

結合ネットワークと、CycT1-Tat で形成される Ch- $\pi$  結合を見出した。前者は Tat との結合の初期認識に、後者は Tat の転写活性の調整（成熟）に関与すると考えられた。

研究発表

研究分担者

岡本 尚

原著論文による発表

欧文

- 1) Tan Gana NH, Victoriano AF, Okamoto T. Evaluation of online miRNA resources for biomedical applications. *Genes Cells*. 17(1):11-27. 2012.
- 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 Retroviruses*. 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(5):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(7):1103-11. 2011.

和文

- 1) Okamoto T. [Positive and negative regulation of transcription from HIV provirus]. *Uirusu*. 61(1):81-9. Japanese. 2011

口頭発表

海外

- 1) Okamoto, T. Epigenetic Control of the HIV Latent Infection. The 6<sup>th</sup> GERMAN-JAPANESE HIV-Symposium. Nov.21-22, 2011, Bochum, Germany.

国内

- 1) 朝光かおり、酒井幸、森祐多朗、岡本尚. HIV-1 Tat と CyclinT1 の相互作用の解析、日本エイズ学会、2011年、東京
- 2) 朝光かおり、酒井幸、森祐多朗、岡本尚. HIV-1 interaction analysis between HIV-1 Tat and P-TEFb(Cyclin T1)、日本分子生物学会年会、2011年、横浜

朝光 かおり

原著論文による発表

欧文

- 1) 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(5):887-95. 2011.

口頭発表

国内

- 1) 朝光かおり、酒井幸、森祐多朗、岡本尚. HIV-1 Tat と CyclinT1 の相互作用の解析、日本エイズ学会、2011年、東京
- 2) 朝光かおり HIV 転写調節機構および Tat の分子作用機構に関する研究、日本エイズ学会、2011年、東京
- 3) 朝光かおり、酒井幸、森祐多朗、岡本尚. HIV-1 Interaction analysis between HIV-1 Tat and P-TEFb(Cyclin T1)、日本分子生物学会年会、2011年、横浜

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

特になし。

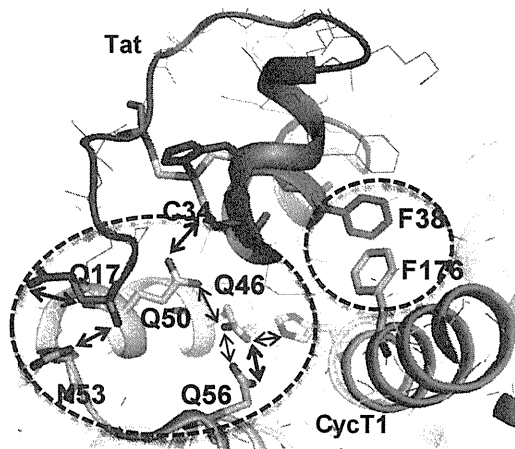


Fig. 1 Tat/P-REFb立体構造での CycT1 Q50周辺領域構造

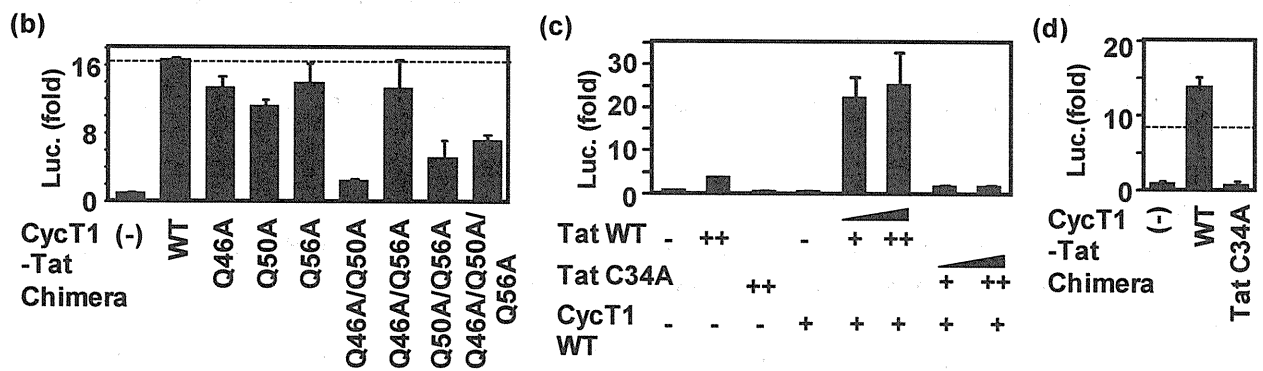
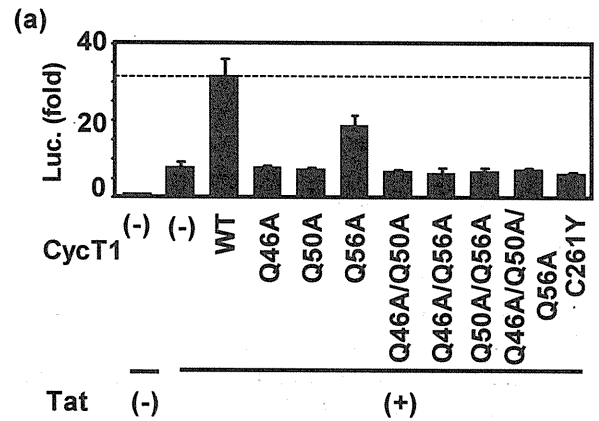


Fig. 2 CycT1 Q46, Q50, Q56がTat依存性の転写活性化に与える影響 a)Tat依存性の転写活性化におけるCycT1Q変異体の効果 b)CycT1-Tat chimeraタンパクにおけるQ残基変異の効果 c)Tat C34A変異体の転写活性 b)CycT1-Tat chimeraタンパクにおけるTatC34A変異の効果

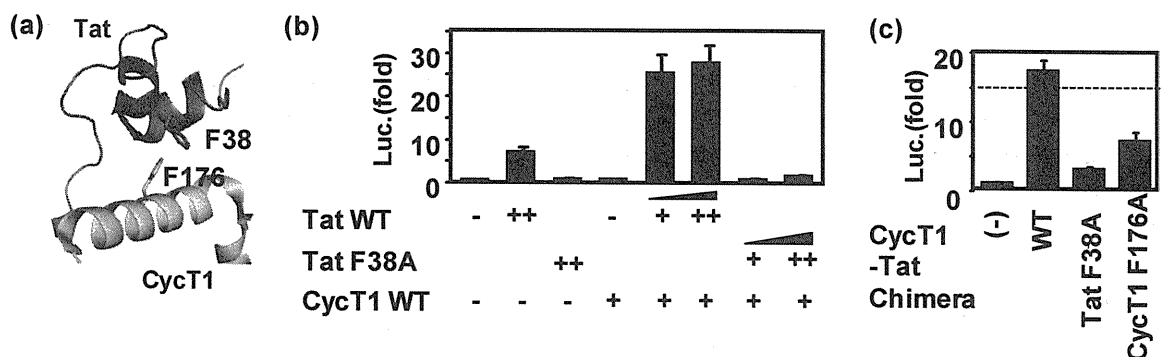


Fig. 3 CycT1 F176とTat F38AのTat転写活性化に与える影響 a) CycT1 F176とTat F38を中心とした立体構造 b)Tat F38A変異体の転写活性 c) CycT1-Tat chimeraタンパクにおけるCycT1 F176とTat F38A変異の効果

## 厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

### 分担者研究報告書

分担研究課題：新型シークエンサーを用いた感染者体内の HIV ゲノムの包括的解析  
分担研究者：本村和嗣（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官）

**研究要旨：**我々は、個体レベルでのウイルスの増殖と変異の理解を深めるために、新型シークエンサーを用い、HIV感染者体内のHIVゲノム情報を包括的に解析する。今年度は、生体内でのHIV-1アクセサリ蛋白質の相互作用部位について解析した。(1)22 症例の血清試料からHIV-1 アクセサリ遺伝子(Vif, Vpr, Vpu, Nef)の塩基配列情報を網羅的に取得した(約 $4.6 \times 10^8$  塩基)。各々のアクセサリ遺伝子領域について、約10000-100000配列得られた。(2)APOBEC3G分解するために必須であるCul5-E3 ユビキチン ligase 複合体とVifとの相互作用部位は、高度に保存されていた。(3)HIVは、感染初期から中期に至るまで、複製—増殖を抑制している可能性が示唆された。CD4<50という感染末期においては、複製—増殖が促進されていることが示唆された。(4)感染中～末期において、HIVが細胞性免疫から逃避できるために、NefはMHC分子の発現を強度に低下させていることが示唆された。

#### A. 研究目的

我々は、感染者体内におけるウイルスの複製、増殖と変異の意義を理解するために、アクセサリ遺伝子に着目している。試験管レベルでHIV アクセサリ蛋白質の機能解析が進んでいるが、実際の感染者体内レベルでの役割については不明である。我々は、新型シークエンサーを用いて、感染者体内のHIV アクセサリ遺伝子領域(Vif, Vpr, Vpu, Nef)のゲノム情報を収集し包括的に解析する。今年度は、得られた配列情報より、既に報告されている相互作用に重要なアミノ酸座位、領域について、多様性解析(情報エントロピー解析)を用いて、保存度、多様度について解析した。アクセサリ遺伝子の変異とHIV感染症の病態進行との関連性について考察した。

#### B. 研究方法

##### (1) 臨床試料を用いた解析

2006年05月15日から2009年02月17日の間に、国立国際医療センターのエイズ治療研究開発センターを受診—加療を受けた22症例

(CD4>500: 8症例, 150<CD4<350: 7症例, CD4<50: 7症例)を対象とした。22名の血清中

のHIVの4種類のアクセサリ遺伝子領域の配列を解析した。血清より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を使って、HIV RNAを抽出した後、特異的逆転写プライマーを用いてcDNAを合成した。cDNAをtemplateにして、HIV-1 アクセサリ遺伝子領域を4種の断片にわけてnested PCRにより増幅した。FLX 454 (Roche)を用い、増幅産物の塩基配列を網羅的に取得した。

##### (2) 多様性解析

編集プログラムで補正した配列情報を用いて、CD4>500群、150<CD4<350群、CD4<50群間で、特徴的アミノ酸の存在、頻度について解析した。アミノ酸の頻度は、シャノンの情報エントロピーを指標とした。解析に用いた数式は下記に示す。

$$H(i) = - \sum_{x_i} p(x_i) \log_2 p(x_i)$$

$$(x_i = G, A, I, V, \dots),$$

(倫理面からの配慮について)

ヒト由来臨床材料を使う研究は、関連機関の倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で行った。動物実験は、研究機関の倫理審査会の審議を受け、承認を得て行った。

## C. 研究結果

### (1) 大量配列情報の収集

FLX 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  $4.6 \times 10^8$  塩基)。各々のアクセサリー遺伝子領域について、約 10000-100000 配列得られた。

### (2) 抗ウイルス因子 APOBEC3G 分解について

(i) APOBEC3G との相互作用に重要な領域は、43-59番目の領域と報告がある。多様性解析では、47, 51, 56番目のアミノ酸座位において、HIV感染者3群共に、多様性に富んでいた。(ii) Cul5-E3 ユビキチン ligase 複合体との相互作用に重要な HCCH motif、<sup>144</sup>SLQ<sup>146</sup> motif は HIV 感染者3群で高度に保存されていた。

### (3) 複製—増殖について

複製、増殖に関わるアクセサリー遺伝子は、Vpr と Vpu が報告されている。Vpr の <sup>22</sup>LLxxL<sup>26</sup>、<sup>64</sup>LxxLL<sup>68</sup> の領域は p300/CBP と相互作用し、LTR トランスアクチベーターとしてウイルスの複製を促進することが知られている (Kino T., et.al. Journal of Virology 2002)。<sup>22</sup>LLxxL<sup>26</sup>、<sup>64</sup>LxxLL<sup>68</sup> の領域は CD4 > 500 群、150 < CD4 < 350 群では多様性に富んでいたが、CD4 < 50 群では高度に保存されていた。Vpu は <sup>65</sup>S だと、ユビキチン—プロテアソーム経路で分解され、ウイルス粒子放出できず、増殖が抑制されるとの報告がある (Nomaguchi M., et. al. Microbes and Infection 2008)。CD4 > 500 群、150 < CD4 < 350 群では高度に保存されていたが、CD4 < 50 群では多様性に富んでいた。

### (4) 細胞表面分子発現について

細胞表面分子発現に影響を及ぼすアクセサリー遺伝子は、Vpu と Nef が報告されている。Vpu では、Cullin1-SCFTrCP 複合体との相互作用に重要な

領域<sup>51</sup>DSGNES<sup>56</sup>は HIV 感染者3群で高度に保存されていた。CD4 の分解促進に働くと考えられる。Nef では、PACS-1 と相互作用に重要で、細胞表面分子 MHC class I の発現低下をもたらす。アミノ酸領域<sup>59</sup>EEEE<sup>62</sup>は、HIV 感染者3群で多様性に富んでいた。一方、human thioesterase と相互作用に重要な<sup>119</sup>FPD<sup>121</sup>は HIV 感染者3群で高度に保存されていた。CD4、MHC 分子等の細胞表面分子の発現低下をもたらすことが示唆される。

## D. 考察

FLX454、エラー補正プログラム、情報エントロピー解析を用いて、生体内における HIV アクセサリー遺伝子の包括的解析をおこなった。

Vif—APOBEC3G との相互作用に重要な領域は多様性に富んでいた。APOBEC は 3C、3F 等、様々な種類があり、これに対応するために多様性である可能性がある。しかし、この下流に親水性アミノ酸が多い高度保存領域が存在する。よって、この領域が APOBEC3G との相互作用に重要な領域かもしれない。また、最近の報告で、Vif は、Cul5-E3 ユビキチン ligase 複合体、更に転写因子 CBF-β と相互作用し APOBEC3G の分解を促していることが報告された (Jager S., et. Al, Nature 2012)。この領域は、CBF-β との相互作用部位の可能性もある。<sup>108</sup>H-<sup>114</sup>C-<sup>133</sup>C-<sup>139</sup>H motif は、Zinc ion が結合し、Cul5 と相互作用するのに構造上重要な motif である (Luo K., et.al. PNAS 2005)。また、<sup>144</sup>SLQ<sup>146</sup> motif は、elongin C と相互作用するのに重要な motif である (Yu Y., et.al. Genes Dev 2004)。これらは、Cul5-E3 ユビキチン ligase 複合体を形成するのに重要なモチーフであるため、高度に保存されていると推測される。

複製—増殖に関して、感染初期から中期では、潜伏感染を維持するために、複製—増殖を抑制していることが示唆される。感染末期では、免疫系が破壊されている生体内環境下で、ウイルスが爆発的に複製—増殖していることが示唆される。HIV は、生体内で持続感染を維持するた

めに、環境に応じて複製-増殖を調節している可能性がある。

細胞表面分子発現の影響について、CD4、MHC分子の発現低下が示唆される。Nef の<sup>59</sup>EEEE<sup>62</sup>領域はPACS-1と相互作用し、MHC分子の発現低下をもたらす。CD4>500群は、<sup>59</sup>EEEE<sup>62</sup>であったが、150<CD4<350群とCD4<50群では、グルタミン酸が一アミノ酸挿入し<sup>59</sup>EEEE<sup>63</sup>になっていた。<sup>59</sup>EEEE<sup>63</sup>は<sup>59</sup>EEEE<sup>62</sup>より、強度にMHC分子を発現抑制させることが報告されている (Agopian K., et.al, Virology 2007)。生体内環境に応じ、細胞性免疫逃避のため、多様性に富んでいる可能性が示唆される。

#### E. 結論

今年度は、既に報告されている相互作用に重要なアミノ酸座位、領域について解析した。しかし、このような座位以外にも、各アクセサリ遺伝子において、病態進行との関連が示唆される多数の多様性領域、保存領域が存在していた。次年度以降は、これらの変異の理解のために、蛋白質立体構造の変化の制約の情報を取得し、塩基配列の情報と統合して、感染者体内における新規の機能的相互作用部位の推定を解析する予定でいる。

#### 謝辞

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

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

1). Ivo N. SahBandar, Kiyomi Takahashi, **Kazushi Motomura**, Zubairi Djoerban, Iman Firmansyah, Katsuhiko Kitamura, Hironori Sato,

Herdiman T. Pohan, Shigehiro Sato “The Indonesian Variants of CRF33\_01B: Near-Full Length Sequence Analysis” AIDS Res Hum Retroviruses. 2011 Jan;27(1):97-102

2). **本村和嗣** “ノロウイルスの生き残り戦略” Medico Vol. 42 No.2 p. 32-35: 2011年2月号, 協和企画

3). **本村和嗣** “ノロウイルス感染症” 臨床とウイルス Vol 39 p.115-p.122: 2011年7月

4). 岸田典子、高下恵美、藤崎誠一郎、徐 紅、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、金 南希、菅原裕美、佐藤 彩、今井正樹、小田切孝人、田代真人、**本村和嗣**、横山 勝 柊元 巖、佐藤裕徳、小口晃央、山崎秀司、藤田信之 “2010/11シーズンのインフルエンザ分離株の解析” 病原微生物検出情報月報 Vol. 32 p. 317-323: 2011年 11月号

#### 2.学会発表

1). 岡智一郎、横山勝、**本村和嗣**、村上耕介、脇田隆宇、佐藤裕徳、片山和彦 “ Role of conserved amino acid residues in the protease among different genera of Caliciviruses” 第131回日本薬学会 2011年3月28-31日 静岡

2). **本村和嗣**、横山勝、岡智一郎、片山和彦、野田衛、田中智之、佐藤裕徳 “ゲノミクスと計算科学の手法によるノロウイルスGII/4 進化様式の解析 “ 第85回日本感染症学会総会 ワークショップ 2011年4月21-22日 東京

3). **Motomura, K.**, Yokoyama, M., Oka, T., Katayama, K., Noda, M., Tanaka, T., Sato, H., Norovirus Surveillance Group of Japan. “ Structural dynamics of norovirus GII.4 genome in nature” 15<sup>th</sup> International Union of Microbiological Sciences, Virology Division

2011 Sep. 12<sup>th</sup>-16<sup>th</sup> Sapporo

H. 知的財産権の出願・登録状況

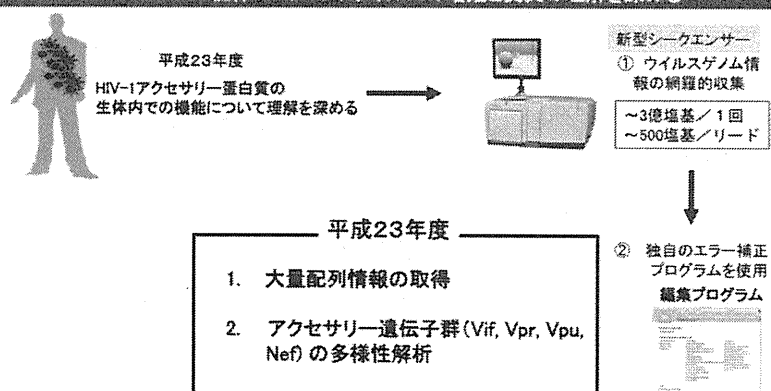
4). 本村和嗣 “2006-2011年シーズンに国内で流行したノロウイルスの全長ゲノム解析” 平成23年度 地方衛生研究所全国協議会近畿支部 ウイルス部会研究会 教育講演 2011年9月30日 奈良

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

### 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

国立国際医療センター(湯永博之 先生)との共同研究

【目的】 感染者体内のHIVゲノム情報を包括的に解析し、  
個体レベルでのウイルスの増殖と変異の理解を深める



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 宿主指向性、感染力、増殖能の決定因子の解析

研究分担者 野間口雅子（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部）

研究要旨

我々は、HIV-1 病原性発現機構の実験的解析を目指し、サル細胞・個体での増殖に適した HIV-1 の構築に取り組んでいる。この過程で、IN-C 末端領域 (CTD) と Gp120 とにウイルス増殖を促進する適応変異を見出した。本研究では、IN-CTD 変異によるウイルス増殖能の向上について分子ウイルス学的解析を行った。その結果、IN-CTD 変異がアミノ酸配列ではなくコドン配列依存的にウイルス産生量をコントロールすることによって増殖力に影響を及ぼすことが分かった。適応変異は IN-CTD の狭い領域内 (N222~V234) で認められた。この領域の HIV-1/SIVcpz シークエンス (192 個) の比較解析は、アミノ酸配列の保存性とコドン配列の偏向性を明確に示した。さらに、ウイルス学的解析から、コドン出現頻度とウイルス増殖能が相関するサイトが存在することを見出した。このことは、この領域内のコドン配列がウイルスの増殖力と密接に関連している可能性を示唆する。

一方、サル TRIM5 $\alpha$  は細胞でのウイルス増殖を規定する。本因子の抑制を回避するため、主として structure-guided mutagenesis を用いて HIV-1 CA 改変体を 88 種作製した。アカゲザル細胞株 M1.3S でウイルス増殖効率が促進された改変体を選択した。ウイルスクローンにおける増殖効率の増強は、TRIM5 $\alpha$  回避能の向上と非常に良く一致していた。本研究におけるサル TRIM5 $\alpha$  抵抗性 HIV-1 CA 構築の成功は、HIV-1 と TRIM5 $\alpha$  との相互作用の理解のみならず、HIV-1 感染サルモデルの確立に大きく貢献する。

A. 研究目的

HIV-1 は宿主域が狭く、適切な感染・発症動物モデルが存在しない。HIV-1 の病原性発現機構の解明や新規抗エイズ戦略の開発のためには、実験用霊長類 (カニクイザルやアカゲザル) に感染できるサル指向性 HIV-1 の構築が欠かせない。この構築過程で得られるウイルス学・分子生物学的情報は、HIV-1 の宿主指向性や増殖能に関わる責任領域や変異を理解する上で重要な知見を提供する。

プロトタイプサル指向性 HIV-1 (NL-DT5R : PNAS 103:16959-16964, 2006; J Virol 81:11549-11552, 2007) の増殖効率向上を目指し、サル細胞でのウイルス馴化を試みた結果、IN-CTD と Gp120 とに増殖を促進する適応変異を見出した。再馴化実験において、これらの変異は再現性をもって出現し、IN-CTD と Gp120 内の適応変異が HIV-1 増殖能増強に強

く関連していることが示された。IN-CTD 変異は、ヒトおよびサル細胞で増殖促進効果を示し、HIV-1 自体の増殖効率向上に寄与していると考えられる (論文投稿準備中)。本研究では、IN-CTD 変異による増殖効率の向上について分子ウイルス学的に解析することを目的とした。

一方、サル細胞には HIV-1 複製を強く抑制する因子である TRIM5 $\alpha$  が存在する。TRIM5 $\alpha$  は CA をターゲットとして作用する。我々は、これまでに HIV-1 CA 改変によりサル細胞・個体での増殖が向上していくことを観察している (Retrovirology 6: 70, 2009; Microbes Infect 13: 58-64, 2011, 論文投稿準備中)。しかし、これまでに作製したサル指向性 HIV-1 CA は、サル TRIM5 $\alpha$  に対して未だ高い感受性を有する。そこで、本研究では、サル TRIM5 $\alpha$  抵抗性 HIV-1 CA の構築を目指した。

## B. 研究方法

1. ウイルスゲノムの改変とシークエンスの確認は定法に従った。
2. ウイルスストックの調製は、ヒト293T細胞へのトランスフェクション（リン酸カルシウム法）により行った。感染実験にはカニクイザルHSC-F細胞、アカゲザルM1.3S細胞とヒトMT4/R5細胞（大阪大学微生物病研究所の塩田達雄教授、中山英美博士より分与）を用いた。サル細胞でのウイルス感染実験はIL-2存在下で行った。ウイルス量は培養上清中の逆転写酵素（RT）活性により測定した。
3. HIV-1 CA改変のためのstructure-guided mutagenesisは国立感染症研究所・病原体ゲノム解析センターの佐藤裕徳博士および横山勝博士との共同研究として行われた。
4. HIV-1 CA改変体のサルTRIM5 $\alpha$ 抵抗性試験は、大阪大学微生物病研究所の塩田達雄教授、中山英美博士および河野健博士との共同研究として行われた。

### （倫理面への配慮）

ヒト由来臨床材料を使用する研究や動物実験は行なわない。組換えDNA実験は徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会（委員長足立昭夫教授）の承認を得て行なう。「キメラゲノムによるHIV-1の分子遺伝学的研究」をする間に執る拡散防止措置については文部科学大臣の確認が得られている（21受文科振第935号）。

## C. 研究結果

1. IN-CTD適応変異（N222K、F223Y、D229EおよびV234I）はウイルス学的解析の結果、IN機能が必須の前期過程には影響せず、ウイルス産生量の増強によりウイルス増殖効率を向上させることが分かった。また、適応変異以外のアミノ酸に置換してもウイルス産生量の増強が認められることから、アミノ酸特異的なものではないと考えられた。
2. 上述の4つのIN-CTD適応変異について、

アミノ酸を維持しコドンを変更した結果、V234Iでは使用コドン（3種）によってウイルス産生量が変動することが分かった。

3. IN-CTD適応変異は狭い領域内（N222-V234）に認められた。この領域について、HIV-1/SIVcpzのシークエンスを比較した（the HIV Sequence Compendium 2010；Los Alamos National Laboratory, <http://www.hiv.lanl.gov>）。アミノ酸配列は高度に保存されているが、使用コドンには著しい偏りがあることが分かった。コドン出現頻度は、ヒト、サルやHIV-1の頻度（かずさDNA研究所）とは相関しなかった。興味深いことに、INの234番目のアミノ酸はVよりはIを持つウイルスが多く、また、VまたはIでの出現頻度が高いコドン配列を持つウイルスは、頻度が低いものに比べて増殖能が高かった。さらに、F223、Y226やP233においても使用コドンによってウイルス増殖能が変動することを明らかにした。これらの結果は、IN-CTD領域がアミノ酸配列ではなく、コドン依存的にウイルス増殖能に影響を及ぼすことを示している。
4. サルTRIM5 $\alpha$ の抑制を回避するためHIV-1 CAの改変を試みた。HIVとSIVのアミノ酸配列比較と構造学的比較解析に基づき、HIV-1 CAのアミノ酸をSIVmac239型に置換した。多様なHIV-1 CA改変体を88個作製した。HIV-1 CA改変体は、アカゲザルM1.3S細胞での増殖効率を指標にスクリーニングした。M1.3S細胞で効率良く増殖するウイルスクローンを選択した。この新型サル指向性HIV-1は、従来型のサル指向性HIV-1と比較して、サルTRIM5 $\alpha$ 抵抗性が著しく増加していることが分かった（図）。

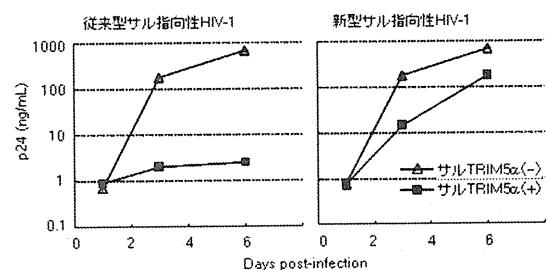


図. サル指向性HIV-1のTRIM5 $\alpha$ 抵抗性



#### D. 考察

ウイルス増殖能をコドン依存的に増強するIN-CTD変異は、サル細胞でのウイルス馴化により得られた。このことは、ウイルスがアミノ酸レベルではなく、核酸レベルでも適応・進化しうることを示唆しており、HIV-1の変異が増殖能に及ぼす影響に関する新しい情報を提供する。IN-CTD変異によるコドン配列依存的なウイルス産生増強機構の解明は、今後の課題である。

本研究での改変により、サルTRIM5αに強い抵抗性を示すHIV-1 CAの構築に成功した。これにより、サルTRIM5αの抑制回避に寄与する4つのアミノ酸を同定できた。ただし、SIVmac239 CAは、より高いサルTRIM5α抵抗性を示しており、現HIV-1 CAもまだ改変の余地があるかもしれない。CA改変にあたり、構造学的解析は非常に有効であった。今後のサル指向性HIV-1改変においてもウイルス学的解析と構造学的解析を組み合わせ大きな成果につなげたい。

#### E. 結論

本研究におけるIN-CTD変異やTRIM5α抵抗性HIV-1 CAの構築から、HIV-1の増殖能や宿主指向性に関与する責任領域や変異が特定できた。TRIM5α抵抗性HIV-1 CA構築は、CAとTRIM5αとの相互作用や抑制メカニズム解明の進展に寄与するとともに、HIV-1感染サルモデルの確立にも大きく貢献すると期待される。

#### F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし。
2. 新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nomaguchi, M., and Adachi, A. HIV-1 Vpr and G2 cell cycle arrest. *Future Microbiology* 6: 375-378, 2011.
- 2) Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. Rhesus M1.3S cells suitable for biological evaluation of macaque-tropic HIV/SIV clones. *Frontiers in Microbiology* 2: 115. doi: 10.3389/fmicb. 2011.00115, 2011.
- 3) Nomaguchi, M., Fujita, M., and Adachi A. The fourth major restriction factor against HIV/SIV. *Frontiers in Microbiology* 2:132. doi: 10.3389/fmicb.2011.00132, 2011.
- 4) Adachi, S., Adachi, A., and 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.
- 5) Nomaguchi, M., Doi, N., Fujiwara, S., and 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.
- 6) Miyazaki, Y., Miyake, A., Nomaguchi, M., and Adachi, A. Structural dynamics of retroviral genome and the packaging. *Frontiers in Microbiology* 2: 264. doi:10.3389/fmicb.2011.00264, 2011.
- 7) Saito, A., Kono, K., Nomaguchi, M., Yasutomi, Y., Adachi, A., Shioda, T., Akari, H., and Nakayama, E.E. Geographic, genetic, and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *Journal of General Virology*, in press.

##### 2. 学会発表等

- 1) Takahashi, N., Saito, A., Nomaguchi,

- M., Adachi, A., Akari, H., and Matano, T. Viral recovery from cynomolgus macaques controlling a simian-tropic HIV-1 challenge. XV International Congress of Virology, Sept. 13, 2011, Sapporo, Japan.
- 2) Saito, A., Nomaguchi, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Yoshida, T., Yasutomi, Y., Matano, T., Adachi, A., and Akari, H. Genotypic variation of cynomolgus monkey trim5alpha determines the susceptibility to monkey-tropic HIV-1 infection. XV International Congress of Virology, Sept 15, 2011, Sapporo, Japan.
- 3) 高橋尚史、齊藤 暁、野間口雅子、松岡佐織、足立昭夫、明里宏文、俣野哲朗：サル指向性HIV-1感染慢性潜伏期のカニクイサルからの感染性ウイルスの回収. 第25回日本エイズ学会学術集会、2011年11月30日、東京.
- 4) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫：Gag-CAおよびVpuの改変によるサル細胞でのHIV複製の増強. 第25回日本エイズ学会学術集会、2011年12月1日、東京.
- 5) 齊藤 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回日本エイズ学会学術集会、2011年12月2日、東京.
- 3) 高橋尚史、齊藤 暁、野間口雅子、松岡佐織、足立昭夫、明里宏文、俣野哲朗：サル指向性HIV-1感染慢性潜伏期のカニ

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  
研究分担者 梁 明秀（横浜市立大学医学部微生物学）

**研究要旨**

I型インターフェロン（IFN）によって発現誘導されるタンパク質には、HIV複製を顕著に抑制する Restriction factor と呼ばれる因子群が存在する。しかしながら、いくつかのウイルスタンパク質は Restriction factor を不活性化することで効率的なウイルス複製を実現している。一方でこのようなウイルスタンパク質が IFN 刺激によってどのような細胞内制御・修飾を受けるかについてはほとんど明らかになっていない。そこで本研究では IFN による抗 HIV 作用に関与する分子ネットワークを解明し、ウイルス-宿主相互作用の新規治療標的としての有用性を検討する。本年度はとくにウイルスタンパク質 Vpu の翻訳後修飾を制御する IFN 誘導性因子 SCYL2 について、I 型 IFN の抗 HIV 活性におけるエフェクター因子としての役割について報告する。

**A. 研究目的**

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染細胞内におけるウイルス-宿主因子間の相互作用は、ウイルスの効率的な産生と感染伝播に不可欠である。HIVに感染した個体では、生体防御機構の一つとしてI型インターフェロン（IFN）が分泌されるが、HIVはこれを巧みに回避することでその複製を維持することができる。I型IFNは細胞種に依存して強い抗HIV活性をもつが、その詳細な分子機構については不明な点が多い。近年、IFN誘導性の生体防御因子（Restriction factor）としてAPOBEC3G, BST2, SAMHD1が同定され、IFNによる抗HIV機構の一端が明らかとなってきた。しかしながら、HIVはアクセサリータンパク質 Vif, Vpu, Vpx の働きによって、Restriction factorをそれぞれ不活性化し、効率的なウイルス複製を実現している。そこで本研究は、アクセサリータンパク質と Restriction factorの相互作用に着目し、それを取り巻く分子ネットワークを解明することで、この相互作用の新規治療標的としての有用性を検討する。

I型IFNでその発現が誘導されるBST2（Tetherin）はN端側に膜貫通部位をC末端側にGPIアンカーを有するユニークな構造の膜タンパク質であり、HIV感染細胞から産生された子孫ウイルスを細胞膜で繫留し、その放出を顕著に抑制するRestriction factorとして2008年に報告された。しかしながらHIV-1感

染細胞では、Vpuが細胞表面のBST2を減少させ、ウイルスを効率的に細胞から放出させている。我々は昨年度までにVpu結合因子としてSCYL2を新規に同定した。SCYL2は脱リン酸化酵素PP2AをVpuにリクルートすることでその機能的リン酸化を阻害し、結果としてBST2の抗HIV活性を亢進させる働きがあることを報告した。本年度はSCYL2の機能を更に詳細に調べるとともに、発現制御機構とI型IFNによる抗HIV作用との関連性についても調べ、SCYL2が生体内におけるHIV複製やエイズ発症にどのような役割を果たしているかについて検討した。

**B. 研究方法**

SCYL2 の同定についてはコムギ無細胞タンパク質合成系とアルファスクリーンを用いた相互作用アッセイ系、データマイニングによるクラスター解析を用いた（昨年度に報告済み）。Vpu と SCYL2 との相互作用は免疫沈降法、GST プルダウン法を用いた。リン酸化 Vpu は、Phos-tag 又はリン酸化特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。タンパク質の安定性は、Vpu 遺伝子導入細胞にシクロヘキシミド処理し一定時間おきに細胞を回収しウェスタンブロット法により判定した。ウイルス感染実験では、バイオセーフティレベル3 実験室にて感染性 HIV 粒子もしくは VSV-G シュードタイプした HIV 粒子を用いて至適 MOI で感染させた。

## C. 研究結果

### 1. HIV-1 Vpu 結合因子 SCYL2 のクラスリン依存的功能

SCYL2 は N 末端にキナーゼ様ドメイン、C 末端にクラスリン結合ドメインをもつが、Vpu との相互作用には N 末端側が重要であることを免疫沈降法により確認した。しかしながら、SCYL2 の Vpu 脱リン酸化およびウイルス粒子産生阻害作用には N 末側、C 末側いずれのドメインも重要であった。このことから SCYL2 の機能発現におけるクラスリンの関与が示唆された。クラスリン特異的 siRNA を導入した HeLa 細胞では SCYL2 が Vpu と共局在せず、Vpu の脱リン酸化作用が見られなくなったことから、クラスリン依存経路が SCYL2 の機能発現に不可欠であることが示唆された。

### 2. SCYL2 による Vpu 脱リン酸化のウイルス学的意義

SCYL2 は Vpu の細胞質ドメインに存在する、2 つのよく保存されたセリン残基 (Ser52, Ser56) の脱リン酸化を促進することは昨年度既に見いだされていたが、そのウイルス学的意義について更に検討した。野生型 Vpu と Ser52, Ser56 を Ala に置換した Vpu 変異体の細胞内における局在と安定性を比較したところ、局在に関しては両者に有意な差は見られなかったものの、安定性については変異型 Vpu が野生型 Vpu よりも安定であることが分かった。シクロヘキシミドを用いたアッセイにより、野生型 Vpu の半減期が約 2 時間なのに対し、変異型 Vpu は 4 時間以上安定的に存在することが分かった。また、Ser52, Ser56 の責任キナーゼであるカゼインキナーゼ II に対する阻害剤を処理した場合においても Vpu の安定性が向上したことから、Vpu の Ser52, Ser56 のリン酸化/脱リン酸化の制御が、直接的にその安定性にも関与することが示唆された。

### 3. SCYL2 の発現制御機構の解明

T 細胞を含むさまざまな細胞株に I 型 IFN 処理したところ、その 2 時間後から 6 時間後にかけて SCYL2 mRNA の発現が上昇することが分かった。種々のヒト T 細胞株に IFN  $\alpha$ 、IFN  $\beta$ 、IFN  $\gamma$ 、TNF  $\alpha$  を投与後、各時間で細

胞を回収し、SCYL2 の発現を RT-PCR 法にて解析した。定量的 PCR の結果、I 型 IFN 処理後 6 時間後の細胞において、SCYL2 mRNA はコントロール mRNA に比べて約 3.5 倍の亢進が見られた。またタンパク質レベルでは約 3 倍の上昇が見られた。SCYL2 の 5'-UTR を用いたジーンレポーターアッセイの結果、SCYL2 のプロモーター活性は I 型 IFN によって約 4 倍の上昇することが確認された。これらの結果から、SCYL2 は I 型 IFN 誘導性タンパク質の 1 つであることが分かった。

### 4. I 型インターフェロン-SCYL2 axis による HIV 複製制御機構の解明

次に、IFN による抗 HIV 作用における SCYL2 の機能について考察した。HIV-1<sub>NL4.3</sub> を感染させた T 細胞に I 型 IFN 処理を行い、細胞内での SCYL2 量と Vpu のリン酸化状態を調べたところ、IFN 処理後では、細胞内の SCYL2 量が増加しており、Vpu の脱リン酸化が促進されていた。この脱リン酸化が SCYL2 によるものであることを確認するため、SCYL2 特異的 siRNA を導入した T 細胞を用いて上記と同様の実験を行った。その結果、SCYL2 をノックダウンした T 細胞では、IFN 処理後も Vpu の脱リン酸化が起これなかった。また、IFN 処理によって BST2 が誘導されたにも関わらず、その抗 HIV 活性は SCYL2 のノックダウンによって阻害されることが分かった。これらのことより、SCYL2 は I 型 IFN による抗 HIV 活性の一端を担っていることが示唆された。

## D. 考察

I 型 IFN のもつ抗ウイルス作用の分子機構については現在もなお未解明な点が多い。本研究では BST2 と同様に I 型 IFN によって発現誘導される Vpu 結合因子 SCYL2 が、IFN の抗 HIV 活性の一端を担っていることを明らかにした。さらに、SCYL2 は Vpu の脱リン酸化だけでなく、安定性にも寄与していることが分かった。Vpu は感染細胞内では極端にその量が少ないことが知られており、なんらかの形でリサイクルされることが示唆されていた。本研究結果から、リン酸化 Vpu は細胞内で不安定なため、脱リン酸化することでその安定性を維持する可能性がある。し

かしながら脱リン酸化 Vpu は、BST2 のダウンレギュレーションが出来ない不活性型であるため、ウイルスは Vpu の安定化 (活性型) と不安定化 (不活性型) を巧みに調節することによって、Vpu をリサイクルしている可能性が考えられる。またこのことは、なぜウイルスが SCYL2 に対する抵抗的手段を進化の過程で身につけなかったかを解明する足がかりになる。一方で、Vpu は BST2 をダウンレギュレーションするために、クラスリン依存的経路を用いることが報告されている。SCYL2 はもともとクラスリン被膜に存在する膜輸送関連タンパク質であることから、Vpu は近隣の SCYL2 をハイジャックすることによって、脱リン酸化するように進化したのかもしれない。

また近年、Vpu のリン酸化非依存的な BST2 ダウンレギュレーション経路が報告されている。SCYL2 は Vpu の脱リン酸化を促進することでその安定性を向上させるため、間接的にリン酸化非依存的経路にも影響を与えている可能性がある。また SCYL2 の他にも Vpu-BST2 の機能的相互作用を調節する因子の存在も示唆される。

I 型 IFN によって、細胞側因子だけでなくウイルスタンパク質も質的に変化するという事象は、本研究によって初めて見いだされたものである。HIV 感染者では IFN だけでなくさまざまなサイトカインストリームが起こっているため、今後は宿主因子研究の場においても、その因子の発現や機能が感染の過程でどのように制御されるかを検討することが必要である。

## E. 結論

SCYL2 は I 型 IFN がもつ抗 HIV 活性の一端を担うエフェクター因子であり、I 型 IFN 存在下において HIV-1 Vpu の翻訳後修飾および安定性の制御に関わる新たなシグナル経路を解明した。今後は HIV の進化にともなう、Vpu と SCYL2 の関係性や、生体内における SCYL2 の抗ウイルス活性について考察していく必要がある。

## F. 知的所有権の取得状況

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) 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.* 286:10051-10057, 2011.
- (2) Nomura W, Masuda A, Ohba K, Urabe A, Ito N, Ryo A, Yamamoto N, Tamamura H: Effects of DNA Binding of Zinc Finger and Linkers for Domain Fusion on Catalytic Activity of Sequence-Specific Chimeric Recombinases Determined by a Facile Fluorescent System. *Biochemistry.* 2011.in press.
- (3) 梁明秀, 宮川 敬: HIV 感染と宿主因子～エイズ制圧にむけて. *Yokohama Medical Journal* 62: 35-41, 2011.
- (4) 宮川 敬, 梁明秀: 宿主防御因子 Tetherin とウイルスの攻防. *The Japanese Society for AIDS Research* 14: 2012, 印刷中.

### 2. 学会発表等

- (1) K Miyakawa, M Nishi, N Yamamoto, A Ryo: The Tumor Suppressor APC Regulates HIV-1 Assembly and Release. IUMS 2011 International Congress of Virology, Sapporo, Sep 11-16, 2011, Sapporo, Sep 11-16, 2011.
- (2) Matsunaga S, Furukawa A, Kojima Y, Morishita R, Sawasaki T, Takaori-kondo A, Sugiura W, Katahira M, Ryo A: An in vitro cleavage assay system for XMRV protease by wheat-germ cell free protein production. IUMS 2011 International Congress of Virology, Sapporo, Sep 11-16, 2011.
- (3) Kanuma T, Kudoh A, Jounai N, Takeshita F, Sawasaki T, Ryo A: Immune evasion by HIV-1 protease-mediated cleavage of TBK1. IUMS 2011 International Congress of Virology, Sapporo, Sep 11-16, 2011.
- (4) Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Kimura H, Yamamoto N, Guatelli J, Ryo A: Identification of SCYL2 as an interferon-inducible antagonist of HIV-1 Vpu. 6th German-Japanese HIV Symposium, Ruhr-Universität Bochum, German, Nov 21-22, 2011.
- (5) Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Sugiura S, Sato H, Ryo A: An in vitro cleavage assay system for retrovirus protease by wheat germ cell-free protein production. 6th German-Japanese HIV Symposium, Ruhr-Universität Bochum, German, Nov 21-22,

2011.

(6) 松永智子, 澤崎達也, 小島良績, 森下 了, 佐藤裕徳, 大出裕高, 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7月28~29日, 新潟.

(7) 宮川 敬, 澤崎達也, 松永智子, 山本直樹, 梁 明秀: Posttranslational modification of HIV-1 Vpu in an innate antiviral response. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会, 2011年11月30日~12月1日, 東京.

### III. 協力研究報告書

HIV 粒子に存在する蛋白質の構造と機能

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

**研究要旨** 本研究では、HIV 粒子を標的としたプロテオーム解析によって得られる翻訳時・翻訳後修飾情報から HIV 感染初期過程の解明を試みた。これまでに、HIV Capsid (CA) タンパク質の Ser<sub>16</sub> におけるリン酸化を見出し、このリン酸化が脱殻過程において機能していることを示した。本年度は、このリン酸化は、HIV が感染細胞より出芽する際に取り込まれる宿主細胞由来のキナーゼによって触媒され、HIV CA の Ser<sub>16</sub> 特異的なリン酸化が、宿主細胞内ではなく出芽後のウイルス粒子内で生じ、Pr55<sup>gag</sup> のプロセシングの過程で生じることを明らかにした。現在までに、*in vitro* キナーゼアッセイによって候補宿主細胞由来キナーゼを特定し、そのキナーゼの阻害剤を処理した持続感染細胞から精製したウイルスは、感染価が低下し、粒子内におけるリン酸化の程度も減少していた。これらの知見は、HIV 脱殻過程の分子制御機構を解き明かすことに役立つと考えられる。

A. 研究目的

本研究は、HIVのライフサイクルにおいていまだ十分明らかにされていない感染初期過程を明らかにすることであり、得られた結果をもとに、新しいHIV制御法の開発に活かすことを目的としている。なお、本研究は、「HIVの構造、増殖、変異に関する研究」(主任研究者:佐藤裕徳先生)の協力研究として行われたものである。

一旦HIV DNAが宿主DNAに組込まれてしまうと、HIVを宿主から排除することは非常に困難であるため、HIV感染初期過程を制御する機構を明らかにすることは、HIV感染症を克服するために重要な情報を提供することになると考えられる。HIV-1粒子を構成するプロテオームは、その機能の多様化のために翻訳後修飾を受ける事が知られており、それらについて詳細に解析する事は、HIV感染初期過程を制御する機構を明らかにする上で必要であると考えられる。

B. 研究方法

1) Peptide mass fingerprint (PMF) 法およびPost source decay (PSD)・MS/MSによる蛋白質の同定・解析

タンパク質の同定および翻訳後修飾部位の同定は、酵素消化物のMALDI TOF-MSによる質量分析及び、データベース検索とともに、ESI-Q-TOFによる酵素消化産物のMS/MS

解析を行った。

2) リン酸化アッセイ

野生型、およびsaquinavir (SQV)を持続感染細胞に処理し調製した未成熟ウイルスを可溶化し、種々の抗体(anti-p24 mAb , HIV positive plasma , anti-phospho Ser<sub>16</sub> mAb)を用いてwestern immunoblotting analysisを行った。

3) *in vitro*キナーゼアッセイ

HIV CA コアの Ser<sub>16</sub>-Pro<sub>17</sub>モチーフを含む12残基のペプチドを合成し、*in vitro* キナーゼアッセイを行った。組換えkinaseをペプチド基質らと混合後、リン酸化されたペプチドフラグメントを質量分析によって検出した。

4) ウイルス感染価測定

候補キナーゼに対する阻害剤を持続感染細胞に処理し、産生されたウイルス粒子の感染価を、TZM-bl 細胞を用いて評価した。

C. 研究結果

HIVは感染細胞より出芽する際に、宿主細胞由来のキナーゼをウイルス粒子内に取り込む。その後、HIV CAのSer<sub>16</sub>特異的なリン酸



化が、宿主細胞内ではなく出芽後のウイルス粒子内で生じ、Pr55 <sup>Gag</sup>のプロセッシングの過程で生じることがわかった (Fig. 1)。

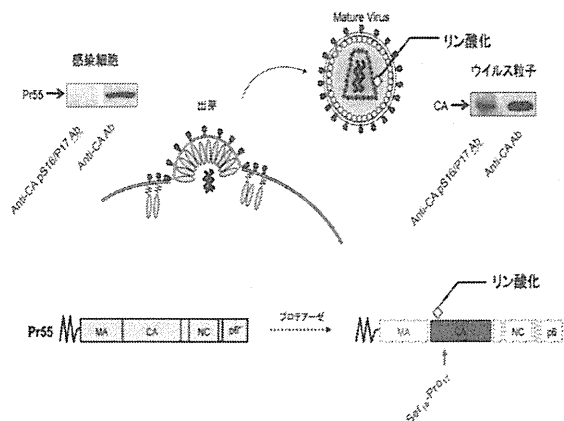


Fig. 1 Ser<sub>16</sub>-Pro<sub>17</sub>モチーフは感染細胞内でリン酸化を受けず、ウイルス粒子内でリン酸化を受ける

HIV proteaseの活性中心に変異を入れ活性をなくした変異体ウイルスでは、Ser<sub>16</sub>がリン酸化を受けないことも明らかにしている。

さらに、*in vitro*キナーゼアッセイによって候補キナーゼを見いだした。候補換えkinaseとSer<sub>16</sub>を含むペプチド基質を混合後 (Fig. 2)、キナーゼアッセイを行い、Ser<sub>16</sub>のリン酸化に関するキナーゼを明らかにした。

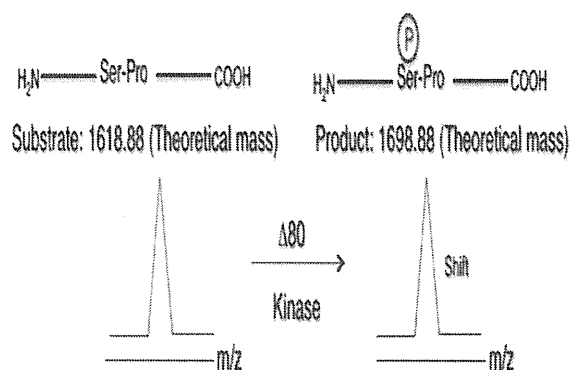


Fig. 2 *in vitro*キナーゼアッセイ

*in vitro*キナーゼアッセイによって明らかにすることができたキナーゼの阻害剤を処理した持続感染細胞から精製したウイルス

は、Ser<sub>16</sub>のリン酸化が低下していた (Fig. 3)。さらに、そのウイルスの感染価は低下していた (Fig. 4)

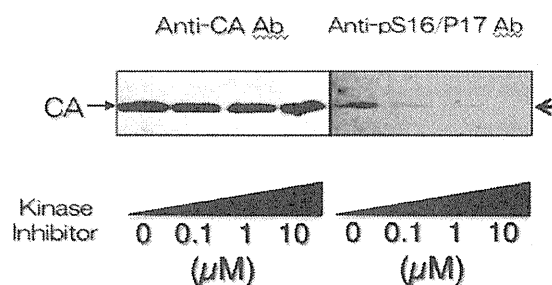


Fig. 3 ウイルス粒子内の Ser16 リン酸化の阻害

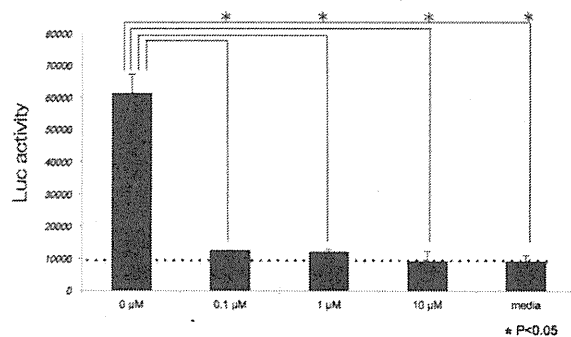


Fig. 4 Kinase 阻害剤は HIV 感染を阻害する

#### D. 考察

HIVゲノムは、わずか20種足らずのタンパク質をコードしているにすぎない。そのためウイルス複製に必要なそれらの機能を発現するために翻訳時修飾・翻訳後修飾を利用していると思われる。したがって、HIV複製機構を明らかにするには、ウイルスゲノムレベルの解析だけでは不十分であるといえる。研究協力者は、HIV粒子プロテオーム解析により、複製に関与する未知の翻訳時修飾・翻訳後修飾をつきとめ、真のHIV複製機構を明らかにしたいと考えている。これまでに、明らかにしてきたCAのSer<sub>16</sub>リン酸化は、ウイルス粒子内で宿主由来のkinaseによってプロセッシングの過程でリン酸化を受けることを明らかにできた。この酵素がどのようにウイルス

粒子内に取り込まれるかを含め、解析を進めている。また、このキナーゼに対する阻害剤を用いることで、Ser<sub>16</sub>のリン酸化が抑制され、ウイルスコアの脱殻がうまく進まないために感染価が低下すると考えている。

## E. 結論

- 1) HIVが感染細胞より出芽する際に取り込まれる宿主細胞由来のキナーゼによってHIV CAのSer<sub>16</sub>リン酸化が触媒される。
- 2) Ser<sub>16</sub>リン酸化は、宿主細胞内ではなく出芽後のウイルス粒子内で生じ、Pr55<sup>gag</sup>のプロセシングの過程で生じる。
- 3) *in vitro*キナーゼアッセイによって候補宿主細胞由来キナーゼを特定できた。
- 4) 特定できたキナーゼの阻害剤を処理した持続感染細胞から精製したウイルスは、粒子内におけるリン酸化の程度が減少していた。
- 5) 特定できたキナーゼの阻害剤を処理した持続感染細胞から精製したウイルスは、感染価が低下した。

## F. 知的所有権の取得状況

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nishi, K., Komori, H., Kikuchi, M., Uehara, N., Fukunaga, N., Matsumoto, K., Watanabe, H., Nakajou, K., Misumi, S., Suenaga, A., Maruyama, T., Otagiri, M., Characterization of the hepatic cellular uptake of  $\alpha(1)$ -acid glycoprotein (AGP), part 1: A peptide moiety of human AGP is recognized by the hemoglobin  $\beta$ -chain on mouse liver parenchymal cells. *J. Pharm Sci.*, (2011) doi: 10.1002/jps.22804.
2. Misumi, S., Biochemical analyses of HIV-1 uncoating process based on proteome

analysis. *Seikagaku*, (2011) 83, 846-850

### 2. 学会発表等

- (1) 三隅将吾、井上睦美、堂地起生、岸本直樹、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三：HIV-1脱殻プロセスに関する研究  
平成23年度 日本生化学会九州支部例会講演要旨集 p.43 2011年5月21-22日(土・日)、久留米。
- (2) 三隅 将吾、井上 睦美、堂地 起生、岸本直樹、高宗 暢暁、杉本 幸彦、庄司 省三：宿主因子によるHIV-1脱殻過程の制御. 第84回日本生化学会大会、2011年9月21-24日(水・土)、京都。
- (3) 堂地 起生、高宗 暢暁、杉本 幸彦、庄司 省三、三隅 将吾：翻訳後修飾を標的とした脱殻制御機構に関する解析. 第10回 次世代を狙う若手ファーマバイオフォーラム PBF2011、2011年10月8-9日(土・日)、仙台。
- (4) 岸本直樹、鬼塚彩乃、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾：プロテオーム解析によるHIV感染初期過程を制御する因子の探索. 第10回 次世代を狙う若手ファーマバイオフォーラム PBF2011、2011年10月8-9日(土・日)、仙台。
- (5) 岸本直樹、鬼塚彩乃、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾：HIV粒子プロテオーム解析に基づいた感染初期過程を制御する宿主因子の探索とIntegraseの翻訳後修飾. 第25回 日本エイズ学会学術集会、2011年11月30日-12月2日(水・金)、東京。
- (6) 堂地起生、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾：HIVキャプシドのSer<sub>16</sub>リン酸化による脱殻制御機構に関する解析. 第25回日本エイズ学会学術集会、2011年11月30日-12月2日(水・金)、東京。
- (7) 堂地起生、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾：HIV脱殻制御機構に関する解析. 平成23年度日本薬学会九州支部大会学術集会、2011年12月10日-11日(土・日)、福岡。

(8) 岸本直樹、鬼塚彩乃、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾：HIV粒子プロテオーム解析に基づいた感染初期過程を制御する因子の探索. 平成23年度日本薬学会九州支部大会学術集会、2011年12月10日-11日(土-日)、福岡.

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

薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法に関する研究  
（HIV ゲノム二量体化と組換えに関する解析）

研究協力者 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）

研究要旨 研究協力者はこれまでに、独自に構築した HIV ゲノム二量体化を効果的に検出できるシステムを用いて HIV 粒子内で実際に働く二量体化シグナル（DLS）の必要十分領域を同定している。しかしこの RNA 領域の取りうる二次構造として提唱されている BMH 型が *in vivo* で二量体化に働いている証拠は得られなかったため、その内部の塩基対形成について詳細な解析を行った。得られた結果を用いて計算機科学による RNA 構造モデリングを行った結果、全く新規の特異的高次構造をとっている可能性を強く示唆する結果を得た。この構造は抗ウイルス戦略における新たな標的として期待される。

#### A. 研究目的

HIV-1を含むレトロウイルスのポジティブ一本鎖RNAゲノムはウイルス粒子内で非共有的に結合して二量体を形成している。これは遺伝子組換えによって子孫に遺伝的多様性をもたらし、また片方のゲノムが傷ついていた時の補償をすることで、生き残りに有利な状況を作り出していると解釈されている。したがってHIVゲノム二量体化及びゲノム組換えの機序の解明は、遺伝的多様性を主要な生き残り戦略としているHIVの制圧の端緒となり、ワクチン開発を実施する科学的基盤を提供する。

本研究で研究協力者は、HIVゲノム二量体化シグナル（DLS）の必要十分領域に着目し、その内部の塩基対形成について詳細な解析を行い、その高次構造に関して考察を行った。DLSに変異を導入した様々な変異体を作成し、分子生物学的手法あるいはウイルス学的手法を用いて解析を行った。

#### B. 研究方法

HIV-1プロウイルス型プラスミド pNL43 を母体としてすべての変異体を作成した。これまでに研究協力者が独自に同定した HIV 粒子内で実際に働く二量体化シグナル（DLS）の必要十分領域（144 塩基）を d2 断片と名付け、pNL43 の Env 領域に挿入した変異体 pDDNd2 を作成した。pDDNd2 を母体とし

て 5'側あるいは 3'側のパッケージングシグナル／二量体化シグナル(E/DLS)に様々な変異を導入した一連の変異体を作成し、二量体化能解析に用いた。

pNL43 の DLS 領域変異体を構築し、293T 細胞へのトランスフェクションにより変異体ウイルスを作成し、T 細胞系に感染させて増殖能の変化について観察した。

同じく変異体ウイルスを分離後生理的条件下でウイルス RNA を単離精製した。RNA に NMIA を作用させて化学修飾した後、プライマー伸長法を行うことにより RNA の二次構造マッピングを試みた。

上記の実験によって得られたデータを元に CentroidFold, MC-fold, MC-Sym, 等の構造予測プログラムを用いて RNA 高次構造のモデリングを行った

ウイルスの精製・感染・ノザンハイブリダイゼーション・プライマー伸長法・定量 PCR 等は定法に従って行った。

（倫理面への配慮）

倫理面への配慮を必要とする研究は行っていない。

#### C. 研究結果

これまでの解析により決定した HIV-1 の *in vivo* DLS 必要十分領域はわずか 144 塩基であった。この RNA 領域が取りうる二次構造としてステムが 4 つ並ぶ SL4 構造、クロ