

201124022A

平成23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23年度

総括・分担研究報告書

平成24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23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23年度

総括・分担研究報告書

平成24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
野間口雅子	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	准教授
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	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	准教授
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
有海 康雄	研究協力者	熊本大学 エイズ学研究センター	准教授

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	
1. <i>In silico</i> 解析のウイルス学研究への応用	9
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)	
2. HIV 感染制御因子とその解除因子の構造機能解析	13
「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)	
3. HIV 感染抵抗性因子の構造機能解析	17
塩田 達雄 (大阪大学微生物病研究所)	
4. 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)	
5. 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)	
6. HIV-1 ゲノムの核移行制御因子の構造機能解析	29
間 陽子 (理化学研究所・分子ウイルス学特別研究ユニット)	
7. HIV 転写制御因子の構造機能解析	33
岡本 尚 (名古屋市立大学・医学研究科)	
8. 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
「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」	
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)	
9. HIV 宿主指向性、感染力、増殖能の決定因子の解析	41
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)	
10. 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	45
梁 明秀 (横浜市立大学医学部微生物学教室)	

III. 協力研究報告書	
1. HIV 脱殻過程に関する研究.....	49
「HIV 粒子に存在する蛋白質の構造と機能」	
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. HIV ゲノム二量体化と組換えに関する解析.....	53
「薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法に関する研究」	
櫻木 淳一 (大阪大学微生物病研究所 ウイルス感染制御分野)	
3. tetherin の HIV-1 cell-cell transmission と細胞融合に及ぼす影響.....	57
久保 嘉直 (長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科)	
IV. 業績一覧 (2011)	61

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）、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）、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・臨床研究センター 室長）

1. 研究目的

科学的根拠に立脚してエイズ対策を推進するには、エイズの病原である HIV の理解が欠かせない。特に、「HIV の構造、増殖、変異」の知見は、HIV の検査法・制御法・動物モデル等の開発・改良など、エイズ対策の疫学から臨床応用研究に幅広く不可欠な基盤情報となる。HIV は高度に変異性のため、感染者体内で構造や性質を速やかに変える。実験のみで HIV の構造や性質を知るには時間がかかり、ウイルスの変化に迅速に対処するのは難しい。

申請者は、HIV を含む変異性病原体の解析を効果的に支援する手法として、急速に進展している計算科学の技術に着目した。これまでに、コンピュータを用いてウイルスと宿主の蛋白質の立体構造、性質、変化を解析し、国内外の研究者と共同で実験データとの整合性を検証してきた。その結果、計算科学の技術は、ウイルス学、疫学、薬剤耐性、動物モデル開発等、幅広い分野の研究支援に有効であることを立証してきた。

そこで本研究では、国内の基礎ウイルス学研究者が連携し、ウイルス学に視点をおき、実験と計算科学等の技術を併用して HIV の構造、増殖、変異に関する原子・分子・細胞・個体レベルの新知見を幅広く収集し、成果を論文等で広く提供してエイズ対策に役立てる。最終年度も上の方針に沿ってウイルス学情報の収集と解析を行う。計算科学の技術を生命科学に適用する試みは、必ずしも独創的ではない。すでに様々な分

野でその有効性が確認されている。しかし、ウイルス研究への適用は、国内外ともに未だ発展の途上にある。本研究の実施は、エイズの病原体の新たな解析技術基盤と情報基盤の形成に寄与することで、エイズ対策を推進するための科学的基盤の強化に貢献する。

2. 研究方法

(1) 研究代表者：コンピュータを用いた分子解析技術を、HIV の構造、増殖、進化の解析に応用する方法を研究する。研究分担者らと共同で、理論と実験を連動させて HIV のウイルス学情報を収集する。

(2) 研究分担者：実験により、HIV の構造、増殖、変異に関する原子・分子・細胞・個体レベルの新知見を幅広く収集する。① HIV 蛋白質と相互作用する細胞蛋白質を特定し、HIV 複製制御における意義を明らかにし、機能発現に必須の領域とその構造を解析する（梁、塩田、岩谷、増田、村上、間、岡本）。② 新型シーケンサーを用いて感染者体内の HIV ゲノム情報を包括的に収集し、体内における変異のプロファイルを解析する（本村）。③ HIV の宿主指向性、感染力、増殖能等の変化に関わる変異の種類と構造要因を特定する（野間口）。

なお、HIV の構造、増殖、変異に関する情報収集については、横山勝博士（国立感染症研究所・主任研究官）、櫻木淳一博士（大阪大学微生物病研究所・助教）、三隅将吾博士（熊本大学生命科学研究部・准教授）、久

保嘉直博士（長崎大学医学部・准教授）、有海康雄博士（熊本大学エイズ学研究センター・准教授）に研究協力者として支援を受ける。

（倫理面への配慮）

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。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。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。

3. 研究結果

(1) 研究代表者 (*in silico* 構造解析とウイルス研究) : ホモロジーモデリング法、分子動力学法、結合シミュレーション等を用いて、種々の HIV 増殖制御因子の物理化学的特性を明らかにした。成果を研究分担者らの実験データの考察と新たな実験（変異導入解析等）の支援に活用した。これにより、HIV の増殖能、宿主域、薬剤感受性、免疫逃避能等の生物学的性質の決定に関わる領域の構造特性、並びに変異による性質変化のしくみを分子・原子レベルで明らかにした。

(2) 研究分担者

HIV の構造、増殖、変異に関する原子・分子・細胞レベルの新知見を幅広く収集し、成果を論文に公表した。

①増田 (HIV ゲノムの逆転写制御因子の構造機能解析) : HIV-1 インテグラーゼ (IN)、逆転写酵素、宿主因子の精製蛋白質標品を用いた無細胞 IN 多量体化アッセイ系を確立した。宿主因子 Gemin2 存在下で IN 2 量体および 4 量体形成効率が顕著に増強されること、逆転写反応に致命的影響を及ぼす IN 変異により Gemin2 依存的な多量体化能が消失すること、などがわかった。

②間 (HIV ゲノムの核移行制御因子の構造機能解析) : 末梢血単核球から未熟樹状細胞 (DC) およびマクロファージを調製し、細胞内で Vpr が発現したときの細胞 RNA の発現変動を microarray analysis により網羅的に解析した。Vpr は、interferon 誘導遺伝子、および Ubiquitin 結合酵素の一つであ

る UBE2C 遺伝子の発現を制御することを見出した。

③岡本 (HIV ゲノムの転写制御因子の構造機能解析) : P-TEFb/CycT1 立体構造をもとに Tat 転写活性制御に関与するアミノ酸を推定し、その妥当性をシフェラーゼアッセイで検討した。CycT1 分子上で 46, 50, 56 番目のグルタミン残基 (Q46, Q50, Q56)、CycT176 番目のフェニルアラニン残基 (F176) が Tat の転写活性化に重要であることが判明した。

④岩谷 (HIV 感染制御因子とその解除因子の構造機能解析) : X 線結晶構造解析法により、APOBEC3C (A3C) 蛋白質の構造決定に成功した (PDB#:3VM8)。Structure-guided mutagenesis により、Vif への結合に関与するアミノ酸残基 (11 残基) を同定した。Vif 結合インターフェイスは負電荷に偏り、疎水性側鎖を中心とした“くぼみ”を形成していることがわかった。

⑤塩田 (HIV 感染抵抗性因子の構造機能解析) : ヒト TRIM5 α の多型 (Coiled-coil 領域と SPRY 領域の間のリンカー部分の一塩基多型により生じるアミノ酸置換 (A249D)) が抗 HIV-1 効果に及ぼす影響をウイルスの多段増殖ならびに single round infection 法により検討した。抗 HIV-1 効果は 249G の TRIM5 α のほうが 249D の TRIM5 α よりわずかに強いことが、両方アッセイ法で示された。

⑥村上 (HIV の感染御因子の構造機能解析) : HIV-1 Gag MA 蛋白質部分ペプチドの抗 HIV-1 活性を増強する方法を検討した。エンドソーム酸性化阻害剤クロロキンを 5 μ M 添加することで、細胞毒性に影響を与えずに抗 HIV-1 活性のみ数倍増強することに成功した。HIV-1 Gag CA 蛋白質部分ペプチドにも抗 HIV-1 活性があることを見出した (EC50 で数 μ M から数十 μ M)。

⑦梁 (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) : コムギ無細胞蛋白質合成法およびアルファスクリーン法等を用い、ウイルス複製を負に制御する候補宿主因子を網羅的に探索した。HIV-1 Vpu と相互作用する因子として SCYL2 を同定した。SCYL2 は Vpu の脱リン酸化を促進することで Vpu 機能を抑制し、宿

主防御因子 Tetherin の抗 HIV 活性を昂進させる補的因子として働きうることがわかった。

⑧本村 (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) : 454 を用いて、22 症例の血清試料から HIV-1 アクセサリー遺伝子 (Vpr, Vpu, Nef, Vif) の塩基配列情報を網羅的に取得した (約 4.6×10^8 塩基)。個体レベルでの配列多様性の情報を得た。得られた情報を元に、アミノ酸変異プロファイルを作成した。

⑨野間口 (HIV 宿主指向性、感染力、増殖能の決定因子の解析) : 遺伝子工学の手法を用いてサル指向性 HIV-1 プロトタイプの Gag CA と Vpu を改変し、既知の全ての抗 HIV-1 因子による抑制を回避する MN4/LSDQgtu の構築に成功した。HIV-1 IN-C 末端領域にはコドン配列依存的にウイルス産生量を制御し、複製に強く影響を及ぼすサイトがあることを見出した。

4. 考察

1) HIV 研究と計算科学

コンピュータを用いた分子解析技術の有用性を種々の共同研究で示した。第一に、実験データの分子・原子レベルの考察に有用である。第二に、予測を取り入れて効率的に実験を行える。今後も計算機科学と計算科学は急速に進展すると想定されている。その過程で、特に理論に基づく予測能力の進歩が見込まれる。将来は、他の研究分野と同様に、病原体研究においても、理論と実験を併用することで研究の効率や質の向上、あるいは新展開が見込まれる。その基盤を今から構築していくことは重要と考える。

2) HIV の構造、増殖、変異に関わる新知見の収集

特に以下の研究成果は、新規性や研究の基盤形成の観点から特筆できる。①APOBEC3 上の Vif の結合インターフェイスについて、実験による構造情報を世界で初めて示した。(岩谷)。②HIV-1 Vpu 蛋白質の翻訳後修飾を制御し、その抗 Tetherin 活性を変動させる宿主因子として SCYL2 を同定した (梁)。③HIV-2 Gag CA 蛋白質の 1 アミノ酸置換でヒト TRIM5 α 感受性を変動すること、ヒト

TRIM5 α の一塩基多型がヒトの HIV-1 感染感受性の変化に結びつく可能性があることを示唆した (塩田)。④宿主蛋白質 Gemin2 に HIV インテグラーゼの多量体化を促進する能力があることを示した (増田)。⑤Vpr が樹状突起細胞やマクロファージで発現した際に発現変動のおきる細胞遺伝子を複数特定した (間)。⑥抗 HIV 作用をもつ HIV-1 マトリックス部分ペプチド誘導体の創成に成功した (村上)。⑦HIV プロウイルスの転写制御に関する構造・機能の新知見を基に HIV 転写阻害剤の候補分子を設計した (岡本)。⑧ HIV-1 アクセサリー遺伝子の感染者体内での変異を包括的に解析するための大規模 HIV 配列リソースを得た (本村)。⑨既知の抗 HIV 因子を全て回避し、サル指向性が増強した HIV-1 の構築に成功した (野間口)。

5. 自己評価

1) 達成度について

研究計画に沿い概ね達成された。個体レベルの知見の情報収集は、最終年度に期待する。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

研究成果は、常時、第三者の査読を経てウイルス学分野等の欧文専門誌に掲載されている。本研究班の活動は、HIV に関わるウイルス学的新知見や新技術を広く国内外に発信・提供する情報プラットフォームとして機能している。

3) 今後の展望について

引き続き、HIV に関わるウイルス学情報を幅広く提供する。特に、HIV の増殖制御法やサルを用いた HIV 感染モデルの開発を進めるために有用な以下の情報の収集に力を入れる。①佐藤：コンピュータを用いて種々の HIV 増殖制御因子の構造特性を明らかにし、創薬や動物モデル開発の研究に資する。新たに、生体での重要な相互作用部位を推定する方法の研究を始める。②増田：HIV-1 IN の多量体化と逆転写促進活性の関連を立証し、IN の多量体化に関わる領域と構造特性を明らかにし、新たな逆転写阻害薬開発の基盤を作る。③塩田：HIV-1/2 のカプシドの構造特

性とウイルスのヒト TRIM5a 感受性の関連を検証するとともに、TRIM5a の構造機能相関に関する知見を集積することで、ヒト TRIM5a の抗 HIV-1 活性を増強する方法の開発基盤を作る。④岩谷：APOBEC3C 並びに他の APOBEC ファミリー蛋白質について、Vif との相互作用領域と構造特性を明らかにし、Vif/APOBEC 相互作用を阻止する方法の開発基盤を作る。⑤岡本：嫌気性細菌が HIV 感染・複製やエイズ発症の共役因子として働く可能性を検証すると共に、HIV Tat 阻害剤の開発を進める。⑥梁：これまでに構築した独自の相互作用解析系等を用いて新たな HIV 増殖制御因子を探索し、HIV 複製制御の標的候補の種類を拡充する。⑦間：マクロファージで発現し Vpr に結合する細胞因子を特定し、その因子が HIV-1 増殖制御に果たす役割を明らかにする。⑧村上：抗 HIV 活性をもつ HIV-1 Gag 蛋白質部分ペプチドを探索し、抗 HIV 作用のしくみを明らかにすると共に、それらのペプチドをプローブとして新たな HIV 増殖制御因子を探索する。⑨本村：454 で得た HIV-1 アクセサリー遺伝子の大規模配列情報を用いてア

ミノ酸変異のプロファイルを解析し、病態との関連を検証する。⑩野間口：サル細胞で未知の抗 HIV 因子もしくは増殖促進因子の存在が示唆されたのでこの因子の存在を検証し、創薬やサル感染モデルの開発基盤を作る。

6. 結論

新しい技術を取り入れながら、HIV の構造、増殖、変異に関する原子・分子・細胞レベルの新知見を幅広く収集し、成果を論文等で提供した。これにより、エイズの病原体に関する最新情報や最新技術を広く国内外に発信・提供する情報プラットフォームとしての役割を果たした。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

- 1) 特願 2009-158179 号 (Vpr タンパク質の検出方法及び検出用試薬) 発明者 間陽子、鈴木正昭、石井英樹、鈴木辰徳、松田剛。
- 2) 特願 2010-177176 (特許出願中)：岡本、朝光、鈴木、宮田。HIV 複製阻害剤。

研究発表

研究代表者

佐藤裕徳

- 1) Kamiyama H., Kubo Y., Sato H., Yamamoto N., Fukuda T., Ishibashi F., and Iwao M. Synthesis, structure-activity relationships, and mechanism of action of anti-HIV-1 lamellarin α 20-sulfate analogues. *Bioorg Med Chem.* Oct 20[Epub ahead of print], 2011.
- 2) Chutiwitoonchai N., Hiyoshi M., Mwimanzi P., Ueno T., Adachi A., Ode H., Sato H., Fackler O.T., Okada S., and Suzu S. The Identification of a Small Molecule Compound That Reduces HIV-1 Nef-Mediated Viral Infectivity Enhancement. *PLoS One.* 6:e27696, 2011.
- 3) Nishitsuji H., Yokoyama M., Sato H., Yamauchi S., and Takaku H. Identification of amino acid residues in HIV-1 reverse transcriptase that are critical for the proteolytic processing of Gag-Pol precursors. *FEBS Lett.* 585:3372-3377, 2011.
- 4) Miyamoto T., Yokoyama M., Shioda T., Sato H., and Nakayama E. A single amino acid of human immunodeficiency virus type 2 capsid protein affects conformation of two external loops and viral sensitivity to TRIM5 α . *PLoS One* 6:e22779, 2011.
- 5) Yoshii H., Kamiyama H., Goto K., Oishi K., Katunuma N., Tanaka Y., Hayashi H., Matsuyama T., Sato H., Yamamoto N., and Kubo Y. CD4-independent human immunodeficiency virus infection involves participation of endocytosis and cathepsin B. *PLoS One.* Apr 25;6:e19352, 2011.

- 6) Shibata J., Sugiura W., Ode H., Iwatani Y., Sato H., Tsang H., Matsuda M., Hasegawa N., Ren F., and Tanaka H. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *Antiviral Res.* 90:33-41, 2011.
- 7) Kobayashi T., Ode H., Yoshida T., Sato K., Gee P., Yamamoto S.P., Ebina H., Strebel K., Sato H., and Koyanagi Y. Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. *J. Virol.* 85:932-945, 2011.

研究分担者

間 陽子

- 1) Takeda E, Matsuda G, Murakami T, Zako T, Maeda M, Aida Y. Nuclear Exportin Receptor CAS Regulates the NPI-1-mediated Nuclear Import of HIV-1 Vpr, submitted in PLOS ONE, 6, 11, e27815, 2011.
- 2) Ishii H, Koyama H., Hagiwara K., Miura T., Xue G., Hashimoto Y., Kitahara G, Aida Y, Suzuki M: Synthesis and biological evaluation of hematoxylin derivatives as a novel class of anti-HIV-1 reagents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, in press, 2011

岩谷靖雅

- 1) Li, J., Hakata, Y., Takeda, E., Liu, Q., Iwatani, Y., Kozak, CA., and Miyazawa, M. Two genetic determinants acquired late in Mus evolution regulate the inclusion of exon5, which alters mouse APOBEC3 translation efficiency. *PLoS Pathogens*, *in production*, 2011.
- 2) Kitamura, S., Ode, H., and Iwatani, Y. Structural features of antiviral APOBEC3 proteins are linked to their functional activities. *Frontiers in Microbiology* 2:258, 2011.
- 3) Shibata, J., Sugiura, W., Ode, H., Iwatani, Y., Sato, H., Tsang, H., Matsuda, M., Hasegawa, N., Ren, F., and Tanaka, H. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *Antiviral Research* 90:33-41, 2011.
- 4) Fujisaki, S., Yokomaku, Y., Shiino, T., Koibuchi, T., Hattori, J., Ibe, S., Iwatani, Y., Iwamoto, A., Shirasaka, T., Hamaguchi, M., and Sugiura, W. Outbreak of infections by hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in patients coinfecting with HIV-1 in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 49:1017-1024, 2011.

塩田達雄

- 1) Ohishi, M., Nakano, T., Sakuragi, S., Shioda, T., Sano, K., and Sakuragi, JI. The relationship between HIV-1 genome RNA dimerization, virion maturation and infectivity. *Nucleic Acids Res.* 39(8):3404-17, 2011.
- 2) Miyamoto, T., Yokoyama, M., Kono, K., Shioda, T., Sato, H., and Nakayama, EE. A Single Amino Acid of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Capsid Protein Affects Conformation of Two External Loops and Viral Sensitivity to TRIM5alpha. *PLoS ONE* . 6(7): e22779, 2011.
- 3) Saito, A., Kono, K., Nomaguchi, M., Yasutomi, Y., Adachi, A., Shioda, T., Akari, H., and Nakayama, EE. Geographic, Genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *J Gen Virol.* Nov 23, 2011.

岡本尚

- 1) Tan Gana NH, Victoriano AF, Okamoto T. Evaluation of online miRNA resources for biomedical applications. *Genes Cells*. 2011. (in press)
- 2) Victoriano AF, Okamoto T. Transcriptional control of HIV replication by multiple modulators and their implication for a novel anti-viral therapy. *AIDS Res Hum Retrovir*. 2011. (in press)
- 3) Asamitsu K, Hibi Y, Imai K, Victoriano AF, Kurimoto E, Kato K, Okamoto T. Functional characterization of human cyclin T1 N-terminal region for human immunodeficiency virus-1 Tat transcriptional activation. *J Mol Biol*. 410:887-95. 2011.
- 4) Victoriano AF, Imai K, Togami H, Ueno T, Asamitsu K, Suzuki T, Miyata N, Ochiai K, Okamoto T. Novel histone deacetylase inhibitor NCH-51 activates latent HIV-1 gene expression. *FEBS Lett*. 585:1103-11. 2011.

野間口雅子

- 1) Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Adachi A. Macaque-tropic HIV-1 derivatives: a novel experimental approach to understand viral replication and evolution *in vivo*. *HIV-Host Interactions*, pp.325-348, 2011.
- 2) Adachi S, Adachi A, Nomaguchi M. Commentary on a new era of investigating 3D structure-based human-virus protein network dynamics. *Frontiers in Microbiology* 2: 186. doi:10.3389/fmicb.2011.00186, 2011.
- 3) Nomaguchi M, Fujita M, Adachi A. The fourth major restriction factor against HIV/SIV. *Frontiers in Microbiology* 2:132. doi: 10.3389/fmicb.2011.00132, 2011.
- 4) Saito, A., Kono, K., Nomaguchi, M., Yasutomi, Y., Adachi, A., Shioda, T., Akari, H., Nakayama, E.E. Geographic, Genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *J. Gen. Virol.* doi:10.1099/vir.0.038075-0 (Epub Nov 23, 2011)
- 5) Nomaguchi M, Adachi A. HIV-1 Vpr and G2 cell cycle arrest. *Future Microbiology* 6: 375-378, 2011.
- 6) Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., Nomaguchi, M. Rhesus M1.3S cells suitable for biological evaluation of macaque-tropic HIV/SIV clones. *Frontiers in Microbiology* 2: 115, 2011.

増田貴夫

- 1) Masuda, T. Non-Enzymatic Functions of Retroviral Integrase: The Next Target for Novel Anti-HIV Drug Development. *Frontiers in Microbiology* 2, 210, 2011.
- 2) Yamamoto S P, Okawa K, Nakano T, Sano K, Ogawa K, Masuda T, Morikawa Y, Koyanagi Y, and Suzuki Y. Huwe1, a novel cellular interactor of Gag-Pol through integrase binding, negatively influences HIV-1 infectivity. *Microbes and infection*. 13. 339-349: 2011.

村上 努

- 1) Narumi, T., M. Komoriya, C. Hashimoto, H. Wu, W. Nomura, S. Suzuki, T. Tanaka, J. Chiba, N. Yamamoto, T. Murakami, and H. Tamamura. Conjugation of cell-penetrating peptides leads to identification of anti-HIV peptides from matrix proteins. *Bioorg. Med. Chem.* In press.
- 2) Tanaka, T., T. Narumi, T. Ozaki, A. Sohma, N. Ohashi, C. Hashimoto, K. Itotani, W. Nomura, T.

- Murakami, N. Yamamoto, and H. Tamamura. Azamacrocyclic-metal complexes as CXCR4 antagonists. *Chem. Med. Chem.*, 6:834-839, 2011.
- 3) Yanagita, H., E. Urano, K. Mastumoto, R. Ichikawa, Y. Takaesu, M. Ogata, T. Murakami, H. Wu, J. Chiba, J. Komano, and T. Hoshino. Structural and biochemical study on the inhibitory activity of derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid for RNase H function of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorg. Med. Chem.* 19:816-825, 2011

本村和嗣

- 1) SahBandar I, Takahashi K, Motomura K, Djoerban Z, Firmansyah I, Kitamura K, Sato H, Pohan H.T, Sato S. The Indonesian variants of CRF33_01B: near-full length sequence analysis. *AIDS Res Hum Retroviruses.* ;27(1):97-102 ; 2011.

梁 明秀

- 1) 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.* 25:286(12):10051-7, 2011.
- 2) Yoshizaki S, Nishi M, Kondo A, Kojima Y, Yamamoto N, Ryo A. Vaccination with Human Induced Pluripotent Stem Cells Creates an Antigen-Specific Immune Response Against HIV-1 gp160. *Frontiers in Microbiology.* 2: 27, 2011.

和文

岩谷靖雅

- 1) 徳永 研三、足立 昭夫、高折 晃史、中山 英美、岩部 幸枝、岩谷 靖雅. HIV-1 感染阻害因子. *日本エイズ学会誌* 13:56-62, 2011
- 2) 岩谷 靖雅. 宿主防御因子 APOBEC3 ファミリーと抗レトロウイルス機序. *ウイルス* 61:61-72, 2011

岡本尚

- 1) 岡本 尚. HIV プロウイルスからの正および負の転写制御機構について. *ウイルス*. 61 : 81-90, 2011
- 2) 酒井 幸、岡本 尚. 創薬インフォマティクスの実際、*Nagoya Medical Journal*, 2011, in press

増田貴夫

- 1) 増田貴夫. HIV-1 ゲノム逆転写過程の新規制御機構. *ウイルス* 61 : 73-83, 2011.

II. 分担研究報告書

In silico 構造解析の HIV 複製研究への応用

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 の構造・増殖・変異の研究に役立つ新たな解析・情報基盤の構築を目的とする。変異がウイルス分子の構造や性質に与える影響を迅速に解析する手法として計算科学のシミュレーション技術に着目した。本年度は、コンピュータを用いて種々の分子モデルを構築し、本研究班で得られる変異や複製機構の情報を取り入れて、ウイルスの生物学的性質とその変化を支える構造要因を解析した。その結果、①Gag-pol 前駆体の切断効率、②テザリンの Vpu 感受性、③CA の Trim5 α 感受性、④PR と Gag の共進化、⑤RT による Gag-pol 前駆体プロセッシング調節、⑥Nef の 2c 親和性、などを司る構造が明らかになった。これらの解析を通じ、HIV の構造情報を迅速に収集し、本研究の推進に役立てる *in silico* 構造解析プラットフォームの構築が着実に進んだ。

A. 研究目的

計算機能力の向上や物理化学の諸原理に基づく計算科学の進展とともに、コンピュータを用いた分子モデリングやシミュレーション技術が急速に向上している。これらの *in silico* 技術を用いれば、実験では解析しにくい問題にアプローチできる。また、解析時間の短縮や効率の向上が見込まれる。シミュレーション技術は、既に、物理化学、地学、環境科学、工学、薬学、医学など、基礎から応用開発研究の幅広い分野において、研究を支援する汎用技術となっている。しかし、病原体研究への応用は遅れている。

そこで本研究では、分子モデリングやシミュレーション技術をウイルス学に応用する方法を研究する。主に本研究班で得られる変異や複製機構の情報を取り入れながら、ウイルスの生物学的性質とその変化を支える構造要因の情報を収集する。本年度は、蛋白質モデリングの代表的手法であるホモロジーモデリング法 (1, 2)、および蛋白質の水溶液中での動的性質を解析する分子動力学法 (3-5) の応用法について研究を進めた。

References

- (1) Baker D, Sali A., Protein structure prediction and structural genomics. *Science* 294: 93-96, 2001.
- (2) Sanchez R, et al., Protein structure modeling for

structural genomics. *Nat Struct Biol* 7 Suppl: 986-990, 2000.

- (3) Garcia-Viloca M, et al., How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations. *Science* 303: 186-195, 2004.

- (4) Karplus M, Kuriyan J. Molecular dynamics and protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 6679-6685, 2005.

- (5) Dodson GG, Lane DP, Verma CS. Molecular simulations of protein dynamics: new windows on mechanisms in biology. *EMBO Rep* 9: 144-150, 2008.

(倫理面への配慮)

該当する事項は無い。

B. 研究方法

1. ホモロジーモデリング

変異蛋白質の分子モデリングは、ホモロジーモデリング法 (1, 2) を用いた。ホモロジーモデリングは、Molecular Operating Environment (MOE) (6) (Chemical Computing Group Inc., Montreal, Quebec, Canada) に搭載されているプログラムを用いた。MOE はカナダ CCG 社が独自に開発した SVL

(Scientific Vector Language) を搭載する統合計算化学システムで、分子の構造・機能を統合的に解析するプラットフォームを提供する(6)。モデリングの鑄型には、"Protein

Data Bank (7)”に登録されている類似蛋白質の結晶構造を用いた。

2. 分子動力学解析

一般に、蛋白質とリガンドの結合には、結合ポケットのアミノ酸側鎖の“適切な揺らぎ”が重要となる。分子動力学解析により、実験では得ることの難しい蛋白質の水溶液中での揺らぎ等の動的性質の情報が得られる(3-5)。本研究では、Amber (8) に搭載された分子動力学計算ツールを用いて分子動力学解析を実施した。解析対象分子の初期構造(x線結晶構造やホモロジーモデル)の周辺に水分子を配置し、加速度を与えた後、1 atm, 310Kにおける全原子の運動を計算した。これにより、水溶液環境中の蛋白質の動態を追跡した。一般には、加速度を与えた後0-30ナノ秒の間の構造動態を計算した。構造が比較的安定する10-30ナノ秒の間の構造(60,000構造)を回収し、その間の平均構造、平均構造からの揺らぎ、分子表面でのアミノ酸側鎖間水素結合形成の頻度、などをAmberに搭載されたツールを用いて求めた。これらの解析を野生株と変異株の蛋白質について実施した。両者を比較することで、変異により蛋白質の相互作用表面の構造や動的特性がどのように変化したのかを明らかにした。

References

- (6) MOE. <http://www.chemcomp.com/>
(7) PDB: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
(8) Amber: <http://ambermd.org/>

C. 研究結果

1. ホモロジーモデリング

①HIV-1 プロテアーゼ (PR) と基質ペプチド複合体の構造解析、②HIV-1 RT p66/p51 ヘテロ二量体の構造解析、③HIV-1 Nef 蛋白質と小分子化合物 2c の複合体、についてホモロジーモデリングと結合シミュレーションを行った。その結果、①HIV-1 が薬剤耐性を獲得する過程で生じる PR と Gag の共進化、② RT による Gag-pol 前駆体プロセッシング調節、③Nef の活性阻害剤 2c の親和性、などを司る構造基盤が明らかになった。

2. 分子動力学解析

①HIV-1 Gag-pol 前駆体の7カ所の切断部位の構造解析: HIV-1 PR は、ウイルスの Gag 蛋白質前駆体の特定箇所を順序だてて切断する。*in silico* 立体構造解析と実験データを組み合わせることで、基質の切断効率を制御する基質自身の構造特性を特定した。ホモロジーモデリング法とレプリカ交換分子動力学法を用いて切断部位周辺の構造特性を明らかにし、プロテアーゼ結合効率および Gag 前駆体の切断効率と相関する構造特性が存在することを明らかにした。HIV-1 PR 活性阻害薬開発・改良の基盤情報が得られた。(研究協力者: 大出裕高[現: 国立病院機構名古屋医療センター])

②細胞の抗 HIV 蛋白質テザリンの膜貫通領域の構造解析: ヒト細胞タンパク質テザリンは、HIV 粒子の放出を阻害する抗 HIV 因子として知られる。HIV は、Vpu タンパク質の働きでテザリンの抗 HIV 活性を中和し、ヒト細胞で増殖できる。京大の小林らは、テザリンの Vpu 感受性を制御するアミノ酸として I34, L37, L41 の3種を同定した。この制御を司る構造要因を解析した。分子動力学法を用いてテザリン膜貫通部位の脂質二重層における構造モデルを構築した。I34, L37, L41 は、脂質中でヘリックス構造をとること、側鎖はヘリックスの同じ表面で脂質中に露出すること、さらに T45 の側鎖もこれらのアミノ酸と同一表面に配置すること、これら4種のアミノ酸が変異すると側鎖の配向が崩れることなどを見出した。これら4種のアミノ酸は Vpu との相互作用表面を形成する可能性が高い。この予測結果はさらなる変異導入解析で支持された。(研究協力者: 大出裕高、小林朋子、小柳義夫[京都大学ウイルス研究所])

③HIV のカプシド蛋白質 (CA) の溶液中に露出している N 末ドメインの構造解析: TRIM5 α は、HIV/SIV 感染の阻害活性をもつ細胞性抗ウイルス蛋白質で、ウイルスのカプシド蛋白質に作用する。阪大微研の塩田、中山らは、我々と共同で、HIV-2 のカニクイザル TRIM5 α 感受性は、カプシド L6/7 ループ内の1つのアミノ酸で制御されること、このアミノ酸(120番目のアミノ酸)の変化は感染者のウ

ウイルス量の変化と相関すること、カプシド六量体の表面に位置すること、などを見出した。TRIM5 α の結合表面に配置されると考えられる。この120番目のアミノ酸によるTRIM5 α 感受性制御を司る構造要因を解析した。ホモロジーモデリングにより、HIV-2 CAN末ドメイン120番目のアミノ酸を8種のアミノ酸に置換した点変異体モデルを構築し、分子動力学法を用いてカプシド表面の構造特性を調べた。その結果、L6/7ループに隣接するL4/5ループに、カニクイザルTRIM5 α 感受性HIV-2株に共通する構造を見出した。また、この共通構造、およびウイルスのTRIM5 α 感受性は、L4/5とL6/7, helix6の間の水素結合の強弱により調節されることがわかった。構造解析により見出されたこれらの結論は、さらなる変異導入解析により支持された。

D. 考察

初年度と本年度の研究で、計14種の分子(ペプチド、蛋白質単量体、蛋白質多量体など)のモデルをつくった。さらにこれらの分子から派生する多数の変異分子のモデルをつくった。構築した分子モデルは50種以上に達する。いずれも比較的高い相同性を持つ蛋白質の構造を鋳型として用いており、結晶構造とのずれは $\sim 2\text{\AA}$ 程度であることが期待される(1,2)。実験データを取り込みながら、構造比較、結合シミュレーション、分子動力学解析などを行うことで、ウイルスの生物学的性質や変化を支える構造要因を多数明らかにした。また、構造解析の結果に基づくウイルスの性質変化の予測は、変異導入解析等の実験データと高い一貫性を示した。計算科学のアプローチを取り入れて実験を進めることで、実験のみでは達成することの難しいスピードで、入手することの難しい構造情報を入手できることを立証した。

E. 結論

一連の研究成果と論文発表により、計算科学のシミュレーション技術は、変異がウイルス分子の構造や性質に与える影響を迅速に解析する手法として極めて有用であることを立証した。易変異性HIVのウイルス学的基盤

情報の効率的な収集に活用したい。

F. 知的所有権の取得状況 なし

G. 研究発表

(*in silico* 構造解析関連発表の抜粋)

1. 論文発表

Ode H, Yokoyama M, Kanda T, Sato H. Identification of folding preferences of cleavage junctions of HIV-1 precursor proteins for regulation of cleavability. *J. Mol. Model.*, 17(2):391-9, 2011.

Kobayashi T, Ode H, Yoshida T, Sato K, Gee P, Yamamoto SP, Ebina H, Strebel K, Sato H, Koyanagi Y. Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. *J. Virol.* 85:932-4, 2011.

Shibata J, Sugiura W, Ode H, Iwatani Y, Sato H, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F, Tanaka H. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *Antiviral Res.* 90(1):33-41, 2011.

Miyamoto T, Yokoyama M, Shioda T, Sato H, Nakayama E. A single amino acid of human immunodeficiency virus type 2 capsid protein affects conformation of two external loops and viral sensitivity to TRIM5 α . *PLoS One* 6(7):e22779, 2011.

Nishitsuji H, Yokoyama M, Sato H, Yamauchi S, Takaku H. Identification of amino acid residues in HIV-1 reverse transcriptase that are critical for the proteolytic processing of Gag-Pol precursors. *FEBS Lett.* 585(21):3372-7, 2011.

Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Mwimanzu P, Ueno T, Adachi A, Ode H, Sato H, Fackler OT, Okada S, Suzu S. The Identification of a Small Molecule Compound That Reduces HIV-1 Nef-Mediated Viral Infectivity Enhancement. *PLoS One.* 6(11):e27696, 2011.

Iijima S, Lee YJ, Ode H, Arold S, Kimura N, Yokoyama M, Sato H, Tanaka Y, Strebel K, Akari H. A non-canonical mu-1A-binding motif

in the N-terminus of HIV-1 Nef determines its activity to down-regulate MHC-I in T lymphocytes. *J Virol. in press*
Sakuragi J, Ode H, Sakuragi S, Shioda T, Sato H. *Nuc.Acids.Res.* A proposal for a new HIV-1 DLS structural model. *in press*

2. 学会発表等

Sato H, Motomura K, Ode H, Yokoyama M. 「分子認識・ネットワーク解析の新たなキーワードとしての分子共進化」日本蛋白質科学会 ワークショップ 6月7-9日、2011年、大阪.

佐藤裕徳. 病原性ウイルス研究と計算科学. MOEフォーラム 7月13日、2011年、東京.

松永智子、澤崎達也、小島良績、森下了、佐藤裕徳、大出裕高、古川亜矢子、片平正人、杉浦互、梁明秀：コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) プロテアーゼの解析. 日本プロテオーム学会2011年大会、7月28-29日、2011年、新潟.

櫻木淳一、大出裕高、櫻木小百合、塩田達雄、佐藤裕徳：HIV-1ゲノム二量体化シグナルの新規構造モデル. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会、2011年11月30-12月2日(水-金)、東京.

Sakuragii J, Ode H, i Sakuragi S, Shioda T, and Sato H. A proposal of new structural model of HIV-1 DLS. 8th International Retroviral NC Symposium, Sep 18-21. 2011, Barcelona, Spain.

Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, and Sato H. V3 region-regulated conformations of HIV-1 gp120 outer domain bring insights into structural mechanisms of immune evasion. **XV International Congress of Virology** (The IUMS 2011 Sapporo Congress, Virology). 11-16 September 2011, Sapporo.

Miyamoto T, Yokoyama M, Kono K, Shioda Sato H, and Nakayama EE. A single amino acid of human immunodeficiency virus type 2 capsid protein affects conformation of two external loops and viral sensitivity to TRIM5 α . **CAXV International Congress of Virology** (The IUMS 2011 Sapporo Congress, Virology). 11-16 September 2011, Sapporo.

Izumi T, Io K, Yokoyama M, Shinohara M, Shirakawa K, Matsui M, Uchiyama T, Sato H, Sindo K, and Takaori-kondo A Arginine at position 122 of APOBEC3G might be involved in interaction to Vif, but not to RNA required for encapsidation. **XV International Congress of Virology** (The IUMS 2011 Sapporo Congress, Virology). 11-16 September 2011, Sapporo.

HIV 感染抑制因子とその解除因子の構造機能解析
HIV-1 Vif が結合する APOBEC3 の相互作用部位(インターフェイス) の構造を解明

研究分担者 岩谷靖雅 ((独) 国立病院機構 名古屋医療センター 臨床研究センター)

研究要旨 宿主防御因子 APOBEC3(A3) を活用した抗 HIV-1 薬剤を開発などに情報を提供するため、A3 上の Vif の結合部位 (インターフェイス) の構造学的特徴を明らかにする研究に取り組んだ。APOBEC3 ファミリーのうち、HIV-1 Vif に結合し、かつ最も単純な構造 (シングルドメイン構造) をもつ APOBEC3C (A3C) を中心に研究を進めた。本年度 (3 年計画の 2 年目) は、X 線結晶構造解析法により A3C (完全長) タンパクの結晶構造を決定することに成功した。Vif の結合インターフェイスを保持する A3 の構造としては世界初である (論文投稿準備中)。決定した A3C の構造は、既報の Cytidine Deaminase と同様に 6 つの α helix と 5 つの β strand から形成され、酵素活性中心および核酸結合に寄与する基本構造は酷似していることが明らかになった。昨年度得られた研究成果 (A3C のモデル構造より決定した Vif 結合責任領域) を基に、結晶構造上の Vif 結合インターフェイスをさらに精査し、実構造上のインターフェイスを見出した。これらの結果は、A3 を活用した新規機序の薬剤開発に向けた基盤情報の一端を提供できる考えられる。

A. 研究目的

HIV 感染症に対する多剤併用療法 (HAART) の進歩によって、感染者の予後は大幅に改善されつつある。しかし、根治には至っておらず終生にわたって服薬の継続が求められている。そのため治療の長期化により深刻化することが想定される、薬剤耐性ウイルスの出現や治療薬による副作用の問題を克服しなければならない。そのためには、少なくとも基礎研究レベルでは既存の薬に満足することなく、不断な薬剤開発は必要不可欠である。

本分担研究課題では、新規作用機序による抗 HIV 治療薬の開発に繋がるタンパク相互作用のインターフェイスの探索とその構造情報の創出を目的とし、APOBEC3(A3)タンパク上の Vif 結合インターフェイスの構造解析に焦点を当てた。

B. 研究方法

A3C が唯一、Vif に結合し、かつ最も単純な構造 (単量体 CTD 構造) をもつことから、A3C に着目している

(1) A3C タンパクの構造決定

N 末端に GST タグを付加した GST-A3C タンパクとして大腸菌で発現した。GST タグ

を切断し、A3C のみを精製・分画 (98%以上) した。精製した A3C タンパクを濃縮 (約 10 mg/ml) 後、結晶構造解析用の緩衝液に置換した。Hanging-Drop 蒸気拡散法により、A3C タンパクの結晶化条件を検討した。結晶化したタンパクの回折データを収集した。得られたデータから、既報の A3G 191-384-2K3A の X 線結晶構造 (PDB#3IR2) を基にした分子置換法により、A3C タンパクの結晶構造を決定した。

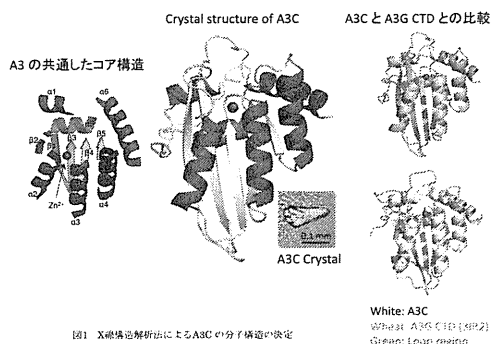
(2) A3C の Vif 結合領域の検索

A3C 発現プラスミドに変異導入し、HIV-1 Vif に対する感受性 (細胞内分解性) について検討し、Vif の結合に重要なアミノ酸残基を検索した。コンピュータ上で構築した A3C モデル構造を基に行った方法を同様な手法 (昨年度報告) を用いた。A3C のタンパク表面上に存在するアミノ酸残基を検索した。構造情報を基に、変異体作製と Vif 感受性実験を繰り返し試行 (いわゆる、Structure-guided Mutagenesis) することにより、A3C の Vif 感受性に影響を及ぼすアミノ酸残基を同定した。

C. 研究結果

(1) A3C タンパク構造の決定

多くの核酸結合タンパクと同様に、A3C タンパクは非常に難溶性であるため、濃縮過程において沈殿が頻繁におこり、タンパクの精製および結晶化の試行錯誤に多大な時間を費やした。結果的に、A3C タンパクの結晶化に成功し、タンパクの構造決定を行うことができた。A3C の構造 (図 1) は、既報 (A3G CTD; *Nature* 452, 116- (2008), *Structure* 18, 28- (2010), *Nature* 456, 121- (2008), *EMBO J.* 28, 440- (2009), A2; *Nature* 445, 447- (2007)) の Cytidine Deaminase と同様に 6 つの α helix と 5 つの β strand から構成されるコア構造 (図 1) が存在し、酷似していた。酵素活性中心および核酸結合に寄与するアミノ酸残基のポジションは保存されていた。しかし、ループ領域の構造は既報のものとは異なっており、A3C の機能の特異性を決定することに関連することが示唆された。さらに、 $\beta 2$ 領域は、既報の A3G 191-384-2K3A の X 線結晶構造 (PDB #3IR2) とは異なり、安定した β strand 構造をとることが示された。決定した A3C の結晶構造は Protein Data Bank に登録された (PDB #3VM8)。



(2) A3C の結晶構造を利用した A3C 上のインターフェイス検索

昨年度報告した A3C のモデル構造より見出した HIV-1 Vif のインターフェイスに関して、結晶構造に置き換え、そのインターフェイスを再度精査した。*in silico* で構築したモデル構造と実構造との間に、差異が生じていたため、E106 の 1 アミノ酸残基を起点に Structure-guided Mutagenesis を再試行した。その結果、E106 残基を含む 10 残基をインターフェイスとして同定された (図 2)。さらに、プルダウン法により、これらの残基

の変異体が実際に Vif への結合能が低下したのか調べた。その結果、10 残基すべて、Vif への結合に重要であることが明らかになった。ウイルス粒子への取込みに対する影響も調べた結果、各残基の変異はウイルス粒子への取込みに大きな影響を与えないことが分かった。A3 ファミリーのウイルス粒子への取込みは A3 の核酸結合能に相関することから、変異導入によって A3C の核酸結合能に有意な影響が無かったことが示唆された。

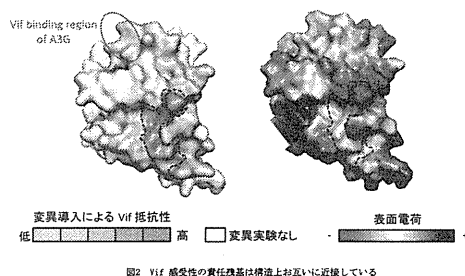


図2 Vif 感受性の責任残基は構造上お互いに近接している

(3) A3F の Vif インターフェイス

A3F は、A3G 同様、HIV-1 感染においては重要な細胞因子であることが知られている。A3C と A3F (2nd CTD) は、アミノ酸配列で約 80% の相同性を示す。一方、A3F と A3DE は、相同性が高い (CTD で 88%)。さらに、Vif 側の A3C/F/DE の結合に関与するアミノ酸残基が同じであるということから、A3C の結果を基に A3F と A3DE の Vif インターフェイスについて解析した。まず、A3C の結晶構造より、A3F および A3DE のモデル構造を構築した (図 3)。A3C で同定した 10 残基に相当する A3F/A3DE の変異体を作製し、Vif 感受性を調べた。その結果、A3F/DE においても 10 残基が重要であり、プルダウン法により Vif の結合に重要であることが明らかになった。以上のことから、同定した 10 残基が HIV-1 Vif のインターフェイスを形成していることが示唆された。さらに、これらの A3F 変異体は、野生型 HIV-1 と *vif* 欠損 HIV-1 に対して同等な抗ウイルス効果を示した。さらに、興味深いことに、A3F のモデル構造上、Vif 結合領域は、A3C のインターフェイスと酷似していた。