

は、SAHA の hydroxamic acid 部分を S-isobutyrate に、また phenyl 基を bi-phenyl (NCH-47) もしくは phenyl-thiazol (NCH-51) 基に変換したところ、HDAC 阻害活性にはほとんど変化がなく、生体内での安定性と薬動力学上ではるかに有効な二つの化合物を得た。

2. NCH-51 による潜伏感染 HIV-1 の活性化：

これらの化合物を HIV-1 潜伏感染細胞株である OM10.1 に作用させたところ、特に NCH-51 は TNF と同等程度の HIV-1 複製誘導作用を認めた。また、その作用機序を調べる目的で TNF 刺激と NCH-51 投与を同時に行ったところ、相乗的に作用した。我々はすでに TNF 刺激により NF- κ B の活性化が起こることを示しているが、この結果は NCH-51 は TNF とは異なる過程、すなわち NF- κ B 以外の転写因子を標的としていることを示唆した。

3. NCH-51 によるヒストン H3 のアセチル化と HIV-1 プロウイルス DNA の LTR 領域への種々の転写因子のリクルート：

NCH-51 投与により OM10.1 を始めとする種々のヒト細胞株でクロマチンヒストン H3 のアセチル化が著明に増加した。さらに、HIV-1 に潜伏感染している OM10.1 細胞内の HIV-1 プロウイルス DNA の LTR 領域を対象とするクロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) を行ったところ、NCH-51 投与によって HDAC と AP-4 などの負の転写制御因子が排除され、代わって RNA pol II, TATA 結合蛋白 (TBP)、p300、がリクルートされ、局所の H3 ヒストンのアセチル化が増加した。

4. NCH-51 による HIV-1 複製誘導へのクロマチン・リモデリングの関与：

潜伏感染状態から転写的に活性型となって HIV-1 の複製を開始するためにクロマチン構造の改変 (リモデリング) の起こることが示唆されるが、この際に topoisomerase II などの関与が知られている。そこで、次に topoisomerase II 阻害剤である novobiocin の効果を調べた。その結果、NCH-51 による潜伏感染 HIV-1 の複製誘導は novobiocin の量に反応して抑制された。このことは、NCH-51

による作用がクロマチン構造の改変を伴っていることを示唆している。

5. 宿主転写因子 Sp1 の関与：

最後に、NCH-51 による HIV-1 転写誘導に関与する宿主の転写因子を調べた。そのために、HIV-1 LTR 内に結合する種々の転写因子の結合部位を欠失もしくは変異を加えたものを多数作成した。NCH-51 による転写誘導は、HIV-1 LTR の NF- κ B 結合領域を含む上流配列を欠失させても十分に観察されたが、NF- κ B と TATA 結合領域の間に存在する Sp1 結合領域を欠失させるとほとんど見られなくなった。また、全長を含む HIV-1 LTR の中で Sp1 結合領域のみを変異させたものでも NCH-51 の効果は全く見られなくなった。これらの結果は、HDAC 阻害剤による潜伏感染 HIV-1 の誘導に宿主の転写因子である Sp1 が関与することを強く示唆した。

D. 考察

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ックな制御機構の存在が注目されている。なかでも、ヒストンはエピジェネティック制御で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、その 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 (Strahl and Allis, Nature 403: 41-45, 2000)。遺伝子発現のサイレンシング成立には、HDAC によるヒストンの脱アセチル化が重要であることが示されているが、HIV の潜伏感染においても同様のメカニズムが示唆される。

近年、SAHA や valproic acid (VPA) などの HDAC 阻害剤を用いて潜伏感染 HIV を再活性化させた後、HAART 療法を行うという新たな治療法が試されている (Lehrman et al., Lancet 366: 549-555, 2005)。今回の研究で HDAC 阻害剤が潜伏感染 HIV の再活性化を強く誘導したことから、HIV 潜伏感染の維持にヒストンの脱アセチル化が関与し、その阻害剤を併用することにより強い潜伏 HIV の活性化が起こることがわかった。

この結果は、HIV の転写制御機構の解明は

潜伏感染を分子レベルで理解することにつながり、次世代の抗 HIV 薬開発に重要な情報を提示するものと考えられる。すでに HDAC を介するクロマチンレベルでの潜伏感染維持に関する研究成果が基盤となり、潜伏感染細胞を標的として、VPA を使用した新たな” flush out” (軍隊用語で「建物などに隠れている敵兵を外におびき出す」戦法のこと) エイズ治療法の可能性が提示された (Lehrman et al., Lancet 366: 549-555, 2005)。本研究で、われわれは宿主細胞の転写因子 Sp1 がその際に必須の役割を担うことを始めて明らかにした。

今後、Sp1 がクロマチン修飾に関与する分子レベルの効果を解明する必要があるが、今回の研究結果は、新しい抗 HIV 治療戦略に重要な情報をもたらすものと考えられる。

E. 結論

HDAC は HIV の感染細胞内での潜伏感染の維持に重要な役割を演じ、HDAC 阻害剤によって HIV 潜伏感染の破綻が生じることが明らかになった。また、その際に宿主転写因子 Sp1 が主要な役割を演じていることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsuchiya A, Imai K, Asamitsu K, Waguri-Nagaya Y, Otsuka T And Okamoto T: Inhiition of inflammatory cytokine production from rheumatoid synovial fibroblasts by a novel I κ B kinase inhibitor. J. Phamacol. Exp. Ther. 333: 236-243, 2010.
- 2) Cueno ME, Hibi Y, Imai K, Laurena AC and Okamoto T: Impaired plant growth and development caused by human immunodeficiency virus type 1 Tat. Transg. Res. 19: 903-913, 2010.
- 3) Cueno ME, Hibi Y, Karamatsu K, Yasutomi Y, Laurena AC And Okamoto T: Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant. Trans. Res. 19: 889-895, 2010.
- 4) Imai K, Togami H and Okamoto T: Involvement of histone H3 Lysine 9 methyltransferase G9a in the maintenance of HIV-1 latency and its reactivation by BIX01294. J. Biol. Chem. 285: 16538-16545. 2010.
- 5) Zineldeen HD, Uranishi H and Okamoto T:

NF- κ B signature on the aging wall. (Review) Curr. Drug. Metab. 11: 431-435, 2010.

- 6) Tanaka K, Asamitsu K, Uranishi H, Iddamalgoda A, Ito K, Kojima H and Okamoto T: Protecting photoaging by NF- κ B inhibitor. (Review) Curr. Drug. Metab. 11: 431-435, 2010.
- 7) Gao N, Hibi Y, Cueno ME, Asamitsu K and Okamoto T: A-kinase interacting protein 1 (AKIP1) acts as a molecular determinant of PKA in NF- κ B signaling. J. Biol. Chem. 285: 28097-28104, 2010.

2. 学会発表は省略

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担者研究報告書

分担研究課題：新型シーケンサーを用いた感染者体内の HIV ゲノムの包括的解析
分担研究者：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）
研究協力者：大出裕高（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター 流動研究員）

研究要旨：HIV-1ウイルス粒子は、感染者生体で一日に 10^{9-10} 個新生され、多様な準種が発生していると考えられる。我々は、個体レベルでのウイルスの増殖と変異の理解を深めるために、新型シーケンサーを用い、HIV感染者体内の準種の種類とダイナミズムを包括的に解析する方法を研究する。初年度はシーケンス条件の検討と改良、独自の編集プログラムの作製を行い、包括的ゲノム解析の系を構築した。（1）独自の編集—エラー補正プログラムを用いて、シーケンスエラーの含有率（人為的変異率）は0.01%未満に低減できた。（2）準種の存在頻度推定の精度を検証し、1%までの準種の存在までは確認できた。（3）薬剤耐性研究への応用として、未治療感染者血液中のHIV-1エンベロープ遺伝子全域の配列情報を網羅的に取得・解析し、Maraviroc（CCR5受容体拮抗薬）やT20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。

A. 研究目的

HIV-1 ウイルス粒子は、感染者生体で一日に 10^{9-10} 個、新生される。生体内では、日々多様な準種が発生していると考えられる。しかし、感染者体内の準種の種類や動態を解析する系はない。既存の技術では、血清中に20%未満存在するウイルスを検出することは困難である。我々は、新型シーケンサーの大容量配列情報収集能力に着目した。HIV感染者体内に1%以上存在する準種の種類や動態を包括的に解析することで、持続感染を理解する手がかりを得たい。今年度は、編集—エラー補正プログラムを構築し、大容量配列情報収集・解析の系を構築した。

B. 研究方法

（1）シーケンスエラーの頻度解析

HIV-1_{LAI}プラスミドのV3領域（105塩基）をPCRで増幅し、FLX 454（Roche）を用い、増幅産物の塩基配列を網羅的に取得した（～110,000塩基）。HIV-1_{LAI}プラスミド配列と異なる塩基を抽出するプログラムを作製し、塩基置換、挿入・欠失等のシーケンスエラーの頻度を計算した。シーケンスエラーが優

先的に生じる箇所（ポリA/G/C/T配列を特定し、ポリ配列のエラーを補正するプログラムを作った。

（2）準種の存在頻度推定の精度検証

HIV-1_{LAI}プラスミドとHIV-1_{NL4-3}プラスミド（ 10^1-10^7 コピー）を適当な比率で混ぜ（10:1, 100:1, 1000:1）、V3と周辺領域をPCRで増幅し、FLX 454（Roche）を用い、増幅産物の塩基配列を網羅的に取得した（～14,476,400塩基）。HIV-1_{LAI}とHIV-1_{NL4-3}に特徴的な塩基を指標にしてシーケンス配列を分類するプログラムを作製し、2種のウイルス配列の存在頻度を計算した。

（3）臨床試料を用いた解析

2006年05月15日から2009年02月17日の間に、国立国際医療センターのエイズ治療研究開発センターを受診—加療を受けた22症例（CD4>500: 8症例, 150<CD4<350: 7症例, CD4<50: 7症例）を対象とした。これらの患者は全てMaravirocやEnfuvirtide

（T20）の治療を受けていなかった。22名の血清中のHIVのエンベロープ遺伝子領域の配列を解析した。血清より、QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を使って、HIV RNAを抽出した後、特異的逆転写プライマーを用いてcDNAを合成した。cDNAをtemplateにして、HIV-1 env 領域を9種の断片

にわけてnested PCRにより増幅した。FLX 454 (Roche) を用い、増幅産物の塩基配列を網羅的に取得した。(1) で作製した補正プログラムで補正した配列情報を用いて、MaravirocやT20耐性関連変異を持つHIV-1の存在頻度を解析した。

(倫理面からの配慮について)

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て、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。

C. 研究結果

(1) 独自の編集—エラー補正プログラムによるシーケンサーのエラーの低減

HIV-1_{LAI} プラスミドのシーケンサーのエラーの含有率(人為的変異率)は、エラー補正をすることで0.01%未満に低減した(0.857%のエラー率が0.0027%に低減)。

(2) 準種の存在頻度推定の精度検証(図1)

HIV-1_{LAI} プラスミドと HIV-1_{NL4-3} プラスミドの混合物を出発材料にした場合、HIV-1_{LAI} プラスミドが1%以上含まれるときは、コピー数に依存せずに、ほぼ頻度を反映して検出された。

(3) 薬剤耐性研究への応用

多検体(最大48検体)を、同時にシーケンスする系を作った。一回の解析で、80万種類の配列(平均長450塩基)、約3億5千万塩基が得られた。Maraviroc耐性関連変異(A316T, I323V, S405A)をもつHIV-1準種(>1%)は、6名の検体で検出された(CD4>500: 1/8症例, 150<CD4<350: 4/7症例, CD4<50: 1/7症例)。一方、T20耐性関連変異(G36D/S, I37V/M, V38A/E, Q39R, Q40H, N42T, N43D)を持つ準種(>1%)は、検出されなかった。しかし、0.1%程度の頻度で存在する可能性のある準種に広く検出された(22/20症例)。これらの結果は、HIV-1が治療前に存在しうることを示唆する。

D. 考察

FLX454とエラー補正プログラムを用い、検体中に1%前後の割合で存在する準種を検出する系を構築した。pyro-sequence法では、原理的にポリ配列周辺に人為的変異が生じやすい。実際、我々の解析で人為的変異率は約~0.9%であった。本状況では、収集された配列より実在する準種か人為的変異かの判別が困難である。我々は、独自にエラー補正プログラムを構築し、補正処理後、0.0027%まで低減できた。そして、異なる比率、濃度で、準種頻度の精度を検証し、1%までの準種の存在までは確認できた。よって、我々は、1%前後の頻度であれば、実在の可能性があると考えている。

今回の我々の解析では、Maraviroc 服薬歴がない、CD4>500: 1症例、150<CD4<350: 4症例、CD4<50: 1症例について耐性関連する点変異をもつ準種(>1%)が検出された。ただし、これまでの報告によれば、単一のアミノ酸置換では強い薬剤抵抗性を獲得できず、env遺伝子のV3やV4領域に複数の変異が蓄積すると耐性となる(Westby M. et.al, J. Virology, 2007)。今回の解析対象では、複数の変異の蓄積はなく、実際にはMaravirocに感受性である可能性が高い。しかし、耐性ウイルスへ進化する祖先ウイルスとなりうる。

E. 結論

初年度は、血清試料から、一回の解析で、HIV-1準種の80万種類の配列(平均長450塩基)を取得する系を作った。新規薬剤であるMaravirocやT20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唆する結果を得た。次年度以降は、感染者体内におけるHIV-1アクセサリー蛋白質(Vif, Vpr, Vpu, Vif, Vpr, Vif)の準種の種類と性質を包括的に解析する予定でいる。

謝辞

血清試料の収集に、瀧永博之先生(国立国際医療センター エイズ治療研究開発センター)に、御協力いただきました。厚く御礼申し上げます。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1). **Motomura K**, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H, and the Norovirus Surveillance Group of Japan “Divergent Evolution of Norovirus GII/4 By Genome recombination over 2006-2009 in Japan” Journal of Virology;84(16):8085-97; 2010 Aug.

2). Ivo N. SahBandar, Kiyomi Takahashi, **Kazushi Motomura**, Zubairi Djoerban, Iman Firmansyah, Katsuhiko Kitamura, Hironori Sato, Herdiman T. Pohan, Shigehiro Sato “The Indonesian Variants of CRF33_01B: Near-Full Length Sequence Analysis” AIDS Res Hum Retroviruses. ;27(1):97-102; 2011 Jan.

3). 岸田典子、高下恵美、藤崎誠一郎、徐紅、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、金南希、菅原裕美、氏家誠、小淵正次、小田切孝人、**本村和嗣**、佐藤彩、横山勝、終元巖、佐藤裕徳、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、田代真人 “2009/10 シーズンの季節性および新型インフルエンザ分離株の解析” 病原微生物検出情報月報 Vol. 31 p. 253-260: 2010年9月号

4). 田村務、田澤崇、渡邊香奈子、渡部香、昆美也子、三好龍也、内野清子、吉田永祥、松尾光子、西口智子、田中智之、北元憲利、**本村和嗣**、佐藤裕徳 “ノロウイルス GII/4 の 2008a 亜株の動向とイムノクロマト法の改良” 病原微生物検出情報月報 Vol. 31 p. 316-317: 2010年11月号

2. 学会発表

1). **本村和嗣**、野田衛、田中智之、Norovirus Surveillance Group of Japan “ノロウイルス GII/4 の生き残り戦略”, 第 84 回 日本感染症学会総

会、ワークショップ、京都 2010年4月5-6日

2). **本村和嗣** “ノロウイルスのゲノム組換えと抗原性変異”, 第 20 回 国立感染症研究所シンポジウム、シンポジウム、東京 2010年5月21日

3). **本村和嗣** “ノロウイルスのゲノム解析”, 第 1 回新興・再興感染症拠点ゲノムセミナー、講演、仙台 2010年5月31日

4). 田中智之、**本村和嗣** “ノロウイルス”, 第 51 回 日本臨床ウイルス学会、シンポジウム、香川 2010年6月19-20日

5). **Motomura, K**, Yokoyama, M, Ode, H, Oka, T, Katayama, K, Noda, M, Tanaka, T, Sato, H. Norovirus Surveillance Group of Japan. “EVOLUTION OF NOROVIRUS GII/4 IN JAPAN BY GENOME RECOMBINATION” Fourth International calicivirus Conference, Santa Cruz, Chili., Oct. 19 – 22, 2010

6). Tanaka T., **Motomura K**., Uchino K., Yoshida H., Miyoshi T., Matsuo M., Sato H., “Genetic characteristics of double infection of Noroviruses not related to oyster consumption” Fourth International calicivirus Conference, Santa Cruz, Chili., Oct. 19 – 22, 2010

7). **本村和嗣** “ゲノミクスと計算科学の手法に基づくノロウイルス進化の研究”, 第 58 回 日本ウイルス学術集会 シンポジウム、徳島 2010年11月7-9日

8). 岸田典子、徐紅、高下恵美、藤崎誠一郎、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、金南希、**本村和嗣**、佐藤彩、佐藤裕徳、網康至、須崎百合子、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、小淵正次、氏家誠、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所 “2009/10 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 22 年度のワクチン株” 第 58 回 日本ウイルス学術集会 徳島 2010年11月7-9日

9). 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、金南希、岸田典子、徐紅、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、**本村和嗣**、佐藤彩、佐藤裕徳、氏家誠、小淵正次、田代真人、小田切孝人

全国地方衛生研究所 “2009/10 シーズンにおける抗インフルエンザ薬剤耐性 pandemic A/H1N1 株の検出と新規薬剤ペラミビルに対する交叉耐性” 第58回 日本ウイルス学術集会 徳島 2010年 11月 7-9日

10). 田中智之、**本村和嗣**、内野清子、三好達也、

松尾光子、西口智子、佐藤浩徳、吉田永祥“食中毒事例におけるノロウイルス重感染のウイルス遺伝子学的解析” 第31回日本食品微生物学会学術集会 2010年 11月 11-12

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

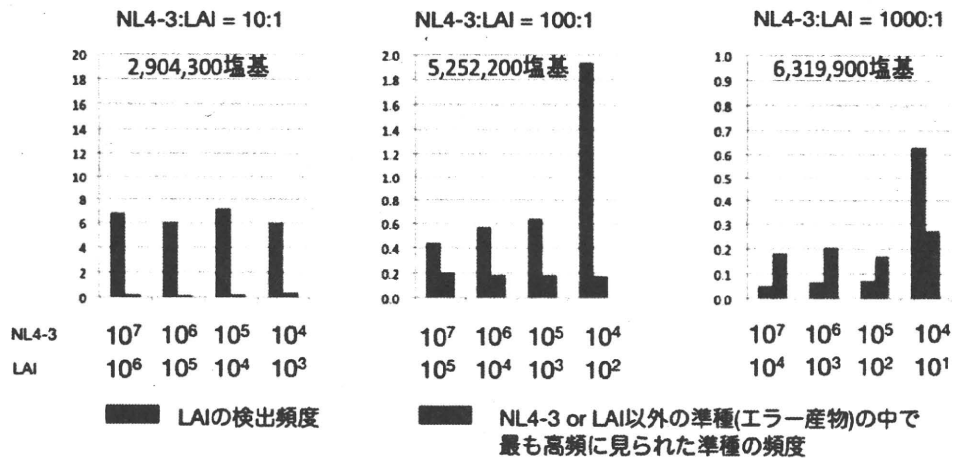
3. その他

図1

準種の頻度推定の精度検証

14,476,400塩基

HIV-1 NL4-3株とLAI株 を適当な比率で混在させた材料で検証



構築した系で、1%までの準種の存在は確認可能

分担研究報告書

HIV 種特異性と動物モデルの研究

研究分担者 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
研究協力者 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 准教授

研究要旨 病原性発現機構の実験的解析を目指し、サル細胞での複製・増殖に適化した HIV-1 クローンの分子構築を試みた。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を得た。これらのウイルスクローン (MN4Rh-4 [X4 ウイルス] と MN5Rh-4 [R5 ウイルス]) はプロトタイプクローン (NL-DT5R および NL-DT562) と比べ僅か 10 アミノ酸程度の違いしかないが、カニクイザルおよびアカゲザル TRIM5 α に抵抗性を示し、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。

これまでに実施された感染実験の結果によれば、サル指向性 HIV-1 のカニクイザル個体での増殖効率は用いたウイルスクローン (NL-DT5R, MN4S および MN4Rh-3) の細胞株での増殖能と極めて良く一致していた。本年度に構築した四種のウイルスクローンは全て MN4Rh-3, MN4S や NL-DT5R より著しく増殖能が向上しているため、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と考えられる。

A. 研究目的

我々が世界に先駆けて構築したプロトタイプサル指向性 HIV-1 (NL-DT5R) は SIVmac239 の *vif* 遺伝子全部と *gag* 遺伝子のごく一部 (CA helix 4/5 loop に対応) とを持つ。NL-DT5R は種々のサル細胞 (カニクイザル由来 HSC-F 細胞、アカゲザル由来 HSR5.4 細胞、ブタオザル、アカゲザルおよびカニクイザル由来 PBMC) だけでなく、ブタオザルやカニクイザル個体にも感染・増殖できる (PNAS 103:16959-16964, 2006; J Virol 81:11549-11552, 2007; Rev Med Virol 18:261-275, 2008; Microbes Infect 13: 58-64, 2011)。しかしながら、NL-DT5R はサル病原性標準株である SIVmac239 よりサル細胞での増殖効率が悪く (PNAS 103:16959-16964, 2006)、また、ブタオザルやカニクイザル感染個体でのウイルス血症も一過性であった

(J Virol 81:11549-11552, 2007; Microbes Infect 13: 58-64, 2011)。NL-DT5R の Gag-CA helix 6/7 loop を SIVmac239 型に置換し (Retrovirology 6: 70, 2009)、さらに、HSC-F 細胞での適応変異 (Pol-IN と Env-SU 内変異) を導入した MN4S クローンはカニクイザル PBMC での増殖効率が向上し、カニクイザル個体に持続感染を成立させた (Microbes Infect 13: 58-64, 2011)。MN4Rh-3 は MN4S の Gag-CA に 1 アミノ酸置換を導入したもので、サル細胞と個体において MN4S より優れた増殖能を持つ (論文投稿準備中)。

本年度は、MN4Rh-3 を出発材料として Gag-CA の改変を行い、サル細胞におけるウイルス増殖能の更なる改善を試みた。また、抗サル tetherin 活性を持つサル細胞指向性 HIV-1 の構築も試みた。これらにより、エイズ発症霊長類モデル (カニクイザルやアカゲ

ザル)の樹立に向けたインプットウイルスの確立を目指した。

B. 研究方法

1. ウイルスゲノムの改変は定法に従った。
2. トランスフェクションにはヒト 293T 細胞を用いた。TRIM5 α の抗ウイルス作用の測定には、種々の TRIM5 α 遺伝子が導入されたネコ CRFK 細胞を用い、ルシフェラーゼ活性で評価した (Microbes Infect 11: 164-171, 2009; 論文未発表)。同様の手法によりカニクイザル MK. P3(F)細胞の抗ウイルス活性も測定した。感染実験には主としてカニクイザル HSC-F 細胞とアカゲザル M1. 3S 細胞を用いた。293T、MK. P3(F)および CRFK 細胞は 10%FCS 加 MEM 培地で、HSC-F と M1. 3S 細胞は 10%FCS 加 RPMI1640 培地で維持し、サル細胞でのウイルス感染実験は IL-2 存在下で行なった。トランスフェクションにはリン酸カルシウム法を用いた。ウイルス量は培養上清中の逆転写酵素 (RT) 活性により測定した。
3. ウイルスゲノムのシーケンスはアプライドバイオシステムのサイクルシーケンスキットを用いて決定した。
4. Computer-assisted mutagenesis は国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センターの佐藤裕徳博士および横山勝博士との共同研究として行なわれた。

(倫理面への配慮)

本研究では、動物実験あるいはヒト材料を用いた実験は行っていない。

C. 研究結果

1. 各種 TRIM5 α を発現するネコ CRFK 細胞を用いて解析したところ、MN4Rh-3 はカニクイザル TRIM5 α および TRIMCyp に MN4S と同様の抵抗性を示すが、アカゲザル TRIM5 α の抑制は回避していなかった。一

方、MK. P3(F)細胞においては、MN4Rh-3 は MN4S より格段に高い感染性を示した。これらの成績等から、MN4Rh-3 は TRIM5 α 以外の抗ウイルス因子の抑制を回避していると考えられた。

2. アカゲザル TRIM5 α に抵抗性である Gag-CA を構築するため、computer-assisted mutagenesis を行ない、機能検証実験の結果、アカゲザル TRIM5 α の抑制回避に有効なアミノ酸を同定した。これらによりカニクイザル TRIM5 α に対する抵抗性も向上した。この Gag-CA を持つウイルスクローン (MN4Rh-4 および MN5Rh-4) はカニクイザル HSC-F 細胞において SIVmac239 と同様に効率良く増殖した。また、M1. 3S 細胞での増殖効率も劇的に改善された。
3. HIV-1 の progenitor である SIV の中には抗サル tetherin 活性を示す Vpu を持つものがある。この情報に基づき、抗サル tetherin 活性を示す MN4Rh-4 および MN5Rh-4 の構築に成功した (MN4Rh-4gT および MN5Rh-4gT)。

D. 考察

HIV-1 の基礎・臨床研究を格段に進展させるためには、SIV や SHIV ではなく HIV-1 そのものを用いたサル感染・発症モデルが必要である。このシステムが確立できれば、長い間不可能であった (1)HIV-1 の病原性発現機構の解析、(2)HIV-1 アクセサリー蛋白質の個体内機能の解析、(3)HIV-1 の宿主における変異・進化の系統的解析、(4)HIV-1 感染症の制御に繋がる新薬/ワクチンの評価・開発研究 が実現可能となる。本年度に得られた HIV-1 の分子クローン (MN4Rh-4、MN4Rh-4gT、MN5h-4 および MN5h-4gT) はこれらの目標の実現に向け極めて重要な成果である。

本年度の成果でも明らかであるが、ウイルス蛋白質の構造解析に基づく機能予測/機能検証は本研究の目標達成に極めて重要なステップである。今後も鋭意取り組んでいきたい。

E. 結論

カニクイザル細胞で SIVmac239 と同様に効率良く増殖する HIV-1 クローンが構築され、本研究の最終目標達成に向け大きく前進した。これらのクローンを用いて大規模なカニクイザル感染実験を実施すれば、不明の点の多かった HIV-1 の個体内挙動が明らかにされ、さらに、実践的臨床研究への道も開かれると期待される。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jere, A., Fujita, M., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2010. Role of HIV-1 Nef protein for virus replication *in vitro*. *Microbes and Infection* 12: 65-70.
- 2) Yamashita, T., Nomaguchi, M., Miyake, A., Uchiyama, T., and Adachi, A. 2010. Status of APOBEC3G/F in cells and progeny virions modulated by Vif determines HIV-1 infectivity. *Microbes and Infection* 12: 166-171.
- 3) Nagao, T., Yamashita, T., Miyake, A., Uchiyama, T., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010. Different interaction between HIV-1 Vif and its cellular target proteins APOBEC3G/APOBEC3F. *Journal of Medical Investigation* 57: 89-94.
- 4) Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010. Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions. *Reviews in Medical Virology* 20: 68-76.
- 5) Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010.

Virology as biosystematics: towards understanding the viral infection biology. *Frontiers in Microbiology* 1: 2. doi: 10.3389/fmicb.2010.00002.

- 6) Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2010. Growth ability in various macaque cell lines of HIV-1 with simian cell-tropism. *Journal of Medical Investigation* 57: 284-292.
 - 7) Nomaguchi, M., Doi, N., Fujiwara, S., Fujita, M., and Adachi, A. 2010. Site-directed mutagenesis of HIV-1 *vpu* gene demonstrates two clusters of replication-defective mutants with distinct ability to down-modulate cell surface CD4 and tetherin. *Frontiers in Microbiology* 1: 116. doi: 10.3389/fmicb.2010.00116.
 - 8) Saito, A., Nomaguchi, M., Iijima, S., Kuroishi, A., Yoshida, T., Lee, Y.-J., Hayakawa, T., Kono, K., Nakayama, E. E., Shioda, T., Yasutomi, Y., Adachi, A., Matano, T., and Akari, H. 2011. Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes and Infection* 13: 58-64.
 - 9) Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2011. HIV-1 Vpr and G2 cell cycle arrest. *Future Microbiology*, in press.
 - 10) Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2011. Monkey-tropic HIV-1 derivatives: a novel experimental approach to understand viral replication and evolution *in vivo*. *HIV-1 Infection/Book 1*, in press.
- ### 2. 学会発表
- 1) Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. Analysis of growth adaptive mutations in HIV-1 genome identifies a pol-integrase region that enhances virion production in a cell-independent and codon triplet-dependent manner. The 10th Awaji International Forum on Infection

and Immunity, Sept. 9, 2010, Awaji, Japan.

- 2) 三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫、野間口雅子 HIV-1 インテグラーゼ (IN) C 末端領域(CTD)における 1 塩基置換によるウイルス増殖促進機構の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7 日、徳島.
- 3) 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 8 日、徳島.
- 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 8 日、徳島.
- 5) 三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫、野間口雅子 HIV-1 増殖過程におけるインテグラーゼ (IN) C 末端領域 (CTD) の影響. (ワークショップ) 第 24 回日本エイズ学会学術集会、2010 年 11 月 24 日、東京.
- 6) 齊藤 暁、河野 健、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、安富康宏、俣野哲朗、明里宏文 カニクイザル TRIM5 allele がサル指向性 HIV-1 の増殖に与えるインパクト. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、2010 年 11 月 24 日、東京.
- 7) 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 サル細胞で効率よく増殖する 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、2010 年 11 月 24 日、東京.
- 8) 足立昭夫、野間口雅子 HIV-1 宿主域を規定する細胞因子とウイルス蛋白質. (シンポジウム 4) 第 24 回日本エイズ学会学術集会、2010 年 11 月 25 日、東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし。
2. 新案登録
なし。
3. その他
なし。

III. 協力研究報告書

HIV 脱殻過程に関する研究

研究協力者 三隅将吾 熊本大学・大学院生命科学研究部・薬学生化学分野 准教授

研究要旨 本研究では、翻訳時・翻訳後修飾解析から脱殻因子の同定及び脱殻メカニズムの解明を試み、HIV-1 CA タンパク質の Ser₁₆ におけるリン酸化を見出せただけでなく、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し、HIV-1 の感染性の維持に必須なモチーフであることを示した。さらに、このモチーフのリン酸化が出芽したウイルス粒子内の CA コアに認められることから、リン酸化 Ser₁₆-Pro₁₇モチーフが脱殻過程において機能するためには、標的細胞内に侵入後に何らかの因子と相互作用する必要があると考え、Fate-of-capsid assay を行った結果、HIV の標的細胞内で Pin1 が脱核因子として機能することを見出すことができた。

A. 研究目的

研究は、HIVのライフサイクルにおいて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、「HIVの構造、増殖、変異に関する研究」（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) Fate-of-Capsid assay

Fate-of-Capsid 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. 研究結果

1. 脱殻過程における Pin1 の役割

Pin1 が結合する CA タンパク質の Ser₁₆-Pro₁₇モチーフが脱殻過程において機能することをこれまでの研究成果で明らかにしていることから、次に脱殻過程における Pin1 ノックダウンの影響を検討した。Fate-of-Capsid assay を行い、感染細胞の細胞質で WT ウイルスがどの程度脱殻しているのかを調べた。Pin1 ノックダウン細胞 (Fig. 1) では、control と比較して上清中の CA タンパク質は少なく (Fig. 2 middle panel, Sup.)、ペレット中の CA コアは多い (Fig. 2 lower panel, Pellet) ことから、control よりも脱殻しにくいことが分かった。また、ウイルス RNA の逆転写によって生じるウイルス DNA を qPCR で定量した結果、Pin1 ノックダウン細胞におけるウイルス DNA はほとんど検出されず、逆転写が進んでいないことが分かった (Fig. 3)。これらの結果は、Pin1 が脱殻過程において CA コアのリン酸化 Ser₁₆-Pro₁₇モチーフに働きかけることにより、HIV-1 の感染を成立させていると考えられる。

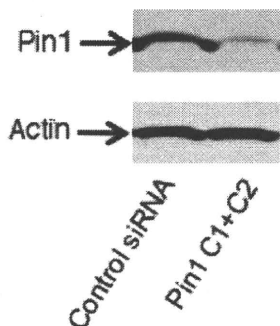


Fig. 1 Pin1 ノックダウン

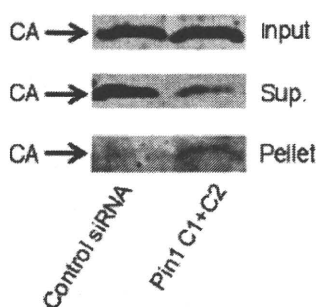


Fig. 2 Fate-of Capsid Assay

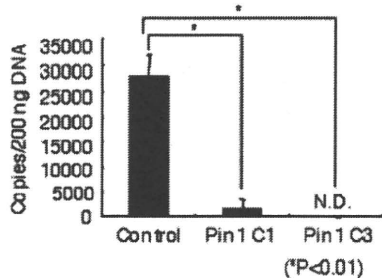


Fig. 3 qPCR (逆転写後期課程)

D. 考察

リン酸化 Ser-Pro モチーフに結合することが知られている PPIase Pin1 が CA タンパク質のリン酸化 Ser₁₆-Pro₁₇ モチーフに結合することを明らかにし、さらに HIV-1 感染にも寄与していることを示した。また、Pin1 特異的 siRNA のトランスフェクションによって標的細胞の Pin1 をノックダウンすると、WT ウイルスの脱殻過程が障害されたことから、Pin1 が脱殻過程に寄与していることも明らかになった。これまでに Pin1 は癌、アルツハイマー病、自然免疫に関与していることが報告されているが、それらに

おける Pin1 の作用は、基質タンパク質の構造を *cis-trans* 異性化によって変化させ、脱リン酸化酵素や E3 ユビキチンリガーゼ等に認識されやすくすることで、基質タンパク質の機能や安定性を調節しているというものであり、脱殻過程のような CA コアの大構造体の劇的な構造変化にも Pin1 が寄与することを明らかにできた。

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。本研究では、CA コアが特異的にリン酸化を受けることから、現在 Ser₁₆ のリン酸化を触媒する酵素を探索している。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。

F. 知的所有権の取得状況

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Misumi S, Inoue M, Dochi T, Kishimoto N, Hasegawa N, Takamune N, Shoji S. Uncoating of human immunodeficiency virus type 1 requires prolyl isomerase Pin1. *J Biol Chem.* (2010) 285(33):25185-95.
- Anraku K, Fukuda R, Takamune N, Misumi S, Okamoto Y, Otsuka M, Fujita M. Highly sensitive analysis of the interaction between HIV-1 Gag and phosphoinositide derivatives based on surface plasmon resonance. *Biochemistry.* (2010) 49(25):5109-16.
- Ohya Y, Jono H, Nakamura M, Hayashida S, Ueda M, Obayashi K, Misumi S, Asonuma K, Ando Y, Inomata Y. Effect of recipient-derived cells on the progression of familial amyloidotic polyneuropathy after liver transplantation: a retrospective study. *Ann Clin Biochem.* (2010) 47(Pt 6):529-34.

- 4) Takamune N, Kuroe T, Tanada N, Shoji S, Misumi S. Suppression of human immunodeficiency virus type-1 production by coexpression of catalytic-region-deleted N-myristoyltransferase mutants. Biol Pharm Bull. (2010) 33(12):2018-23.
- 5) Endo M, Gejima S, Endo A, Takamune N, Shoji S, Misumi S. Treatment of breast cancer cells with proteasome inhibitor lactacystin increases the level of sensitivity to cell death induced by human immunodeficiency virus type 1. Biol Pharm Bull. (2010)33(11):1903-6.

2. 学会発表等

- 1) リン酸化とcis-trans異性化によって制御されたHIV-1の脱殻素過程
井上睦美 第34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講演要旨集 p. 50
- 2) HIV-1脱殻プロセス解明に関する研究
井上睦美、堂地赳生、岸本直樹、高宗暢暁、庄司省三、杉本幸彦、三隅将吾
- 第9回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム2010講演要旨集 p.75
- 3) SIV感染におけるプロリルイソメラーゼ Pin1依存性脱殻機構の寄与
井上睦美、岸本直樹、堂地赳生、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾
第58回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集 p.173
- 4) プロリルイソメラーゼ Pin1 の脱殻促進作用の解析
井上睦美、堂地赳生、岸本直樹、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾
第24回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集 p.380
- 5) HIV-1 脱殻過程の制御とリン酸化
井上睦美、堂地赳生、岸本直樹、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三²、三隅将吾
第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会プログラム p.186

tetherin の HIV-1 cell-cell transmission に及ぼす影響

研究協力者 久保嘉直、神山陽香
(長崎大学熱帯医学研究所エイズ感染防御分野)

研究要旨 tetherin は、HIV-1 粒子をウイルス産生細胞の表面につなぎ止めることにより、cell-free HIV-1 transmission を抑制する。tetherin の cell-cell transmission に及ぼす影響に関して、既に3つの研究グループから報告されたが、それらの結果は一致しておらず、tetherin の HIV-1 cell-cell transmission に及ぼす影響は未だ明らかでない。我々は、de novo 感染が成立しないとルシフェラーゼ遺伝子が発現しない HIV-1 vector 系を用い、tetherin の cell-cell transmission に及ぼす影響を解析した。その結果、tetherin は cell-free transmission と同程度の効率で cell-cell transmission を抑制した。この結果は、tetherin が単に HIV-1 粒子の放出を物理的に抑制しているだけでなく、機序は不明であるが HIV-1 感染を機能的に抑制する働きを持っていることを示唆している。

A. 研究目的

1型インターフェロンによって発現が上昇するtetherinは、HIV-1粒子をウイルス産生細胞の表面につなぎ止めることにより、HIV-1 cell-free transmissionを抑制する。このtetherinの作用により、HIV-1粒子はウイルス産生細胞の表面に蓄積する。そのため、tetherinはcell-free transmissionを抑制するが、cell-cell transmissionは抑制しないと推測される。この問題を明らかにするため、tetherinのHIV-1 cell-cell transmissionに及ぼす影響を解析した。3つの研究グループが、この問題に関し既に報告している。最初に、tetherinはcell-cell transmissionを抑制するが、その効果はcell-free transmissionよりも低いことが報告された（PLoS Pathog.(2010) 6, e1000955）。次に別のグループは、tetherinがcell-cell transmissionに影響しないことを報告した（J.Virol.(2010) 84, 12185）。さらに最近、tetherinはcell-cell transmissionを抑制することが報告された（Retrovirology (2010) 7, 115）。このようにtetherinのcell-cell transmissionに及ぼす影響は、統一していない。我々は、de novo感染が成立しないとルシフェラーゼが発現しないHIV-1 vector系を用い、tetherinのHIV-1 cell-cell transmissionに及ぼす影響を解析したので、報告する。

B. 研究方法

1. FACSによる HIV-1 cell-cell transmission 測定実験系

293T 細胞もしくは COS7 細胞に HIV-1 gag-pol 発現プラスミド (R8.91)、GFP を持つ HIV-1 vector 発現プラスミド (HOX-GFP)、及び gp160 発現プラスミドをトランスフェクションし、HIV-1 vector 産生細胞とした。tetherin の影響を観察するため、tetherin 発現プラスミドを同時にトランスフェクションした。標的細胞 (293T/CD4 細胞もしくは Jurkat 細胞) を Cell Tracker Orange により染色し、vector 産生細胞と混合培養した。Cell Tracker Orange 陽性 GFP 陽性細胞を FACS により測定し、感染細胞とした。

2. De novo 感染が成立しないとルシフェラーゼが発現しない HIV-1 vector による cell-cell transmission 測定実験系

de novo 感染が成立しないとルシフェラーゼが発現しない HIV-1 vector (HIV-1 inLuc) は、Mazurov らによって開発された (PLoS Patho.(2010) 6, e1000788)。293T もしくは COS7 細胞に R8.91 発現プラスミド、HIV-1 inLuc 発現プラスミド、gp160 発現プラスミドをトランスフェクションし、HIV-1 vector 産生細胞とした。tetherin の影響を観察するため、同時に tetherin 発現プラスミドをトランスフェクションした。vector 産生細胞と標的細胞を混合培養し、ルシフェラーゼ活性を測定することによって感染価を定量した。

C. 研究結果

1. FACS による HIV-1 cell-cell transmission 測定系における tetherin の影響

FACS を用いた測定系により、tetherin の HIV-1 cell-cell transmission に及ぼす影響を測定した。tetherin の cell-cell transmission に及ぼす影響に関して既に発表された3つの報告は、いずれも、この実験方法に基づいている。その結果、Cell Tracker Orange 陽性 GFP 陽性細胞の出現は、tetherin によって抑制されなかった (図1)。しかし、Cell Tracker Orange 陽性 GFP 陽性細胞の出現は、AZT 処理によって阻害されなかった (図2)。また、vector 産生細胞を作製する時、R8.91 をトランスフェクションせず、gp160 発現プラスミドと HOX-GFP 発現プラスミドのみをトランスフェクションした時にも、Cell Tracker Orange 陽性 GFP 陽性細胞が同程度出現した (図3)。この結果は、Cell Tracker Orange 陽性 GFP 陽性細胞は、de novo 感染によって出現したのではなく、gp160 による細胞融合によって出現したと考えられる。

2. HIV-1 inLuc vector 実験系における tetherin の影響

FACS による cell-cell transmission 測定系の問題を克服するため、HIV-1 inLuc vector 実験系を用い、tetherin の cell-cell transmission に及ぼす影響を測定した。HIV-1 inLuc vector 産生細胞はルシフェラーゼを発現していないことを確認した。HIV-1 inLuc vector 産生細胞の培養上澄を標的細胞に接種した場合 (cell-free transmission)、tetherin はルシフェラーゼ発現を大きく抑制した (図4A)。HIV-1 inLuc vector 産生細胞と標的細胞を混合培養した時も (cell-cell transmission)、tetherin は cell-free transmission と同じようにルシフェラーゼ発現を抑制した (図4BCD)。

D. 考察

既に発表された3つの報告は、FACS による cell-cell transmission 測定系に基づいている。それらの報告において、HIV-1 cell-cell transmission は、高濃度の逆転写酵素阻害剤にもかかわらず、効率よく抑制されていない。よって、FACS を用いた cell-cell transmission 測定系では、高い割合で感染ではなく細胞融合によって生じた Cell Tracker

Orange 陽性 GFP 陽性細胞を含んでいる。この問題により、tetherin の cell-cell transmission に及ぼす影響に関し、異なった結果が得られたと思われる。

今回我々が用いた、de novo 感染が成立しないとルシフェラーゼが発現しない HIV-1 inLuc vector は、この問題を解消し、tetherin の HIV-1 cell-cell transmission に及ぼす正しい影響を観察することができる。その結果、tetherin は cell-free transmission と同様に cell-cell transmission を抑制することが明らかとなった。この結果は、tetherin が物理的に HIV-1 粒子の放出を阻害しているだけでなく、HIV-1 感染に必須な何らかの機能を抑制している可能性を示している。

E. 結論

tetherin の HIV-1 cell-cell transmission に及ぼす影響に関して、今まで相反する結果が報告されていたが、本研究により、tetherin は HIV-1 cell-free transmission と同様に cell-cell transmission を抑制することが明らかとなった。tetherin の HIV-1 感染抑制機構を詳細に解析することにより、新規 AIDS 治療法の開発に貢献するであろう。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 著書

- 1) Y. Kubo. Retroviral membrane fusions: regulation by proteolytic processing and cellular factors. L.-I. Larsson edited Cell fusion. Springer Press. 41-61 (2011).

3. 学会発表等

- 1) 久保嘉直、神山陽香、山本直樹。「XMRV の XC細胞におけるエンドソーム依存性かつ、その酸性化を必要としない感染機構について」第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月、徳島。
- 2) 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、2010年11月、徳島。
- 3) 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、徳島.

- 4) Y. Kubo. Murine leukemia virus in Japanese prostate cancer patients and its cell entry mechanism. The 8th Japan-China International Conference of Virology, July 2010, China
- 5) Y. Kubo, H. Kamiyama, T. Matsuyama, N. Yamamoto, H. Sakai, T. Igawa. Murine leukemia

virus in Japanese prostate cancer patients and its cell entry mechanism. The 10th Nagasaki-Singapore Medical Symposium on Infectious Diseases. April, 2010, Singapore.

- 6) H. Kamiyama, H. Yoshii, M. Iwao, N. Yamamoto, Y. Kubo. pH-independent cathepsin activation induces pH-independent infections by MLV and XMRV. International Workshop on Retroviral Pathogenesis. November, 2010, USA.

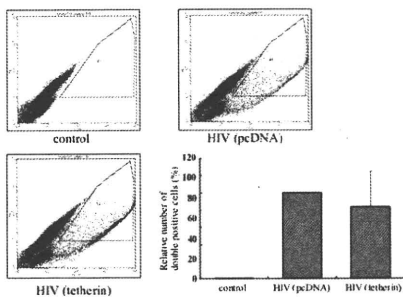


図1 Cell Tracker Orange陽性GFP陽性細胞の出現におけるtetherinの影響

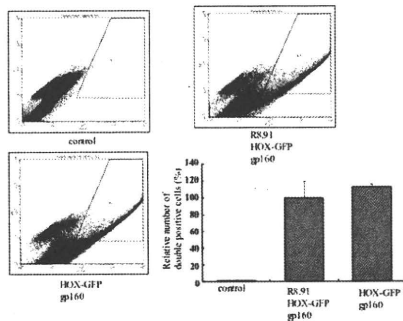


図3 Gag-pol発現プラスミドなしでCell Tracker Orange陽性GFP陽性細胞が出現する

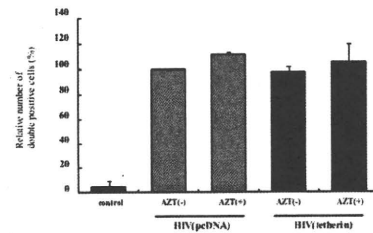


図2 Cell Tracker Orange陽性GFP陽性細胞の出現はAZTによって阻害されない

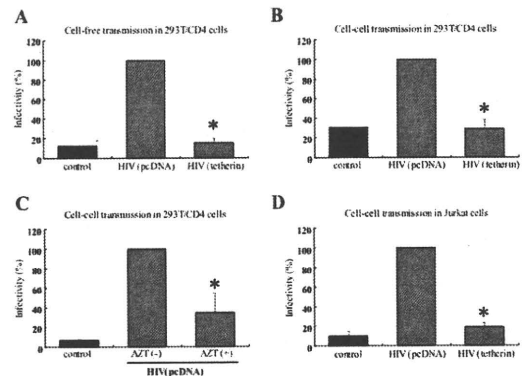


図4 HIV-1 inLuc vector 実験系において、tetherinはHIV-1 cell-cell transmissionを抑制する

IV. 業績一覽 (2010)

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					
Kobayashi T, Ode H, Yoshida T, Sato K, Gee P, Yamamoto S, Ebina H, Strelbel K, <u>Sato H</u> , Koyanagi Y.	Identification of Amino Acids in the Human Tetherin Transmembrane Domain Responsible for HIV-1 Vpu Interaction and Susceptibility	J Virol.	85(2)	932-45	2011
Sahbandar IN, Takahashi K, Motomura K, Djoerban Z, Firmansyah I, Kitamura K, <u>Sato H</u> , Pohan HT, Sato S.	The Indonesian Variants of CRF33_01B: Near-Full Length Sequence Analysis.	AIDS Research and Human Retroviruses	27(1)	97-102	2011
Ode H, Yokoyama M, Kanda T, <u>Sato H</u> .	Identification of folding preferences of cleavage junctions of HIV-1 precursor proteins for regulation of cleavability.	Journal of Molecular Modeling	17(2)	391-9	2011
Inagaki N, Takeuchi H, Yokoyama M, <u>Sato H</u> , 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	7	90	2010
Kono K, Song H, Yokoyama Y, <u>Sato H</u> , Shioda T, 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
Onyango C, Leligidowicz 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	28 Suppl 2	B60-7	2010
Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, <u>Sato H</u> , Takiguchi M, 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

Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, <u>Sato H</u> , Takiguchi M, 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	1596-602	2010
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
梁秀明					
Kojima Y, <u>Ryo A</u>	Pinning down viral proteins: A new prototype for virus-host cell interaction.	Frontiers in MICROBIOLOGY			in press
Sugiyama R, Nishitsuji H, Furukawa A, Katahira M, Habu Y, Takeuchi H, <u>Ryo A</u> , Takaku H	Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G.	The Journal of Biological Chemistry			in press
Inagaki N, Takeuchi H, Yokoyama M, Sato H, <u>Ryo A</u> , 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	7	90	2010
Tsukagoshi H, Masuda Y, Mizutani T, Mizuta K, Saitoh M, Morita Y, Nishina A, Kozawa K, Noda M, <u>Ryo A</u> , Kimura H	Sequencing and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Japan.	Jpn J Infect Dis	63(5)	378-80	2010
Kanzaki S, Yamaguchi A, Yamaguchi K, Kojima Y, Suzuki K, Koumitsu N, Nagashima Y, Nagahama K, Ehara M, Hirayasu Y, <u>Ryo A</u> , Aoki I, Yamanaka S	Thymic Alterations in GM2 Gangliosidosis Model Mice.	PLoS ONE	5(8)	e12105	2010
Shimada M, Yoshizaki S, Jounai N, Kondo A, Ichino M, <u>Ryo A</u> , Okuda K	DNA vaccine expressing HIV-1 gp120/immunoglobulin fusion protein enhances cellular immunity.	Vaccine	28(31)	4920-7	2010
Pulikkan JA, Dengler V, Peer Zada AA, Kawasaki A, Geletu M,	Elevated PIN1 expression by C/EBPalpha-p30 blocks C/EBPalpha-induced	Leukemia	24(5)	914-23	2010