

201029040A

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
(H21-エイズ-若手-020)

HIV-1ゲノム産物の翻訳後修飾とその機能に関する研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 高宗暢暁

(熊本大学大学院生命科学研究部)

平成23(2011)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

HIV-1ゲノム産物の翻訳後修飾とその機能に関する研究-----	1
高宗 暢暁	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	19
-------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷-----	21
-----------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（エイズ研究事業）

総括研究報告書

HIV-1 ゲノム産物の翻訳後修飾とその機能に関する研究

研究代表者 高宗暢暁 熊本大学生命科学研究部 助教

研究要旨 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 複製に必須となる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。平成 22 年度においては、アクセサリタンパク質 Nef とウイルス構造タンパク質 Gag に着目し検討を行い、以下に記す知見を得た。

1) 低発現型 Nef の存在を明らかにし、その特徴は少なくともプロテアソームを介したタンパク質の易分解性が原因であることが明らかとなった。低発現型 Nef だけでなく高発現型 Nef の C 末端側配列は、タンパク質の低発現化を誘導する能力を有していた。低発現型 Nef の易分解性の特徴は、そのウイルスの感染性増強作用の機能と関連している可能性が示唆された。

2) HIV-1 複製に重要な Gag および Nef の N-ミリスチル化は、宿主性の N-ミリスチルトランスフェラーゼ (NMT) によって触媒される。ミリスチル化が行われるリボゾームへの NMT 局在に重要な NMT のアミノ末端領域からなる触媒活性を有しない変異体 (NMTΔC 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。NMTΔC 変異体による内在性 NMT のリボゾームの局在の阻害が、ウイルス産生の抑制と関連していることが示唆された。

3) HIV-1 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 (p24) タンパク質は、ウイルス粒子内でその Ser¹⁶-Pro¹⁷ motif の Ser¹⁶ がリン酸化を受けていることが明らかになった。S16A/P17A mutant HIV-1 は著しくその複製能力が低下した。また宿主因子 peptidyl prolyl isomerase Pin1 はリン酸化 Ser¹⁶-Pro¹⁷ motif を認識し、ウイルスコアの脱殻 (uncoating) 過程に寄与していることが明らかとなった。

A. 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 ゲノム産物の中で、アクセサリタンパク質 Nef およびウイルス構造タンパク

質 Gag に着目し、翻訳後修飾の観点から各種検討を行った。

B. 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_{NL4-3} 株のウイルスゲノムを用いたが、研究の展開上、適宜、HIV-1_{NL4-3} 株以外の HIV-1 株や近縁のレンチウイルスも利用する。

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_{NL4-3} 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。

C. 研究結果

H22 年度においては、HIV-1 遺伝子産物の中で、Gag 及び Nef に力点をおいて研究を進めた。その結果、主として以下の 3 つの柱で結果を得た。

(1) 高発現型及び低発現型 Nef の存在と翻訳後修飾

Nef は HIV-1 アクセサリータンパク質のひとつであり、HIV-1 の病原性因子の一つとして知られている。Nef 欠損ウイルスは低病原性であることやウイルス複製能力が野生型と比較して低いことが明らかになっており、Nef の機能阻害はそのウイルス病原性低下を来すことが予想され、HIV/AIDS 制御につながると考えられる。

昨年報告で、実験室レベルで汎用されている

HIV-1 株である HIV-1_{NL4-3}, HIV-1_{JR-CSF}, HIV-1_{YU-2} 及び HIV-1_{89.6} 由来各種 Nef (Nef_{NL4-3}, Nef_{JR-CSF}, Nef_{YU-2} 及び Nef_{89.6}) の発現レベルを、同条件でウエスタンイムノブロット法等によって各 variant 間の比較をした結果、Nef_{JR-CSF} の発現レベルは、他の 3 つの variants よりも相対的に著しく高レベルであった。この結果から、高発現型と低発現型のおよそ 2 種類に分類される Nef 表現系が存在するのではないかと予想された。そのような相対的な発現レベルの相違の特徴がより普遍的に Nef variant 間において認められるのかどうか検討するため、米国ノースカロライナ大学チャペルヒル校の Swanstrom 博士より分与いただいた 6 種の Nef clone (21155#1-13, 255740#1-9, 101#6-3, 109#17-1, 644020#2-2, 及び 644020#2-3) をもちいて、同条件でそれら Nef を発現させウエスタンイムノブロット法で比較検討した。この際、以前実験方法と同じく、発現ベクターは pcDNA3.1 および細胞は HEK293 を用いた。Nef は C 末端側に V5 エピトープを付加した。各種 Nef 発現ベクターをトランスフェクトし、48 時間後の一過性に発現した Nef を、抗 V5 抗体を用いたウエスタンイムノブロット法で検出・評価した。その結果を Fig. 1 に示した。

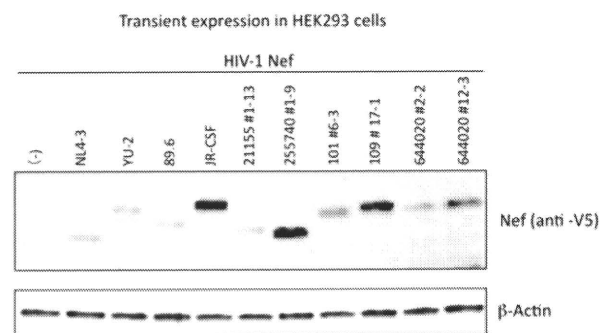


Fig. 1. 各種 Nef variant 間の発現レベルの比較

以前の結果と一致して Nef_{NL4-3}, Nef_{YU-2}, Nef_{89.6} の発現レベルは相対的に Nef_{JR-CSF} よりも著しく低レベルであった。今回新たに検討した 6 個の Nef variant

のうち、Nef_{255740#1-9}、Nef_{109#17-1} は相対的に高発現レベルであり、他の4 variants は相対的に低発現レベルであった。以上の結果から、Nef には、およそ高発現型と低発現型の2種類の表現系で存在していることが示唆された。先述した通り Nef はウイルス複製を促進することから、低発現型 Nef において、その低発現性には何らかの合目的な意義があるのではないかと考えられた。

このように Nef が高発現型または低発現型として検出される理由が、DNA のトランスフェクション効率の相違でないことを確認するために、Nef_{NL4-3} と Nef_{JR-CSF} の安定発現細胞を構築し細胞のクローニングを行い、各細胞における Nef の発現レベルの比較をウエスタンイムノブロット法 (Fig. 2) および免疫染色法 (Fig. 3) で行った。

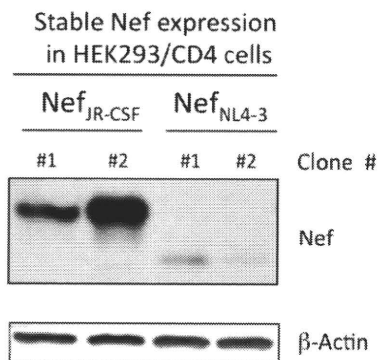


Fig. 2. 安定発現 HEK293/CD4 細胞による Nef 発現レベルの比較

Fig. 2 は、Nef_{JR-CSF} または Nef_{NL4-3} の安定発現 HEK293/CD4 細胞のそれぞれ2クローンを用いて、ウエスタンイムノブロット法で Nef の発現レベルを比較した結果である。Fig. 1 の結果と同様に、いずれのクローンにおいても Nef_{JR-CSF} の発現レベルは Nef_{NL4-3} のそれよりも相対的に著しく高く、10倍以上の差を認めた。Fig. 3 は、Fig. 2 で用いた Nef 安定発現細胞を、抗 V5 抗体を用いて Nef を免疫染色し、

核を DAPI で染色した結果である。各細胞は DAPI 染色された核を観察することで識別できる。Nef_{JR-CSF} 及び Nef_{NL4-3} の発現細胞においても、全ての細胞において Nef が発現していることを確認した。さらに細胞内における Nef の発現様式を比較すると、Nef_{NL4-3} は核周辺のある部分に集積して存在していることが観察された。この様式は過去に報告されている Nef の局在様式と同様であり、過去の報告からゴルジ体集積している Nef を検出しているものと考えられた。一方、Nef_{JR-CSF} においては、Nef_{NL4-3} と同様に核周辺に観察されるとともに、細胞質においても高度に分布していることが観察された。以上の結果から、明らかに Nef_{NL4-3} と Nef_{JR-CSF} の細胞内における発現様式が異なっていることが示された。この結果から、Nef が高発現型または低発現型として検出された理由が、トランスフェクション効率等のアーティファクトによる違いではなく、Nef そのものの特徴に起因していることが確認された。

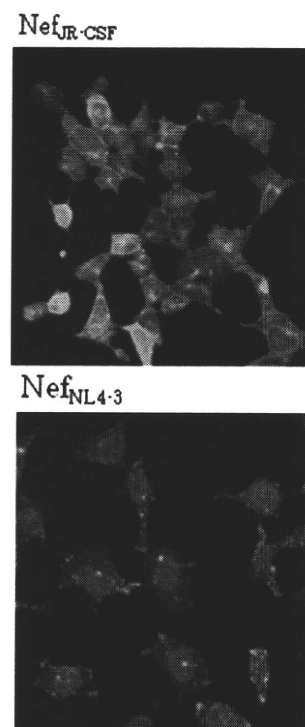


Fig. 3 Nef_{JR-CSF} 及び Nef_{NL4-3} を安定発現した HEK293/CD4 細胞の免疫染色

低発現型 Nef と高発現型 Nef 間の発現レベルの相違は mRNA レベルの相違に起因するのかを検討するため、Nef_{NL4-3} と Nef_{JR-CSF} を発現した HEK293 細胞から RNA を抽出し定法に従い、RT-qPCR 法により Nef_{NL4-3} と Nef_{JR-CSF} 間の mRNA レベルの比較を行った。その結果、タンパク質レベルでの比較では両者間で 10 倍以上の発現レベル差が観察されていたのに対し、mRNA は両者間で同等レベルであることが明らかになった (Fig. 2)。

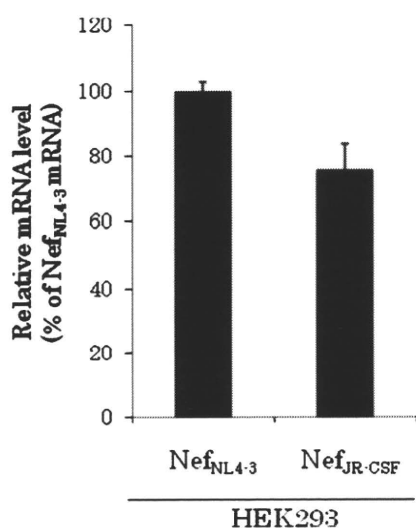


Fig. 4. Nef_{NL4-3} 及び Nef_{JR-CSF} の mRNA レベルの比較

この結果から、Nef_{NL4-3} と Nef_{JR-CSF} 間の発現レベルの差が、mRNA レベルに起因しないことが明らかになった。このことから、この発現レベルの差はタンパク質の安定性に起因するのではないかと考えられた。一つの可能性として、低発現型 Nef は著しい易分解性の特性を有し、その結果として見かけの発現レベルが低くなると予想された。主要なタンパク質分解機構の一つにユビキチン化-プロテアソーム系が存在する。ポリユビキチン化を受ける前にもタンパク質のリン酸化等がポリユビキチン化のトリガーになる場合があることがよく知られている。このようなことから Nef の低発現性の特徴には、幾つかの翻訳

後修飾が関連していることが考えられた。

以上の考察を踏まえ、低発現型 Nef である Nef_{NL4-3} がユビキチン化を受けているかどうかを検討した。まず、Nef_{NL4-3} を発現した HEK293 細胞を可溶化後、抗 V5 抗体で Nef_{NL4-3} を免疫沈降し抗ユビキチン抗体でウエスタンブロット法により Nef_{NL4-3} を検出した (Fig. 5)。

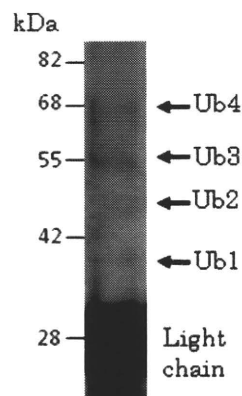


Fig. 5. Nef_{NL4-3} のポリユビキチン化の検出

その結果、Fig. 5 に示すように、Nef_{NL4-3} は抗ユビキチン化抗体により 35kDa (Ub1), 43kDa (Ub2), 51kDa (Ub3), 及び 59kDa (Ub4) のサイズで検出された。これらはそれぞれおよそ 8kDa のユビキチンが 1, 2, 3 及び 4 個連結したサイズと一致する。このことから、Nef_{NL4-3} はポリユビキチン化を受けていることが明らかになった。

Nef_{NL4-3} のポリユビキチン化が認められたことから、Nef_{NL4-3} の低発現性がプロテアソームを介したタンパク質の分解の亢進によるものであるかどうかを調べるため、プロテアソーム阻害剤である MG132 を処理し、0、3、及び 6 時間後に、その発現レベルが上昇するかどうかを検討した。その結果、Fig. 6 に示すように MG132 を 20 μ M 処理することで、時間依存的な Nef_{NL4-3} 発現レベルの上昇が認められた。このことから、Nef_{NL4-3} のような低発現型 Nef における低レベル発現の特徴は、少なくとも Nef タンパク質のプ

ロテアソームを介した分解亢進が関連していることが示唆された。

Nef_{NL4-3} の低発現性を規定する責任領域を特定するにあたり、高発現型 Nef_{JR-CSF} の前半領域(アミノ酸残基 1-139)と低発現型 Nef_{NL4-3} の配列の後半領域(アミノ酸残基 129-206)を有する Nef_{chimera} の発現系を構築し (Fig. 7 A)、発現レベルの比較検討を行った (Fig. 7 B)。その結果、Fig. 7B に示すように Nef_{chimera} の発現レベルは相対的に Nef_{NL4-3} と同程度に Nef_{JR-CSF} の 10%程度と低レベルであったことから、Nef_{NL4-3} のアミノ酸残基 129-206 の配列がその低発現性に寄与していることが明らかになった。研究代表者は、この低発現性に寄与する領域をタンパク質分解亢進によることから、Nef degradation sequence (NDS) と命名した (特許出願; 特願 2009-239220)。

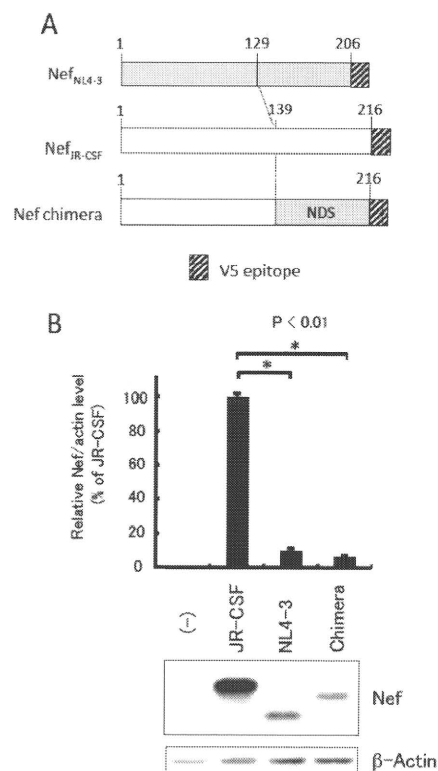


Fig. 7. Nef_{NL4-3} の低発現性を規定する領域

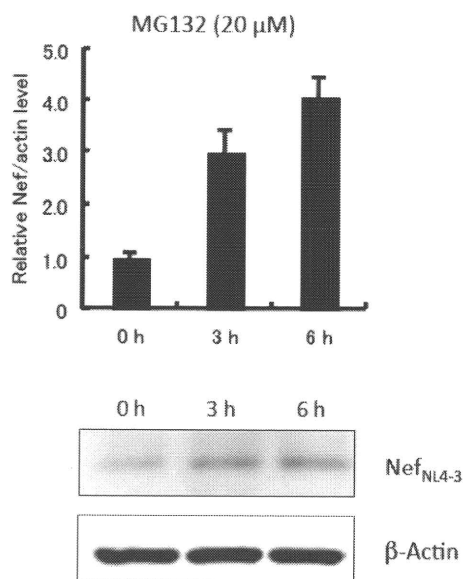


Fig 6. MG132 処理による Nef_{NL4-3} 発現レベルの上昇

NDS の Nef_{NL4-3} の低発現性への寄与の効果が必要十分であるかどうか、及び既知の低発現化配列との比較を行うため以下の実験を行った。安定なタンパク質として知られる増強型緑色蛍光タンパク質 (EGFP) に NDS、既知のタンパク質分解配列 CL1-PEST (CP) 配列を EGFP に融合させて発現させ (Fig. 8 A)、同条件下での発現レベルの比較を行った。その結果、Fig. 8 B に示すように、予想通りに CP 融合した EGFP (CP-EGFP) は、コントロールと比較して著しく低レベルの発現を示した。NDS 融合した EGFP (NDS-EGFP) の発現レベルも CP と同様に、コントロールと比較して著しく低い結果となった。このことから、NDS の融合はタンパク質低発現化の誘導に必要十分であることが示され、また NDS によるタンパク質の低発現化効果が、既知の強力なタンパク質分解誘導配列 CP 配列による低発現化効果と同等レベルに高いことが明らかになった。

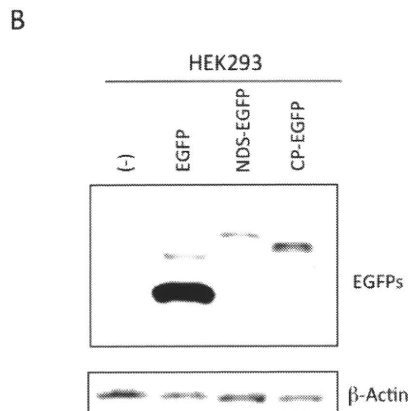
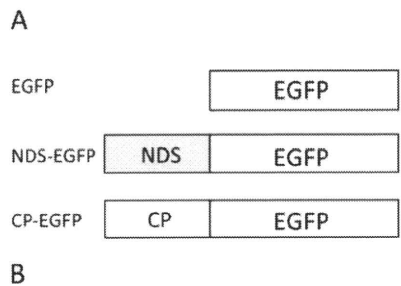


Fig. 8. NDS 融合 EGFP の発現レベルの検討

Fig. 1-3 に示したように Nef_{JR-CSF} は高発現型 Nef であった。また data は示していないが、SIVmac239 由来 Nef (Nef_{mac239}) も Nef_{JR-CSF} と同様に高発現型 Nef であった。また Fig. 7-8 で示したように、低発現型 Nef の Nef_{NL4-3} の NDS は融合させることで EGFP の低発現化を誘導した。ここで、次に高発現型 Nef の C 末端領域に位置する NDS 相当領域が、タンパク質低発現化能を有しているかどうかを検討した。ここで Nef_{JR-CSF} 及び Nef_{mac239} の NDS 相当配列を JNDS 及び macNDS と名付けた。Fig. 8 と同様に JNDS または macNDS を EGFP に融合させて、その発現レベルを比較検討した。その結果、Fig. 8 で示した Nef_{NL4-3} 由来 NDS と同様に、JNDS 及び macNDS も融合によって EGFP の著しい低発現化を誘導した。以上の結果から、発現レベルの観点から Nef は高発現型と低発現型のおよそ 2 つに分類されるが、低発現型 Nef のみならず高発現型 Nef においても、NDS 相当領域はタンパク質の低発現化能を保有していることが示唆された。

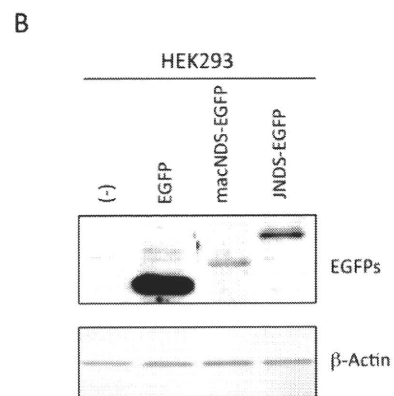
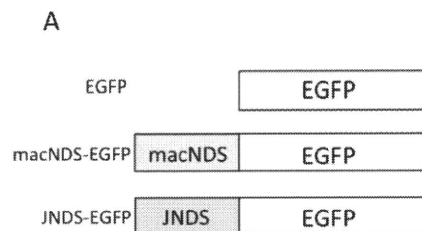


Fig. 9. JNDS 及び macNDS 融合 EGFP の発現レベルの検討

NDS 融合による EGFP の低発現化も同様にプロテアソームによる分解亢進であることを確認するために、NDS-EGFP 発現細胞にプロテアソーム阻害剤である MG132 を処理し、0、3、及び 6 時間後に細胞を回収しその発現レベルをウェスタンイムノブロット法で解析した。

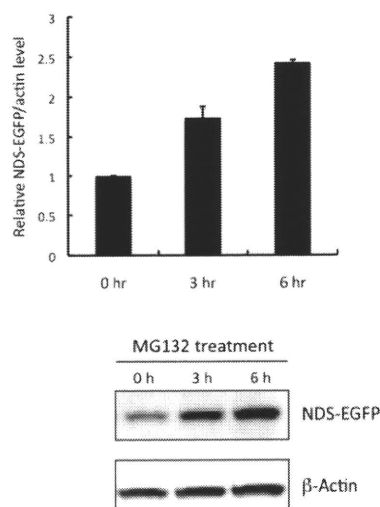


Fig 10. MG132 処理による NDS-EGFP 発現レベルの上昇

その結果 Fig. 10 に示すように、NDS-EGFP の発現レベルが MG132 処理後時間依存的に上昇し、処理 6 時間後では 0 時間のおよそ 2.5 倍に達した。この結果は、Nef_{NL4-3} の発現レベルが MG132 処理によって上昇する結果 (Fig. 6) と同様であった。以上の結果より、NDS 融合によって誘導される EGFP の低発現化は、少なくともプロテアソームを介したタンパク質分解の亢進が関与していることが示唆された。

Nef はウイルス複製を促進する因子であることから、高発現型 Nef であることがウイルス生存にとって有利であると考えられる。しかし低発現型 Nef を有するウイルスが存在している事実を踏まえると、その低発現性には何らかの合目的な意義があるのではないかと考えられた。その低発現性が Nef の機能と関連するのかどうかを検討するため、本研究では Nef の有するウイルス感染性増強作用と低発現性との関連について検討した。

高発現型 Nef にタンパク質分解を亢進する特徴を付与することで低発現型 Nef としたとき、感染性増強作用にどのような影響を与えるか検討した。高発現型 Nef に低発現性を付与するために、Fig. 8 で用いた既知のタンパク質分解亢進配列である CP を、高発現型 Nef である Nef_{mac239} および Nef_{JR-CSF} の C 末端側に融合した Nef_{mac239}-CP 及び Nef_{JR-CSF}-CP の発現系を構築した (Fig. 11 A)。まず CP 融合 Nef が野生型より低発現性を示し、その低発現性がプロテアソームによる分解亢進によることを確認するため、HEK293 細胞に一過性に発現した Nef_{mac239} 及び Nef_{mac239}-CP の発現レベルを、抗 V5 抗体を用いたウエスタンイムノブロット法で検出し比較検討した。その結果 Fig. 11B に示すように Nef_{mac239}-CP の発現レベルは野生型と比較して著しく低レベルであった。またプロテアソーム阻害剤である MG132 を 3 h 及び 6 h 処理すると、処理時間依存的に Nef_{mac239}-CP の発現レベルの上

昇が観察された。この結果から、高発現型 Nef は CP を融合することによってプロテアソームを介した分解が亢進することで低発現化することが確認された。CP 融合 Nef を、高発現型 Nef が低発現化へ変化した低発現型 Nef のモデルとして利用した。

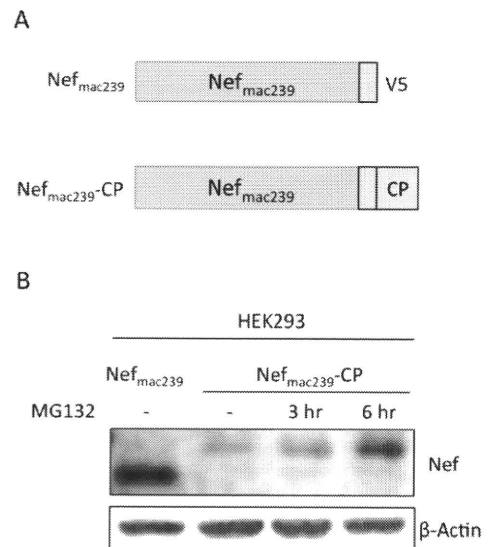


Fig 11. CP 融合による Nef の低発現化

高発現型 Nef_{mac239} 及び その低発現型モデル Nef_{mac239}-CP、高発現型 Nef_{JR-CSF} 及びその低発現型モデル Nef_{JR-CSF}-CP のウイルス感染性増強作用を検討した。Nef_{mac239} 及び Nef_{mac239}-CP の評価には SIV_{mac239} のレポーターウイルスを発現する DNA を用いた。この DNA は *nef* 遺伝子領域にルシフェラーゼ遺伝子が挿入された *nef* 遺伝子欠損体である。一方 Nef_{JR-CSF} 及び Nef_{JR-CSF}-CP の評価には HIV-1_{NL4-3} のレポーターウイルスを発現する DNA を用いた。この DNA も *nef* 遺伝子領域にルシフェラーゼ遺伝子が挿入された *nef* 遺伝子欠損体である。これらウイルス DNA とそれぞれの Nef 発現ベクターもしくは mock DNA をコトランスフェクトし産生されたウイルスを、標的細胞 MAGIC-5 細胞に接種し、48 時間後のルシフェラーゼ活性で感染性を評価した。このとき、接種したウイ

ルス量を SIV_{mac239} は p27 抗原量で、 $HIV-1_{NL4-3}$ は p24 抗原量で補正し、単位ウイルス当たりの感染性を評価した。その結果を Fig. 12 に示した。 Nef_{mac239} と Nef_{mac239} -CP おいては Nef のアミノ末端がミリストイル化されないことで Nef の機能を失う変異体である Nef_{mac239_G2A} 及び Nef_{mac239} -CP_G2A をネガティブコントロールとして使用した。ウイルス産生細胞における Nef の発現をウェスタンイムノブロット法で検出したのが Fig. 12 B (SIV_{mac239}) と D ($HIV-1_{NL4-3}$) になる。期待したとおり CP を融合することによって Nef_{mac239} 及び Nef_{JR-CSF} は各々の野生型と比較して著しい低発現化を示した。Fig. 12 A に示すように、 SIV_{mac239} は野生型 Nef_{mac239} によって mock と比較して感染性の有意な増強が認められた。また期待したとおり機能性のない Nef_{mac239_G2A} 変異体による感染性増強は認められず、mock と同等レベルであった。興味深いことに、見かけの発現レベルが著しく低い低発現型 Nef モデルである Nef_{mac239} -CP は野生型の Nef_{mac239} と同等レベルにまで有意に感染性を増強した。一方 Nef_{mac239} -CP_G2A 変異体は感染性増強を示さなかった。Fig. 12 C に示すように、 Nef_{JR-CSF} は $HIV-1_{NL4-3}$ の感染性を有意に増強し、その低発現型 Nef モデルである Nef_{JR-CSF} -CP も有意な感染性増強効果を示した。以上の結果から、タンパク質分解が亢進することで低発現化し、見かけの発現量が著しく低下した Nef においても、ウイルスの感染性増強作用の機能が保持されていることが明らかになった。

ここで、 Nef による感染性増強作用が、著しく低発現の Nef でも十分である可能性があるので、野生型 Nef_{mac239} の発現量を低下させたときの感染性増強作用について検討した。ウイルス DNA とコトランスフェクトする Nef_{mac239} の発現 DNA 量を段階的に減らした (1000 ng, 900 ng, 500 ng, 100 ng, 50 ng 及び 0 ng)。そのときトランスフェクトする total DNA

を揃えるために、mock DNA 添加した。この条件で産生された各 SIV_{mac239} の感染性を比較した。Fig. 13 A はウイルス産生細胞における Nef_{mac239} の発現レベルを示している。期待したとおり DNA の容量依存的に Nef_{mac239} の発現レベルが低下した。 Nef_{mac239} -CP 発現 DNA を 1000 ng コトランスフェクトしたときの Nef_{mac239} -CP の発現レベルと同等レベルの野生型 Nef_{mac239} の発現を示したのは、 Nef_{mac239} 発現 DNA 50 ng をコトランスフェクトした条件であった。これら Nef 発現細胞から産生した SIV_{mac239} の感染性を評価した結果、Fig. 13 B に示すように、 Nef_{mac239} の発現レベルに依存して感染性の低下が観察された。 Nef_{mac239} -CP 発現 DNA を 1000 ng コトランスフェクトしたときのウイルスの感染性は Nef_{mac239} 発現 DNA を 1000 ng コトランスフェクトしたときと同等であり、この結果は Fig. 12 A と同じ結果である。また発現レベルが同等となる Nef_{mac239} DNA 50 ng と Nef_{mac239} -CP DNA 1000 ng をコトランスフェクトしたときのウイルスの感染性を比較すると、 Nef_{mac239} の感染性は Nef_{mac239} -CP よりも有意に低く、 Nef_{mac239} による感染性増強作用は認められなかった。

以上の結果から、低発現型 Nef_{mac239} -CP と同等レベルの発現の条件下では野生型の Nef_{mac239} は感染性増強作用を示さないことから、 Nef が低発現であるのみでは感染性増強作用を発揮することは十分でないことが明らかになった。また低発現であるにも関わらず感染性増強作用を示す Nef_{mac239} -CP と、感染性増強作用を示さない同等の低発現レベルの野生型 Nef_{mac239} 間の違いは、CP の付加による易分解性の特徴の有無であることから、 Nef_{mac239} -CP の易分解性の特徴がその感染性増強作用と関連することが示唆された。このことから、低発現型 Nef における低発現性の特徴は、 Nef による感染性増強作用の機能と関連するのではいかと考えられた。

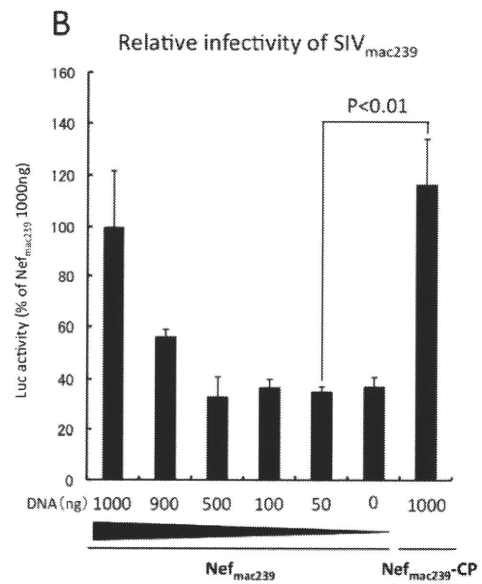
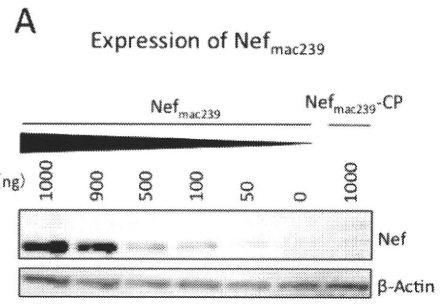
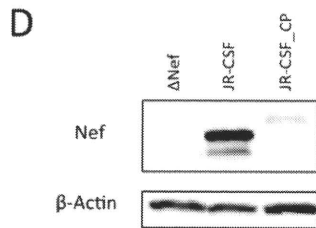
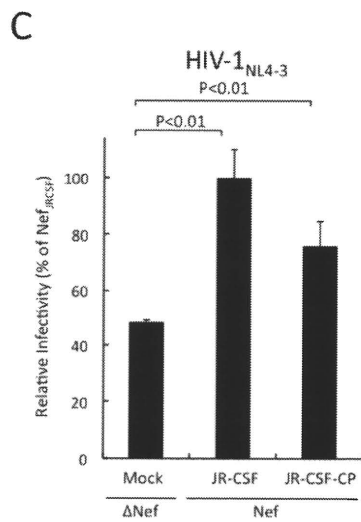
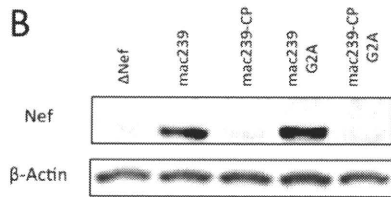
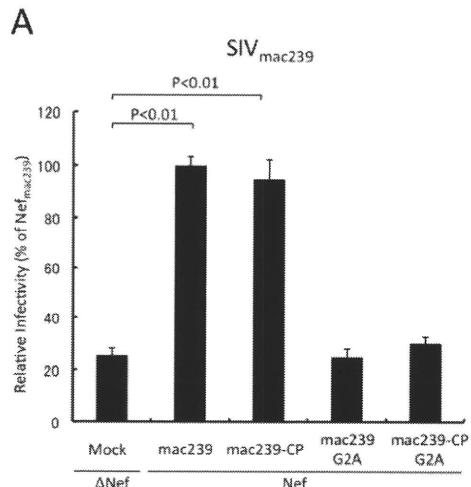


Fig. 13. 低発現レベル Nef_{mac239} の感染性増強作用

Fig. 12. CP 融合型 Nef の感染性増強作用

(2) NMTのリボゾーム局在と HIV 複製との関連

N-ミリスチル化は HIV-1 複製に必須の翻訳後修飾の一つであり、ウイルス構造タンパク質である Gag (Pr55^{gag})およびアクセサリタンパク質 Nef のアミノ末端 Gly 残基でおこる。これら N-ミリスチル化は、著しく多様性に富む HIV-1 において完全に保存されていることから、その阻害は有力な薬剤耐性ウイルス出現を回避する HIV-1 制御戦略の一つになると考えられる。そのような、N-ミリスチル化は、宿主性因子である N-myristoyltransferase (NMT) によって行われる。ヒトにおいて NMT は 2 つの遺伝子 NMT1 及び NMT2 の存在が知られており、複数の isozyme で発現することが明らかになっている。さらに、細胞内において NMT1 は、細胞質だけでなくリボゾームにも局在することが報告されていた。また未発表データであるが、研究代表者は、NMT が核内やミトコンドリアにも局在していることを明らかにしている。従って、NMT は、複数の isozyme での存在と様々な細胞内領域での機能が想定されることから、従来から提案されている触媒活性を標的とする NMT 阻害では、細胞内の全ての NMT の機能を阻害してしまうことから細胞への障害が大きいと予想される。従って研究代表者は、NMT を標的とする抗 HIV 戦略を構築するにあたり、HIV-1 複製と密接に関連する NMT 分子種をより特異的に阻害することが重要であると考えた。

N-ミリスチル化はタンパク質がリボゾームで合成されている時に起こる翻訳時修飾と、カスパーゼによりタンパク質が限定分解された結果、露出したペプチド基質が N-ミリスチル化される翻訳後修飾に分類される。このことから、研究代表者は、リボゾームに局在する NMT は翻訳時の N-ミリスチル化に関与し、細胞質局在型 NMT は翻訳後 N-ミリスチル化に関連しているという作業仮説を立ててい

る。

Fig. 14 に示すように NMT の構造はアミノ末端領域と触媒領域に区分でき、アミノ末端領域は触媒活性に必要とされない。NMT1 と NMT2 の触媒領域の相同性は 84% であるのに対し、アミノ末端領域の相同性は 41% と低い。以前の NMT1 に関する研究で、NMT1 が細胞質とリボゾームに局在し、リボゾーム局在には NMT1 のアミノ末端領域が関与していることが示唆されていたが、その詳細についてはほとんど判っていなかった。そこで本研究では、NMT1 と NMT2 のリボゾーム局在に関する特徴付けを行ってきた。

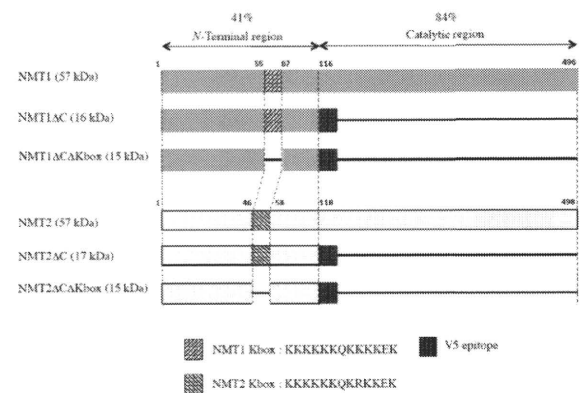


Fig. 14. NMT 各 isozyme と構築した変異体

%は NMT1 と NMT2 間の相同性を示す。

本研究でこれまでに明らかにした NMT の細胞内局在に関する知見は以下の通りである。内在性 NMT1 と NMT2 の両方の isozyme は、細胞質とリボゾームの両方に局在する。NMT1 と NMT2 がリボゾームへ局在するにはアミノ末端領域のみで十分である。Fig. 14 に示すように、NMT1 と NMT2 間で相同性の低いアミノ末端領域の中に 13 残基からなる塩基性アミノ酸残基に富む領域 (K box と命名) が存在するが、この K box はリボゾーム局在に必須の領域である。

このことを踏まえ、本年度は、NMT の触媒領域を含まない変異体である NMT1ΔC 及び NMT2ΔC の細胞内における発現が、内在性 NMT1 及び NMT2 のリボゾーム

局在に与える影響を検討した。NMT1 Δ CまたはNMT2 Δ Cを発現した HEK293 細胞をダウンスホモジネーターでホモジネート後、連続的な遠心分離法を行うことで、細胞質フラクション (Cyto) とリボゾームフラクション (Ribo) を分離し、ウェスタンイムノブロット法にて NMT の検出を行った。乳酸デヒドロゲナーゼを細胞質マーカー、28S リボゾーム RNA をリボゾームマーカーとした。その結果、Fig. 15 に示すように、コントロール細胞 (Mock) では Ribo の NMT1 が Cyto の NMT1 よりも相対的に多く存在した。この様式は NMT2 においても同様であった。一方 NMT1 Δ C を発現した細胞では、Ribo の NMT1 が Cyto の NMT1 より相対的に少なかった。またこの細胞において Ribo の NMT2 は Cyto の NMT2 より相対的に多くコントロールと同様であった。NMT2 Δ C を発現した細胞においては、Ribo の NMT1 と Cyto の NMT1 は同程度検出され、Ribo の NMT2 は Cyto の NMT2 より相対的に少なかった。Data を示していないが、リボゾームに局在しない NMT1 Δ C Δ K または NMT2 Δ C Δ K の発現した細胞においては、内在性 NMT1 及び NMT2 の Ribo および Cyto への局在様式はコントロール細胞と同様であった。以上の結果をまとめると、NMT1 Δ C は内在性 NMT1 の Ribo への局在に影響し内在性 NMT2 の Ribo への局在には影響しなかった。NMT2 Δ C は内在性 NMT1 の Ribo への局在に部分的に影響し、内在性 NMT2 の Ribo への局在に影響した。NMT1 Δ C Δ K または NMT2 Δ C Δ K では内在性 NMT への影響は認められなかったことから NMT1 Δ C と NMT2 Δ C はドミナントネガティブな様式で内在性 NMT1 と NMT2 の Ribo 局在に影響したと考えられた。

Fig. 16 では、HIV-1_{NL4-3} の野生型、Gag の N-ミリスチル化を受けない gag G2A 変異体ウイルス、Nef の N-ミリスチル化を受けない Nef G2A 変異体ウイルス、及び Gag と Nef の両方の N-ミリスチル化を受けない GagG2A/NefG2A 変異体ウイルスの産生量の

比較を示した。それぞれ野生型ウイルスの産生量のおよそ 15%、40%、及び 15%程度であった。このことから、完全に Gag や Nef が N-ミリスチル化されないウイルスでこのレベルのウイルス抗原が培養上清中に検出されることが明らかになった。

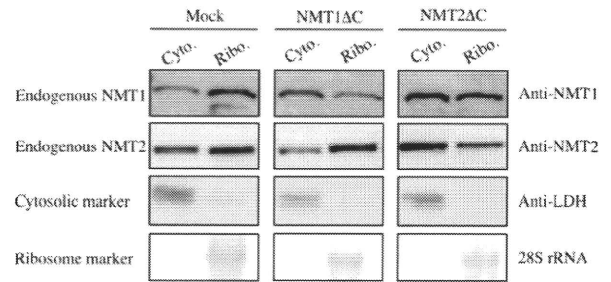


Fig. 15. NMT1 Δ C 及び NMT2 Δ C の内在性 NMT1 及び NMT2 のリボゾーム内局在に与える影響

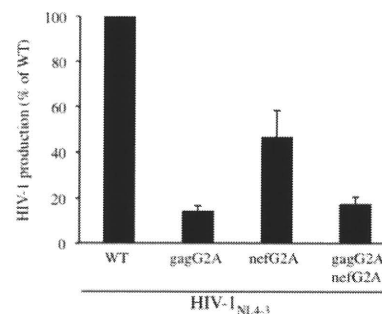


Fig. 16. 各種 G2A HIV-1 変異体の産生量の比較

Fig. 15 で示された通り、NMT1 Δ C と NMT2 Δ C が内在性 NMT のリボゾームへの細胞内局在に影響することから、これら変異体の発現が N-ミリスチル化を必要とする HIV-1 産生に影響すると考えられた。また siRNA 等を用いた過去の研究で、NMT1 は主に Gag の N-ミリスチル化と関連し、NMT2 は主に Nef の N-ミリスチル化と関連することが報告されている。このことから、野生型 HIV-1 は NMT1 及び NMT2 依存性であり、NefG2A 変異ウイルスは NMT1 依存性ウイルスと考えられる。このことを踏まえ、NMT1 Δ C または NMT2 Δ C 発現細胞からの野生型 HIV-1_{NL4-3} と NefG2A 変異ウイルスの産生量を比較した。

その結果、Fig. 17A に示すように、野生型 HIV-1_{NL4-3} の産生は、NMT1ΔC の発現によってコントロール細胞から産生されるウイルス量のおよそ 30%程度まで有意に減少した。一方 NMT2ΔC の発現によってコントロール細胞から産生されるウイルス量のおよそ 50%程度まで有意に減少した。このことから野生型 HIV-1 は NMT1 及び NMT2 依存性のウイルスであり以前の報告と一致した。Gag の N-ミリスチル化はウイルス複製に必須であることから NMT1ΔC の野生型 HIV-1 に対する影響が NMT2ΔC よりも大きい結果となったと考えられた。これは Fig. 16 で示された GagG2A 変異体ウイルスの産生量が NefG2A 変異体ウイルスの産生量より低い結果とも一致する。Fig. 17B に示すように、NefG2A 変異ウイルスの産生は、NMT1ΔC の発現によってコントロール細胞から産生されるウイルス量のおよそ 30%程度まで有意に減少した。一方 NMT2ΔC の発現によってコントロール細胞から産生されるウイルス量と比較して有意な減少は認められなかった。この結果は、NefG2A 変異体ウイルスは NMT1 依存性ウイルスであるという過去の知見と一致した。またウイルス産生量が著しく低い NMT 非依存性のウイルスである GagG2A 変異体ウイルスと GagG2A/NefG2A 変異体ウイルスの産生に対して、NMT1ΔC と NMT2ΔC はほとんど影響しなかった (Fig. 17C, D)。以上の結果から考察すると、NMT1ΔC または NMT2ΔC の発現によって、内在性 NMT のリボゾームへの局在が阻害され、翻訳時に起こると考えられる HIV-1 の Gag 及び Nef の N-ミリスチル化が効率的に行われなくなり、その結果としてウイルス産生が低下したと考えられた。このことから、内在性 NMT のリボゾームへの局在を阻害することが HIV-1 産生抑制につながると考えられる。

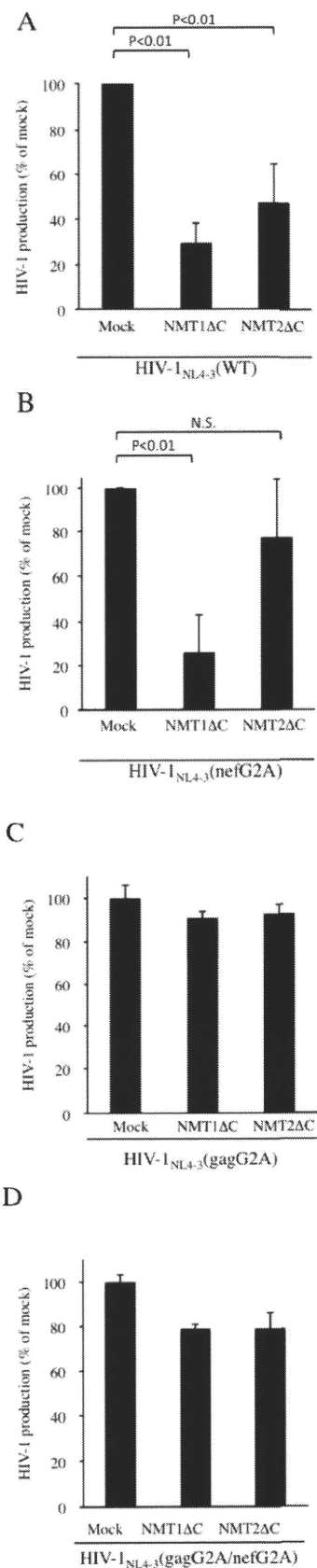


Fig. 17. NMT1ΔC 及び NMT2ΔC の各種 HIV-1 変異体産生に与える影響

(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タンパク質(p24)の Ser16 のリン酸化

HIV-1 持続感染細胞である CEM/LAV-1 から産生された培養上清中に含まれる感染性ウイルス粒子を超遠心分離法により回収し、常法に従い2次元電気泳動法(2D-PAGE)によりウイルスタンパク質を分離展開し、タンパク質を銀染色した。サイズが24kDa付近の各タンパク質スポットをトリプシンで限定分解し、得られたペプチドフラグメントを質量分析した結果、各タンパク質スポットが HIV-1 キャプシドタンパク質(p24)であることが明らかになった。ウイルス粒子を直接的にタンパク質レベルで解析することにより、p24が複数の isoform (少なくとも6個)でウイルス粒子内に存在していることが明らかになった。得られたペプチドフラグメントの質量分析的な詳細な解析により p24-a isoform の Ser16 がリン酸化を受けていることが明らかになった(昨年までの結果)。

p24-a の Ser16 のウイルス複製における重要性を検討するため、Ser16 を Glu に置換したウイルス HIV-1 S16E 変異体、Ser16 を Ala に置換したウイルス HIV-1 S16A 変異体及び Ser16 を Thr に置換したウイルス HIV-1 S16T 変異体を作成し、その感染性を評価した。また Ser16 とそれに続く Pro17 の Ser16-Pro17 モチーフは種々の HIV-1 株で高度に保存されていることから、この2残基が重要であることを想定し、Ser16 と Pro17 の2残基を Ala に置換した HIV-1S16A/P16A 変異体を作成した。S16E 変異は Ser16 のリン酸化をミミックした変異であり、S16A 変異はリン酸化を受けない変異となる。これらウイルスを HIV-1 感染のインジケータ細胞である MAGIC-5 細胞に接種し感染性を評価した。その結果、Fig. 18 に示すように、HIV-1S16E 変異体は野生株と

同等の感染性を示した。非リン酸化変異である HIV-1 S16A の感染性は、野生株のおよそ50%と有意に低いレベルであった。HIV-1S16A 変異体と HIV-1 S16A/P17A 変異体の感染性は、野生株のおよそ10%であり有意に低レベルの感染性を示した。

また T 細胞株である Jurkat および CEM に HIV-1 S16A/P17A を接種し、経日的に培養上清中の p24 抗原を定量することでウイルスの複製能を評価した。その結果、Fig. 19 に示すように、野生株ウイルスは時間依存的に培養上清中の p24 抗原量の増加が認められその複製が認められたのに対し、HIV-1 S16A/P17A 変異体は、p24 抗原量の増加が観察されず、複製能力が消失していることが明らかになった。

以上の結果から、p24 のリン酸化 Ser16-Pro17 モチーフのウイルス複製における重要性が示唆された。

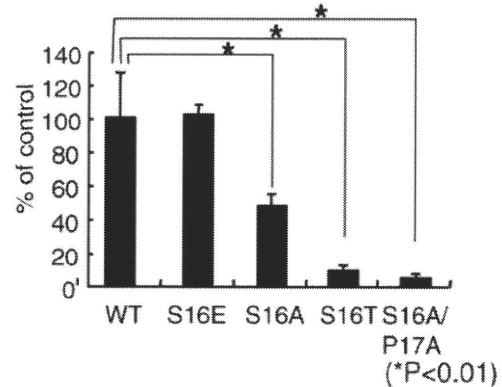


Fig. 18. 各種 Ser16 変異体ウイルスの感染性の評価

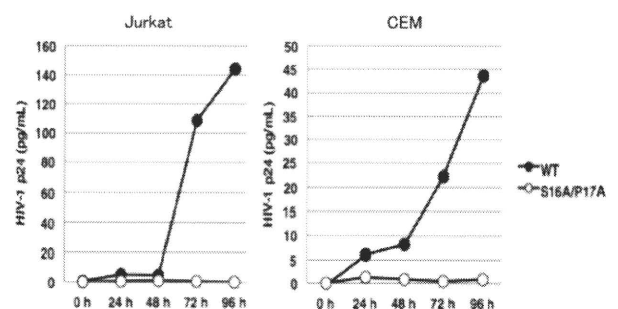


Fig. 19. HIV-1S16A/P17A 変異体の複製能の評価

HIV-1 S16A/P17A 変異体の複製能の著しい低下が、複製のどのステップで障害があるのかを検討した。まず培養上清中のウイルスの逆転写酵素活性を測定した結果、野生株の逆転写酵素活性と同等の活性が認められた (data not shown)。また HIV-1 S16A/P17A 変異体の細胞内への侵入効率を検討した結果、野生株との差は認められなかった (data not shown)。次にウイルスが細胞内侵入後におこる逆転写効率を検討した。早期逆転写産物または後期逆転写産物を増幅する特異的なプライマーを用いて qPCR 法で定量した。その結果、Fig. 20 A に示すように、野生型と変異体間で早期逆転写産物の差は認められなかった。一方後期逆転写産物を比較した結果、Fig. 20 B に示すように変異体ウイルスにおいて有意な後期逆転写産物の低下が観察された。このことから、HIV-1 S16A/P17A 変異体の複製能の著しい低下は、ウイルスの標的細胞への侵入後から核移行までの過程に障害があると考えられた。

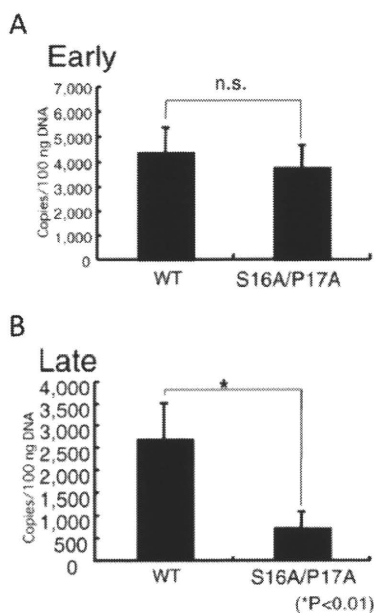


Fig. 20. HIV-1 S16A/P17A の逆転写産物の評価

p24 がウイルスコアを構成するタンパク質であることから、ウイルスコアが崩壊する過程である脱殻

(uncoating) 過程の障害ではないかと考え Fate-of-capsid assay を行った。Fate-of-capsid assay は感染細胞内におけるウイルスコアの脱殻の程度を評価する系である。脱殻により遊離した p24 と脱殻がおこらず未崩壊のままのウイルスコアを超遠心により分離することで評価する。その結果、Fig. 21 に示すように、野生株において、超遠心操作後の Sup 中に脱殻により崩壊して遊離した p24 (CA) が検出され、pellet 中に含まれる未崩壊のコア由来 p24 (CA) はほとんど認められなかった。一方、HIV-1S16A/P17A 変異体において、Sup 中の p24 (CA) の量が減少し、pellet 中の p24 (CA) が強く検出された。この結果から、HIV-1 S16A/P17A 変異体は、脱殻過程の障害によりウイルス複製能が低下していることが明らかになった。

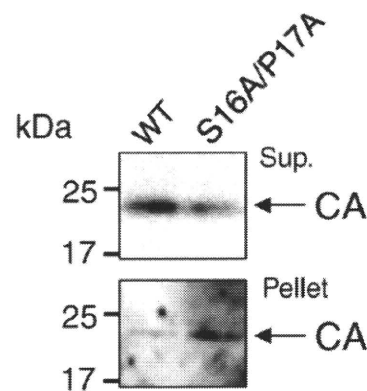


Fig. 21. Fate-of-capsid assay

P24 S16A/P17A の変異により脱殻過程が障害を受けていることが明らかになり、p24 におけるリン酸化 Ser16-Pro17 モチーフの重要性が示唆された。研究代表者らは、このリン酸化 Ser16-Pro17 モチーフを介した脱殻過程に関わる宿主因子が存在すると仮定した。ペプチジルプロリルイソメラーゼ Pin1 はペプチド結合の *cis-trans* 異性化反応を触媒する酵素でリン酸化 Ser-Pro モチーフを認識することができることが知られていた。そこで、Pin1 の脱殻への関

与を仮定し、まず Pin1 とウイルスコアが相互作用するかどうか検討した。Pin1 は GST 融合タンパク質として調製した。ウイルスコアはウイルス粒子から調製した。これらを用いて GST pull-down assay を行った。その結果、Fig. 22 に示すように、GST-Pin1 と p24 (CA) が共沈した。GST のみでは p24 (CA) は共沈しなかった。このことから、Pin1 とウイルスコアが直接相互作用することが明らかになった。

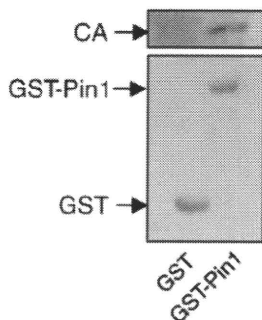


Fig. 22. GST-Pin1 とウイルスコアの直接的相互作用

次に標的細胞における Pin1 の siRNA による knockdown の後期逆転写産物の生成に与える影響を検討した。Pin1 siRNA を処理した MAGIC-5 細胞に HIV-1 野生株を接種し、DNA を抽出後、Fig. 20 で用いた特異的なプライマーを用いて qPCR 法で後期逆転写産物を定量した。その結果、Fig. 23 に示すように、Pin 1 に対する siRNA (Pin1 C1, Pin1 C2) による knockdown によって、有意な後期逆転写産物の生成の低下が観察された。

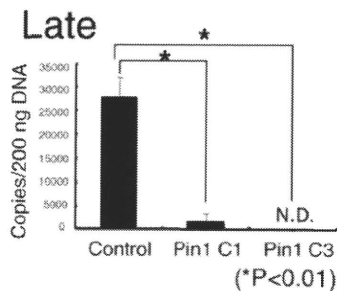


Fig. 23. Pin1 knockdown の後期逆転写産物生成に与える影響
また同様にウイルス標的細胞を siRNA で Pin1 を

knockdown 後、HIV-1 野生株を接種し、Fig. 21 と同様の Fate-of-capsid assay を行った。Fig. 24 に示すように、Pin1 の knockdown により、Sup 中の p24 (CA) の量が減少し、pellet 中の p24 (CA) が強く検出された。この結果から、Pin1 が脱殻過程に関与していることが示唆された。

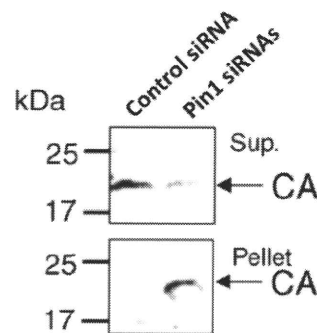


Fig. 24. Pin1 knockdown の脱殻過程に与える影響

D. 考察

(1) 高発現型及び低発現型 Nef の存在と翻訳後修飾

Nef の NDS がどのようにして急激なタンパク質分解を導いているのか詳細は不明なままであるが、ユビキチン化が重要であれば関連する E3 リガーゼの認識部位として NDS が機能するか、または NDS そのものがプロテアソームへのターゲティング機能を有している可能性が考えられる。HIV-1 全ての株の Nef が低発現を示すわけではないようだが、潜在的に低発現性の特性を有している可能性がある。Nef の低発現性の特徴を論ずるには、より多くの Nef variants について検証する必要があるだろう。また Nef の低発現性は感染性増強作用と関連している可能性が示唆された。この Nef の低発現性の機能的意義については今後さらに検証していく必要がある。

(2) NMTのリボゾーム局在と HIV 複製との関連

研究代表者は、リボゾームに局在する NMT は主として翻訳時の N-ミリスチル化に関与し、細胞質局在型 NMT は主として翻訳後 N-ミリスチル化に関連するのではないかという作業仮説を立てている。本研究で、内在性 NMT のリボゾーム局在の低下が HIV-1 複製の低下と関連することが明らかになった。この結果は、その仮説を支持する結果である。NMT のリボゾーム局在の阻害法の構築は、翻訳後修飾の阻害を介した新しい HIV-1 複製阻害法の構築につながると考えられる。そのためには、詳細な NMT のリボゾーム局在機構を解明することが重要になる。

(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タンパク質(p24)の Ser16 のリン酸化

p24 リン酸化 Ser16-Pro を認識し脱殻に関与する Pin1 は細胞内で様々なタンパク質に対して機能している。特異性向上の観点から、今後、脱殻に関与する他の分子、例えば p24 Ser16 のリン酸化に関わるリン酸化酵素の同定等の脱殻の詳細を明らかにした上で、本プロセスを標的とする HIV-1 複製阻害戦略をデザインする必要がある。

E. 結論

Nef には低発現性を示す variant が存在し、それはタンパク質の易分解性によることが明らかになった。またその特性は HIV-1 感染性増強と関連する可能性が示唆された。

HIV-1 複製に必須の翻訳後修飾であるミリスチル化を担う NMT の機能を阻害するにあたり、HIV-1 に対する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た。

ウイルスコアを形成する CA の Ser16 のリン酸化は、脱殻のステップに重要であることが明らかになった。宿主因子 peptidyl prolyl isomerase Pin1 はリン酸化 Ser16-Pro17 motif を認識し、ウイルスコアの脱殻(uncoating)過程に寄与していることが明らかとなった。

F. 健康危惧情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takamune N, Kuroe T, Tanada N, Shoji S, and Misumi S. Suppression of human immunodeficiency virus type-1 production by coexpression of catalytic-region-deleted N-myristoyltransferase mutants. *Biol. Pharm. Bull*, 33: 2018-2023, 2010.
- 2) 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*. 285: 25185-25195, 2010.
- 3) 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* 49: 5109-5115, 2010.
- 4) Endo M, Gejima S, Endo A, Takamune N, Shoji S, and 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*, 33:1903-1906, 2010.

2. 学会発表

- 1) 高宗暢暁、山本充奈美、入坂由香梨、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV-1 Nef タンパク質の低発現性に関する研究 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、2010、福岡
- 2) Takamune N, Yamamoto M, Harada K, Irisaka Y, Shoji S, and Misumi S. Potential low protein expression property of Nef. The 11th Kumamoto AIDS Seminar, 2010, 熊本
- 3) 原田圭輔、入坂由香梨、山本充奈美、三隅将吾、杉本幸彦、庄司省三、高宗暢暁、HIV-1 及び SIV Nef の低発現性がウイルスの感染性増強に与える影響、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010、徳島
- 4) 原田圭輔、入坂由香梨、山本充奈美、三隅将吾、杉本幸彦、庄司省三、高宗暢暁、HIV/SIV アクセサリータンパク質 Nef の低発現性と機能発現の関連性に関する解析 BMB2010, 2010, 神戸
- 5) 岸本直樹、井上睦美、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV-1 preintegration complex 構成因子である integrase を標的としたプロテオーム解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010、徳島
- 6) 堂地赳生、井上睦美、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾、HIV カプシドタンパク質の Ser16 のウイルス粒子内のリン酸化に関する研究 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010、徳島
- 7) 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、HIV カプシドタンパク質の Ser16 のウイルス粒子内のリン酸化に関する研究 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 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010、徳島
- 8) 原田 圭輔、入坂 由香梨、山本 充奈美、三隅 将

吾、杉本 幸彦、庄司 省三、高宗 暢暁、 HIV/SIV アクセサリータンパク質 Nef の低発現性と機能発現に関する基礎研究、日本薬学会九州支部大会、2010、長崎

- 9) 小川 実菜子、高宗 暢暁、杉本 幸彦、庄司 省三、三隅 将吾、HIV-1 p2 peptide のポストエントリ一過程における役割に関する基礎研究、日本薬学会九州支部大会、2010、長崎

H. 知的財産権の出願・登録状況

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、平成 22 年 10 月 15 日優先権主張出願。

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
Takamune N, Kuroe T, Tanada N, Shoji S, and Misumi S.	Suppression of human immunodeficiency virus type-1 production by coexpression of catalytic-region-deleted N-myristoyltransferase mutants.	<i>Biol. Pharm. Bull</i>	33	2018-2023	2010
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.	<i>J Biol Chem.</i>	285	25185-25195	2010
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.	<i>Biochemistry</i>	49	5109-5115	2010
Endo M, Gejima S, Endo A, Takamune N, Shoji S, and 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	<i>Biol. Pharm. Bull</i>	33	1903-1906	2010
Takamune N, Yamamoto M, Harada K, Irisaka Y, Shoji S, and Misumi S.	Potential low protein expression property of Nef.	The 11th Kumamoto AIDS Seminar abstract		38	2010