

201029027A

平成22年度 厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
H22-エイズ-一般-003

HIV の構造、増殖、変異に関する研究

平成22年度

総括・分担研究報告書

平成23年3月

研究代表者 佐藤 裕徳
(国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・室長)

平成22年度 厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
H22-エイズ-一般-003

HIVの構造、増殖、変異に関する研究

平成22年度

総括・分担研究報告書

平成23年3月

研究代表者 佐藤 裕徳
(国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・室長)

研究組織

研究者名	分担	所属	役職
佐藤 裕徳	研究代表者	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター	室長
梁 明秀	研究分担者	横浜市立大学 医学部微生物学	教授
村上 努	研究分担者	国立感染症研究所 エイズ研究センター	室長
岩谷 靖雅	研究分担者	国立病院機構 名古屋医療センター	室長
塩田 達雄	研究分担者	大阪大学微生物病研究所 感染機構研究部門	教授
増田 貴夫	研究分担者	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科	准教授
間 陽子	研究分担者	理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット	ユニットリーダー
岡本 尚	研究分担者	名古屋市立大学大学院 医学研究科	教授
本村 和嗣	研究分担者	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター	主任研究官
足立 昭夫	研究分担者	徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部	教授
櫻木 淳一	研究協力者	大阪大学微生物病研究所 感染機構研究部門	助教
三隅 将吾	研究協力者	熊本大学大学院 医学薬学研究部	准教授
久保 嘉直	研究協力者	長崎大学熱帯医学研究所 エイズ・感染防御学	助教
横山 勝	研究協力者	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター	主任研究官

目 次

I. 総括研究報告書	1
研究代表者：佐藤 裕徳 (国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター)	
II. 分担研究報告書	
II-1. 原子・分子レベルの研究	
1. HIV とその増殖因子の <i>in silico</i> 構造解析への応用	5
「HIV-1 Gp120 の立体構造・抗体感受性・多様性の制御要因の特定」	
佐藤 裕徳 (国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター)	
II-2. 分子・細胞レベルの研究	
2. 無細胞系蛋白質合成系と蛍光分子相互作用を用いた HIV の増殖制御因子の網羅的同定	9
「HIV の複製と病原性に関与する宿主因子の探索」	
梁 明秀 (横浜市立大学医学部微生物学教室)	
3. HIV 感染抵抗性因子の構造機能解析	13
塩田 達雄 (大阪大学微生物病研究所)	
4. HIV 感染制御因子とその解除因子の構造機能解析	17
「HIV-1 Vif が結合する APOBEC3 の相互作用部位 (インターフェイス) の構造の解明」	
岩谷 靖雅 (名古屋医療センター 臨床研究センター)	
5. HIV 感染制御因子の構造機能解析	21
村上 努 (国立感染症研究所・エイズ研究センター)	
6. HIV ゲノム逆転写制御因子の構造機能解析	25
「インテグラーゼの多量体形成と機能相関」	
増田 貴夫 (東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科)	
7. HIV ゲノム核移行制御因子の構造機能解析	29
「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」	
間 陽子 (理化学研究所・分子ウイルス学特別研究ユニット)	
8. HIV ゲノム転写制御因子の構造機能解析	33
「HIV プロウイルス DNA のクロマチン構造と潜伏感染に関する研究」	
岡本 尚 (名古屋市立大学・医学研究科)	

II-3. 分子・細胞・個体レベルの研究	
1. 新型シーケンサーを用いた HIV 準種の包括的ゲノム解析.....	37
本村 和嗣 (国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター)	
2. HIV 宿主指向性、感染力、増殖能の決定因子の解析.....	41
「HIV 種特異性と動物モデルの研究」	
足立 昭夫 (代) 野間口雅子 (徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部)	
III. 協力研究報告書	
1. HIV 脱殻過程に関する研究.....	45
三隅 将吾 (熊本大学大学院・医学薬学研究部・薬学生化学分野)	
2. tetherin の HIV-1 cell-cell transmission に及ぼす影響.....	49
久保 嘉直 (長崎大学熱帯医学研究所エイズ感染防御分野)	
IV. 業績一覧 (2010)	53

I. 総括研究報告書

研究課題：HIV の構造、増殖、変異に関する研究

課題番号：H22-エイズ一般-003

研究代表者：佐藤裕徳（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 室長）

研究分担者：梁明秀（横浜市立大学医学部微生物学・分子生体防御学 教授）、足立昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）、塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所感染機構研究部門 教授）、本村和嗣（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官）、村上努（国立感染症研究所エイズ研究センター 室長）、増田貴夫（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 准教授）、岡本尚（名古屋市立大学医学研究科 教授）、間陽子（理化学研究所 ユニットリーダー）、岩谷靖雅（国立病院機構名古屋医療センター 室長）

研究要旨

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の理解と増殖制御に役立つ情報と新技術の基盤構築を目的とする。コンピュータのシミュレーション技術を用いて、増殖制御因子の構造・機能・変異を分子・原子レベルで研究する。実験と臨床試料の解析により、HIV の細胞や個体レベルでの増殖と変異のしくみを研究する。関連する知見を統合し、HIV のより良い理解を目指す。特に、創薬やワクチン開発の基盤となる蛋白質の相互作用について、構造・機能・進化の統一的理解に重点を置いて進める。初年度の研究は順調に進み、以下の成果を得た。① HIV-1 の構造蛋白質（エンベロープ Gp120、カプシド）、酵素（インテグラーゼ、逆転写酵素、プロテアーゼ）、アクセサリ蛋白質（Vpr）、並びに細胞の抗 HIV 蛋白質（APOBEC3、テザリン）について立体構造、機能、および分子進化に関する新知見を得た（佐藤、塩田、岩谷、増田、間）。② ウイルス複製を抑制するウイルス由来ペプチドや細胞蛋白質を見つけた（村上、梁、岡本）。③ 新型シーケンサーを用いて血液試料中の HIV 準種を包括的に解析する系を作った（本村）。④ カニクイザルで効率良く増殖する HIV-1 を得た（足立）。

1. 研究目的

HIV の構造、増殖、変異の知見は、エイズ対策の基礎研究から疫学、臨床応用研究に幅広く不可欠な基盤情報となる。しかし、国内には、これらを系統的に研究する組織は無い。このため、HIV の理解に必要な原子・分子レベルから細胞・個体レベルの解析を包括的に実施する基盤は無い。

現在、生命科学において統合の重要性が高まっている。実験、自然界由来の材料の解析、コンピュータを用いたシミュレーション等の多様な解析アプローチを統合的に用い、複雑で動的な生命系の全体の理解を目指すもので、ウイルス感染症の基礎・疫学・臨床研究分野においても極めて重要なアプローチと考えられる。

以上の観点から、本研究では、HIV の基礎研究者が連携し、3年計画で、分担して HIV

の構造、増殖、変異の原子・分子レベルから細胞・個体レベルの新知見を収集し、関連する知見を統合して HIV のより良い理解を目指す。その際、基礎ウイルス学分野の汎用技術と先端技術分野の多様な解析アプローチを組み合わせる研究を進める。

本研究では、特に、感染症が発現する発端となり、創薬やワクチン開発の基盤となる蛋白質の相互作用について、構造・機能・進化の統一的理解に重点を置いて進める。これにより、今後の HIV 基礎研究の新たな解析手法や方向性が生まれ、我が国のエイズ対策の科学的基盤が拡充すると期待される。構造・増殖・進化の統合的研究は、組織的研究の実施で初めて可能となる。学術的にも重要かつ斬新な研究で、内外に類似の特色をもつ HIV 研究組織は無い。

2. 研究方法

本研究では、基礎ウイルス学分野の汎用技術と先端技術分野の多様な解析アプローチを組み合わせ、研究を進める。これには、培養細胞と動物の感染実験、変異導入解析等の古典的な解析手法から、コムギ無細胞タンパク質合成系とアルファスクリーン技術を組み合わせた蛋白質相互作用の包括的解析、新型シーケンサーによる包括的ゲノム解析、コンピュータを用いたシミュレーション技術等の先端技術が含まれる。

本研究では、HIVの構造、増殖、変異の理解に必要な以下の情報を分担して収集する。これには、原子・分子レベルから細胞・個体レベルの研究が含まれる。特に、「蛋白質の相互作用」の理解に重点を置く。共同研究により関連情報の統合を試みる。

(分担研究課題)

①HIVとその増殖因子の *in silico* 構造解析 (佐藤) : ②無細胞系蛋白質合成系と蛍光分子相互作用を用いた HIV の増殖制御因子の網羅的同定 (梁) ③HIV 感染抵抗性因子の構造機能解析 (塩田) ④HIV 感染制御因子とその解除因子の構造機能解析 (岩谷) ⑤HIV の感染制御因子の構造機能解析 (村上) ⑥HIV ゲノム逆転写制御因子の構造機能解析 (増田) ⑦HIV ゲノム核移行制御因子の構造機能解析 (間) : 分子生物学や細胞生物学的手法等により、Vpr とその結合因子のマクロファージでの HIV-1 複製における生物学的役割を明らかにする。⑧HIV ゲノム転写制御因子の構造機能解析 (岡本) ⑨新型シーケンサーを用いた HIV 準種の包括的ゲノム解析 (本村) ⑩HIV 宿主指向性、感染力、増殖能の決定因子の解析 (野間口 : 平成 23 年度より足立と交代)

(協力研究)

HIV 増殖機構の分子・細胞レベルでの研究を支援するために、協力研究を実施する。本年度は、①HIV 脱殻過程の解析 (三隅)、②HIV-1 cell-cell transmission の解析 (久保、神山)、③HIV 粒子・ゲノム RNA の成熟ステップの解析 (櫻木) を実施した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来臨床材料を使う研究は、関連機関

の倫理審査会の承認を得、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で行った。動物実験は、研究機関の倫理審査会の審議を受け、承認を得て行った。組換え DNA 実験は、実験を実施する研究機関の承認を得て行った。

3. 研究結果

(分担研究)

① *in silico* 構造解析 (佐藤) : HIV の酵素 (逆転写酵素、プロテアーゼ、インテグラーゼ)、構造蛋白質 (カプシド、エンベロープ)、細胞の抗 HIV 蛋白質 (テザリン) の立体構造解析データに実験データを取り入れて、HIV の生物学的性質の変化を司る領域の構造特性を明らかにした。蛋白質の構造と進化の情報を統合して、蛋白質の相互作用表面を予測する新しい解析手法の研究に着手し、解析プログラムとフローチャートを構築した (産総研生命情報工学研究センター 藤博幸博士との共同)。

② HIV の複製と病原性に関与する宿主因子の探索 (梁) : コムギ無細胞タンパク質合成系とアルファスクリーン技術を組み合わせたハイスループットで高感度の検出系を用い、HIV-1 Vpu 蛋白質のリン酸化に関与する宿主プロテインキナーゼ SCYL2 を同定した。SCYL2 は Vpu の脱リン酸化を促進し、Vpu による tetherin/BST-2 の阻害をブロックすることで、ウイルス粒子形成を抑制することが示唆された。

③ HIV 感染抵抗性因子の構造機能解析 (塩田) : HIV-2 カプシド蛋白質の TRIM5 α 感受性を制御するアミノ酸 (120 番目のアミノ酸) を特定し、*in silico* 構造解析により相互作用表面の構造特性と制御のしくみを原子レベルで明らかにした。120 番目のアミノ酸は 97 番目と 119 番目のアミノ酸間の水素結合形成に影響して L4/5 の構造維持に重要な役割を果たしており、L4/5 も含めた領域が TRIM5a と結合することが示唆された。

④ HIV-1 Vif が結合する APOBEC3 の相互作用部位 (インターフェイス) の構造の解明 (岩谷) : APOBEC3 ファミリーの中で、Vif に結合し、最も単純な単量体ドメイン構造をもつ APOBEC3C のモデル構造を構築し、Structure-Guided Mutagenesis を繰り返して、HIV-1 Vif 感受性に影響を及ぼすアミノ

酸（8残基）を同定した。構造上、これらの残基は近接し、くぼみ（Cavity）を形成していることが示唆された。

⑤HIV 感染制御因子の構造機能解析：HIV-1 Gag 部分ペプチドの細胞内導入による HIV 複製制御の可能性を検証した。HIV-1 マトリックス由来部分ペプチドに Octa-Arg を付加して細胞内に導入すると、EC50 で数～数十 μ M の範囲で X4、R5 の両方のタイプの HIV-1 の複製を阻害することを見つけた（村上）。

⑥ インテグラーゼの多量体形成と機能相関（増田）：HIV-1 インテグラーゼ（IN）の Val156, Ala57, Leu241, Leu242 は、IN の Gemin2 結合を介して HIV ゲノムの逆転写反応と HIV の感染性を制御すること、逆転写反応には IN の 2-4 量体形成が重要であること、Gemin2 は IN の 4 量体化を促進すること、などを見つけた。Monomeric-Kusabira-Green 発現系を用いた細胞内インテグラーゼ相互作用の評価系を樹立した。

⑦非分裂細胞における HIV-1 複製における Vpr の役割（間）：樹状細胞およびマクロファージでの HIV-1 複製における Vpr とその結合因子の役割に関する解析を進めた。HIV-1 Vpr は、核膜孔に結合した後に、Imp α サブファミリーの 1 つ Npi1 依存的に核内に移行する事を見出した。ケミカルアレイを用いて Vpr と特異的に結合する小分子化合物をスクリーニングし、マクロファージにおけるウイルス複製の阻害効果を示すものを同定した。

⑧HIV ゲノム転写制御因子の構造機能解析（岡本）：HIV プロウイルス DNA のクロマチン構造と潜伏感染に関する解析を進めた。宿主細胞の Sp1 蛋白質が、宿主細胞の HDAC 蛋白質を介してヒストンアセチル化による HIV プロウイルス転写抑制の制御に関わることを見出した。

⑨次世代シーケンサーを用いた HIV 準種の包括的ゲノム解析（本村）：HIV-1 分子クローンを用いて新型シーケンサーのエラーの種類と頻度を明らかにし、エラー補正法を構築した。感染者血液中の HIV-1 エンベロープ遺伝子の配列情報を網羅的に取得・解析し、新しく認可された HIV-1 侵入阻害剤 Maraviroc の耐性関連変異を持つ HIV-1 が治療前に存在しうることを示した。

⑩HIV 宿主指向性、感染力、増殖能の決定因

子の解析（足立）：主として computer-assisted mutagenesis により、カニクイザル由来細胞株 HSC-F において SIVmac239 と同様な増殖能を示すクローン（MN4Rh-4[X4 ウイルス]と MN5Rh-4[R5 ウイルス]）を得た。これらは、TRIM5 α の抑制回避とは別の機構でサル細胞での増殖能が向上している。また、抗サル tetherin 活性を持つ Vpu の構築に成功し、この機能性 Vpu を持つウイルスクローン（MN4Rh-4gT [X4 ウイルス]と MN5Rh-4gT [R5 ウイルス]）も得た。

（協力研究）

① HIV 脱殻素過程に関する研究（三隅）：HIV-1 脱殻のステップは、分子レベルでほとんどわかっていない。HIV-1 粒子のカプシドの一部は、Ser₁₆ がリン酸化されている。このリン酸化部位を含む Ser₁₆-Pro₁₇ モチーフが脱殻過程において機能する証拠を得た。また、このモチーフを認識して脱殻を制御する細胞因子候補として Pin1 を同定した。

② HIV-1 cell-cell transmission の研究（久保、神山）：細胞の抗 HIV 蛋白質テザリンが HIV-1 の cell-cell transmission に及ぼす影響は明確にされていない。既報の実験系の不備を解消した系をつくり、テザリンが cell-free transmission と同程度の効率で cell-cell transmission を抑制することを示した。

③ HIV 粒子・ゲノム RNA の成熟ステップと感染能獲得との相関（櫻木）：HIV 粒子の成熟過程におけるウイルスゲノム RNA の性状変化は不明である。成熟過程を段階ごとに止めて観察することのできる系を用い観察した結果、Gag の最初の切断で RNA は二量体化を開始し被逆転写能も十分に獲得するが、細胞内における感染能の獲得及び均質な二量体化の完成には更なる Gag 切断が必須であることが明らかとなった。

4. 考察

①～⑩の分担研究、並びに①～③の協力研究は、いずれも当初の計画以上に進展した。特に、HIV-1 IN と Gemin2 の研究成果（⑥）は、元来プロウイルスの組み込み過程で働くとされていたインテグラーゼについて、感染初期における未知の機能を原子・分子レベル

で解明する手がかりを与え、新たな作用点をもつ抗 HIV 薬の開発に繋がるものとして期待される。

サル指向性 HIV-1 の構築も順調に進んだ(⑩)。本年度に構築した四種のウイルスクローンは全て既報のクローンより著しく増殖能が向上している。サル指向性 HIV-1 を用いたサル感染モデルの確立に向け大きく前進した。ほぼ HIV-1 のゲノム情報を持ちながら、サルで効率的に増殖するウイルスの創出が期待される。HIV-1 の個体レベルでの増殖や病原性発現機構の解明、新しい抗エイズ戦略の開発への展開が期待される。

in silico 構造解析情報と実験データを統合して HIV の増殖制御機構を解析する手法の運用は順調に軌道に乗った。原子・分子レベルの知見と細胞・個体レベルの知見の統一的理解を可能とし、今後の研究の速度、効率、質の向上をもたらす手法として期待される。

5. 自己評価

1) 達成度について

①～⑩の分担研究、①～③の協力研究は、いずれも当初の計画以上に進展した。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究の成果は水準の高い英文専門誌に掲載されている。また、HIV の構造・増殖・進化の統合的研究は、科学的に重要かつ斬新性がある。よって、本研究の学術的・国際的意義は高い。また、本研究により、創薬やワクチン開発研究に重要な情報基盤や今後の新しい HIV 基礎研究を支える技術基盤ができる。我が国のエイズ対策の科学基盤が拡充し、公衆衛生行政と保健医療に貢献する。

3) 今後の展望について

2年度目以降は、当初計画を継続しつつ、統合的な研究を進める。特に、創薬、ワクチン開発の基盤となる「蛋白質の相互作用」の統合的解析に重点を置く。①の研究で構築した手法を用いて、HIV/SIV や増殖制御蛋

白質の機能的な相互作用部位や適応進化を司る部位を予測し、班員と共同で検証を進める。①の研究で得られる構造、機能、進化の情報、③や⑥の研究などで得られる増殖制御因子の情報、並びに⑨や⑩の研究で得られる個体レベルでの情報を統合し、*in vivo* で HIV-1 増殖の制御に関わるウイルス・細胞蛋白質の相互作用表面、構造特性、可変能を明らかにする。統合的研究の基盤形成のため、引き続き、計画に沿って①～⑩の分析的研究を続ける。以上の HIV の構造、増殖、変異に関する分析と統合の研究を進めることで、HIV-1 の複製と病原性の解明や新しい抗エイズ戦略開発の基盤が形成される。今後の HIV 基礎研究の新たな解析手法や方向性が確立し、我が国のエイズ対策の科学的基盤が拡充すると期待される。

6. 結論

HIV の形や性質に関する重要な情報の収集と統合、および今後の HIV 基礎研究の新たな解析手法や方向性の確立に向けて、HIV の構造、増殖、変異に関する分析的研究と統合的研究を進めた。初年度の研究は、順調に進んだ。特に *in silico* 構造解析情報と実験データを統合して HIV の増殖制御機構を解析する手法の運用は軌道に乗った。次年度以降は、当初計画を継続しつつ、統合的な研究を推進する。特に、蛋白質の相互作用の理解に重点を置いて進める。新型シーケンサーや感染サルモデルの研究は高額な研究費を必要とする。経費削減の折、十分な量と質の解析の実施が危惧されるが、可能な範囲での推進を計る。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

(1) 増田貴夫、神奈木真理：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、特許第4562290号（特許庁）、8月26日、2010。(2) 岡本尚：HIV複製阻害剤、特願2010-177176（特許出願中）（岡本、朝光、鈴木、宮田）

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

in silico 構造解析の HIV 複製研究への応用
「HIV-1 Gp120 の立体構造・抗体感受性・多様性の制御要因の特定」

研究分担者 佐藤裕徳（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター）
研究協力者 横山勝（同上）

研究要旨

HIV の増殖阻害剤やワクチンの開発に役立つ情報と技術の基盤構築を目的とする。HIV-1 Gp120 の立体構造・抗体感受性・受容体指向性・多様性の制御要因を研究する。初年度は、分子動力学法を用いて、HIV-1 Gp120 outer domain の水溶液中での構造の動態を解析した。Gp120 のループ領域は、水溶液中で常時揺らいでいることがわかった。興味深いことに、Gp120 V3 配列の荷電量が+3 から+7 に増加すると、outer domain の CD4 結合ループの立体配置と揺らぎの程度が大きく変化した。V3 荷電量の増加で HIV-1 の抗 CD4 結合部位抗体中和感受性が高まると予測されたので、V3 組換えウイルスを用いた中和実験を行った。V3 の荷電量が+3 から+7 に増加すると、outer domain の配列が同じでも抗 CD4 結合部位抗体中和感受性が高まることが確かめられた。V3 荷電量の増加で CD4 結合部位周辺の多様性が増加すると予測されたので、公共データベースの Gp120 配列を用いた多様性解析を行った。V3 の荷電量が+3 から+7 に増加すると、CD4 結合部位周辺のアミノ酸多様性が増加することが確かめられた。本研究により、V3 の荷電量は、Gp120 outer domain のループ構造を制御することで Gp120 の抗体感受性と変異性を司る要因となることがわかった。

A. 研究目的

HIV-1 のエンベロップ Gp120 は、ウイルスの感染に必須の構造蛋白質である。中和エプिटープが存在し、ワクチンの主要成分となりうる。Gp120 に生じる変異の種類や位置によっては抗原性や抗体感受性が変化し、ワクチンの有効性が低下しうる。また、ウイルスの感染受容体指向性が変化することで細胞指向性、組織指向性、宿主指向性が変化したウイルスが発生しうる。このため、Gp120 の性質変化をもたらす変異の種類を理解することは、HIV-1 の病原性の研究、動物モデルの開発、制御法の開発を効果的に実施する際に極めて重要となる。

Gp120 の変異の生物学的影響とそのしくみを迅速に把握することは難しい。Gp120 の構造解析は、Gp120 の性質変化を構造レベルで理解するための重要な手がかりを与える。しかし、実験による構造解析は、長期間を要する。このため、易変異性 HIV-1 の Gp120 の解析を効果的に進める際に不可欠な迅速性を欠く。

我々は、迅速性の観点から、コンピュータ

を用いたシミュレーション技術に着目した。この技術は、既に工学や物理化学の分野では、研究を効果的に進めるために不可欠となっている。この技術を生命科学に応用できれば、解析の迅速性が達成できる。そこで本研究では、コンピュータのシミュレーションデータと実験データを組み合わせて、Gp120 の構造と性質変化をもたらす変異を解析した。

B. 研究方法

(1) 分子動力学解析

MOE に搭載された分子モデリングツールを用い、Gp120 単量体の結晶構造 (PDB code: 2B4C) を鋳型としてホモロジモデリング法で HIV-1_{LAI} 株の Gp120 outer domain の V3 組換え分子のモデルを 2 種類 (LAI-TH09V3 と LAI-NH1V3、それぞれ荷電量が+3 と+7) 構築した。Amber 9 に搭載された分子動力学計算ツールを用い、水を配位した溶液環境中の 1 atm, 310K における Gp120 outer domain の動態を解析した。合計 30 ナノ秒の間の構造の動態を追跡し、コア構造が安定した 10-30 ナノ秒の間の構造情報を回収し、その間の平均

構造、並びに平均構造からの揺らぎを求めた。

(2) 中和実験

HIV-1_{LAI}株のGp120 V3 組換ウイルスは、以前報告したものをを用いた (Sato H et al., *Virology* 257: 491-501, 1999)。HIV-1_{LAI-TH09V3} と HIV-1_{LAI-NHIV3} は、それぞれ、上で解析した Gp120 LAI-TH09V3 と LAI-NHIV3 をもつ。HIV-1_{LAI-TH09V3} と HIV-1_{LAI-NHIV3} の感染価を HeLa CD4+CXCR4+CCR5+細胞 (MAGIC5 細胞) で測定し、同じ感染価のウイルスと抗体を 37°C で 1 時間混合し、MAGIC5 細胞での感染価を測定した。ウイルスの感染価を 50% 低下させる抗体の希釈度を求め、抗体の中和能力 (ND₅₀) を計算した。Gp120 の CD4 結合部位を認識するヒト単抗体 (49G2, 42F9, 3D6 (0.58))、および CD4 結合後に形成される構造を認識するヒト単抗体 (4C11) は、松下修三博士 (熊本大学) より分与された。対照に用いた他の Gp120 領域を認識するマウス単抗体 4301 は、市販のものを購入した (Advanced BioScience Laboratories)。

(3) 多様性解析

公開データベース (HIV sequence database: <http://www.hiv.lanl.gov/>) より、HIV-1 CRF01_AE の Gp120 全長のアミノ酸配列を取得し、V3 荷電量が +3 の配列、および +7 の配列を抽出した。それぞれのグループの Gp120 配列の各アミノ酸残基の多様性は、Shannon の式を用いたエントロピーのスコア (0-4.4) を指標とした。

(倫理面への配慮)

該当する実験は行わなかった。

C. 研究結果

(1) V3 荷電量が Gp120 outer domain の立体構造に及ぼす影響 (Fig. 1)

Gp120 outer domain のコア領域は、シミュレーション時間が約 10 ナノ秒後には、熱力学的平衡に達して安定構造を形成した。しかし、ループ領域は、10 ナノ秒後も水溶液中で大きく揺らぎ続けることが示された。興味深いことに、V3 荷電量が +3 から +7 に変化すると、ループ領域の揺らぎの程度が大きく変化した。特に、CD4 結合部位の中心である CD4 結合ループと β 20- β 21 ループ、およびコレセプター結合部位の中心である V3 チップ領

域と β 20- β 21 ループについて揺らぎが大きく変化した。

V3 荷電量が +3 から +7 に変化すると、ループ領域の立体配置も大きく変化した。V3 荷電量が +7 の Gp120 の CD4 結合ループは +3 である gp120 よりも V4 ループの方向に位置していた。これにより、荷電量が +7 の Gp120 は +3 の Gp120 よりも CD4 結合部位が広がる。また、V3 の先端部は V3 配列の荷電量が +3 では β 20- β 21 ループとは反対方向に向き、荷電量が +7 では β 20- β 21 ループの方向に向いていた。Gp120 コアが同じアミノ酸配列であっても、V3 配列の荷電量によって V3 の配置が異なることが示された。

(2) V3 荷電量が HIV-1 の抗 CD4 結合部位抗体中和感受性に及ぼす影響

+3 V3 をもつ HIV-1_{LAI-TH09V3} は、市販のマウス単抗体 4301 にのみ感受性 (ND₅₀ = 0.57 μ g/ml) で、抗 CD4 結合部位抗体 (49G2, 42F9, 3D6 (0.58))、並びに CD4 結合後に形成される構造を認識するヒト単抗体 (4C11) に高度耐性であった (ND₅₀ > 10 μ g/ml)。一方、+7 V3 をもつ HIV-1_{LAI-NHIV3} は、市販のマウス単抗体 4301 に HIV-1_{LAI-TH09V3} と同程度の感受性を示す (ND₅₀ = 0.59 μ g/ml) と共に、49G2, 42F9, 3D6 (0.58) に感受性であった (ND₅₀ = 0.22-0.934 μ g/ml)。4C11 には、HIV-1_{LAI-TH09V3} 同様に耐性であった。

(3) V3 荷電量が Gp120 outer domain の多様性に及ぼす影響

公共データベースに登録されている HIV-1 Env Gp120 配列から 2 群の Gp120 配列 (+3 V3 をもつ群と +7 V3 を持つ群) を抽出し、多様性を比較した。V3 配列の荷電量が +3 の Gp120 では、V4 および V4 周辺のみのアミノ酸が多様であることがわかった。一方、V3 配列の荷電量が +7 の Gp120 では、V4 および V4 周辺に加えて、CD4 結合ループ周辺のアミノ酸がより多様であることがわかった。

D. 考察

変異による Gp120 V3 配列の荷電量の変化は、ウイルスの細胞指向性や抗体感受性の変化につながるということが知られている。我々は、V3 の荷電量の変化により、コレセプターや抗体の相互作用表面の構造変化が生じると推察した。本研究では、まず、分子動力学法

を用いて、この点を検証した。HIV-1 Gp120 outer domain の水溶液中での構造の動態の全容を解析し、次いで Gp120 V3 の荷電量の変化が構造に及ぼす影響を解析した。分子動力学解析の結果から、V3 荷電量が+3 から+7 に変化すると、Gp120 コアの配列が同じでも、Gp120 outer domain のループ領域の揺らぎと立体配置が変化することが示された。変化が検出されたループ領域は、受容体との相互作用部位を含んでいた。V3 の正電荷が低下すると Gp120 のコア内に位置する CD4 結合ループの露出度が低下することがわかった。

蛋白質の相互作用表面の揺らぎや立体配置は、相互作用する分子の指向性に影響する。分子動力学の解析データから、V3 荷電量が+3 から+7 に変化すると、他の Gp120 領域の配列が変わらなくても、HIV-1 の抗 CD4 結合部位抗体中和感受性が変化すると予測した。実際に、V3 組換えウイルスを用いた中和実験により、V3 の荷電量が+3 から+7 に増加すると、抗 CD4 結合部位抗体への中和感受性が昂進することが示された。

抗体の中和エピトープ周辺は、正の選択 (positive selection) により多様性が増大することが知られている。上の結果から、V3 荷電量が+3 から+7 に変化すると、CD4 結合ループ周辺の多様性が増大すると予測した。実際に、データベースの Gp120 配列の多様性解析により、荷電量が+7 では+3 よりも V3 や CD4 結合部位周辺のアミノ酸がより多様であることが判明した。

以上の構造・中和感受性・配列多様性の解析結果は、相互に一貫性があり、V3 の荷電量が Gp120 outer domain の構造・機能・進化の調節を司る重要な要因の一つであることを示唆する。

E. 結論

昨年度までに、V3 の正電荷量の変異により低下すると、V3 の立体配置が変化し、ウイルスの抗 V3 抗体中和感受性が低下することを報告した。本年度は、V3 配列の荷電量が V3 自身だけでなく Gp120 outer domain のループ構造をも制御し、CD4 結合部位の抗体感受性や多様性を変化させることを見いだした。

F. 知的所有権の取得状況 なし

G. 研究発表 (構造解析関連抜粋)

1. 論文発表

1) Ode, H., Yokoyama, M., Kanda, T., and Sato, H. Identification of folding preferences of cleavage junctions of HIV-1 precursor proteins for regulation of cleavability. *Journal of Molecular Modeling*. [Epub ahead of print], 2010.

2) Inagaki, N., Takeuchi, H., Yokoyama, M., Sato, H., Ryo, A., Yamamoto, H., Kawada, M., and Matano, T. A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology*. 7 : 90, 2010.

3) Kono, K., Song, H., Yokoyama, Y., Sato, H., Shioda, T., and Nakayama E. Multiple sites in the N-terminal half of human immunodeficiency virus type 2 capsid contribute to rhesus monkey TRIM5 α susceptibility. *Retrovirology*. 7 : 72, 2010.

4) Onyango, C., Leligdowicz, A., Yokoyama, M., Sato, H., Song, H., Nakayama, EE., Shioda, T., de Silva, T., Townend, J., Jaye, A., Whittle, H., Rowland-Jones, S., and Cotton, M. HIV-2 Capsids Distinguish High and Low Virus Load Patients in a West African Community Cohort. *Vaccine*. 28 Suppl 2 : B60-7, 2010.

5) Gatanaga, H., Ode, H., Hachiya, A., Hayashida, T., Sato, H., Takiguchi, M., and Oka, S. Impact of human leukocyte antigen-B*51-restricted cytotoxic T-lymphocyte pressure on mutation patterns of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *AIDS*. 24 : F15-22, 2010.

6) Gatanaga, H., Ode, H., Hachiya, A., Hayashida, T., Sato, H., and 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 etravirine. *Antimicrob Agents Chemother*. 54 : 1 596-602, 2010.

7) Yokoyama, M., Mori, H., and Sato, H. Allosteric regulation of HIV-1 reverse transcriptase by ATP for nucleotide selection. *PLoS One*. 5 : e8867, 2010.

2. 学会発表等

1) Yokoyama M, Naganawa S, Kitamura K, Sato

H. Influence of Net Positive Charge in V3 Sequence on Conformation of HIV-1 gp120 outer domain. 5TH GERMAN-JAPANESE HIV-SYMPOSIUM May, 10-11, 2010. Keio University, Tokyo, Japan.

2) 佐藤裕徳: 薬剤耐性HIVの発生機序とその制御方法に関する研究. 厚生労働科学研究成果発表シンポジウム. 2010年10月23日(土), 埼玉.

3) 佐藤裕徳、金井昭夫: ゲノミクス、情報科学、計算科学とウイルス学. 第58回日本ウイルス学会学術集会、シンポジウム. 2010年11月7-9日(日・火)、東京.

4) 野間口 雅子、土肥 直哉、藤原 佐知、三宅在子、横山 勝、大出 裕高、佐藤 裕徳、足立 昭夫: アカゲザルに存在する抗HIV-1 因子TRIM5 α とtetherin を回避するサル細胞指向性HIV-1 の構築. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7-9日(日・火)、東京.

5) 土肥 直哉、齊藤 暁、明里 宏文、藤原 佐知、三宅 在子、横山 勝、大出 裕高、佐藤 裕徳、足立 昭夫、野間口 雅子: サル指向性HIV-1 CA の1アミノ酸変異はサル細胞での増殖を促進する. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7-9日(日・火)、東京.

6) 河野 健、横山 勝、佐藤 裕徳、塩田 達雄、中山 英美: アカゲザルTRIM5 α はHIV-2/SIVmac キャプシドの複数領域を認識する. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7-9日(日・火)、東京.

6) 久保 嘉直、吉居 廣朗、神山 陽香、田中 勇悦、佐藤 裕徳、山本 直樹: カテプシンB はCD4非依存性HIV 感染感受性の重要な決定因子の

一つである. 第58回日本ウイルス学会学術集会.

7) 神山 陽香、岩尾 正倫、佐藤 裕徳、山本 直樹、久保 嘉直: Tetherin のHIV-1 cell-cell transmission に及ぼす影響. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7-9日(日・火)、東京.

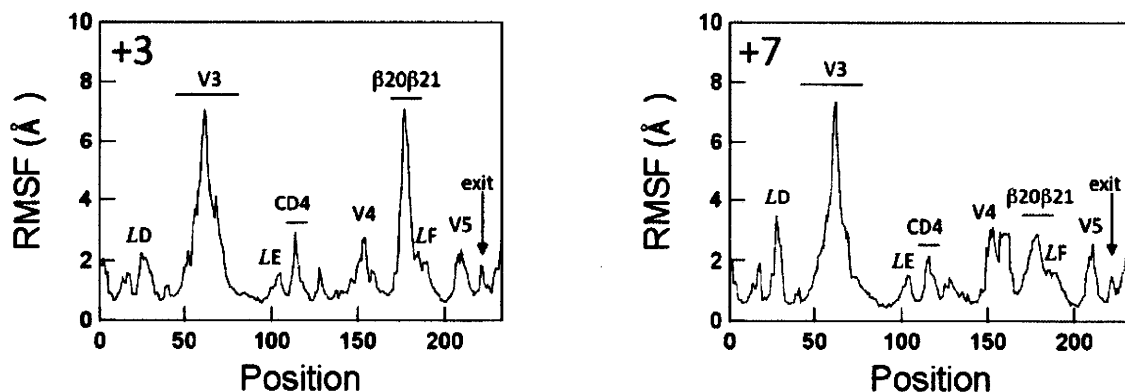
8) 稲垣 奈都子、武内 寛明、横山 勝、佐藤 裕徳、梁 明秀、俣野 哲朗: SIV CA のNドメインとCDドメインの機能的相互作用に関わるアミノ酸残基の同定. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7-9日(日・火)、東京.

9) 泉 泰輔、横山 勝、篠原正信、松井道志、井尾克宏、佐藤裕徳、高折晃史: 抗HIV-1宿主因子APOBEC3GのN末端ポケット構造の重要性. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 2010年11月24-26日(水・金), 東京.

10) 小林朋子、大出裕高、佐藤 佳、Gee Peter、山元誠司、蝦名博貴、佐藤裕徳、小柳義夫: Human tetherin transmembrane domain is responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 2010年11月24-26日(水・金), 東京.

11) 野間口雅子、齊藤 暁、明里宏文、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫: サル細胞で効率良く増殖するHIV-1の構築—アカゲザルTRIM5 α とtetherinによる抑制の回避—. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 2010年11月24-26日(水・金), 東京.

Fig.1



HIV の複製と病原性に関与する宿主因子の探索

研究分担者 梁 明秀（横浜市立大学医学部微生物学）

研究要旨 ウイルスタンパク質の翻訳後修飾機構は、その機能調節だけでなく病原性への影響に重要な過程であると考えられている。実際、多くのウイルスタンパク質にはリン酸化部位が存在するにも関わらず、これらのリン酸化に関わる宿主因子やその意義を論じた報告は少ない。本研究では、コムギ無細胞タンパク質合成系とアルファスクリーン技術を組み合わせたハイスループットで高感度の検出系を用い、HIV タンパク質のリン酸化に関与し、ウイルス複製を制御する宿主プロテインキナーゼの探索・同定を行った。また、これらの宿主因子のうち、SCYL2 について Vpu タンパク質との相互作用や、HIV の粒子形成における役割について考察した。

A. 研究目的

真核細胞内におけるタンパク質の翻訳後修飾は、その機能調節に重要な機構の一つであるにも関わらず、ウイルスタンパク質が感染細胞内でどのような翻訳後修飾を受けるかについてはいまだ不明な点が多い。そこで本研究では HIV タンパク質とリン酸化酵素の機能的相互作用について、コムギ無細胞タンパク質合成系とアルファスクリーン技術を組み合わせたハイスループット検出系を用いて解析を行う。とくに、本研究課題においては、HIV-1 の効率的な粒子産生に関与するアクセサリータンパク質（Vpu）のリン酸化調節機構を明らかにし、ウイルス増殖や病態との関連について考察を行う。

B. 研究方法

ヒト全長 cDNA ライブラリー-MGC クローン由来の約 420 種類の完全長プロテインキナーゼ遺伝子をもつ大腸菌から PCR 法を用いて、鋳型 DNA の構築を行い、コムギ無細胞タンパク質合成系によりプロテインキナーゼタンパク質ライブラリーの構築を行った。また、ビオチン化に必要な配列を N 末端に付加したキナーゼ遺伝子を split-PCR 法を用いて作製し、in vitro transcription 後、ビオチンリガーゼ BirA とビオチンを上記無細胞系に加えることにより、ビオチンでラベルしたプロテインキナーゼタンパク質を得た。次に HIV アクセサリータンパク質をコムギ

無細胞法にて合成し、プロテインキナーゼとの相互作用の有無についてアルファスクリーンを用いた近接アッセイを用いて行った（一次スクリーニング）。次に、遺伝子オントロジーと siRNA を用いた二次・三次スクリーニング系にて、HIV-1 の複製を負に制御する候補宿主因子を同定した。免疫染色法および免疫沈降法により、細胞内での共局在および機能を確認した。次に同定した宿主因子がウイルスタンパク質のリン酸化状態や機能に与える影響について、ウイルス学および生化学的手法を用いて解析した。

C. 研究結果

1. ウイルスタンパク質 Vpu と相互作用する宿主キナーゼの探索

アルファスクリーンアッセイによる一次スクリーニングの結果、Vpu と結合親和性をもつ宿主キナーゼとして新規に 45 種類を同定した。遺伝子オントロジー法を用いて、細胞内局在が Vpu と明確に異なる因子を除いたところ、13 種類に絞り込まれた。また、Vpr および Vif をリン酸化するキナーゼとの比較を行い、Vpu を特異的にリン酸化するキナーゼを 4 種類同定した。次に、siRNA によりこれらの候補因子をノックダウンした感染細胞を用いて HIV-1 粒子産生効率を調べた結果、SCYL2 が HIV-1 の複製に関与する Vpu 結合因子であることが判明した。SCYL2（別名 CVAK104）はこれまでクラスリン依

存性の小胞輸送や TGN を介したメンブレントラフィック系に関わる因子として知られていたが、当該因子が HIV の複製に関与するという知見は本研究が初めてである。

2. SCYL2 による Vpu リン酸化調節機構の解明

免疫染色法および免疫沈降法を用いた結果、SCYL2 は、Vpu と細胞内の核近傍で共局在し、Vpu と直接的に結合することを確認した。リン酸化抗体を用いた生化学的アッセイの結果、興味深いことに、SCYL2 はキナーゼ様ドメインをもつにも関わらず、Vpu の機能に必須である 2 つのセリン残基 (Ser52,56) のリン酸化に対してはむしろ抑制的に作用した。このことから、SCYL2 は Vpu のリン酸化を負に制御する (脱リン酸化を促進する) 因子である可能性が考えられた。各種脱リン酸化阻害剤を用いた阻害実験の結果、脱リン酸化酵素 PP2A を特異的に阻害するオカダ酸 (Okadaic acid) の存在下では SCYL2 の Vpu 脱リン酸化活性が低下したことから、SCYL2 が PP2A による Vpu の脱リン酸化を促進することが推測された。実際に、細胞に SCYL2 を強制発現させると、PP2A と Vpu の共局在が認められたことから、SCYL2 は PP2A を Vpu にリクルートすることで Vpu の脱リン酸化を誘導することが示唆された。

3. SCYL2 による HIV-1 粒子産生抑制機構の解明

Ser52,56 がリン酸化された Vpu は、F-box ユビキチンリガーゼである β -TrCP と結合し、Tetherin (BST-2) と呼ばれる抵抗性宿主因子をユビキチン化することで分解に導くことが知られている。Tetherin は感染細胞膜上にウイルス粒子を繫留することでウイルスの出芽・放出を阻止する因子である。次に SCYL2 が Vpu による Tetherin の抑制にどのような影響を与えるかをウエスタンブロット法および ELISA 法を用いて調べた。その結果、SCYL2 過剰発現下では、Vpu が Tetherin を抑制・分解できず、その結果として感染細胞から放出されるウイルス粒子量が顕著に減少することが示された。このことから、SCYL2 は Vpu を不活化し、Tetherin がもつ抗

ウイルス活性を亢進させることでウイルス産生を負に制御していることが示唆された (宮川、梁、論文投稿準備中)。

D. 考察

本研究では、ハイスループットなタンパク質間相互作用アッセイ系、データマイニングによる候補因子の絞り込み、さらには siRNA を用いた機能的スクリーニングを組み合わせたことにより、従来の方法よりも短期間かつ合理的に、機能的に重要性の高い宿主因子の探索に成功した。Vpu はカゼインキナーゼによってリン酸化されると考えられているが、それ以外にも多くのキナーゼが Vpu と結合親和性をもつことが明らかとなり、今後カゼインキナーゼ非依存性の Vpu リン酸化経路も明らかになるかもしれない。

HIV-1 はヒト細胞が本来備えている、いわゆる内在性抗 HIV 因子 (intrinsic restriction factors) から逃れるためにアクセサリタンパク質群を獲得したと考えられている。SCYL2 はアクセサリタンパク質 Vpu を脱リン酸化し、その機能を不活性化することで、逆に Tetherin の抗 HIV 活性を高めるといった新しいタイプの宿主因子であると考えられる。我々は SCYL2 が HIV 感染や I 型インターフェロンにより誘導されることを突き止めているが、今後 SCYL2 の発現や活性がどのように調節されているかについて詳細に解析する必要がある。また、SCYL2 が生体内における HIV 複製やエイズ発症にどのような役割を果たしているかについて今後さらに検討を行う必要がある。

E. 結論

コムギ無細胞タンパク質合成系とアルファスクリーンを用いた相互作用アッセイ系、データマイニングによるクラスター解析および、従来分子生物学的解析技術を組み合わせることにより、HIV タンパク質の翻訳後修飾に関与し、ウイルス複製を負に制御する宿主因子として SCYL2 を新たに同定した。SCYL2 は Vpu タンパク質を脱リン酸化することで不活化し、Tetherin の抗ウイルス活性を高めることでウイルス複製を阻止する新しいタイプの宿主因子である。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kojima Y, Ryo A: Pinning down viral proteins: A new prototype for virus-host cell interaction. *Frontiers in VIROLOGY*. in press
- 2) Sugiyama R, Nishitsuji H, Furukawa A, Katahira M, Habu Y, Takeuchi H, Ryo A, Takaku H: Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G. *J Biol Chem*. 2011 Jan 12.
- 3) Inagaki N, Takeuchi H, Yokoyama M, Sato H, Ryo A, Yamamoto H, Kawada M, Matano T: A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology* 2010 Oct, 7:90
- 4) Kanzaki S, Yamaguchi A, Yamaguchi K, Kojima Y, Suzuki K, Koumitsu N, Nagashima Y, Nagahama K, Ehara M, Hirayasu Y, Ryo A, Aoki I, Yamanaka S: Thymic Alterations in GM2 Gangliosidosis Model Mice. *PLoS ONE*. 2010 Aug 10;5(8). pii: e12105.
- 5) Shimada M, Yoshizaki S, Jounai N, Kondo A, Ichino M, Ryo A, Okuda K: DNA vaccine expressing HIV-1 gp120/immunoglobulin fusion protein enhances cellular immunity. *Vaccine*. 2010 Jul 12;28(31):4920-7.
- 6) Pulikkan JA, Dengler V, Peer Zada AA, Kawasaki A, Geletu M, Pasalic Z, Bohlander SK, Ryo A, Tenen DG, Behre G: Elevated PIN1 expression by C/EBPalpha-p30 blocks C/EBPalpha-induced granulocytic differentiation through c-Jun in AML. *Leukemia*. 2010 May;24(5):914-23.
- 7) Yashima S, Yoshizaki S, Shinoda K, Yoshida A, Kondo A, Mizuguchi H, Ryo A, Okuda K, Shimada M: Co-administration of viral vector-based vaccines suppresses antigen-specific effector CD8 T cells. *Vaccine*. 2010 Apr 19;28(18):3257-64.

2. 学会発表等

- 1) K Miyakawa, T Sawasaki, S Matsunaga, N Yamamoto, A Ryo: Identification of a Host Factor Antagonizing Vpu-Mediated Tetherin Down-Regulation. The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia,

PA, Dec 11-15, 2010.

- 2) M Nishi, K Miyakawa, N Yamamoto, A Ryo: The Tumor Suppressor Apc Regulates HIV-1 Assembly and Release. The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA, Dec 11-15, 2010.

- 3) S Matsunaga, Y Kojima, R Morishita, T Sawasaki, A Ryo: An In Vitro Cleavage Assay System for XmrV Protease by Wheat-Germ Cell Free Protein Production. The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA, Dec 11-15, 2010.

- 4) M Nishi, K Miyakawa, N Yamamoto, A Ryo: The Tumor Suppressor APC Regulates HIV-1 Assembly and Release. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Sep 7-10, 2010.

- 5) A Ryo: Identification of host proteins Required for HIV-1 infection. 5th German-Japanese HIV Symposium, Keio University, Tokyo, May 10-11, 2010.

- 6) K Miyakawa, A Ryo: A New Host Restriction Factor Promoting HIV-1 Particle Destruction. 5th German-Japanese HIV Symposium, Keio University, Tokyo, May 10-11, 2010.

- 7) 梁 明秀: 革新的技術を応用した次世代エイズ研究の展望. 平成 22 年 11 月 24 日~26 日、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、グランドプリンスホテル高輪、東京

- 8) 正岡崇志, 杉浦 亙, 澤崎達也, 松永智子, 遠藤弥重太, 巽 正志, Shafer Robert, 山本直樹, 梁 明秀: コムギ無細胞合成 HIV プロテアーゼを用いた薬剤耐性高速検査法の開発. 平成 22 年 11 月 24 日~26 日、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、グランドプリンスホテル高輪、東京

- 9) 宮川 敬, 澤崎達也, 松永智子, 山下暁朗, 山本直樹, 梁 明秀: 包括的キノーム解析による HIV-1 Vpu のリン酸化調節機構の解明. 平成 22 年 11 月 7 日~9 日、第 58 回ウイルス学会学術集会、あわぎんホール、徳島

- 10) 稲垣奈都子, 武内寛明, 横山 勝, 佐藤裕徳, 梁 明秀, 俣野哲朗: SIV CA の N ドメインと C ドメインの機能的相互作用に関わるアミノ酸残基の同定. 平成 22 年 11 月 7 日~9 日、第 58 回ウイルス学会学術集会、あわぎんホール、徳島

11) 正岡崇志, 杉浦 亙, 澤崎達也, 松永智子, 遠藤弥重太, 巽 正志, Shafer Robert, 山本直樹, 梁 明秀: 酵素活性を指標とした HIV プロテアーゼ薬剤耐性新規検査法の開発. 平成 22 年 11 月 7 日~9 日、第 58 回ウイルス学会学術集会、あわぎんホール、徳島

12) 島田 勝, 吉崎慎二, 奥田研爾, 梁 明秀: DNA Vaccine Expressing HIV-1 gp120/immunoglobulin Fusion Protein Enhances Cellular Immunity. 平成 22 年 11 月 7 日~9 日、第 58 回ウイルス学会学術集会、あわぎんホール、徳島

13) 近藤麻美, 野村 涉, 玉村哲和, 鈴木陽一, 梁 明秀: 亜鉛フィンガー-LEDGF 融合タンパクを用いた LV ベクターの配列特異的挿入法の開発の試み. 平成 22 年 11 月 7 日~9 日、第 58 回ウイルス学会学術集会、あわぎんホール、徳島

厚生労働科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)
分担研究報告書

HIV 感染抵抗性因子の構造機能解析

研究分担者 塩田達雄 (大阪大学微生物病研究所)

研究要旨 HIV-2 は分離株により TRIM5 α 感受性が異なり、カプシド蛋白質 120 番目のアミノ酸がプロリンなら感受性、グルタミンあるいはアラニンなら耐性を示す。HIV-2 カプシド三次元構造の TRIM5 α 感受性を決定する必要条件を明らかにするために、120 番目にプロリン、グルタミン、アラニン以外のアミノ酸を持つ 17 種類の変異ウイルスを作成した。その結果、疎水性残基や環状構造を持つアミノ酸は感受性、水酸基、アミド基あるいは酸性の残基を持つアミノ酸は耐性と相関した。ホモロジーモデリングによりこれらの変異のカプシド全体の三次元構造に及ぼす影響を検討した結果、TRIM5 α 感受性のカプシドは 97 番目と 119 番目のアミノ酸間の水素結合の形成頻度が低下し、隣接するヘリックス 4/5 ループ(L4/5)の形状がより安定することが予想された。従って、HIV-2 のカプシドの 120 番目のアミノ酸は 97 番目と 119 番目のアミノ酸間の水素結合形成に影響して L4/5 の構造維持に重要な役割を果たしており、L4/5 も含めた領域が TRIM5 α と結合することが示唆された。

A. 研究目的

TRIM5 α はアカゲザルの抗HIV-1因子として2004年に同定された。レトロウイルスに対する自然免疫を担う重要な因子であるが、そのウイルス感染阻害の分子機構は明らかにされていない。今のところ、TRIM5 α は細胞質内に存在し、侵入してきたウイルスのカプシドを認識し、感染を阻害すると考えられている。我々は以前、8種類のHIV-2株を用いて、カニクイザルTRIM5 α による感染抑制効果を調べ、カプシドの120番目(株によっては119番目)のアミノ酸がプロリンの場合は両TRIM5 α による感染抑制を受けるが、グルタミンまたはアラニンの場合は感染抑制を受けないことを明らかにしてきた。この120番目のアミノ酸はHIV-2カプシドとTRIM5 α との結合に直接関与する可能性が高いため、本研究では、残りの17種類のアミノ酸を120番目のアミノ酸部位に変異導入し、カニクイザルTRIM5 α による感染抑制を受けるか否かを検討して、TRIM5 α による感染抑制を受けるカプシドの必要条件を抽出することを目的とした。

B. 研究方法

1. 変異ウイルスの作成とその TRIM5 α 感受性の検討

株化 T 細胞 MT4 にカニクイザル TRIM5 α 及び SPRY 領域を欠いた TRIM5 α を発現させるセンダイウイルスベクターを感染させ、9 時間後に HIV-2 GH123 株及びカプシド蛋白質に変異を導入した GH123 株を感染させた。HIV-2 感染 1、3、6 日後の培養上清中の p25 抗原量を ELISA にて測定した。カプシド蛋白質への変異導入は常法により行い、293 細胞に変異導入したプラスミドを導入することにより、変異 HIV-2 を回収した。

2. 変異カプシドの三次元構造予測

最近報告された高解像度の HIV-2 のカプシド蛋白質の三次元結晶構造をもとにホモロジーモデリング法でモデルを作成し、分子動力的計算を行ってモデルの妥当性を検討した(佐藤研究代表者との共同研究による)。

C. 研究結果

1. 変異ウイルスのカニクイザル TRIM5 α 感受性

120 番目のみが異なる 20 種類の変異 HIV-2 を作成した。293 細胞から回収した変異 HIV-2 はいずれも野生型(プロリンを120番目の持つ)ウイルスと同様に成熟したカプシド蛋白質を持っていた。作成した