩一・塩田達雄 第23回日本エイズ学会学術集会、一般口演、名古屋。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし。

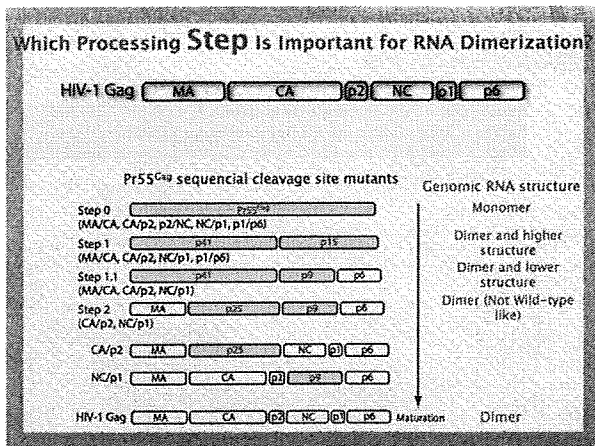


Fig.1 Gag の成熟段階を模倣した変異体の作成

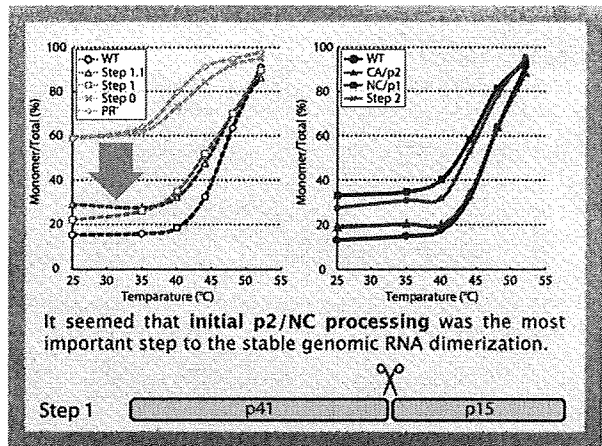


Fig.2 Gag の成熟段階とゲノム二量体化との相関

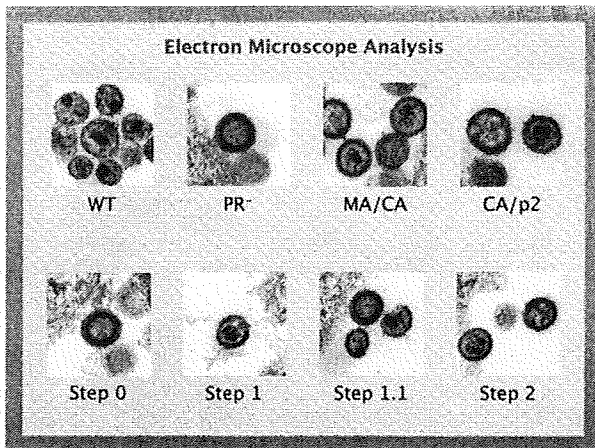


Fig.3 Gag の成熟段階における粒子形態変化

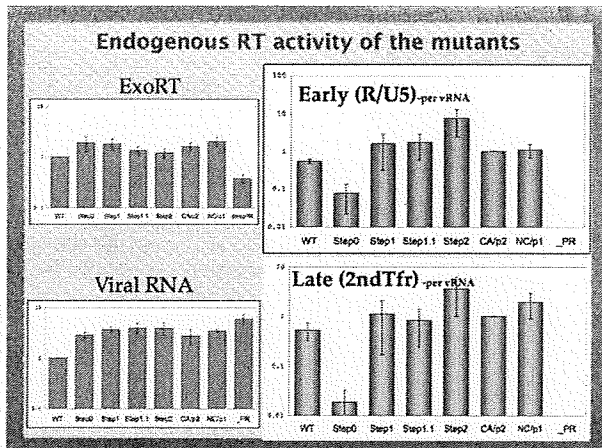


Fig.4 変異体のゲノムパッケージング、ウイルス内逆転写能の比較

HIV 脱殻過程に関する研究

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 粒子内には複数の capsid (CA) isoform が存在し、一部の isoform のアミノ末端に位置する 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、*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。さらに、実際にウイルスの標的細胞を用いた *in vivo* uncoating assay 実験によりにおいても、Ser16 に変異を導入するとウイルスがうまく脱殻できないことを明らかにできた。本研究は、HIV の脱殻機構を明らかにするための重要な知見を与えるものと考えられる。

A. 研究目的

研究は、HIV のライフサイクルにおいてい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、種々の T 細胞株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* & *in vivo* uncoating assay

in vitro uncoating assay については、Dr. Auewarakul *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 を用いて行った。*in vivo* uncoating assay については、Dr. Sodroski *et al.*, (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 5514-5519)の方法を用いて行った。

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、一つのCA isoform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。さらにリン酸化Ser₁₆を含むCAペプチド抗原に対する抗体を用いた解析から、Ser₁₆のリン酸化はウイルス出芽後に受けると示唆された。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 配列に、peptidyl cis-trans isomerase 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。また、*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。さらに、このPin1によるCA coreの崩壊は、感染細胞内でも起こっていることが *in vivo* uncoating assayによりあきらかにできた。

D. 考察

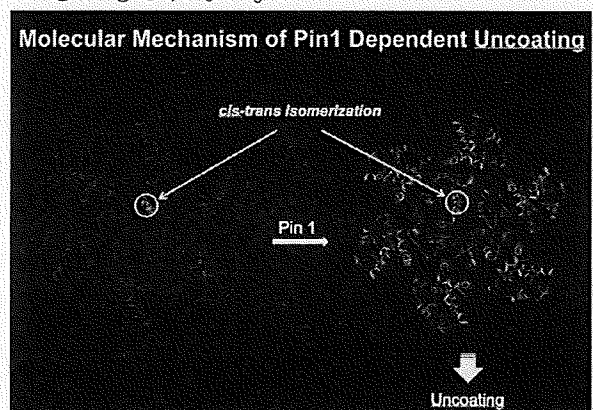
HIV-1 CA isoformのうち、Ser₁₆が特異的にリン酸化を受けている isoform を同定した。CAのアミノ末端に存在するSer-Pro配列のSer残基が細胞内のkinaseにより、ウイルスが出芽後にリン酸化を受けると考えられる。次に、ウイルスが標的細胞に侵入すると、この phosphorylated Ser-Pro を特異的に認識するPPIase Pin1がCA六量体のリング内に入り込むことによってSer-Pro間の結合の共鳴安定性を効果的に低下させ、CA coreが崩壊すると考えられる。

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、Pin1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際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、CA coreの崩壊にPin1が寄与していることを *in vitro* だけでなく *in vivo* で明らかにできた。つまり、感染細胞内でのCA coreの崩壊にCA中の phosphorylated Ser₁₆-Pro₁₇モチーフが重要であることをあきらかにできた。現在の抗HIV療法は残念ながら根治療法ではなく、耐性ウイルスの出現が常に懸念される。その一方で、ウイルスの複製において宿主依存性の高い脱殻過程を新たな創薬ターゲットとして研究を進めることは、耐性ウイルス出現の問題を克服するための一つの突破口につながるかもしれない。



第9回日本蛋白質科学会年会プログラム
要旨集 p. 44

F. 研究発表

論文発表

1. Misumi, S., Masuyama, M., Takamune, N. et al., Targeted delivery of immunogen to primate M-cells with tetragalloyl lysine dendrimer. *J. Immunol.* 182, 6061-6070 (2009)
 2. Taishi Higashi, Fumitoshi Hirayama, Shogo Yamashita, Shogo Misumi, Hidetoshi Arima, Kaneto Uekama., Slow-release system of pegylated lysozyme utilizing formation of polypseudorotaxanes with cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics* 374, 26-32 (2009)
 3. Taishi HIGASHI, Fumitoshi HIRAYAMA, Shogo MISUMI, Keiichi MOTOYAMA, Hidetoshi ARIMA, and Kaneto UEKAMA. Polypseudorotaxane Formation of Randomly-Pegylated Insulin with Cyclodextrins: Slow Release and Resistance to Enzymatic Degradation *Chem. Pharm. Bull.* 57(5), 541-544 (2009)
 2. Molecular mechanism of peptidyl-prolyl isomerase Pin1 dependent HIV-1 uncoating
井上睦美、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾
第82回日本生化学会大会抄録集 p. 162
 3. プロリルイソメラーゼ Pin1 依存性 HIV 脱殻過程の解析
井上睦美、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾
第57回日本ウイルス学会抄録集 p. 127
 4. HIV カプシド(CA)コア特異的リン酸化を介した HIV 脱殻過程の解析
井上睦美、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾
第23回日本エイズ学会学術集会抄録集 p. 436
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
なし。

口頭発表

1. Virion proteomics を基盤とした HIV 複製過程の解析
三隅将吾

薬剤耐性 HIV の制御方法における新規薬剤標的としての SEC14L1a C 末端ドメインの評価

協力研究者：駒野 淳（国立感染症研究所 エイズ研究センター 第3室 主任研究官）

研究要旨

薬剤耐性 HIV の制御方法には既存の作用機序とは異なる新規薬剤の開発が求められるが、その礎として HIV 複製の分子メカニズムを理解して宿主ウイルス相互作用を明らかにして創薬標的を見いだす必要がある。変異しやすい HIV の特性を考えると、ウイルスそのものを標的とするよりも宿主を標的とした治療方法開発が望ましいと考えられている。宿主を標的とする方法はウイルス複製を抑制する一方で、細胞生理学への負の影響が懸念される。宿主を標的にした創薬を考える上で、創薬標的の探索からヒト T 細胞を背景としたアプローチをとり、培養細胞レベルで T 細胞株の増殖に明らかな影響を与えず HIV-1 の複製を特異的に抑制するものを cDNA ライブラリーから網羅的な解析法にて同定する方法は非常に有用と考えられる。本年度は cDNA ライブラリーからウイルス複製を抑制する活性を持つ遺伝子をスクリーニングしてえられた SEC14L1a の C 末端ドメインが恒常的発現によって細胞増殖に影響を与えずに HIV-1 複製を抑制する事を証明した。SEC14L1a の C 末端ドメインはウイルス粒子への Env 取り込みを選択的に抑制することにより HIV-1 複製を抑制した。このプロセスは既存の抗レトロウイルス薬が標的にする作用点とは異なるため、新たな抗レトロウイルス薬開発に有望な分子モデルになると期待される。

A. 研究目的

多剤併用療法が導入されてエイズ患者の予後は画期的な改善をみせた。しかし、根治療法はいまなお存在せず、HIV-1 感染者は終生治療を継続する必要がある。そのため薬剤耐性ウイルスの出現は治療上の大きな問題である。現実的な対処方法としては、既存の薬剤とは作用機序の異なる新規抗レトロウイルス薬を開発する事である。これにより既存の抗レトロウイルス薬抵抗性のウイルスも抑制する事が出来る可能性があるからである。しかし、ウイルスは変異しやすい性質があるため、薬剤抵抗性ウイルスが発生する危険性を常に持っている。そこで世界的トレンドとして、創薬標的をこれまでのようにウイルスに求めるのではなく、細胞のタンパク質を標的とするという戦略がとられるようになった。実際、CCR5 antagonist は

HIV-1 感染症に対する治療薬として実用化されている。宿主因子とウイルス因子の相互作用を明らかにし、ウイルス複製のアキレス腱となる宿主—ウイルスタンパク質の相互作用をブロックすることは新世代の抗 HIV-1 戦略の重要な側面を有する事になるであろう。

本研究の目的は、宿主タンパク質の創薬標的をヒト遺伝子ライブラリーから網羅的手法によって phenotype screening することにより、ヒト T 細胞株の細胞増殖には影響しないが HIV-1 複製には負の影響をあたえる遺伝子を同定し、それらの創薬標的としての評価を行う事である。昨年度は本実験系を確立し、その候補遺伝子として同定された Brd4 C 末端ドメインの抗 HIV-1 活性について評価した。本年度は新たに同定された SEC14L1a の C 末端ドメインを評価した。

B. 研究方法

ヒト T 細胞株 MT-4 細胞に hPBL と RK13 細胞由来の cDNA ライブラリーを lentivirus または MLV ベクターにて導入し、GFP 発現を指標に cDNA を安定に発現する細胞を選択した。HIV-1 (HXB2 株) を感染させた後、ウイルス感染耐性となって生存してくる細胞を選択し、それらから DNA を抽出し、PCR によって遺伝子導入ベクターにより MT-4 細胞に導入された cDNA を増幅し核酸配列決定を行った (方法の詳細は Urano E et al., FEBS Lett 2008 を参照)。同定された遺伝子の中から SEC14L1a の C 末端ドメインに着目して実験を行った。SEC14L1a の C 末端ドメインと GFP を融合させたタンパク質発現ベクター CTD1, 2, FL (図 1) を構築し、融合タンパク質の挙動と、これを恒常的に発現させたヒト T 細胞株にて HIV-1 複製効率を解析した。HIV-1 複製サイクル各ステップを独立に検索して候補遺伝子の持つ抗ウイルス活性の作用点を解析した。コントロールとして GFP のみ発現する細胞を用いた。解析手法の詳細は Komano et al., Mol Biol Cell 2004, Shimizu et al., AIDS 2007 に記載されている。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

SEC14-like 1a (SEC14L1a) の C 末領域に位置する Golgi dynamics (GOLD) ドメインの

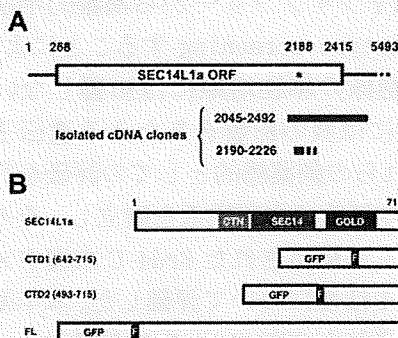


図 1. HIV-1複製抵抗性遺伝子として同定されたSEC14L1aの遺伝子構造を核酸レベル(A)とタンパクレベルでの標記(B)。本研究で作製したSEC14L1a誘導体を(B)に示す。

C 末端側が 2 つの cDNA ライブラリーから 1.5、2.4% の確率で同定された (図 1)。MT-4 と SupT1 細胞に C 末領域 (CTD1, aa642-715) を MLV ベクターにより恒常的に発現させると、HIV-1 複製抵抗性が再現された。GOLD ドメイン全領域を含む変異体 CTD2 (aa493-715) も HIV-1 複製抵抗性を示したが、全長 (FL) は明らかな抗 HIV-1 活性を示さなかった (図 2)。FL, CTD1, 2 の発現は T 細胞株に発現

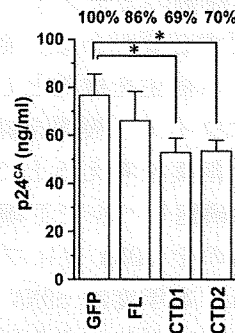


図 2. HIV-1複製抵抗性遺伝子として同定されたSEC14L1aの誘導体を恒常的に発現させたMT-4細胞におけるHIV-1複製抑制。

する CD4 や CXCR4 の発現に影響を及ぼさず、HIV-1 の感染初期過程及び LTR 転写にも検出しうる影響を与えなかった。一方、ウイルス産生について解析すると、FL はウイルス産生効率を低下させたが CTD1, 2 は低下させなかった。さらに、Env のウイルスへの取り込みについて解析すると、CTD1, 2 はウイルス様粒子への Env 取り込み効率を減少させたが FL は増大させることが判明した。細胞における Env 発現レベルには影響が見られなかった (図 3)。

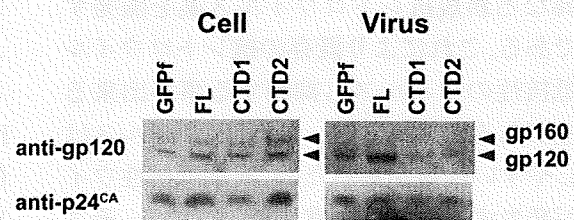


図 3. SEC14L1a誘導体を発現させた際に見られるウイルス遺伝子Env(anti-gp120)とGag(anti-p24)の発現を細胞(左)とウイルス(右)分画でそれぞれ解析したもの。CTD1 とCTD2の発現によりウイルスへのEnv取り込みが有意に減少している。

D. 考察

我々が樹立した機能的な cDNA スクリーニングにより GFP-Brd4 CTD が HIV-1 複製抵抗性を有する事を例示したが、同様の方法でえられた SEC14L1a の C 末端ドメインも HIV-1 複製抵抗性がある事も明らかとなった。以上の結果より本法がエイズウイルス抵抗性遺伝子を同定するための優れた機能的スクリーニングであることが示された。

SEC14L1a の機能はほとんど知られていない。わずかにある報告によると SEC14L1a がゴルジ体を集積し、コリン性レセプターの細胞表面への輸送に関与しているという報告がある。この際、レセプターと SEC14L1a の相互作用は本報告で焦点を絞った GOLD ドメインであった。GOLD ドメインは Golgi dynamics domain の略称であり、まさにゴルジ体でタンパク質が機能することを示唆している。これに対し、我々が解析した CD4 や CXCR4 も通常の ER-Golgi ルートを通して細胞膜に輸送されるため、SEC14L1a の影響を受ける可能性があった。しかし、これらの細胞表面レベルが影響されなかった事は、SEC14L1a が標的タンパク質を選択的に認識して相互作用することを示唆している。

SEC14L1a は Env や Gag の細胞内での合成や細胞膜への輸送を阻害する事無くウイルス粒子への Env 取り込みを選択的に抑制した。ウイルス粒子への特異的な Env 取り込みの詳細な分子メカニズムは未だ明らかになっておらず、我々が発見した SEC14L1a 誘導体をきっかけにこの複製ステップの理解を深める事が出来ると期待できる。さらに、我々の研究結果は SEC14L1a 誘導体が作用する標的部位が細胞毒性の少ない抗レトロウイルス薬の分子創薬標的として位置づけられることを示している。このステップを標的にする抗レトロウイルス薬は存在しないので、我々の見いだした SEC14L1a 誘導体様作動体は既存の薬剤に対する耐性ウイルスに対抗するための新規薬剤開発において重要な知見であると考えられる。

HIV-1 複製は多くのプロセスからなり、各ステップでこれを制御する宿主因子が存在する。しかし、未だその全貌は明らかになっておらず、精力的な研究が求められている。ウイルス複製を制御する宿主因子の同定とその作用機序の解明はウイルス複製の理解を深めるだけでなく新たな治療を開発する礎となる。本研究によりヒト T 細胞株を使用して特異的にウイルス複製を抑止する遺伝子を同定する実験系が機能する事がさらに確証付けられた。今後はさらに網羅的な解析を行い、薬剤抵抗性ウイルスに対抗できる宿主因子を分子標的とする新規治療薬開発に繋げるよう研究を進展させていきたい。

E. 結論

細胞増殖に明らかな影響を与えず HIV-1 の複製を抑制する遺伝子を cDNA ライブラリーから phenotype screening で同定する系を樹立した。これにより、昨年の GFP-Brd4 CTD に引き続き SEC14L1a による選択的抗 HIV-1 活性を実証した。既存の薬剤抵抗性ウイルスに対抗できる新規治療薬開発のため、本実験系が有用である事を示す事ができた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Kariya Y, Hamatake M, Urano E, Yoshiyama H, Shimizu N, Komano J. A dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression during the acute phase of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome. *Cancer Sci*. In press.
- 2) Emiko Urano, Reiko Ichikawa, Yuko Morikawa, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Jun Komano. T cell-based functional cDNA library screening

identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. Vaccine. In press.

3) Ranya Hassan, Shinya Suzu, Masateru Hiyoshi, Naoko Takahashi-Makise, Takamasa Ueno, Tsutomu Agatsum, Hirofumi Akari, Jun Komano, Yutaka Takebe, Kazuo Motoyoshi and Seiji Okada.

Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. Journal of Cellular Physiology. 2009 Nov;221(2):458-468.

4) Tsutomu Murakami, Sei Kumakura, Toru Yamazaki, Reiko Tanaka, Makiko Hamatake, Kazu Okuma, Wei Huang, Jonathan Toma, Jun Komano, Mikiro Yanaka, Yuetsu Tanaka, and Naoki Yamamoto. The Novel CXCR4 Antagonist, KRH-3955 Is an Orally Bioavailable and Extremely Potent Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Comparative Studies with AMD3100. Antimicrobe Agents and Chemotherapy. 2009 Jul;53(7):2940-2948.

学会発表

(国際学会)

1) Tsutomu Murakami, Kei Miyakawa, Cecilia Bucci, Jun Komano, Naoki Yamamoto. Role of Rab7 and its effector protein in HIV-1 assembly. CSHL meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA 2009

2) Emiko Urano, Hiroyuki Okunaga, Yuko Morikawa, Jun Komano. Inhibition of HIV-1 replication by the co-chaperone DnaJ/Hsp40 protein family. CSHL meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA 2009

(国内学会、抜粋)

1) 駒野 淳. オーミクス解析手法が次世代エイズ治療・予防法開発に与えるインパクトシンポジウム「これからのHIV研究の進むべき方向」第23回日本エイズ学会, 名古屋, 11月27日 2009

2) 濱武牧子, 宮内浩典, 青木 徹, 浦野恵美子, 駒野 淳. Higher-order homotypic oligomerization determines the steady-state cell surface levels of CXCR4. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009

3) 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, 山本直樹, 駒野 淳. Development of 5th generation lentiviral vector. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009

4) 浦野 恵美子, 市川 玲子, 森川 裕子, 芳田剛, 小柳 義夫, 駒野 淳. SEC14-like 1a carboxy-terminal domain negatively regulates the infectivity of human immunodeficiency virus replication. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009

5) 浦野 恵美子, 倉持紀子, 供田 洋, 武部 豊, 駒野 淳, 森川 裕子. 酵母の膜結合Gag-Gag反応系で同定されたHIV-1 Gagアセンブリー阻害剤. 第23回日本エイズ学会学術集会, 名古屋, 2009

6) 濱武牧子, 駒野 淳, 前田 史子, 長塚靖子, 竹腰 正隆. HIV-1複製抑制能を有する健常人由来CD4反応性IgM抗体クローンの分離: HIV-1に対するnatural humoral resistance. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

7) 滝澤 万里, 草川 茂, 北村克彦, 長縄 聡, 村上 利夫, 本多 三男, 山本 直樹, 駒野 淳. Diversified HIV-1を利用した中和抗体KD-247感受性を規定するEnv アミノ酸残基の網羅的解析.

第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

Hideto Chono, Jun Komano, et al. Inventory of high-titer lentivirus production system by modifying the amino-terminus of Gag (出願2009年11月19日 特願2009-263587).

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

IV. 業績一覽 (2009)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
佐藤裕徳					
Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, <u>Sato H</u> , Oka S.	Combination of V106I and V179D Polymorphic Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Confers Resistance to Efavirenz and Nevirapine but not to Etravirine.	Antimicrob. Agents Chemother.			In press
Yokoyama M, Mori H, <u>Sato H</u> .	Allosteric regulation of HIV-1 reverse transcriptase by ATP for nucleotide selection.	PLoS ONE	5	e8867	2010
Onyango C, Leligdowicz A, Yokoyama M, <u>Sato H</u> , Song H, Nakayama EE, Shioda T, de Silva T, Townend J, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S, Cotton M.	HIV-2 Capsids Distinguish High and Low Virus Load Patients in a West African Community Cohort.	Vaccine			In press
Sahbandar IN, Takahashi K, Djoerban Z, Firmansyah I, Naganawa S, Motomura K, <u>Sato H</u> , Kitamura K, Pohan HT, Sato S.	Current HIV type 1 molecular epidemiology profile and identification of unique recombinant forms in Jakarta, Indonesia.	AIDS Res. Hum. Retroviruses.	25	637-646	2009
Kamiyama H, Yoshii H, Tanaka Y, <u>Sato H</u> , Yamamoto N, Kubo Y.	Raft localization of CXCR4 is primarily required for X4-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection.	Virology	386	23-31	2009
瀧永博之					
Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, Sato H, Oka S.	Combination of V106I and V179D Polymorphic Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Confers Resistance to Efavirenz and Nevirapine but not to Etravirine.	Antimicrob. Agents Chemother.			In press
Tsukada K, Teruya K, Tasato D, <u>Gatanaga H</u> , Kikuchi Y, Oka S.	Raltegravir-associated perihepatitis and peritonitis: a single case report.	AIDS	24	160-161	2010

Watanabe T, Yasuoka A, Honda H, Tanuma J, Yazaki H, Tsukada K, Honda M, Teruya K, <u>Gatanaga H</u> , Kikuchi Y, Oka S.	Serum (1→3) beta -D-glucan as a non-invasive useful adjunctive diagnostic marker for Pneumocystis pneumonia in patients with human immunodeficiency virus.	Clin. Infect. Dis.	49	1128-1131	2009
Honda H, <u>Gatanaga H</u> , Matsumura J, Kamimura M, Goto K, Tsukada K, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S.	Favorable use of non-boosted fosamprenavir in patients treated with warfarin.	Int. J. STD AIDS	20	441	2009
Davaalkham J, Unenchimeg P, Baigalmaa Ch, Oyunbileg B, Tsuchiya K, Hachiya A, <u>Gatanaga H</u> , Nyamkhuu D, Oka S.	High-risk status of HIV-1 infection in the very low epidemic country, Mongolia, 2007.	Int. J. STD AIDS	20	391-394	2009
Hachiya A, Shimane K, Sarafianos SG, Kodama EN, Sakagami Y, Negishi F, Koizumi H, <u>Gatanaga H</u> , Matsuoka M, Takiguchi M, Oka S.	Clinical relevance of substitutions in the connection subdomain and RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase from a cohort of antiretroviral treatment-naïve patients.	Antiviral Res.	82	115-121	2009
Kawashima Y, Pfafferott K, Frater J, Matthews P, Payne R, Addo M, <u>Gatanaga H</u> , Fujiwara M, Hachiya A, Koizumi H, Kuse N, Oka S, Duda A, Prendergast A, Crawford H, Leslie A, Brumme Z, Brumme C, Allen T, Brander C, Kaslow R, Tang J, Hunter E, Allen S, Mulenga J, Branch S, Roach T, John M, Mallal S, Ogwu A, Shapiro R, Prado JG, Fidler S, Weber J, Pybus OG, Klenerman P, Ndung'u T, Phillips R, Heckerman D, Harrigan PR, Walker BD, Takiguchi M, Goulder P.	Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I.	Nature	458	641-645	2009
村上 努					
<u>Murakami T</u> , Kumakura S, Yamazaki T, Tanaka R, Hamatake M, Okuma K, Huang W, Toma J, Komano J, Yanaka M, Tanaka Y, Yamamoto N.	The Novel CXCR4 Antagonist, KRH-3955 Is an Orally Bioavailable and Extremely Potent Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Comparative Studies with AMD3100.	Antimicrob. Agents Chemother.	53	2940-2948	2009

Iwasaki Y, Akari H, <u>Murakami T</u> , Kumakura S, Dewan Z, Yanaka M, Yamamoto N.	Efficient inhibition of SDF-1 α -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists.	Cancer Sci.	100	778-781	2009
村上 努	HIV 複製を制御する宿主因子の探索	The Journal of AIDS Research	11	205-209	2009
村上 努	HIV の粒子形成のメカニズム—Gag 蛋白に関する最新の知見—	Confronting HIV2009	35	5-7	2009
上野貴将					
Motozono C, Yanaka S, Tsumoto K, Takiguchi M, <u>Ueno T</u> .	Impact of intrinsic cooperative thermodynamics of peptide-MHC complexes on antiviral activity of HIV-specific CTL.	J. Immunol.	182	5528-5536	2009
Zheng N, Fujiwara M, <u>Ueno T</u> , Oka S, Takiguchi M.	Strong ability of Nef-specific CD4+ cytotoxic T cells to suppress HIV-1 replication in HIV-1-infected CD4+ T cells and macrophages.	J. Virol.	83	7668-7677	2009
Hassan R, Suzu S, Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, <u>Ueno T</u> , Agatsuma T, Akari H, Komano J, Takebe Y, Motoyoshi K, Okada S.	Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms.	J. Cell Physiol.	221	458-468	2009
足立昭夫					
Yamashita T, Nomaguchi M, Miyake A, Uchiyama T, <u>Adachi A</u> .	Status of APOBEC3G/F in cells and progeny virions modulated by Vif determines HIV-1 infectivity.	Microbes Infect.			In press
Fujita M, Otsuka M, Nomaguchi M, <u>Adachi A</u> .	Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions.	Rev. Med. Virol.			In press
Jere A, Fujita M, <u>Adachi A</u> , Nomaguchi M.	Role of HIV-1 Nef protein for virus replication in vitro.	Microbes Infect.	12	65-70	2010
Kuroishi A, Saito A, Shingai Y, Shioda T, Nomaguchi M, <u>Adachi A</u> , Akari H, Nakayama EE.	Modification of a loop sequence between α -helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) vif and CA α -helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells.	Retrovirol.	6	70	2009

Kamada K, Yamashita T, Hacho K, <u>Adachi A</u> , Nomaguchi M.	Evasion from CypA- and APOBEC-mediated restrictions is insufficient for HIV-1 to efficiently grow in simian cells.	Microbes Infect.	11	164-171	2009
Nagao T, Hacho K, Doi N, Fujiwara S, <u>Adachi A</u> , Nomaguchi M.	Amino acid alterations in Gag that confer the ability to grow in simian cells on HIV-1 are located at a narrow CA region.	J. Med. Invest.	56	21-25	2009
増田貴夫					
Nishitsuji H, Hayashi T, Takahashi T, Miyano M, Kannagi M, <u>Masuda T</u> .	Augmentation of reverse transcription by integrase through an interaction with host factor, SIP1/Gemin2 is critical for HIV-1 infection.	PLoS One	4	e7825	2009
Obitsu S, Ahmed N, Nishitsuji H, Hasegawa A, Nakahama K, Morita I, Nishigaki K, Hayashi T, <u>Masuda T</u> , Kannagi M.	Potential enhancement of osteoclastogenesis by severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a/X1 protein.	Archiv. Virol.	154	1457-1464	2009
Takatsuka N, Hasegawa A, Takamori A, Shimizu Y, Kato H, Ohashi T, Amagasa T, <u>Masuda T</u> , Kannagi M.	Induction of IL-10- and IFN-gamma-producing T-cell responses by autoreactive T-cells expressing human T-cell leukemia virus type I Tax.	Int. Immunol.	21	1089-1100	2009
Kinpara S, Hasegawa A, Utsunomiya A, Nishitsuji H, Furukawa H, <u>Masuda T</u> , Kannagi M.	Stromal cell-mediated suppression of human T-cell leukemia virus type 1 expression in vitro and in vivo by type I interferon.	J. Virol.	83	5101-5108	2009
Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A, Kurimura M, Yamano Y, Hishizawa M, Hasegawa A, Kondo F, Kurihara K, Harashima N, Watanabe T, Okamura J, <u>Masuda T</u> , Kannagi M.	Impaired Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-1 in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages.	Cancer Sci.	100	481-489	2009
岡本 尚					
Cueno ME, Hibi Y, Imai K, Laurena AC, <u>Okamoto T</u> .	Impaired plant growth and development caused by human immunodeficiency virus type.	Transgenic. Res.			In press
Cueno ME, Hibi Y, Karamatsu K, Yasutomi Y, Imai K, Laurena AC, <u>Okamoto T</u> .	Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant.	Transgenic. Res.			In press

Tsuchiya A, Imai K, Asamitsu K, Waguri-Nagaya Y, Otsuka T, <u>Okamoto T.</u>	Inhibition of Inflammatory Cytokine Production from Rheumatoid Synovial Fibroblasts by a Novel IκB Kinase Inhibitor.	JPET			In press
Imai K, Asamitsu K, Victoriano A FB, Cueno ME, Fujinaga K, <u>Okamoto T.</u>	Cyclin T1 stabilizes expression levels of HIV-1 Tat in cells.	FEBS J.	276	7124-7133	2009
Kawaguchi A, Orba Y, Kimura T, Iha H, Ogata M, Tsuji T, Aina A, Sata T, <u>Okamoto T.</u> , Hall WW, Sawa H, Hasegawa H.	Inhibition of the SDF-1α-CXCR4 axis by the CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses the migration of cultured cells from ATL patients and murine lymphoblastoid cells from HTLV-I Tax transgenic mice.	Blood	114	2961-2968	2009
Ohba K, Ryo A, Dewan Z, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Nagashima Y, Tanaka Y, <u>Okamoto T.</u> , Terashima K, Yamamoto N.	Follicular Dendritic Cells Activate HIV-1 Replication in Monocytes/Macrophages Through a Juxtacrine Mechanism Mediated by P-Selectin Glycoprotein Ligand-11.	J. Immunol.	183	524-532	2009
Imai K, Ochiai K, <u>Okamoto T.</u>	Reactivation of latent HIV-1 infection by the periodontopathic bacterium Porphyromonas gingivalis involves histone modification.	J. Immunol.	182	3688-3695	2009
Teranishi F, Takahashi N, Gao N, Akamo Y, Takeyama H, Manabe T, <u>Okamoto T.</u>	Phosphoinositide 3-kinase inhibitor (wortmannin) inhibits pancreatic cancer cell motility and migration induced by hyaluronan in vitro and peritoneal metastasis in vivo.	Cancer Sci.	100	770-777	2009
高折晃史					
Izumi T, <u>Takaori-kondo A.</u> , Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, Akari H, Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T.	MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif.	Retrovirology	6	1	2009
Yamamoto R, Nishikori M, Tashima M, Sakai T, Ichinohe T, <u>Takaori-Kondo A.</u> , Ohmori K, Uchiyama T.	B7-H1 expression is regulated by MEK/ERK signaling pathway in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma.	Cancer Sci.	100	2093-2100	2009

Sakai T, Nishikori M, Tashima M, Yamamoto R, Kitawaki T, <u>Takaori-Kondo A</u> , Suzuki T, Tsuzuki S, Uchiyama T.	Distinctive cell properties of B cells carrying the BCL2 translocation and their potential roles in the development of lymphoma of germinal center type.	Cancer Sci.	100	2361-2367	2009
泉泰輔、高折晃史	APOBEC3G/Vif システムによる HIV-1 の複製制御	実験医学	27	135-144	2009
森川裕子					
Urano E, Ichikawa R, <u>Morikawa Y</u> , Yoshida T, Koyanagi Y, Komano J.	T cell-based functional cDNA library screening identified SEC13-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication.	Vaccine			In press
Mizukoshi F, Yamamoto T, Mitsuki Y, Terahara K, Kawana-Tachikawa A, Kobayashi K, Iwamoto A, <u>Morikawa Y</u> , Tsunetsugu-Yokota Y.	Activation of HIV-1 Gag-specific CD8+ T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen.	Microbes Infect.	11	191-197	2009
Fujii H, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tatsumi J, Hoshino T, <u>Morikawa Y</u> , Yamamoto N, Komano J.	Derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamylmethyl ester inhibit RNaseH activity associated with HIV-1 reverse transcriptase.	J. Med. Chem.	52	1380-1387	2009
Nishi M, Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Sawasaki T, Morishita R, Perrem K, Aoki I, <u>Morikawa Y</u> , Yamamoto N.	Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag.	FEBS Let.	585	1243-1250	2009
Suyama M, Daikoku E, Goto T, Sano K, <u>Morikawa Y</u> .	Reactivation from latency displays HIV particle budding at plasma membrane, accompanying CD44 upregulation and recruitment.	Retrovirology	6	63	2009
間 陽子					
<u>Aida Y</u> , Matsuda G.	Role of Vpr in HIV-1 nuclear import; therapeutic implications.	Current HIV-1 Research	7	136-143	2009
Zhang X, <u>Aida Y</u> .	HIV-1 Vpr: a novel role in regulating RNA splicing.	Current HIV-1 Research	7	163-168	2009
Suzuki T, Yamamoto N, Nonaka M, Takeshima S-n, Hashimoto Y, Matsuda G, Matsuyama M, Igarashi T, Miura T, Tanaka R, Kato S, <u>Aida Y</u> .	Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr-Importin α interactions as a novel HIV-1 therapy.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	380	838-843	2009