

研究課題：HIV が形成する高分子複合体の機能不全化とそれを応用したウイルス制御法の確立に関する研究

課題番号：H21-エイズ-若手-018

研究代表者：鈴木 陽一（京都大学ウイルス研究所 准教授）

## 1. 研究目的

エイズは HIV の感染によって引き起こされる疾患であるが、多剤併用療法が可能となった現在でも、長期服用に伴う副作用や耐性ウイルスの出現が依然として大きな問題となっている。よって、今後のエイズ治療に求められるのは既存の化学療法の欠点を補い、その効果を高めるような治療システムの構築であろう。そのひとつは生体機能の応用である。HIV の複製にはウイルス DNA の合成と組み込み、そしてそれに続くウイルス遺伝子の発現が必須であるが、この一連のプロセスはウイルスゲノムが“RNA”から“DNA”へ、そして再び“RNA”へと変換されるダイナミックな反応である、これらを完遂するためにウイルスゲノムは様々な蛋白質と共に高分子複合体を形成しなければならない。本課題研究では、この HIV 由来高分子複合体に影響を及ぼす細胞性因子を解析し、細胞が本質的にもつウイルス制御機構を明らかにすることを目的とする。

## 2. 研究方法

HIV が感染細胞内で形成するインテグレーション複合体 (preintegration complex : PIC) を抽出するため、VSV-G でシュードタイプした HIV-1 由来レンチウイルスベクターを MOI:40 で HeLa 細胞に感染させた。感染から 6 時間後に、感染細胞の細胞質分画を界面活性剤であるジギトニンを用いて抽出したものを HIV PIC サンプルとした。活性の評価は、PIC サンプルに標的 DNA である ΦX174 DNA を加え、インテグレーションした HIV DNA をサザンブロットィング法で検出することによっておこなった。In vitro 解析に用いる組換え体蛋白質は大腸菌で発現させ、FPLC を用いて調製した。インテグラーゼ (IN) 結合性因子の同定は MLV IN の N 末端領域に 2 種類のエピトープタグを配位した蛋白質を細胞に発現させ、それぞれのエピトープタグに対するアフィニティピーズを用いたタンデムアフィニティ精製によっておこなった。分離された複合体に含まれる蛋白質は質量分析法によって同定した。各蛋白質の HIV IN に対する結合性は免疫沈降法で確認し、ウイルス感染における役割は標的蛋白質をノックダウンした MT-4 細胞を用いておこなった。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたり、HIV の使用は P3 レベルの物理

的封じ込め施設によっておこなった。また、必要な DNA 組換え実験は京都大学の組換え DNA 委員会より承認を受けている。

## 3. 研究結果

研究代表者はマウス白血病ウイルス (MLV) を用いた先行研究で、ウイルスが感染細胞内で形成するインテグレーション複合体 (PIC) の機能維持には BAF や LAP2α のような細胞核ラミナ関連蛋白質が必要であることを報告している (Suzuki *et al.*, EMBO J, 2004)。最近我々は、BAF をリン酸化することによって PIC から BAF を解離し、結果的に MLV PIC のインテグレーション機能を喪失させる細胞性キナーゼ VRK1 を見出した (論文投稿中)。VRK1 によるインテグレーション複合体の機能不全が HIV においても引き起こせるのか否かを検討するために、まず HIV PIC を用いた *in vitro* 解析システムの構築をおこなった。HIV ベクターを感染させた細胞から抽出した PIC は、試験管内においても標的 DNA (ΦX174 DNA) に対するインテグレーション活性を保持しており、この高分子複合体の評価が可能となった。そしてこの解析システムに組換え体 VRK1 を添加し、ATP の存在下でインキュベーションしたところ、HIV PIC のインテグレーション活性が大きく低下した。この結果は、HIV インテグレーションを阻害する細胞性因子が存在することを示している。一方、PIC のような高分子複合体は感染細胞内で形成される量が極めて少なく、このことが生化学的な解析を困難にしている。本研究ではインテグレーション複合体に含まれる細胞性蛋白質の同定をおこなうために、PIC の細胞性構成因子である LAP2α にタンデムエピトープタグを付加した蛋白質を NIH3T3 細胞に発現させ、ウイルスを感染後、アフィニティ精製による PIC の抽出を試みた。しかし、質量分析法に供することのできる機能性 PIC を大量に得ることはできなかった。そこで、PIC のもっとも重要なウイルス性構成因子である IN にタンデムタグを付加し、IN に相互作用する細胞性因子の分離をおこなったところ、tubulin と Huwe1 が新規結合性因子として同定された。そして実際に、この両分子は PIC の構成因子であった。このうち、Huwe1 は HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼであることから、IN のユビキチン化と分解を介して、PIC 機能の低下を引き起こす可能性が考

えられた。しかし、Huwei をノックダウンした MT-4 細胞において、HIV のインテグレーションまでの前期過程には、コントロール細胞との差を見出せなかった。一方、Huwei ノックダウン細胞より産生される HIV の感染価がコントロール細胞に比して 1.5-3 倍上昇していた。この結果は、IN 結合性因子として同定された Huwei が感染性 HIV-1 粒子の産生を負に制御する可能性を示している。

#### 4. 考察

本研究では HIV 感染で形成されるヌクレオプロテイン複合体、特にインテグレーション複合体 (PIC) に着目し、その機能に影響を及ぼす細胞性蛋白質の解析をおこなった。マウスのレトロウイルス (MLV) を用いた先行研究より、研究代表者は PIC 機能に必須の BAF を PIC から解離させる細胞性キナーゼ VRK1 を同定しているが、この分子は HIV PIC のインテグレーション活性も抑制することがわかった。この結果は HIV PIC における BAF の重要性を示すと同時に、インテグレーション反応を阻害する細胞性因子の存在を示唆している。BAF はリン酸化修飾によってその DNA 結合活性を失うことから、VRK1 によって HIV PIC の BAF がリン酸化され、ウイルス DNA から解離したものと思われる。一方、PIC の構成状態を把握するには、PIC を大量に分離し、質量分析法によって構成蛋白質を同定する手法が考えられる。しかし、感染細胞で形成される複合体の量は極めて少ないと予想され、実際に本研究でも機能性 PIC を高純度に精製することはできなかった。そこで、既知の構成因子に相互作用する分子を同定することで PIC の構成状態の解析を試みた。そして、IN に結合する細胞性因子として tubulin と Huwei を新規に見出した。両分子は PIC の構成因子であったが、Huwei は HIV 感染の前期過程ではなく、後期過程、とくに感染性ウイルス粒子の産生段階を制御していることが明らかとなった。IN は PIC 機能に必須の因子であるが、これに作用する分子がインテグレーション以外の過程を負に調節しているという結果は興味深い。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

本年度は HIV ゲノムを内包するヌクレオプロテイン複合体を感染細胞から分離し、その構成状態の把握と、機能低下をもたらす細胞性因子の解析を目標とした。研究代表者はすでに MLV PIC を用いてインテグレーション機構の解析をおこなってきた。HIV の場合、PIC の抽出は難しく、我が国ではその解析が進んでいないのが現状である。しかし、

本研究において HIV PIC の *in vitro* 評価システムの確立することができた。さらに、このシステムを用いることによって、VRK1 が HIV インテグレーションを阻害することを実験的に証明した。一方、質量分析法による PIC 構成因子の網羅的解析をおこなうことは依然として困難であり、今後は複合体をより効率的に形成する HIV-1 感染システムの樹立と分離・精製法の確立が必要である。しかし、本研究では PIC の構成因子に相互作用する細胞性因子を質量分析法によって解析し、Huwei という HIV の複製を抑制する分子の同定に至った。以上のことより、HIV 増殖を負に制御する細胞性因子の同定という本年度の目標はある程度達成できたものと考えられる。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

HIV インテグレーションに関する研究は、組換え IN を用いた生化学的解析や、変異ウイルスを用いた遺伝子学的解析が中心であるが、本研究ではこの反応機構をヌクレオプロテイン複合体を用いて解析した。特に、VRK1 のようなインテグレーションを抑制する分子の報告はこれまでになく、本研究の結果は学術的に意義が大きい。また HIV PIC の *in vitro* 解析はこれまで我が国でおこなわれてこなかったが、このシステムは IN 阻害剤の開発にもつながる重要な解析系である。したがって本研究の成果は国際的ならびに社会的にも意義が高い。

##### 3) 今後の展望について

今後は PIC 構成因子の網羅的解析を目指す必要がある。また、本年度に同定された細胞性因子の HIV 感染における関与を *in vivo* で明らかにしなければならない。一方、PIC だけでなく、逆転写反応や遺伝子発現のプラットフォームとなるヌクレオプロテイン複合体の解析も進めていきたいと考えている。

#### 6. 結論

本研究では HIV の機能性インテグレーション複合体を用いて、その活性評価システムの確立と細胞性阻害因子の解析をおこなった。結果として、インテグレーションを抑制する VRK1 と感染性ウイルス粒子の形成を制御する Huwei の同定に到った。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

現在のところなし

研究発表

研究代表者

鈴木陽一

原著論文による発表

欧文

1) Shinoda, Y., Hieda, K., Koyanagi, Y., and Suzuki, Y. Efficient transduction of cytotoxic anti-HIV-1 genes by a gene-regulatable lentiviral vector. *Virus Genes* 39: 165-175, 2009.

和文

1) 鈴木康嗣、鈴木陽一. HIV の病原性と細胞内防御機構. 日本臨牀. (印刷中)

口頭発表

国内

1) Suzuki, Y. Disruption of retroviral integration complex by a cellular kinase. The 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research. September 13-14, 2009, Kyoto, Japan.

2) 鈴木陽一、山元誠司、大川克也、増田貴夫、森山裕子、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学術集会. 2009 年 10 月 25-27 日、東京.

3) 渡部匡史、鈴木陽一、宮澤正顕、小柳義夫. Rho GTPase family による HIV-1 複製抑制. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 2009 年 10 月 25-27 日、東京.

4) 鈴木康嗣、小川加那子、小柳義夫、鈴木陽一. レトロウイルスゲノムの組み込み機能を阻害する細胞性キナーゼの同定とその作用機序の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 2009 年 10 月 25-27 日、東京.

5) 鈴木陽一. 細胞性因子によるレトロウイルスのゲノム組み込み機構の制御 - エイズウイルスの制圧に向けて -. 中高温微生物センター開所記念シンポジウム. 2009 年 11 月 19 日、山口.

6) 鈴木陽一. インテグレーションの分子メカニズムと細胞性因子 - 新しい阻害剤の開発に向けて -. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2009 年 11 月 26-28 日、名古屋.

7) 山元誠司、大川克也、増田貴夫、森山裕子、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 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2009 年 11 月 26-28 日、名古屋.

研究課題：高感度薬剤耐性 HIV 検出法を用いた微小集族薬剤耐性 HIV の動態と HAART 治療効果との相関についての研究

課題番号：H21-エイズ-若手-019

研究代表者：西澤 雅子（国立感染症研究所 エイズ研究センター 研究員）

研究分担者：杉浦 互（（独）国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター 感染・免疫研究部 部長）

## 1. 研究目的

抗 HIV 薬剤の投与を受けている HIV/AIDS 患者血中では quasi-species の一部に微小集族(minority population)として薬剤耐性ウイルスが潜在している可能性が知られている。近年、検出技術の進歩とともに、この minority population として存在する薬剤耐性 HIV が HAART による薬剤耐性の選択と治療の転機に影響を及ぼしているが示唆されるようになった。本研究では 20%以下の比率で存在する薬剤耐性 HIV を検出可能な高感度薬剤耐性 HIV 検出法を用いて HAART を受けている患者検体からの微小な薬剤耐性 HIV 検出を試み、至適治療を進める上での臨床的有用性について検討する。

## 2. 研究方法

高感度薬剤耐性 HIV 検出法（高感度法）は米国 CDC で開発された定量 PCR を応用した定性的検出法を用いた。検出する耐性変異としてサブタイプ B では核酸系逆転写酵素阻害剤(NRTD)に対する耐性変異 M41L, K65R, K70R, M184V, T215F/Y、非核酸系逆転写酵素阻害剤に対する耐性変異 K103N, Y181C の計 8 変異を対象とした。尚、CRF01\_AE では、K65R を除く 7 変異を検査対象とした。高感度薬剤耐性 HIV 検出法の概略であるが、標的耐性変異毎に特異的な primer と probe を構築し定量 PCR を行い、これを薬剤耐性特異的反応とする。また逆転写酵素遺伝子内の比較的保存された領域 (HXB2 での nt 番号 258 ~420) を増幅する primer と probe を構築し定量 PCR を行い、これを共通反応（内部コントロール）とした。薬剤耐性特異的反応と共通反応それぞれについて、増幅 cycle が閾値を越えた cycle 数 (Ct 値) を算出した。共通反応の Ct 値と、薬剤耐性特異的反応の Ct 値の差を計算し、これを  $\Delta$ Ct 値とした。この  $\Delta$ Ct 値が予め計算・設定した Cut off 値よりも小さい場合には薬剤耐性陽性、Cut off 値よりも大きい場合には薬剤耐性陰性と判定した。

解析対象は、ダイレクトシーケンシング法（通常法）で複数のクラスの抗 HIV 薬剤にたいする耐性変異が複数確認され多剤耐性と判定された 13 サンプル(サブタイプ B 10 サンプル、CRF01\_AE 3 サンプル)を選択した。このサンプルの中から多剤耐性と判定された通常法のポイント

を 1 点選択し、このポイントについて高感度法を実施し、minority population の薬剤耐性 HIV が検出されるか解析を行い、通常法の結果と比較検討を行った。

（倫理面への配慮）

本研究では感染者血清を使用するため、国立感染症研究所の医学研究倫理審査委員会へ倫理審査を申請しその承認を得る。また薬剤耐性変異を組み込んだベクターの作製で組換え DNA 実験を行うので、組換え DNA 実験安全委員会に実験申請を行いその許可を得る。

## 3. 研究結果

サブタイプ B 10 サンプル中 2 サンプルから通常法では検出できない微小集族として存在していた T215Y を、CRF01\_AE 3 サンプル中 1 サンプルから K70R を検出した。選択したサブタイプ B 10 サンプルのうちの 3 サンプルは長期間にわたって HAART 療法を受け、薬剤耐性検査を複数回実施しているサンプルであった（サンプル A：35 回、サンプル B：32 回、サンプル C：15 回）。この 3 サンプルの各薬剤耐性検査ポイントについて高感度法を行い minority population の薬剤耐性 HIV の経時的動向について解析を行った。その結果、サンプル C では通常法の結果と高感度法の結果は一致したが、サンプル A と B では乖離が認められ、高感度法のみで検出される minority population として薬剤耐性 HIV が存在していた。サンプル A では通常法では検出されなかった K103N が NVP 投与開始後に検出された。またサンプル B では、NVP 投与期間中に Y181C が通常法で検出されていたが、その後 NVP の投与中止に伴い Y181C は通常法では検出されなくなり一見消失したように見えていた。しかし高感度法ではその後も Y181C は minority population として存在し続けていたことが確認された。

## 4. 考察

多剤耐性を獲得した 13 サンプルについて高感度法で minority population の薬剤耐性の有無を解析した。その結果、高感度法のみで薬剤耐性が検出される事例が 3 サンプル観察された。反対に通常法でのみ検出された耐性変異は無かった。通常法での minority population の薬剤

耐性 HIV の検出の限界は electropherogram の精度から major population に対して 20%程度とされており、今回見いだされた minority population はそれ以下の比率で存在していたと思われる。minority population の薬剤耐性 HIV の検出率は 3/13=23%であり、約 1/4 の割合で薬剤耐性 HIV を見逃している可能性が危惧される。経時的なサンプルの解析では薬剤変更により、通常法で薬剤耐性変異が消失したような症例でもその後も長期間に渡り minority population に薬剤耐性 HIV が持続して存在していることが高感度法による解析から確認された。今回の解析は限定的であり、minority population に見いだした薬剤耐性変異がその後の治療の経過にどのように影響を及ぼしたかまでは明らかにできなかったが、今回の結果は、過去の投与薬剤によって選択・誘導された薬剤耐性変異株が長期に渡って minority population として存在することを立証した。また 2 回目以降の HAART レジメの変更に際しては、それ以前の治療による耐性 HIV の存在を高感度法で確認する必要性を示唆している。その是非については今後の研究で明らかにしていきたい。

## 5. 自己評価

### 1) 達成度について

研究一年目の本年度は高感度薬剤耐性 HIV 検査法の立ち上げと系の最適化に取り組み予定通り完了した。また今年度解析対象とした NRTI、NNRTI に対する薬剤耐性変異を組み込んだベクターの作成と、これを用いて目的とする薬剤耐性変異全てについて検出法を確立した。多剤耐性に陥った時点の検体を 13 サンプル解析し、そのうち 3 サンプルから通常では検出できない minority population の薬剤耐性変異を高感度法によって確認する事に成功した。この 3 サンプルについて、異なる時期に行われた薬剤耐性検体サンプルの解析を高感度法で実施し、高感度法の臨床的活用法について考察を行った。当初の計画より解析症例数は少なかったが、本年どの目的概ねは達成されたと考える。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

患者血中に存在する minority population の薬剤耐性 HIV が HAART 治療の転機に関与する可能性が近年報告されており、本研究は高感度法の臨床的意義について結論を出したと考えている。本年度の成果として治療変更後に薬剤耐性変異が minority population として長期間持続感染している事実を捉えており、これは薬剤を切り替える際に影響する重要な情報であり、臨床的・社会的意義があると思われる。

また、過去の薬剤耐性変異株が持続して維持される事実 HIV 感染症の特徴の一つである、latency の問題とも繋がり、学術的に興味深い発見である。

### 3) 今後の展望について

現時点では高感度法で解析が可能な薬剤耐性変異は NRTI と NNRTI に限られているが、次年度はプロテアーゼ阻害剤(PI)に対する耐性変異 D30N、M46I/L、I50V、V82A/F/T/S、I84V と L90M の検出系を確立する。2008 年に承認され処方数の増加しているインテグラーゼ阻害剤の耐性変異 Q148H/K/R、N155H、Y143R/H/C の検出系の確立も行う。新たに構築する検出系も加えて、minority population の薬剤耐性 HIV が HAART の転機に及ぼす影響についてより詳細な解析を進める。また minority population の薬剤耐性 HIV が持続する機序についても解析を試みる。

## 6. 結論

定量 PCR を応用した高感度薬剤耐性 HIV 検査法による NRTI、NNRTI 耐性変異検出系をサブタイプ B と CRF01\_AE について確立した。同一サンプルについて通常法と高感度法の両方で薬剤耐性変異の検出を行い、高感度法の耐性検出頻度が通常法よりも高い事を確認した。そ高感度法の臨床的有用性の評価は今後の課題である。

## 7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし。

## 研究発表

## 研究代表者

西澤 雅子

## 口頭発表

## 国内

1. 西澤雅子、Jeffery A. Johnson、Walid Heneine、山本直樹、杉浦互. 高感度薬剤耐性 HIV 検出法を用いた微少集族薬剤耐性 HIV の検出と存在比率に関する研究. 第 23 回日本エイズ学会、2009、名古屋.
2. 服部純子、瀧永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原 孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、今井光信、長島真美、貞升健志、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、藤井 毅、岩本愛吉、西澤雅子、仲宗根正、巽 正志、椎野禎一郎、林田庸総、岡 慎一、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、横幕能行、濱口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、矢倉裕輝、白阪琢磨、桑原 健、小島洋子、森 治代、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、堀 成美、杉浦 互. 2003-2008 年の新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性頻度の動向. 第 23 回日本エイズ学会、2009、名古屋.
3. 鈴木寿子、服部純子、村田大悟、三浦秀佳、伊部史朗、藤野真之、西澤雅子、山本直樹、杉浦互. インテグラーゼ阻害剤耐性化機序の分子生物学的解析. 第 23 回日本エイズ学会、2009、名古屋.

## 研究分担者

杉浦 互

## 原著論文による発表

## 欧文

- 1) Matsuyama S, Shimizu A, Ode, H, Hata M, Sugiura W, Hoshino T. Structural and Energetic Analysis on the Complexes of Clinically-isolated Subtype C HIV-1 Proteases and Approved Inhibitors by Molecular Dynamics Simulation. *The Journal of Physical Chemistry*. 2009 Oct 29;10:360
- 2) Land S, Cunningham P, Zhou J, Frost K, Katzenstein D, Kantor R, Chen YM, Oka S, DeLong A, Sayer D, Smith J, Dax EM, Law M; TAQAS Laboratory Network. TREAT Asia Quality Assessment Scheme (TAQAS) to standardize the outcome of HIV genotypic resistance testing in a group of Asian laboratories. *J Virol Methods*. 2009 Aug;159(2):185-93.
- 3) Hasegawa N, Sugiura W, Shibata J, Matsuda M, Ren F, Tanaka H. Inferring within-patient HIV-1 evolutionary dynamics under anti-HIV therapy using serial virus samples with vSPA. *BMC Bioinformatics*. 2009 Oct 29;10(1):360.
- 4) Iwatani Y, Chan DS, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Yamamoto N, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W. HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/degradation of APOBEC3G involves four critical lysine residues in its C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 17;106(46):19539-44. Epub 2009 Nov 3.

## 口頭発表

## 海外

- 1) M Fujino, H Miura, J Hattori, S Ibe, S Fujisaki, M Matsuda, M Nishizawa, Y Iwatani and W Sugiura. Mechanism of darunavir resistance acquisition in multi-protease inhibitor resistant HIV-1. XVIII international HIV Drug Resistance Workshop, June 9-13 2009, Fort Myers, Florida

- 2) J Shibata, F Ren, Y Iwatani, H Tsang, M Matsuda, N Hasegawa, H Tanaka, and W Sugiura. Within-Host Coevolution of Gag P453L and Protease D30N/N88D Demonstrates virological Advantage in a Highly Protease Inhibitor-Exposed HIV-1 Case, 10th Annual symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov15-18 2009, Richmond,VA
- 3) Y Iwatani, DS.B.Chan, L Liu, H Yoshii, J Shibata, JG. Levin, A M.Gronenborn, and W Sugiura. Fourlysine Residues In The Apobec3g C-Terminal Domain Are Critical For Hiv-1 Vif-Mediated Ubiquitination/Degradation. 10th Annual symposium on Antiviral Drug Resistance,Nov15-18 2009, Richmond,VA
- 4) T Masaoka, T Sawasaki, W Sugiura, Y Endo, M Tatsumi, N Yamamoto, and A Ryo. Development Of Method For Testing Hiv-1 Rpotase Drug-Resistance Based On Cell-Free Protein Production System. 10th Annual symposium on Antiviral Drug Resistance,Nov15-18 2009, Richmond,VA

研究課題：HIV-1 ゲノム産物の翻訳後修飾とその機能に関する研究

課題番号：H21- エイズ- 若手- 020

研究代表者：高宗 暢暁（熊本大学大学院生命科学研究部 助教）

## 1. 研究目的

抗 HIV 薬に対する薬剤耐性ウイルスの出現は、HIV 感染症治療の長期療養が与える最大の課題の一つであり、この主要な原因は HIV-1 の易変異原性の形質である。薬剤耐性ウイルス出現を出来るだけ回避しうる新しい作用機序に基づく HIV-1 制御法開発は急務である。本研究では、翻訳後修飾という観点で HIV ゲノム産物に着目し、HIV-1 複製に必須の翻訳後修飾を探査し、その翻訳後修飾に関わる宿主因子を標的とした、薬剤耐性出現を回避しうる新しい治療戦略を開拓することを目的とする。本研究期間では HIV-1 ゲノムに含まれるウイルス複製に必須の遺伝子や病原性と密接に関連する遺伝子産物の翻訳後修飾を調べ、新規翻訳後修飾部位に変異を導入し、野生型ウイルスと比較してウイルス複製能力を中心とするどのような表現系の違いが現れるのかを検討する。さらに関連する宿主因子の同定を試み、その宿主因子の機能阻害によるウイルス制御法の検討を行う。

## 2. 研究方法

本研究の対象とする HIV-1 遺伝子として、ウイルス複製に必須の遺伝子や病原性と密接に関連する *gag* 及び *nef* 遺伝子産物に重点を置いた。また複製に重要な翻訳後修飾である Gag 及び Nef の N-ミリスチル化を担う宿主因子 N-ミリスチルトランスフェラーゼ (NMT) に着目した。研究方法の概要は以下の通りである。主として HIV-1<sub>NL4-3</sub> 株のウイルスゲノムを用いたが、研究の展開上、適宜、HIV-1<sub>NL4-3</sub> 株以外の HIV-1 株や近縁のレンチウイルスである SIV 等も利用することになっている。

ウイルス性タンパク質の翻訳後修飾の解析方法の主な流れとして、HIV 研究で一般的に用いられるヒト胚腎由来細胞 HEK293 細胞等に発現ベクターを導入し HIV-1 ウイルスタンパク質安定高発現細胞株を樹立し、本細胞からウイルス性タンパク質を分離して翻訳後修飾解析等を行う。また HIV-1 持続産生細胞から産生される感染性 HIV-1 を回収してウイルス性タンパク質の翻訳後修飾解析等を行う。

同定した翻訳後修飾の HIV-1 複製における意義を明らかにするために、翻訳後修飾部位に各種変異を導入した HIV-1<sub>NL4-3</sub> 発現ベクターを構築し、野生株と変異株間の表現系の比較を行う。表現系の内容としては、第一にウイルス複製能力の差異を解析する。次に注目するウイルス遺

伝子産物の各種機能・注目する特徴の評価を適宜おこなう。各種翻訳後修飾に関わる宿主性酵素の同定を siRNA、阻害剤、ドミナントネガティブ変異体等を利用し行う。

### (倫理面への配慮)

本研究で行った実験については、倫理面への配慮を必要としないものであった。

## 3. 研究結果

初年度 (H21 年度) においては、HIV-1 遺伝子産物の中で、Gag 及び Nef に力点を置いて研究を進めた。その結果、主として以下の 3 つの結果を得た。

(1) Nef に関する新たな知見として、その安定性が著しく低いことを明らかにした。プロテアソーム阻害剤処理によって Nef の安定性が上昇した。現在まで、Nef の C 末端側 (129-206) にその不安定性を規定する領域 (Nef degradation sequence (NDS) と名付け特許申請中：特願 2009-239220) が含まれていることを明らかにしている。鋭意 Nef の不安定性と関連するユビキチン化を含む翻訳後修飾の解析を進めている。興味深いことに、Nef の K158E 変異体 (NDS 内の変異) の安定性の上昇が観察されたが、この Nef 変異をもつ HIV-1 の複製能力は著しく低いことが明らかになった。

(2) Gag と Nef に共通の翻訳後修飾であり HIV-1 複製に重要な N-ミリスチル化は、NMT によって行われる。NMT の触媒活性の阻害では、様々な細胞内のオルガネラに局在している全ての NMT の機能を完全に阻害しうることから細胞への障害が大きいと予想される。本研究では、HIV-1 複製と関連する NMT 分子種の機能阻害という観点で研究を行った。NMT の触媒活性には必要とされないが、NMT のミリスチル化が行われるリボソームへの局在に重要な NMT のアミノ末端領域からなる変異体 (NMT-Nt 変異体) の発現は、HIV-1 の産生を抑制することが明らかになった。

(3) Gag タンパク質の中で、ウイルスコアを形成するキャプシド (CA) タンパク質は、その Ser16 がリン酸化を受け、そのリン酸化はウイルスが宿主細胞への感染プロセスに重要であることを見出した。

## 4. 考察

プロテアソーム阻害剤処理によって Nef の安定性が上昇したことから、ユビキチン化-プロテアソーム系による



分解系と Nef の安定性との関連性が推定された。その責任領域である NDS 領域内の K158E 変異導入によって、Nef 安定性の上昇を認めたが、K158 がその不安定性と関連するユビキチン化を受けないことが示唆され、K158E による安定性上昇の機構については不明なままである。Nef K158E 変異を含む HIV-1 の複製能力の低下から、Nef 不安定性が HIV-1 複製増強に寄与している可能性が考えられた。鋭意 Nef の安定性と関連する翻訳後修飾の解析を進め、そのことについて検証する必要がある。

NMT のアミノ末端領域は触媒活性には必須でないが、リボゾーム局在に重要な領域である。触媒領域をもたない NMT-Nt 変異体の発現によって HIV-1 の産生が抑制されたことにより、この変異体が Gag 及び Nef のミリストイル化に関わるリボゾーム局在の内在性 NMT に影響してその機能を阻害した可能性が考えられる。鋭意このメカニズムに関する解明を行う必要がある。

ウイルスコアを形成する CA の Ser16 のリン酸化の意義について、宿主細胞に侵入後からウイルスゲノムがインテグレーションされる前の段階で重要であることが考えられた。このことについて関連する宿主因子も含め鋭意、各種検討を進める必要がある。

## 5. 自己評価

### 1) 達成度について

初年度、HIV-1 ゲノム産物の中で Gag および Nef に着目し検討した。また Gag および Nef に共通でウイルス複製に重要な翻訳後修飾であるミリストイル化を担う宿主因子 NMT に着目し検討した。

Nef に関しては、その新しい特性として著しく不安定なタンパク質であることを明らかにし、タンパク質の不安定性を誘導するために必要十分となる NDS の同定とこれに関する特許出願を行うに至った。更にこの Nef 不安定性が、HIV-1 複製増強に重要であることが示唆されるまでに至った。その不安定性と関連するユビキチン化を含む翻訳後修飾の存在が推定されたが、その特定までに至らず次年度に持ち越しとなった。しかしながら、本研究において Nef 不安定性、翻訳後修飾、及びウイルス複製の 3 者間の関連性という全く新しい観点の HIV 研究への導入は前進である。

翻訳後修飾に関わる宿主因子の一つである NMT の触媒ドメインを欠損しリボゾーム局在能を残した NMT-Nt 変異体の発現により、HIV-1 産生抑制されたことは、新しい NMT 機能制御法開発の端緒になると考えられ前進した。

ウイルスコアを形成する CA の Ser16 のリン酸化とそのウイルス複製における重要性が示されたことから、Gag の翻訳後修飾についても前進したと考えられる。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

HIV-1 複製に極めて重要な翻訳後修飾の阻害によるウイルス複製制御法の開発は、薬剤耐性ウイルス出現を最小化する HIV/エイズ治療戦略の方向性の一つになると考える。本研究はその端緒になる重要な位置にあると考える。

### 3) 今後の展望について

Nef の不安定性と直接関連する翻訳後修飾(ユビキチン化等)の探索を鋭意進行中である。これが同定されれば、その安定性を回復した Nef 変異体が HIV-1 複製にどのような影響を与えるのか検証できる。Nef K158E をもつ HIV-1 の複製能力が低いことから、同様にその変異をもつ HIV-1 複製能力も低下するのではないかと期待される。更に Nef の不安定性に関わる宿主因子の同定に至れば、Nef 安定性の調節を介した HIV-1 制御という全く新しいウイルス制御法の開発に発展することも考えられる。

HIV-1 複製と関連すると考えられるリボゾーム局在型の NMT に関する理解を深めることが重要である。NMT がどのようにしてリボゾームへ移行・局在するのかその機構の解明は新しい HIV-1 制御法の立案につながると考えられる。

## 6. 結論

Nef は不安定なタンパク質であり、その特性が HIV-1 複製に重要である可能性が示唆された。Nef の不安定性と関連する翻訳後修飾の同定が期待される。

HIV-1 複製に必須の翻訳後修飾であるミリストイル化を担う NMT の機能を阻害するにあたり、HIV-1 特異性向上の観点から HIV-1 複製と関連すると考えられるリボゾーム局在型 NMT を限定的に標的とすることは重要であると考えられる。

ウイルスコアを形成する CA の Ser16 のリン酸化とそのウイルス複製における重要性が示された。

## 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 高宗暢暁、三隅将吾、入坂由香梨;「タンパク質低発現化ペプチドをコードする遺伝子およびその使用方法」; 出願人: 国立大学法人 熊本大学; 特願 2009-239220; 平成 21 年 10 月 16 日出願

## 研究発表

## 研究代表者

高宗暢暁

口頭発表

## 国内

- 1) 入坂由香梨、三隅将吾、杉本幸彦、庄司省三、高宗暢暁. HIV-1 病原性因子 Nef のタンパク質安定性に関する解析. 第26回日本薬学会九州支部大会、2009、福岡
- 2) 高宗暢暁、黒江徹也、杉本幸彦、三隅将吾、庄司省三. N-ミリストイルトランスフェラーゼ変異体による HIV-1 複製制御に関する解析. 第82回日本生化学会大会、2009、神戸
- 3) 高宗暢暁、黒江徹也、杉本幸彦、三隅将吾、庄司省三. N-ミリストイルトランスフェラーゼを介した HIV-1 複製制御に関する研究. 第33回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2009、唐津
- 4) 井上睦美、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾. プロリルイソメラーゼ Pin1 依存性 HIV-1 脱殻の分子機構. 第82回日本生化学会大会、2009、神戸
- 5) 井上睦美、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾. プロリルイソメラーゼ Pin1 依存性 HIV 脱殻過程の解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会、2009、東京
- 6) 井上睦美、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾. HIV-1 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. 第23回日本エイズ学会、2009、名古屋
- 7) 小川実菜子、角真太郎、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾. HIV-1 p2 peptide のポストエントリー過程における役割に関する解析. 第23回日本エイズ学会、2009、名古屋

