

図3 A3C の Vif 感受性に関与する残基は、A3F と A3DE においても同等である

D. 考察

A3C の X 線構造解析 (実構造) と実際の生化学実験を駆使して、A3C の HIV-1 Vif の結合領域 (インターフェイス) を見出すことに成功した。その結果、インターフェイスの構造学的特徴は、1) 浅いくぼみ形成している、2) 負電荷あるいは疎水性アミノ酸で構成されている、3) A3G の HIV-1 Vif 結合領域として $\beta 4$ - $\alpha 4$ 領域 (¹²⁸DPD¹³⁰) 近傍が想定されているが、A3C のインターフェイスは $\beta 4$ - $\alpha 4$ 領域から遠位である、ということが明らかになった。さらに、このインターフェイスは A3F/A3DE においても酷似していることが分かり、A3 の Z2 タイプドメイン構造に共通したものである可能性が考えられる。HIV-1 Vif 側の責任残基が正電荷あるいは疎水性で構成されていることから、A3C のインターフェイスの特徴と整合性があると言える。

今回同定したアミノ酸残基同定法では、側鎖の変換によって Vif への結合を判定しているため、インターフェイス近辺のペプチド鎖のバックボーンも Vif の結合に関与している可能性を調べることができない。そのため、同定した 10 残基は Vif のインターフェイスを構成しているが全てではないという可能性を考慮しなければならない。

構造上、同定したインターフェイスがくぼみを形成していることから、新たな阻害剤開発の可能性が生まれた。つまり、くぼみに特異的に結合する低分子化合物をデザインし、A3C や A3F、A3DE が Vif と結合することを阻害する化合物を見出すことにより、HIV 感染細胞内で Vif によって宿主防御因子である A3F/C/DE の分解を抑制する化合物を探索する。このような研究を通して、A3 の本来の防御機構を利用して HIV の増殖を抑制するという新規な機序の治療薬開発の道が開ける可能性があると考え

えられる。

E. 結論

X 線結晶構造解析法により A3C タンパク構造を決定することに成功した。そして、その構造結果を基に、Structure-Guided Mutagenesis を行うことにより、HIV-1 Vif に対する感受性に影響を及ぼすアミノ酸 (10 残基) を同定した。構造上、これらの残基は近接し、くぼみを形成していることが判明し、HIV-1 Vif のインターフェイスであることが考えられる。さらに、このインターフェイスは A3F/DE においても保存されていることが明らかになった。これらの結果を基に、くぼみに特異的に結合する化合物を見出し、A3C/F/DE・Vif の結合を阻害する新規機序の薬剤開発に新たな可能性を提示することができた。

F. 知的所有権の取得状況

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (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 8:e1002478.
- (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.

(5) 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

(6) 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

2. 学会発表等

国内発表

(1) 岩谷靖雅、北村紳悟、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、杉浦互：HIV-1 NC は逆転写開始反応を促進する。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

(2) 北村紳悟、中島雅晶、大出裕高、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、渡邊信久、鈴木淳巨、杉浦互、岩谷靖雅：HIV-1 Vif 感受性に関する APOBEC3C/F のアミノ酸残基の同定。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

(3) 伊部史朗、近藤真規子、今村淳治、岩谷靖雅、横幕能行、杉浦互：ウェスタンブロット法により HIV-1/HIV-2 重感染が疑われた症例の精査解析。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

(4) 今村淳治、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、杉浦互：薬剤耐性変異を認めた新規未治療 HIV/AIDS 症例の治療と予後の検討。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

(5) 横幕能行、鬼頭優美子、今村淳治、大出裕高、服部純子、伊部史朗、岩谷靖雅、杉浦互：HIV プロテアーゼ表現型検査法である VLP ELISA 法の実臨床への応用。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月

(6) 北村紳悟、中島雅晶、大出裕高、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、渡邊信久、鈴木淳巨、杉浦互、岩谷靖雅：Structure-Guided Mutagenesis を用いた APOBEC3C/F の HIV-1 Vif 感受性に関するアミノ酸残基の同定。第 34 回日本エイズ学会・年会、横浜、

2011 年 12 月

(7) 松岡 和弘、正岡 崇志、田邊 史子、森下了、澤崎 達也、岩谷 靖雅⁴、杉浦 互：Development of in vitro enzymatic method for assessing susceptibility to HIV-1 reverse transcriptase inhibitors using a wheat-germ cell-free translation system。第 34 回日本エイズ学会・年会、横浜、2011 年 12 月

(8) Yasumasa Iwatani, Shingo Kitamura, Masaaki Nakashima, Hiroataka Ode, Akatsuki Saito, Shiro Ibe, Yoshiyuki Yokomaku, Wataru Sugiura: HIV-1 NC Facilitates Formation of Efficient Initiation Complex for Reverse Transcription, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Sep. 2011

(9) Shingo Kitamura, Masaaki Nakashima, Hirohide Ode, Akatsuki Saito, Hiroaki Yoshii, Yoshiyuki Yokomaku, Wataru Sugiura, Yasumasa Iwatani: Identification of Critical Residues in APOBEC3C/F for HIV-1 Vif-mediated degradation, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Sep. 2011

(10) Junko Hattori, Urara Shigemi, Masumi Hosaka, Reiko Okazaki, Yasumasa Iwatani, Yoshiyuki Yokomaku, Wataru Sugiura: Characteristics of drug-resistant HIV-1 transmission, Analysis of drug resistance in recently and not-recently infected treatment naïve patients in Japan, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Sep. 2011

(11) Shiro Ibe, Takashi Masaoka, Yoshiyuki Yokomaku, Yasumasa Iwatani, Wataru Sugiura: Identification of novel drug-resistance mutations selected during abacavir+Lamivudine+Lopinavir/R therapy in HIV-2 CRF01_AB infection, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Sep. 2011

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 教授）

研究要旨 ヒト TRIM5 α の 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 249 番目のアミノ酸のグリシン (G) からアスパラギン酸 (D) への変異が抗 HIV-1 効果に及ぼす影響を検討した。249D のアレル頻度は欧米人では 5%ほどだが、日本人では 40% を超えることがデータベース検索から判明した。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、多段増殖実験ならびに感染初期過程のみを検出する実験の両方で示された。日本人およびインド人において、249D のアレル頻度を HIV-1 感染者と非感染者で比較したところ、感染者における D のアレル頻度が有意に高いことから、この多型による抗 HIV-1 効果の減弱が個体の HIV-1 感染成立にも影響した可能性が示唆された。二次構造予測を行ったところ、G249D 変異により Coiled-coil 領域の α -ヘリックスがリンカー部分まで延長するとの結果が得られた。従って、249D を持つヒト TRIM5 α は、249G のものよりもリンカー部分の可塑性が失われるために、ウイルスカプシドの認識力が減弱している可能性が考えられる。

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。アカゲザル、カニクイザルの TRIM5 α は強い抗 HIV-1 作用を示すが、ヒトの TRIM5 α の抗 HIV-1 作用は強くなく、その結果としてヒトでの HIV-1 感染は拡大を続けている。また、エイズの病態ならびに進行速度は感染者ごとに大きく異なり、感染後急激に CD4 陽性細胞数の減少をみる感染者から 10 年以上発症しない感染者まで様々である。HIV-1 感染感受性自体にも個人差が存在する。本研究は、HIV-1 感染に高い感受性を示すヒト株化 T 細胞 MT4 に認められた一塩基多型の抗 HIV-1 効果に及ぼす影響を検討することを目的とした。この多型は、ヒト TRIM5 α の Coiled-coil 領域と SPRY 領域の間のリンカー部分の 249 番目のアミノ酸のグリシン (G) をアスパラギン酸 (D) に置換するものである (rs11038628)。

B. 研究方法

1. ヒト TRIM5 α の抗 HIV 作用の検討

株化 T 細胞 MT4 にヒト TRIM5 α 、MT4 から得た 249 番目に D を持つ TRIM5 α 及び PRYSPRY 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-1 NL43 株ならびに HIV-2 GH123 株を感染させた。HIV 感染 1、3、6 日後の培養上清中のカプシド抗原量を ELISA にて測定した。

感染初期過程のみの進行を定量するために、CMV プロモーターにより GFP を発現する HIV-1 ベクターを水疱性口内炎ウイルスの G タンパク質を用いて、TRIM5 α あるいは 249 番目に D を持つ TRIM5 α を強制発現させた内在性 TRIM5 α の発現のないハムスター細胞 TK-TS13 に導入して、フローサイトメーターで GFP 発現細胞数を測定した。

2. ヒト TRIM5 α の遺伝子多型解析

日本人 HIV-1 感染者 93 名、非感染者 279 名、インド人 HIV-1 感染者 227 名、非感染者 280 名について、249 番目のアミノ酸を含む TRIM5 遺伝子の第 5 エクソン全長を PCR で増幅し、その塩基配列を決定した。日本人 HIV-1 感染者は非加熱血液製剤で HIV-1 に感染した血友病患者であるが、インド人 HIV-1 感染者は、性的接触によって HIV-1 に感染した。

(倫理面への配慮)

HIV-1 感染者ならびに非感染者の検体を使用するにあたって、検体の提供者には遺伝子

解析を行うことを含めて十分に説明を行い、書面による同意を得られた場合のみを解析の対象とし、検体は匿名化して個人情報特定できないようにして扱った。HIV-1感染者の遺伝子解析は平成13年に大阪大学研究倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. ヒト TRIM5 α の抗 HIV 作用

センダイウイルスベクターによりヒト TRIM5 α を強制発現させた MT4 細胞では、HIV-1 NL43 株の増殖は、感染後 3 日目、6 日目とも、PRYSPRY 領域を欠いた TRIM5 α を発現させた場合と比較して約 10 分の 1 に低下していた。一方、249 番目に D を持つ TRIM5 α を強制発現させた場合では、増殖阻害効果は殆ど観察されなかった。GFP 発現ベクターを用いて、感染初期過程の進行のみを定量した場合でも同様の結果が得られ、249 番目のアミノ酸が G から D に変異することにより、ヒト TRIM5 α の抗 HIV 作用が殆ど失われることが明らかになった。なお、249 番目のアミノ酸が G から D に変異することによる TRIM5 α の発現量への影響は観察されなかった。

一方、HIV-2 GH123 株の増殖は、ヒト TRIM5 α の強制発現により、HIV-1 よりも強く阻害され、249 番目のアミノ酸が G から D に変異することにより阻害作用はやはり低下したものの、PRYSPRY 領域を欠いた TRIM5 α を発現させた場合と比較すると、HIV-2 の増殖はまだ約 20 分の 1 程度に低下していた。

2. ヒト TRIM5 α の遺伝子多型解析

249 番目のアミノ酸が G から D に置換する頻度は、ヨーロッパ人では 5%ほどだが、日本人では 40%以上にもものぼる。MT4 は日本人ドナーより得られた株化 T 細胞で、249 番目のアミノ酸が G から D に置換する一塩基多型を両方の染色体に持つ。この多型が HIV-1 感染感受性に及ぼす影響を検討する目的で、日本人 HIV-1 感染者 93 名、非感染者 279 名、インド人 HIV-1 感染者 227 名、非感染者 280 名について、249 番目のアミノ酸が G から D に置換する多型の頻度を検討した。その結果、非加熱血液製剤にて感染した日本人 HIV-1 感染者においてはこの多型の頻度は 45%、非感染者においては 40%であり、統計学的有意差には至らないものの ($P=0.302$)、HIV-1 感染

者にこの多型が濃縮される傾向が認められた。一方、性的接触によって感染したインド人感染者では 15%、非感染者では 11%で、統計学的有意差 ($P=0.026$) を持って感染者にこの多型が濃縮することが明らかになった。

以上の結果から、この多型による抗 HIV-1 効果の減弱が個体の HIV-1 感染成立にも影響した可能性が示唆された。

D. 考察

249 番目のアミノ酸が G から D に置換することにより、ヒト TRIM5 α の抗 HIV-1 作用ならびに抗 HIV-2 作用が減弱することが明らかになった。特にこの多型により抗 HIV-1 作用は殆ど消失した。HIV-1 感染者、非感染者におけるこの多型の頻度を検討したところ、日本人、インド人とも、弱いながらも HIV-1 感染者においてこの多型の濃縮する傾向が観察され、この多型が個体の HIV-1 感染成立にも影響した可能性が示唆された。

この多型はヒト TRIM5 α の Coiled-coil 領域と SPRY 領域の間のリンカー部分に位置する。この多型がヒト TRIM5 α の抗 HIV 作用を減弱させる理由は不明であるが、二次構造予測を行ったところ、249 番目のアミノ酸が G から D に変異することにより Coiled-coil 領域の α -ヘリックスがリンカー部分まで延長するとの結果が得られた。従って、249 番目に D を持つヒト TRIM5 α は、249 番目に G を持つものよりもリンカー部分の可塑性が失われるために、ウイルスカプシドの認識力が減弱している可能性が考えられる。

HIV-1 感染者でのこの多型の濃縮が、インド人感染者では有意であったが、日本人感染者では有意ではなかった。これは、人種差よりも感染経路の違いが影響した可能性がある。インド人感染者は性的接触で感染し、日本人感染者は非加熱血液製剤で感染したが、HIV が直接血液中に入る非加熱血液製剤感染の方が、様々な物理的バリアーを超えて感染する性的接触よりも TRIM5 α の遺伝子多型による感染感受性の小さい変化に影響を受けにくいと考えられる。

E. 結論

ヒト TRIM5 α の 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 249 番目のアミノ酸のグリシン (G) からアスパラギン酸 (D) への変異が抗 HIV-1 効果に及ぼす影響を検討した。この多型によりヒト TRIM5 α の抗 HIV 作用が明らかに減弱し、HIV-1 感染者にはこの多型の濃縮が認められた。従って、この多型が個体の HIV-1 感染成立にも影響した可能性が示唆された。

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) 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 TRIM5 α . *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.* 93:594-602, 2012.

2. 学会発表等

(1) 塩田達雄. Genetic polymorphisms of TRIM5 gene in human and macaques. 第12回熊本エイズセミナー・グローバルCOE合同国際シンポジウム, Oct 19, 2011, 熊本

(2) 中山英美, Likanonsakul, S., Rattanatham, T., Feangvad, S., Uttayamakul, S., Prasithsirikul, W., Tarkowski, M., Riva, A., and 塩田達雄. 抗レトロウイルス療法副作用の発症に関わる宿主因子. 第25回エイズ学会学術集会・総会, 2011年, 東京.

(3) 齋藤暁、河野健、中山英美、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、塩田達雄、

明里宏文. サル指向性HIV-1への感受性に影響を与えるマカクサルTRIM5遺伝子の多様性. 第25回エイズ学会学術集会・総会, 2011年, 東京.

(4) 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回エイズ学会学術集会・総会, 2011年, 東京.

(5) Saito, A., Nomaguchi, M., Kono, K., Nakayama, EE., Shioda, T., Yoshida, T., Yasutomi, Y., Matano, T., Adachi, A., Akari, H. GENOTYPIC VARIATION OF CYNOMOLGUS MONKEY TRIM5ALPHA DETERMINES THE SUSCEPTIBILITY TO MONKEY-TROPIC HIV-1 INFECTION. 第59回日本ウイルス学会学術集会 (International Congress of Virology), 2011年, 札幌.

(6) Miyamoto, T., Yokoyama, M., Kono, K., Shioda, T., Sato, H., 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 . 第59回日本ウイルス学会学術集会 (International Congress of Virology), 2011年, 札幌.

(7) Kono, K., Kuroishi, A., Nakayama, EE., Hulme, AE., Hope, TJ., Shioda, T. SIMIAN-TROPIC HIV-1 NL-4/5S6/7SVIFS SHOWS SLOWER CAPSID UNCOATING IN HUMAN CELLS. 第59回日本ウイルス学会学術集会 (International Congress of Virology), 2011年, 札幌.

(8) Sakuragi, JI., Sakuragi, S., Shioda T. SL1 REVISITED: FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE STRUCTURE AND CONFORMATION OF HIV-1 GENOME RNA. 第59回日本ウイルス学会学術集会 (International Congress of Virology), 2011年, 札幌.

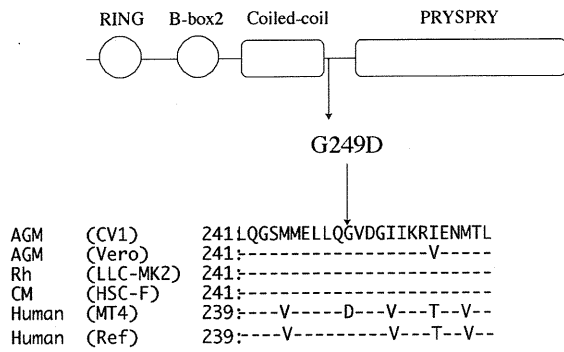


図1. ヒト TRIM5 α の249番目のアミノ酸をグリシン(G)からアスパラギン酸(D)に置換する遺伝子多型。

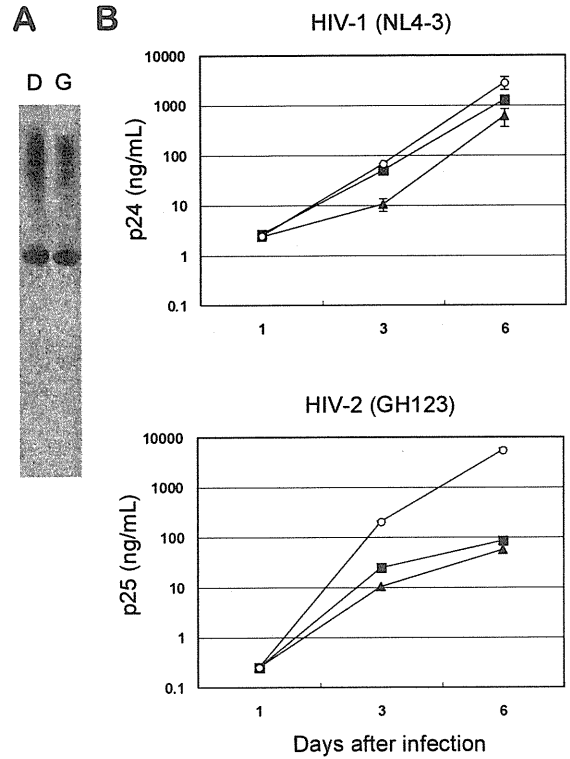


図2. A:249番目がグリシン(G)のヒト TRIM5 α とアスパラギン酸(D)のヒト TRIM5 α の発現。B: ヒト TRIM5 α の249番目のアミノ酸多型の抗HIV作用への影響。白丸はPRYSPRY領域を欠く TRIM5 α 、黒三角はGの TRIM5 α 、黒四角はDの TRIM5 α を強制発現させた MT4細胞における HIV-1あるいは HIV-2の増殖を示す。

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 感染制御因子の構造機能解析

分担研究者：村上 努（国立感染症研究所 エイズ研究センター）

共同研究者：鳴海哲夫、野村 渉、玉村啓和（東京医科歯科大学 生体材料工学研究所）

研究要旨：ペプチド化学的手法による HIV-1 CA 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する準備段階として行ってきた MA 部分ペプチドの細胞内導入実験において Octa-Arg を付加した細胞内導入可能な MA 部分ペプチドの一部は、 EC_{50} =数 μ M で X4、R5 の両方のタイプの HIV-1 の複製を阻害することを明らかにした。さらに蛍光標識した MA 部分ペプチドを用いて Octa-Arg 付加によって実際に細胞内に取込まれていることも示すことができた。しかしながら、導入したペプチドの細胞内エンドソームからの脱出効率が悪いため、細部毒性と抗 HIV-1 活性の濃度に十分な差異を出すことができないという問題が残っていた。この課題に対しては、細胞にエンドソーム酸性化阻害剤クロロキンを 5μ M 添加することによって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。

A. 研究目的

本研究の最終目的は、HIV-1 CA 部分ペプチドライブラリーの抗 HIV-1 活性を指標としたスクリーニングと部分ペプチドと相互作用する宿主因子の探索・同定である。今年度は、CA 部分ペプチドの細胞内導入の予備的研究として、MA 部分ペプチドの細胞内導入による抗 HIV-1 活性試験を行った。また、ペプチドの細胞内エンドソームからの脱出効率の向上を図る実験方法の検討も行った。

B. 研究方法

(1) MA 部分ペプチド（東京医科歯科大玉村啓和先生合成）：MA の N 末より 15 残基ずつ 5 残基ずつオーバーラップさせて合成した。Octa-Arg を C 末に付与した細胞膜透過性ペプチドと付与しないコントロールペプチドのセットを調製した（図 1）。

(2) 抗 HIV-1 活性測定：標的細胞 MT-4 と X4 HIV-1 である NL4-3 の感染系もしく

は、標的細胞 PM1/CCR5 と R5HIV-1 である NL(AD8)または JR-CSF の感染系で行った。

(3) 蛍光標識 MA 部分ペプチドの細胞内導入を確認する実験：glass-bottom dish 上に培養した HeLa(または A549、CHO-K1)細胞を 5μ M の蛍光標識 MA 部分ペプチドと 37°C 、5 min.反応させたのち HBSS で洗浄した。観察と記録は、Zeiss LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

(4) クロロキンによるペプチドの細胞内エンドソームからの脱出効率の向上の可否を検討する実験：エンドソーム酸性化阻害剤であるクロロキンを上述の抗 HIV-1 活性測定実験系に $2.5\text{--}10 \mu$ M 添加し、MA 部分ペプチドの抗 HIV-1 活性および細胞毒性に及ぼす影響を検討した。

（倫理面での配慮）

該当事項なし

C. 研究結果

(1) コントロールペプチドの抗 HIV-1 活性：2C、6C と 9C で抗 HIV-1 活性が認められた。9C は X4, R5 に対してほぼ同程度の抗 HIV-1 活性を示したが、6C では X4 と比較して R5 に対する活性が弱く、2C では逆に R5 と比較して X4 に対する活性が弱かった (表 1)。

(2) 膜透過型ペプチドの抗 HIV-1 活性：Octa-Arg を付加した細胞膜透過性ペプチドの多くは EC₅₀ で数 μM から数十 μM の範囲で X4、また大部分の場合 R5 の HIV-1 複製を阻害した。中でも、8L, 9L は細胞毒性も強かったが、抗 HIV-1 活性の EC₅₀ は X4, R5 に対してともに数 μM と強い活性を示した (表 2)。

(3) 蛍光標識 MA 部分ペプチドの細胞内導入を確認する実験：

抗 HIV-1 活性を示した 8L とほとんど示さなかった 14L に蛍光色素 carboxyfluorescein を GABA をリンカーにして MA ペプチドの N 末側に連結したものを (それぞれ、8F-L、14F-L と命名) を HeLa (または A549、CHO-K1) 細胞とインキュベートした結果、いずれの細胞においても 8F-L (図 2) と 14F-L (データ省略) の細胞内への取込みが観察された。

(4) クロロキンによるペプチドの細胞内エンドソームからの脱出効率の向上の可否を検討する実験：クロロキンを抗 HIV-1 活性測定実験系に 2.5-10 μM 添加し、MA 部分ペプチドの抗 HIV-1 活性および細胞毒性に及ぼす影響を検討した結果、5 μM のクロロキン添加によって細胞毒性にほとんど影響を与えずに抗 HIV-1 活性のみ数倍増強することが判明した (データ省略)。

D. 考察

今回の抗 HIV-1 試験で比較的強い抗ウイルス活性を示した 8L, 9L は MA の helix 4 に存在しており (図 3B)、その立体構造上の位置から MA 三量体同士が相互作用して六量体を形成するときに関与すると考えられているインターフェイスの一部に

相当する (図 3C)。8L, 9L の抗 HIV-1 活性の作用機序がこの構造から推定されるものであるかどうかは今後の検討課題の一つである。

E. 結論

(1) MA の部分ペプチドに細胞膜透過性を付与することにより、HIV-1 の複製を阻害できることを明らかにした。

(2) 細胞にエンドソーム酸性化阻害剤クロロキンを 5 μM 添加することによって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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yanagita, H., E. Urano, K. Mastumoto, R. Ichikawa, Y. Takaesu, M. Ogata, T. Murakami, H. Wu, J. Chiba, J. Komano, and T. Hosino. 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.

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) Narumi, T., N., 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. 学会発表

1) Murakami T., H. Wu, M. Kawamata, J. Chiba, and T. Takemura. Role of Rab11a in HIV-1 assembly. The 2011 Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor, USA, 2011.

2) Takemura T., M. Kawamata, and T. Murakami. Selection and characterization of the mutant HIV-1 that can replicate without cypa in the cypa-dependent jurkat cell. The 2011 Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor, USA, 2011.

3) Murakami T., H. Wu, M. Kawamata, J. Chiba, and T. Takemura. Role of Rab11a in Virus Assembly of HIV-1. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 2011.

4) Takemura T., M. Kawamata, and T. Murakami. Selection and Sequencing Analysis of the Mutant HIV-1 that can Replicate without Cypa in Jurkat Cell. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 2011.

5) 竹村太地郎、川又美弥子、村上 努。サイクロフィリン A 非依存的に増殖可能な新規 HIV-1 変異株の解析 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月 30-12 月 2 日

6) 橋本智恵、鳴海哲夫、野村 歩、村上 努、山本直樹、玉村啓和。HIV-1 第二受容体 CXCR4 の細胞外ドメインを基にしたエイズワクチンの開発研究 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月 30-12 月 2 日

7) 呉 鴻規、竹村太地郎、川又美弥子、千葉 丈、村上 努。HIV-1 粒子形成過程における Rab11a 蛋白質の機能解析 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月 30-12 月 2 日

8) 柳田浩志、横田瑞穂、尾瀧将一、浦野恵美子、市川玲子、村上 努、駒野 淳、星野忠次。HIV-1 逆転写酵素 RNase H 活性阻害剤の開発 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2011 年 11 月 30-12 月 2 日

9) Murakami, T., H. Wu, M. Kawamata, K. Hayashi, J. Chiba, and T. Takemura. Functional analysis of Rab11a in HIV-1 Replication 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月 13 日-16 日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当事項なし。

図1. オーバーラッピングMAペプチドライブラリーの構築

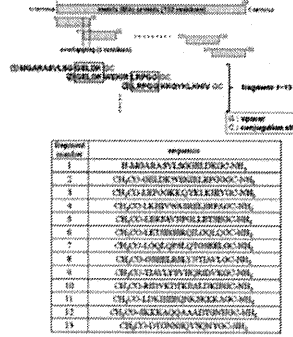


表1. コントロールMAペプチドの抗HIV-1活性

Table 1. HIV-1 activity and infectivity of control MA peptides.

| MA peptide | 5T4-4 cell 50% ^a (IC ₅₀) | PM1L2/MA cell 50% ^a (IC ₅₀) | PM1L2/MA cell 50% ^a (IC ₅₀) | 5T4-4 cell 50% ^a (IC ₅₀) |
|------------|--|---|---|--|
| 11 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 12 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 13 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 14 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 15 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 16 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 17 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 18 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 19 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 20 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 21 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 22 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 23 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 24 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 25 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 26 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 27 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 28 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 29 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 30 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 31 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 32 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 33 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 34 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 35 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 36 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 37 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 38 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 39 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 40 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 41 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 42 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 43 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 44 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 45 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 46 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 47 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 48 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 49 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 50 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 51 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 52 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 53 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 54 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 55 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 56 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 57 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 58 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 59 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 60 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 61 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 62 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 63 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 64 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 65 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 66 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 67 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 68 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 69 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 70 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 71 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 72 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 73 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 74 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 75 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 76 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 77 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 78 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 79 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 80 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 81 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 82 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 83 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 84 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 85 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 86 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 87 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 88 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 89 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 90 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 91 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 92 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 93 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 94 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 95 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 96 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 97 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 98 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 99 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

図2. 蛍光標識細胞膜透過性MAペプチドの細胞内イメージング

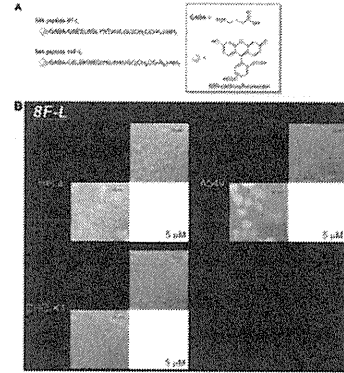


図3. 高いHIV-1活性を示したMAペプチドのMA構造上の位置

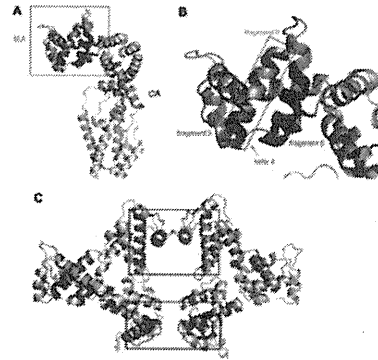


表2. 細胞膜透過性MAペプチドの抗HIV-1活性

Table 2. HIV-1 activity and infectivity of MA peptides with cell membrane permeability.

| MA peptide | 5T4-4 cell 50% ^a (IC ₅₀) | PM1L2/MA cell 50% ^a (IC ₅₀) | PM1L2/MA cell 50% ^a (IC ₅₀) | 5T4-4 cell 50% ^a (IC ₅₀) |
|------------|--|---|---|--|
| 11 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 12 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 13 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 14 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 15 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 16 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 17 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 18 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 19 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 20 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 21 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 22 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 23 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 24 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 25 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 26 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 27 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 28 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 29 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 30 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 31 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 32 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 33 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 34 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 35 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 36 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 37 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 38 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 39 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 40 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 41 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 42 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 43 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 44 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 45 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 46 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 47 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 48 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 49 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 50 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 51 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 52 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 53 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 54 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 55 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 56 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 57 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 58 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 59 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 60 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 61 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 62 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 63 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 64 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 65 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 66 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 67 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 68 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 69 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 70 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 71 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 72 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 73 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 74 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 75 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 76 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 77 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 78 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 79 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 80 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 81 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 82 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 83 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 84 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 85 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 86 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 87 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 88 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 89 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 90 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 91 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 92 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 93 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 94 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 95 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 96 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 97 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 98 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 99 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

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

分担研究課題：インテグラーゼの多量体形成と機能相関

研究分担者：増田貴夫（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・免疫治療学分野）

研究要旨

我々は昨年度、インテグラーゼ変異体の細胞内発現系による性状解析より、逆転写過程におけるインテグラーゼの機能には4量体形成が重要であり、この4量体形成には宿主因子Gemin2が関与することを報告した。本年度は、リコンビナント蛋白を用いた無細胞インテグラーゼ多量体アッセイ系を確立し、インテグラーゼの多量体化におけるGemin2の直接的効果を評価した。その結果、インテグラーゼ蛋白にリコンビナントGemin2を添加することで、2量体および4量体形成効率が顕著に高まることが判明した。さらに逆転写過程に致命的な影響を及ぼす変異は、このGemin2による多量体化能が完全に失われていた。以上より、インテグラーゼの2量体化および4量体化は、Gemin2との直接の相互作用により活性化され、インテグラーゼの多量体形成能と逆転写過程での機能相関が示された。

A. 研究目的

HIV-1 インテグラーゼはウイルスゲノムの組み込み過程以外にも、逆転写過程、核内輸送にも関与している。我々は、逆転写過程に寄与するインテグラーゼ結合宿主因、Gemin2を同定し、インテグラーゼおよびGemin2の逆転写酵素活性への直接的な機能関与およびウイルス複製における意義を明確にしてきた。本年度の研究では、リコンビナント蛋白による無細胞インテグラーゼ多量体化アッセイを確立し、逆転写過程におけるインテグラーゼの多量体形成とその機能相関を明らかにし、インテグラーゼを標的とした逆転写阻害剤開発にむけた分子基盤を築くことを目的とした。

B. 研究方法

①リコンビナント蛋白の調整:pNL4-3由来インテグラーゼ全長配列をpQEベクターに、Gemin2全長をpGEX-6Pベクターに挿入。His-インテグラーゼ蛋白(rIN蛋白)およびGST-Gemin2蛋白を大腸菌(M15株、あるいはBL20由来株)に発現させ、各々ニッケルカラム、Glutathione Sepharose 4Bカラム精製後、イオン交換カラム(HP-SPもしくはHP-Q)により精製した。Gemin2のGSTタグはプレジジョンプロテアーゼによ

り除去後、イオン交換カラム(HP-Q)により精製した。

② rIN蛋白の多量体化アッセイ系の確立:精製rINを種々の条件でクロスリンカー剤(DTSSPもしくはBS3)と反応させ、NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel、MES buffer 50mM MES、50mM Tris-HCl、5mM EDTA、0.5% SDSで電気泳動後ウエスタブロット法により、インテグラーゼの多量体化を検出した。

③ Gemin2蛋白の効果:②のアッセイ系に種々の濃度のリコンビナントGemin2蛋白を添加しその影響を評価した。

④ 種々のインテグラーゼ変異体についてもリコンビナント蛋白を調整し、多量体化能を同様に評価した。

(倫理面への配慮)

該当事項無し。

C. 研究結果

1)リコンビナントインテグラーゼ単独でも2量体化可能は可能である。微量のクロスリンカー存在下(0.3mM BS3)で処理することにより4量体を検出することは可能であるが、効率は非常に悪いことが示

された (図1左)。

2) 1) と同条件下で Gemin2 を添加することでインテグラーゼの2量体および4量体化が顕著に上昇を確認した (図1右)。

3) ニッケルカラムを用いた共沈降法により、Gemin2 との直接結合にはインテグラーゼの酵素活性ドメイン内の Val175, Ala76 と C 末ドメイン内に存在する Leu241, Leu242 のアミノ酸残基が関与することが明らかとなった (図2)。

3) インテグラーゼ : Gemin2 量比が 1 : 1 で最も高い多量体化形成促進効果を認められた (図3上)。この Gemin2 存在下で形成されたインテグラーゼ2量体、および4量体には Gemin2 は存在しないことも示された (図3下)。

4) ウイルス複製レベルで逆転写過程に致命的影響を及ぼすことを確認している Tyr15 残基を Ala に置換した点変異インテグラーゼ (Y15A) リコンビナント蛋白は、Gemin2 による多量体化促進効果が皆無であった。興味深いことに、インテグラーゼの N 末端ドメインは、直接 Gemin2 との結合に関与しない (図2)。よって、NTD は間接的に Gemin2 結合を左右することも明らかになった。

D. 考察

インテグラーゼの多量体化が Gemin2 により直接増強されることを、無細胞インテグラーゼ多量体アッセイ系により示すことができた。ウイルス複製レベルで逆転写過程が阻害されるインテグラーゼ変異体はこの Gemin2 による多量体化促進が全く認められなかった。このことは、本アッセイ系による Gemin2 のインテグラーゼ多量体促進効果とウイルス複製レベルでの機能との相関性を有することを示す。さらに、昨年度までの免疫沈降実験結果より、Gemin2 結合の責任アミノ酸残基はインテグラーゼの中央ドメイン (56-210) と C 末端ドメイン (211-288) に存在することが明らかにされているが、N 末端ドメイン

(1-55) も間接的にだがインテグラーゼと Gemin2 の相互作用に必須な役割をもつことが明らかとなった。また、Gemin2 はインテグラーゼの単量体レベルで相互作用しており、計算力学を用いたより詳細なインテグラーゼと Gemin2 相互作用の分子構造を明確にするための評価系の基盤が整ったといえる。

E. 結論

逆転写過程におけるインテグラーゼの機能には、Gemin2 との相互作用により促進されるインテグラーゼの多量体化が重要である。Gemin2 との相互作用および機能的な多量体化には、インテグラーゼの N 末端構造のコンフォメーションが大きく寄与する。

F. 知的所有権の取得状況

特記すべきこと無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Takamori A, Hsegawa A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Masuda M, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Zeng N, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda T and Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not cytomegalovirus-specific CD8+ T lymphocytes in a minor population of asymptomatic human T-cell leukemia virus type 1-carriers. *Retrovirology*. in press.

(2) Masuda, T. Non-Enzymatic Functions of Retroviral Integrase: The Next Target for Novel Anti-HIV Drug Development. *Frontiers in microbiology*. 2, 210, 2011.

(3) 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.

2. 学会発表等

(1) Masuda T. Structural insight for non-enzymatic roles of retroviral integrase: the next target for novel anti-HIV drug

development. 第6回日独エイズシンポジウム、2011 (ボッカム)

2) Sato Y., Sato M., Hasegawa A., Kannagi M. and Masuda T. Evaluation of integrase-mediated stimulatory effect on HIV-1 reverse transcription using nucleocapsid-coated RNA template. 第6回日独エイズシンポジウム、2011 (ボッカム)

3) Nursarat, A, Hayashi T, Hasegawa A, Okamura N, Masuda T, and Kannagi M. Commensal bacteria-mediated suppression of HIV-1 replication in macrophages through innate immune response. The IUMS Congresses 2011 (札幌)

4) Kinpara S, Hayashi T, Hasegawa A, Masuda T, and Kannagi M. Anti-sense transcripts encoded by HTLV-I in adult T-cell leukemia cells. The IUMS Congresses 2011 (札幌)

実験結果図表等

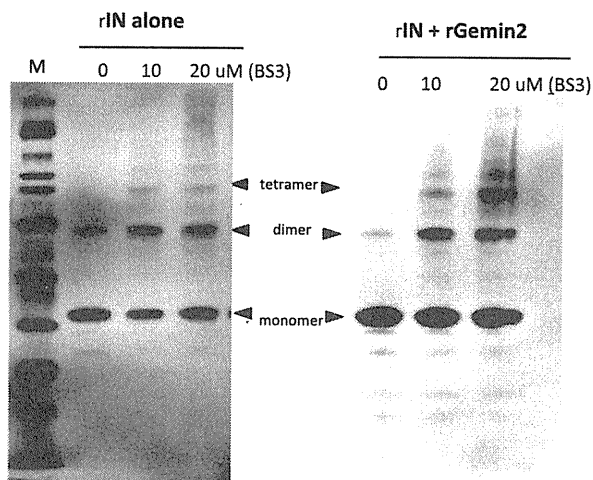


図1 Gemin2 は直接インテグラーゼの多量体化を促進する。精製リコンビナントインテグラーゼ (rIN) を架橋剤 (BS3) 処理を室温で20分行い、還元剤なしでのSDS-PAGE後、インテグラーゼ抗体を用いたウエスタンブロット法によりIN蛋白の多量体化をしらべた(左)。同様の実験を精製リコンビナント Gemin2 (rGemin2) 存在下で行った。

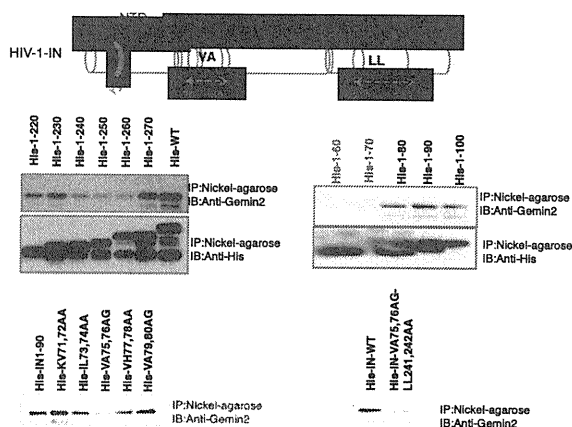


図2 インテグラーゼ内の Gemin2 との相互作用責任モチーフの同定。種々の長さのインテグラーゼ欠損変異体および点変異体 rIN を作成し、rGemin2 との結合能をニッケルカラムを用いた共沈法により解析した。Gemin2 との結合に直接関与するアミノ酸残基 (V75A76 および L241L242) を上部に示した。NTD :N-末端ドメイン、CCD : 中央酵素活性ドメイン、CTD : C-末端ドメイン

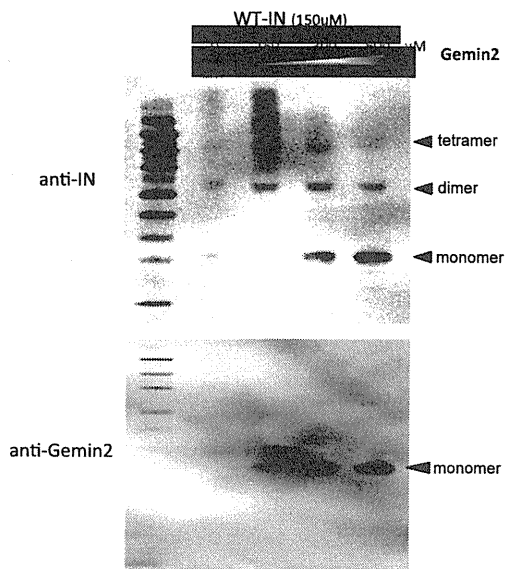


図3 インテグラーゼの多量体化の Gemin2 濃度依存性。rIN (150uM) を種々の量 (0、150、300、600uM) の Gemin2 を添加して、インテグラーゼの多量体化を測定した (上)。同じメンブランを Gemin2 抗体により反応させた (下)。

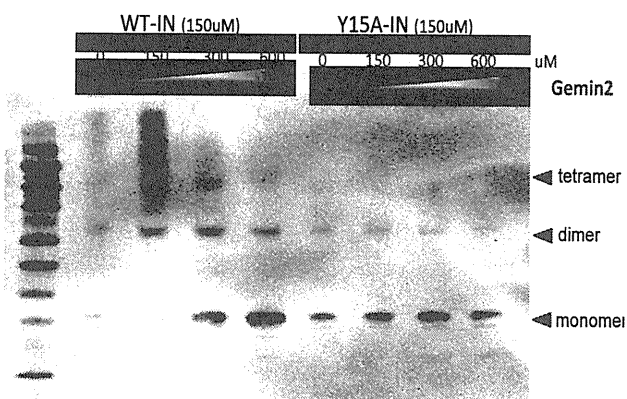


図4 逆転写過程に致命的影響を及ぼす Y15A 変異体の多量体化能。Tyr15 残基を Ala に置換した点変異インテグラーゼ (Y15A) リコンビナント蛋白を精製し、Gemin2 存在下での多量体化能を野性型インテグラーゼ (WT-IN) と比較した。

分担研究報告書

HIV-1 ゲノムの核移行制御因子の構造機能解析

分担研究者 間陽子 独立行政法人理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニットリーダー

研究要旨

これまで我々は、Vpr が核輸送アダプター因子 Importin α (Imp α) の結合を介して核移行する新規核移行機序を有することを報告してきた。さらに Vpr と Imp α の結合がマクロファージのウイルス複製に必須であること、その結合が抗 HIV-1 薬の新しい標的になることを示してきた。これらの解析は、Vpr の全長ではなく、核移行の最小機能ドメインであるアミノ酸 17 番目から 74 番目までの N17C74 を用いて行ってきた。しかし、N17C74 を含む 3 つの α -Helix ドメインだけでなく、Vpr の N 末端及び C 末端も幾つかの機能を担っていることから、本研究では Vpr の全長を用いてその核移行機序を詳細に解析した。全ての Imp α アイソフォーム (Rch1, Qip1, および NPI-1) と結合して核移行する N17C74 とは対照的に、全長の Vpr は NPI-1 によって選択的に核移行することが明らかとなった。その選択性は各々の Imp α アイソフォームの CAS 結合ドメインと Vpr の結合親和力の差異ではなく、核外輸送因子 CAS が Vpr と NPI-1 の結合を選択的に阻害するためであることが始めて明らかになった。

A. 研究目的

HIV-1 の特徴の一つが他のレトロウイルスとは異なりマクロファージなどの非分裂細胞に感染できる点である。それは、HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr が Pre-integration complex (PIC) を核内に移行させるためと考えられる。

我々はこれまで、Vpr が核輸送アダプター因子 Importin α (Imp α) のみを介して核移行する新規核移行機序を有することを発見した。さらに、Imp α には 3 つのサブファミリーが存在するが、その代表である Rch1, Qip1, および NPI-1 アイソフォームはいずれも Vpr と結合して、Vpr の核移行を促進することを見出した。immunodepletion および siRNA を用いて、Vpr の核移行に Imp α が必須であること、そして Imp α との結合能が消失した Vpr 変異体は核移行能を失い、それを組み込んだウイルスは複製が阻害されることを明らかにした。以上の結果は、Vpr と Imp α の結合がマクロファージへのウイルス複製に必須であり、創薬の標的になることを示唆している。事実、我々は Vpr と Imp α との結合を阻害する低分子化合物を同定し、その化合物がマクロファージにおけるウイルス複製を核移行過程で Vpr 依存的に阻害す

ることを立証した。

本研究では、Imp α のみを介して核移行する Vpr の核移行機序を詳細に解析した。

B. 研究方法

1) *in vitro*核移行解析：

Glutathione S Transferase (GST) と Green Fluorescence protein (GFP) 融合野性型 Vpr 蛋白質の核移行をジギトニン処理した HeLa 細胞を用いて行った。対照として、Vpr の核移行の最小機能ドメイン N17C74 を用いた。蛍光強度は Hoechst 33342 で染色後に少なくとも 70 個の細胞核の蛍光量を定量した。

2) 生体分子間相互作用解析：

① mRFP 融合野性型 Vpr と GST 融合野性型および欠失変異体 Imp α (Rch1, Qip1, NPI-1) を用いて、GST pull-down を行った。

② Surface plasmon resonance (SPR) 解析は BIAcore 2000 システムを用いて行った。GST 融合野性型 Vpr と GST 融合野性型および欠失変異体 Imp α (Rch1, Qip1, NPI-1) を用いた。

3) CAS による Vpr と Imp α の結合競合試験：

mRFP 融合野性型 Vpr と GST 融合野性型 Imp α (Rch1, Qip1, NPI-1) を用いた GST pull-down に、哺乳類細胞から精製した CAS

を添加して競合試験を行った。

4) CASのノックダウンと核移行：

HeLa細胞にCAS特異的siRNAを導入してCASをノックダウンし、その細胞をジギトニン処理後に、CASおよびNPI-1を添加して、*in vitro*核移行解析を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト由来臨床材料を用いていない。

C. 研究結果

これまで我々は、Vprの全長ではなく、核移行の最小機能ドメインであるアミノ酸17番目から74番目までのN17C74を用いて実験を行ってきた。しかし、VprのN末端及びC末端は核膜局在やスプライシング等の機能を担っていることが明らかになっているため、全長のVprにGSTおよびGFPを付加して*in vitro*核移行解析を行った。また、Imp α は3つのサブファミリーに分類され、その代表としてRchl、Qip1およびNPI-1アイソフォームが存在するため、全長のVprの核移行にどのアイソフォームが関与するのかを調べた。興味深いことに、N17C74はいずれのImp α によっても核移行したが、全長のVprはNPI-1によってのみ核移行した(図1)。

このようなVprの核移行におけるImp α isoform間の相違の機序を解明するために、各々のImp α と全長のVprとの結合をGST pull-downで調べた。すると、3つのImp α は全長のVprと結合した。Imp α の3つのサブファミリー間は約50%のアミノ酸の相同性しか無い。そこで、Imp α のVpr結合領域を同定するために、Imp α 欠損体として、Imp α のImp β -binding (IBB), armadillo repeat (ARM), apoptosis susceptibility (CAS) 結合ドメイン、C末ドメインを構築し、Vprとの相互作用を確認した(図2)。その結果、VprはCAS結合ドメインと結合すること、その結合に得意性は無く全てのサブファミリーのCAS結合ドメインと結合した。次に、BIAcoreによる解離定数を比較したところ、VprはいずれのサブファミリーのCAS結合ドメインと同じ結合親和力で結合した(図3)。以上の結果は、全長のVprはNPI-1によって選択的に核に運ばれる機構は、VprとCAS結

合ドメインとの結合親和力の違いではない事が明らかとなった。

Imp α の核外輸送因子CASは核内でImp α のCAS結合ドメインと結合して、Imp α から核移行(NLS)を有するタンパク質を解離させる機能を持っている。そこで、各Imp α のアイソフォームとVprの結合をCASが阻害するかを調べるために、CASによるImp α とVprの結合阻害実験を行った(図4)。興味深いことに、NPI-1とVprの結合をCASが濃度依存的に阻害した。一方、VprとRchl及びQip1との結合はCASによって阻害されなかった。

Vprの核移行におけるCASの意義を証明するために、CAS特異的siRNAを導入してCASをノックダウンして、そのHela細胞を用いて、*in vitro*核移行解析を行った。まず、NPI-1のみを添加した場合には、Vprの核移行は促進されなかったが、NPI-1と同時にCASを添加するとVprの核移行は、ノックダウンしていないHela細胞を用いて行った時のVprの核移行能の半分まで回復した。(図5)。以上の結果は、NPI-1によって選択的に促進される全長Vprの核移行はCASによる制御が必須であることを示している。

D. 考察

最近、インフルエンザウイルスのNucleoproteinおよびPB2、ヘルペスウイルスがNPI-1により、HIV-1インテグラーゼがQip1により核移行することが明らかとなった。このように本研究の成果は核内で複製する他のウイルスの核移行のモデルを提供する。

VprはPICの構成因子の一つであり、PICの核移行を促進させる結果として、非分裂細胞であるマクロファージにおけるウイルス感染を上昇させる機能が知られている。従って、マクロファージにおけるウイルス複製のCASおよびNPI-1の役割を明らかにすることが必要である。現在、健康人由来の血液から作成した最終分化マクロファージにCASおよびNPI-1特異的siRNAを導入して、ノックダウン細胞を用いて感染実験を行っている。

E. 結論

全長のVprは、NPI-1によって選択的に核移行すること、その選択性は各々のImp α アイソフォームとVprの結合親和力の差異ではな

く、CAS による制御であることを始めて証明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeda E, Murakami T, Matsuda G, Murakami H, 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) Hideki Ishii, 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, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 1469-1474, 2012

2. 学会発表

国際学会

- 1) Xue G., Zahoor M. A., and Aida Y. HIV-1 Vpr activates type I interferon signaling pathway in macrophages and dendritic cells. 2011 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses. May 23-28, 2011, New York, U.S.A.
- 2) Miyatake H., Sanjoh A., Matsuda G., Tatsumi Y., Dohmae N., Aida Y. Crystal structure of human importin- α (Rch1) 17th International Conference Applications of Computer Algebra ACA 2011, June 27-30, 2011, Texas, U.S.A.
- 3) Aida Y. Potential antiviral targets for flu and AIDS, Singapore-Japan Joint Forum on Emerging Concepts in Microbiology, November 15-16, 2011, Singapore.

国内学会

- 1) 薛光愛、Muhammad A Zahoor、間陽子. HIV-1 Vpr activates type I interferon signaling pathway in macrophages and related with interleukin-1(IL-1) pathway in dendritic cells. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、2011 年、東京。

- 2) 村上知行、間陽子. Fucci を用いた HIV-1 Vpr による細胞周期制御のダイナミクスと細胞死のライブイメージング. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、2011 年、東京。
- 3) 萩原恭二、村上知行、石井秀樹、近藤恭光、本田香織、長田裕之、横田恭子、鈴木正昭、間陽子. Vpr Helix3 領域と結合する新規 HIV-1 阻害剤の開発. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、2011 年、東京。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

無

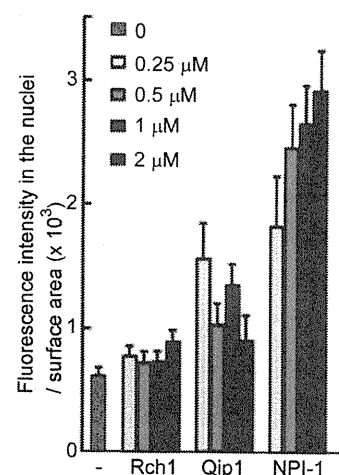
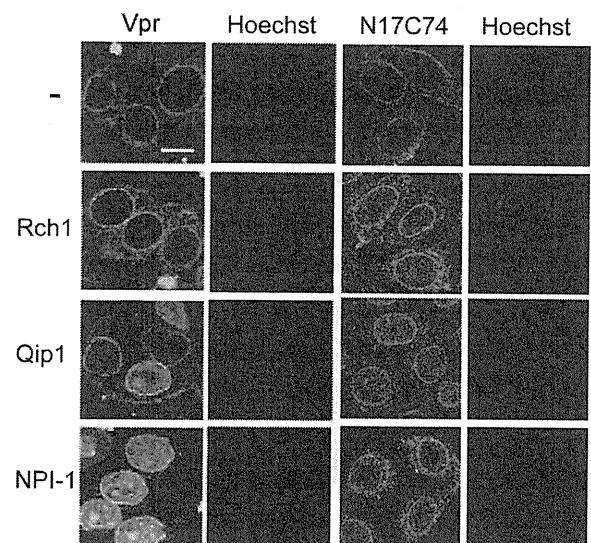


図1

全長VprはNPI-1による選択的核移行

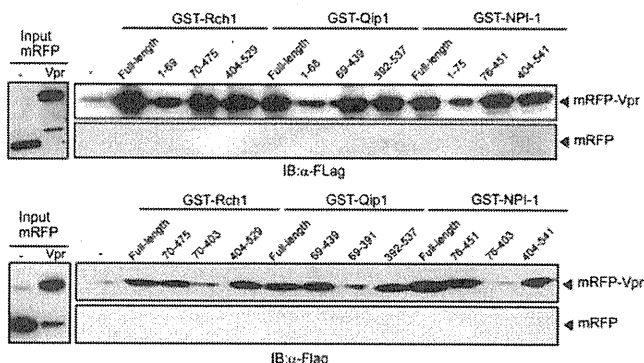
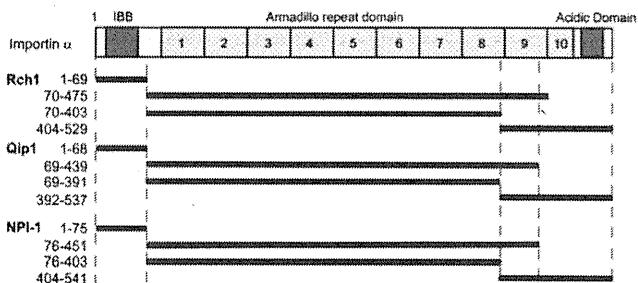


図2 VprとImpαアイソフォームとの GST pull-downによる結合実験

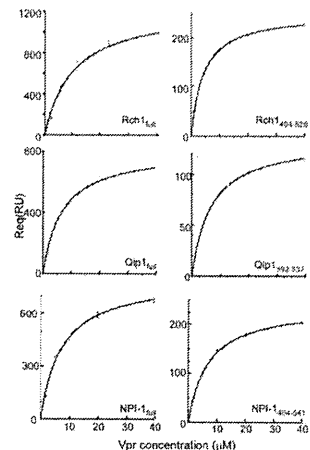
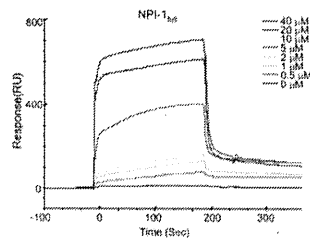


図3 VprとImpαアイソフォームとの BIAcoreによる結合親和力の測定

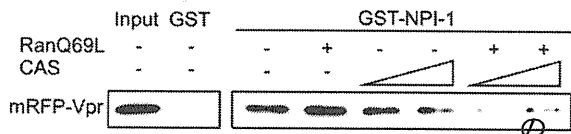
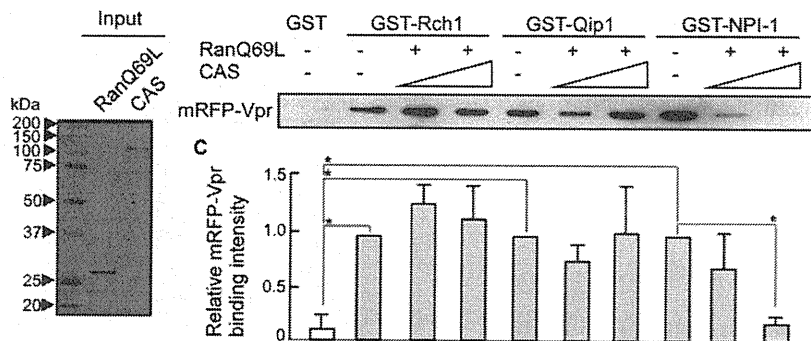


図4 VprとImpαのイソフォームと CASによる結合阻害実験

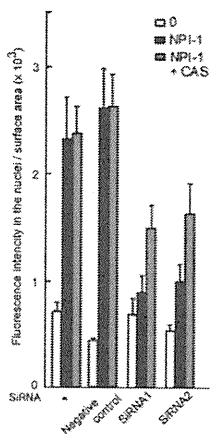
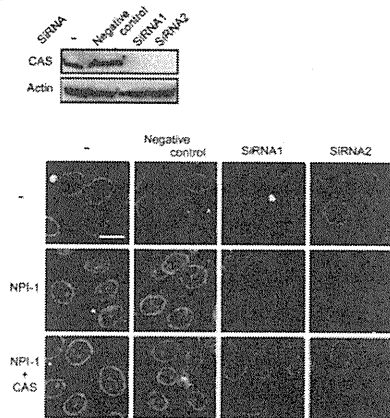


図5 CASノックダウン細胞における

研究課題：HIV 転写制御因子の構造機能解析

課題番号：H 2 2- エイズ- 一般- 0 0 3

研究分担者：岡本 尚（名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学 教授）

研究協力者：朝光 かおり（同上 講師）

1. 研究目的

HIV プロウイルスからの転写過程は、HIV 由来の転写活性化因子 Tat と細胞内の転写伸長因子 P-TEFb (Cyclin T1 と CDK9 の複合体) によって担われている。この活性制御は Tat と直接結合する Cyclin T1 (CycT1) が担う。両者の結合様式については CycT1 の中央部に存在する領域と N 末の領域が重要であることが実験より示唆されるが、詳細はまだ明らかではない。そこで、本研究では近年明らかにされた P-TEFb/Tat 立体構造をもとに Tat-CycT1 の詳細な結合様式について解析を進め、Tat の転写活性調節機構についてさらに追求した。これらの情報は、Tat を標的とした HIV 阻害薬の開発に有用な情報をもたらすことが期待される。

2. 研究方法

P-TEFb/Tat 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、その妥当性を以下に示す 2 種類のルシフェラーゼアッセイで実験的に検証した。

アッセイ①: Tat と CycT1 を別々に細胞内に導入する方法。2 者が別々に発現するため転写活性化に至るには、まず Tat と CycT1 が結合する必要がある。

アッセイ②: Tat と CycT1 が融合したキメラ蛋白を発現させる方法。融合しているため、両者が結合している状態をミミックしている。主に Tat と CycT1 が結合した後の活性について検討することができる。

（倫理面への配慮）現時点では該当せず。

3. 研究結果

3-1: Tat/P-TEFb 立体構造における CycT1 Q50 残基の周辺構造の解析

Tat の転写活性化には CycT1 の 50 番目の Gln 残基 (CycT1 Q50) と 176 番目の Phe 残基 (CycT1 F176) が重要である。その周辺構造を近年明らかにされた Tat/P-TEFb 立体構造をもとに解析した。その結果、CycT1 Q50 は、Q46、Q56 と分子内水素結合を、Tat Q17 と Tat C34 と分子間水素結合を形成していることが明らかになった。また、CycT1 F176 は、Tat F36 と Ch- π 水素結合を形成していること示唆された。

3-2: Gln (Q) 水素結合ネットワークが Tat 活性に与える影響

CycT1 Q56 が Tat 活性制御に関与しているかどうか、ルシフェラーゼアッセイにて検討した。その結果、CycT1 Q56 も Q46、Q50 と同様に Tat の転写活性制御に関与していることが明らかになった (Fig. 2a)。それぞれの Q 残基の Tat 活性に与える影響は、CycT1 Q56 の関与は部分的であるものの、他のアミノ酸残基の変異を加えることにより、完全に活性を欠損した (Fig. 2a)。さらに、Tat と CycT1 を融合したキメラ蛋白を用いたところ、Q46、Q56 変異においてはほぼ WT と同等の活性を示すが、Q50A 変異体は活性を部分的に欠損することが明らかになった (Fig. 2b)。さらに変異を加えると、Q46/50A ダブル変異体では活性がほぼなくなるのに対し、Q46/56A ダブル変異体では活性は WT と同等であった。このことは、Q46 と Q56 は CycT1 と Tat 初期結合のみに関与し、Q50 は Tat の転写活性調節など Tat との結合以降の過程にも関与していることを示唆している。

また、CycT1 Q50 と水素結合を形成すると考えられる Tat C34 について変異体を作成し検討した。その結果、C34 変異により Tat の転写活性化能は失われ、C34 残基は Tat の転

写活性に重要であることが明らかになった (Fig. 2c)。キメラ蛋白においても変異により活性が劇的に抑制され (Fig. 2d)、このアミノ酸残基は Tat と CycT1 の相互作用のみならず、転写活性調節に関与することが示唆された。

3-3 : CycT1 F176-TatF36 間の Ch- π 結合

CycT1 F176 と TatF36 の間で Ch- π 結合を形成している (Fig. 3a)。Tat F38 に変異を導入することにより Tat の転写活性化が失われることから、この結合は重要であると考えられる (Fig. 3b)。Tat-CycT1 キメラ蛋白においては、活性が特に Tat F48A において阻害されており、Ch- π 結合は CycT1-Tat が相互作用した後の過程にも関与していると考えられる (Fig. 3c)。

3-4 : CycT1 の立体構造からみた Tat 相互作用ネットワーク

Q 水素結合ネットワークと Ch- π 結合がどのように形成されるか、現在まで知られている 3 種の CycT1 の構造 (CycT1 単独構造 (2pk2)、CycT1/CDK9 複合体構造 (3BLH)、CycT1/CDK9/Tat 複合体構造 (3MI9)) をもとに検討した。まず、Q 水素結合ネットワークは、2pk2 においては形成されていないが、3BLH、3MI9 において形成されていることから CDK9 の結合によってこのネットワーク形成が誘導されると示唆される。Ch- π 結合については、Phe 残基のフェニル基の方向性が 3 者で異なることから、Tat F38 残基が近傍に位置することにより誘導されると考えられた。

4. 考察

今回我々は、CycT1 が Tat と相互作用に重要な新規相互作用ネットワークを立体構造解析から同定した。CycT1 の Q46, Q50, Q56 から構成される Gln 水素結合ネットワークは Tat との相互作用に、CycT1-Tat で形成される Ch- π 結合は Tat-CycT1 の相互作用以後の過程に関与し Tat の転写活性の調節を行っていることが示唆された。

Tat は、それ自体では特定の構造を持たない天然変性蛋白 (naturally disordered protein) である。したがって、Tat と CycT1 の結合は、まず水素結合ネットワークにより構造が安定している CycT1 Q50 周辺構造が認識し、次いで Ch- π 結合が両者の結合の特異性を決定していると考えられる。2 つの相互作用により Tat/P-TEFb 構造は安定化し、HIV 遺伝子の転写を最大限に活性化できる構造を取ると考えられる。今後これらの情報を活かし、in silico スクリーニング等を経て Tat 活性阻害効果を持つ薬剤の開発に取り組みたいと考えている。

5. 自己評価

1) 達成度について

当初の計画通り、Tat 複合体の立体構造解析データをもとに CycT1 による Tat の新たな活性制御形式を明らかにできた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

蛋白分子間相互作用の種類によって Tat の転写活性化に異なる機能を示すことができたことは前例がなく、学術的・国際的な観点からみて意義が大きいといえる。社会的意義としては、Tat 阻害剤の開発は、薬剤耐性 HIV の出現のために困難となっている ART の新たな治療戦略を構築するための中核となり、言うまでもなく、HIV 感染者や AIDS 患者の治療の緊喫の課題である。

3) 今後の展望について

CycT1 の野生型と変異型の安定性を分子動力学計算により解析する。得られた情報を CycT1-Tat の相互作用解析に加味し、機能的 Tat 複合体を鋳型とした in silico スクリーニングを行う。

6. 結論

CycT1-Tat 相互作用ネットワークとして CycT1 (Q46, Q50, Q56) から構成される Q 水素