

201226003A

平成24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24年度

総括・分担研究報告書

平成25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24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24年度

総括・分担研究報告書

平成25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 |
| 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 —Gp120の抗体耐性構造の研究— | 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感染抵抗性因子の構造機能解析 —TRIM5 α 感受性を規定するカプシド構造の研究— | 13 |
| 塩田 達雄 (大阪大学微生物病研究所) | |
| 3. HIV感染制御因子とその解除因子の構造機能解析 | 17 |
| —APOBEC3Cの相互作用表面構造の解明— | |
| 岩谷 靖雅 (名古屋医療センター 臨床研究センター) | |
| 4. HIVゲノム逆転写制御因子の構造機能解析 | 21 |
| —インテグラーゼの新規機能と機能構造の研究— | |
| 増田 貴夫 (東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科) | |
| 5. HIV転写制御因子の構造機能解析 —CycT1とTatの結合様式の研究— | 25 |
| 岡本 尚 (名古屋市立大学・医学研究科) | |
| 6. HIV宿主指向性、感染力、増殖能の決定因子の解析 | 29 |
| —インテグラーゼ変異による増殖促進機構の研究— | |
| 野間口 雅子 (徳島大学大学院・ヘルスマイオサイエンス研究部) | |
| 7. HIV-1ゲノムの核移行制御因子の構造機能解析 | 33 |
| —HIV-1 Vprを標的とする増殖阻害剤の研究— | |
| 間 陽子 (理化学研究所・分子ウイルス学特別研究ユニット) | |
| 8. HIV感染制御因子の構造機能解析 | 37 |
| —CA部分ペプチドの抗HIV作用の研究— | |
| 村上 努 (国立感染症研究所・エイズ研究センター) | |
| 9. 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 | 41 |
| —アクセサリタンパク質の翻訳後修飾に関わる宿主因子の研究— | |
| 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 ゲノム二量体化と組換えに関する解析…………… | 45 |
| —DLS 機能構造の研究— | |
| 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) | |
| 2. HIV-1 の生活環に関与する RNA ヘリケースの解析…………… | 49 |
| —P-body に局在する RNA ヘリケースの HIV-1 生活環における役割— | |
| 有海 康雄 (熊本大学 エイズ学研究センター) | |
| 3. HIV 脱殻過程に関する研究…………… | 53 |
| —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) | |
| 4. インターフェロン γ による HIV-1 増殖抑制メカニズムの解明…………… | 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 (2012) …………… | 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：H2 2-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：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）、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）、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 室長）、村上努（国立感染症研究所エイズ研究センター 室長）

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）、有海康雄（熊本大学 エイズ学研究センター 准教授）、三隅将吾（熊本大学・大学院生命科学研究所・薬学生化学分野 准教授）、久保嘉直（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染防御因子解析学研究室 准教授）横山勝（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）

本研究は、HIV の構造、増殖、変異の研究を通じて新たな治療標的を探索することを目的とした。最終年度の研究により、複数の治療標的候補となる構造や相互作用を見出した。まず HIV の抗 HIV 因子耐性構造の研究により、低荷電量 V3 をもつ Gp120 の outer domain 構造、並びにカプシド N 末構造が、それぞれ抗体耐性、Trim5 α 耐性の発現に関わり、ウイルスの増殖能維持に重要であることを示唆した。また、複製研究により、インテグラーゼ N 末 D-form 構造、Vpr/核輸送担体 NPI-1 相互作用、Tat/CycT1 相互作用は、HIV 複製の初期反応や転写能の維持に関わることを明らかにした。さらに、抗 HIV 因子の解析により、抗 HIV 因子を新たな治療法開発に活用するための構造・機能情報を得た。今後、これら治療標的候補となる構造や相互作用についてさらに研究を進めることで、新たな HIV 増殖制御法の開発につなげたい。

1. 研究目的

HIV 感染症の制御は、国際社会の主要課題と位置づけられる。現在、多剤併用療法の普及により感染者のエイズ発症阻止が可能となった。しかし、HIV は高度に変異性で、薬剤耐性ウイルスの発生と伝播を完全に防ぐことは難しい。薬剤治療の有効性を保証し、感染の拡大を防ぐには、新たな抗ウイルス薬とワクチンの開発が極めて重要である。これらの開発には、HIV の生活環と構造の理解が不可欠となる。そこで本研究では、HIV の生活環と構造の重要な未解決課題の解明を主目的とし、成果を新たな HIV 制御法の開発研究につなげることをめざす。

HIV は、ヒトで増殖する際に自然・獲得免疫の標的となる。しかし、HIV は免疫を巧みに逃れ、種々の細胞蛋白質と相互作用しながら大量の子孫ウイルスを恒常的に産生し、持続感染を成立させる。この間、ウイルスの生存に必須の性質を維持するために、HIV 蛋白質の致命的構造変化をもたらす変異は淘汰されると推察される。HIV の生存に必須で変化の制約が強く働く構造が特定されれば、その構造は HIV の進化的な弱点となり、感染の予防・治療標的となりうる。HIV 蛋白質の必須機能としては、宿主免疫からの逃避に必須の機能、及びヒト細胞での複製に必須の機能が想定される。しかし、HIV の生活環には未だ不明な点が多く、ウイルスの生存に必須の機能、及びその機能発現に必要な構造と変化の許容度など、HIV

感染の予防・治療標的となりうる分子構造を解明するための基礎科学情報は不足している。

我々は、これら HIV の構造、増殖、変異に関わる未解決課題の解明、さらには HIV 感染の予防・治療標的となりうる構造の解明を目標として、計算科学 (Computational Science) の諸技術を活用した基礎ウイルス学研究を実施している。計算機を駆使して科学上の問題を解決する計算科学は、近年、実験/観測と理論の間を補間する第三の科学形態として急速に進展し、広範な分野で応用されている。計算科学を用いると、実験では難しい事象の解析が可能となる。例えば結晶構造解析ではわからない生理的条件下 (37°C、1 気圧、溶液中) での蛋白質構造の動的特性を近似できる。この情報は、個々の蛋白質に固有の物理化学的性質や生物学的機能の理解に役立ち、延いてはウイルスの性質や変化を構造レベルで理解するのに役立つ。その際、計算科学と実験科学が一体となり、予測と検証を効率的に進めることで、相乗効果が見込まれる。そこで本研究では、両者が連携して HIV の生活環と構造の未解決課題の解析を進めた。

2. 研究方法

分子生物学、ウイルス学、構造生物学、計算科学などの技術を併用する融合的アプローチにより、HIV の感染・増殖能や免疫逃避能を司る蛋白質の構造・機能を解析した。

H24年度は以下の研究を行った。

A. HIV 免疫逃避機構の構造生物学研究

(A-1) Gp120 構造の制御機構の解析 (佐藤)

HIV-1 の抗体抵抗性の発現機構の解明を目的として、Gp120 outer domain の分子動力学解析、中和実験、多様性解析を実施した。ホモロジーモデリングにより V3 組換え Gp120 outer domain の構造モデルを構築し、分子動力学法により 37°C、1 気圧、水溶液中の構造動態を 30ns 追跡した。経時的に得た 40,000 構造を用い、アミノ酸残基の平均構造と揺らぎを求め、V3 荷電量の変化が outer domain 構造と動的特性に及ぼす影響を解析した。MAGIC5 細胞を用いて V3 組換え HIV の抗体感受性を測定した。公共データベースの配列を用いて、V3 荷電量の異なる Gp120 グループの多様性を解析した。

(A-2) HIV 感染抵抗性因子の構造機能解析 (塩田)

TRIM5 α 感受性の HIV 側の決定基の解明を目的とした。HIV カプシドの変異が TRIM5 α 感受性に及ぼす影響を解析した。HIV-1 カプシドの構造をもとに変異カプシドの三次元構造を予測し、TRIM5 α による感染抑制を受けるカプシドの必要条件を抽出した (研究代表者と連携)。

(A-3) HIV 感染抵抗性因子の構造機能解析 (岩谷)

宿主の APOBEC3 (A3) ファミリー蛋白質の生体防御機構を活用した新たな抗 HIV-1 薬剤の開発につながる基礎情報の取得を目的とした。A3C 蛋白質を大腸菌で発現し、98%以上の純度に精製し、結晶化し、X線構造解析法により構造を決定した。Structure-guided mutagenesis により、HIV-1 Vif の結合に重要なアミノ酸残基を探索した。

B. HIV 複製機構の構造生物学研究

(B-1) HIV ゲノム逆転写制御因子の構造機能解析 (増田)

HIV-1 ゲノム逆転写におけるインテグラーゼの機能を規定するアミノ酸残基の特定を目的とした。分子動力学解析情報と NMR 構造解析情報に基づくインテグラーゼ変異体の作成と機能解析を行った (研究代表者と連携)。

(B-2) HIV ゲノムの転写制御因子の構造機能解析 (岡本)

HIV プロウイルスの転写制御の構造基盤解明を目的とした。Tat/P-TEFb 立体構造 (PDB ID: 3MI9) の CycT1 構造とホモロジーモデリングで予測した CycT1 の各種変異体の構造をもとに AMBER9 ソフトウェアにて分子動力学法シミュレーションを行った。

(B-3) HIV 宿主指向性、増殖能の決定因子の解析 (野間口)

HIV-1 馴化実験、及び構造解析情報に基づくサル TRIM5 α 抵抗性 HIV-1 Gag-CA の設計を行った。ウイルスの変異体作製や感染実験は定法に従った。HIV-1/SIVcpz 配列比較は、HIV sequence

compendium (Los Alamos National Laboratory, <http://www.hiv.lanl.gov>)を用いた (研究代表者と連携)。

(B-4) HIV ゲノムの核移行制御因子の構造機能解析 (間)

HIV-1 Vpr 蛋白質の機能解明と阻害剤探索を目的とした。H細胞生物学的手法等により Vpr の核移行能を制御する細胞因子を同定し、ケミカルアレイ法等により当該分子と Vpr との相互作用を阻止する低分子化合物を同定した。

(B-5) HIV の感染御因子の構造機能解析 (村上)

CA の N 末より 5 残基ずつオーバーラップさせて合成した 15 残基長 CA 部分ペプチド (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、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 の感染系で抗 HIV-1 活性を測定した。

(B-6) 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 (梁)

無細胞蛋白質合成法およびアルファスクリーニング法を用いた蛋白質相互作用スクリーニングにより、HIV アクセサリー蛋白質と相互作用する宿主因子の網羅的に同定した。当該候補因子についてウイルス学および生化学的手法を用いてウイルス複製や病原性発現における機能や役割を解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え生物等を用いる実験については、実施機関の承認、あるいは文部科学大臣の承認を得ている。

3. 研究結果

(A-1) V3 ループの荷電量が低下するだけで、Gp120 表面の受容体結合領域 (中和エピトープ領域) の構造と揺らぎが劇的に変化することを見出した。さらに、V3 ループの荷電量が低下すると、HIV は抗 V3 抗体や抗 CD4 結合部位抗体の中和作用に抵抗性となること、中和エピトープ領域のアミノ酸残基の多様性が減ずることを明らかにした。

(A-2) TRIM5 α 感受性の HIV 側の決定基はカプシドの L4/5、120 番目のアミノ酸、ならびに C 末端領域であることを明らかにした。

(A-3) 高分解能の A3C 蛋白質結晶構造を得た (ID# 3VM8 と 3VOW)。HIV-1 Vif への結合と分解に関与するアミノ酸残基 (10 残基) を同定した。この領域は負電荷に偏り、疎水性側鎖を中心とした“くぼみ”を形成していた。A3F および A3DE においても、対応する 10 残基は Vif 結合に重要であり、類似の“くぼみ”を形成していた。

(B-1) HIV-1 インテグラーゼのコンフォメーションを規定する残基 (Tyr15 と Asp25) を見いだした。Tyr15 と Asp25 の構造特性の維持は、ウイルスゲノム逆転写の進行に必須であることを明らかにした。

(B-2) CycT1 の Tat 結合に関与する領域 (H2' ヘリックス領域) が WT では動的変化を示すのに対し、変異型 CycT1 では WT ほど動的変化を示さなかった。また CycT1 内部の水素結合ネットワークが Tat 活性制御に重要であることを見出した。

(B-3) IN-CTD (222-234) の natural synonymous mutation は 1 塩基置換で HIV-1 粒子産生能/複製能を著しく増減させた。この増減がウイルスの前期蛋白質ではなく、後期蛋白質の発現と関連することを見出した。

(B-4) Vpr は importin α サブファミリーの NPI-1 のみで核に運ばれること、この過程に Imp α の核外輸送因子 CAS が関与することを明らかにした。Vpr と Imp α の結合阻害分子ヘマトキシリン誘導体 ($IC_{50}=1nM$, $CC_{50}>80.0\mu M$)、および Vpr に結合しマクロファージでの HIV 複製を阻害する SIP-1 誘導体 ($IC_{50}=0.5\mu M$, $CC_{50}=51.4\mu M$) を同定した。

(B-5) CA 部分ペプチドの fragment 15 が細胞膜透過性を付与することによって X4、R5 HIV-1 のいずれのウイルスに対しても $EC_{50} 1\mu M$ 以下で阻害活性を示した。CA 部分ペプチドの fragment 15 は CA の NTD と CTD の連結領域であり、HIV-1 コアのアセンブリー阻害の可能性がある。

(B-6) HIV 蛋白質 Vpu、Vif、Vpx と相互作用するリン酸化関連因子を多数同定した。バイオインフォマティクスを用いた分類および機能解析の結果、特に I 型インターフェロン誘導性因子 SCYL2 は Vpu の脱リン酸化を促進することで Vpu の抗 Tetherin 活性を抑制し、HIV 粒子産生を減少させることを明らかにした。

4. 考察

(1) Gp120 構造制御と中和抵抗性発現 : V3 ループには Gp120 の表面構造と動的性質を制御する能力があることがわかった。V3 ループの荷電量が低下すると、中和エピトープ領域の構造と揺らぎが変化し、エピトープマスキングにつながることを示唆された。自然界では主に低荷電 V3 をもつ HIV (R5 ウイルス) が維持されることから、この低荷電 V3 依存的な Gp120 構造の維持は HIV の持続感染に必要と考えられる。本知見は、HIV が中和抵抗性や CCR5 指向性を維持するために必要な Gp120 構造の解明につながる。さらには Gp120 を標的とする感染阻害剤やワクチン抗原を設計する際の重要な情報基盤となる。

(2) HIV 複製制御機構 : 以下が示唆された。A3C/A3F/A3DE と HIV-1 Vif の結合には静電的引

力が重要。HIV の TRIM5 α 感受性決定部位はカプシドの L4/5、120 番目のアミノ酸と C 末端領域。HIV-1 ゲノム逆転写促進を司るインテグラーゼ構造は、インテグラーゼの Tyr15 と Asp25 残基により制御される。インテグラーゼの塩基配列 (222-234) は HIV-1 遺伝子の発現を制御する。マクロファージにおける HIV 増殖には Vpr と importin α の相互作用が重要。CycT1 の Tat 結合部位構造の動的変化は、Tat の活性制御に重要。SCYL2 は Vpu 脱リン酸化を促進することで Vpu の抗 Tetherin 活性を抑制する。カプシド NTD と CTD の連結領域に類似するペプチドは HIV 増殖を阻害する。

5. 自己評価

1) 達成度について

概ね目指したレベルの研究成果を得た。計算科学を取り入れた研究アプローチの普及が進み、研究が加速し、実験のみでは難しい事象の解明が進んだ。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

A3C 結晶構造の解明は、A3 ファミリー蛋白質の構造機能比較と医学応用への道を切り開くもので、学術的意義が高い。HIV の免疫逃避と複製の構造生物学研究の成果は、計算科学とウイルス学研究が一体となることで得られたもので、国際的にも先進性が高い。これらの成果は、HIV の生活環と構造の理解に基づく薬剤・ワクチン開発への道を切り開くもので、社会的意義も高い。

3) 今後の展望について

本研究の成果をもとに予防・治療標的分子を絞り、計算科学と HIV 複製研究に加えて有機化学の技術を取り入れて、新しい治療薬やワクチン抗原の設計に結びつく研究を展開する。

6. 結論

計算科学の解析手法を取り入れて HIV の構造・増殖・変異を研究し、実験のみでは難しい事象の解明が進んだ。HIV の免疫耐性構造や複製に必須の構造が種々明らかになった。A3C の結晶構造を解明し、Vif 結合部位を明らかにした。これらの成果は、HIV の生活環と構造の理解に基づく新たな HIV 制御法を開発する端緒となるものと期待される。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

なし。

【協力研究】

本研究では、分担研究者とは異なる視点で HIV 複製研究を実施する 5 名の研究者に協力研究の実施を依頼した。

1. HIV ゲノム二量体化と組換えに関する研究

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）

（目的）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。

（方法）DLS に変異を導入した様々な変異体を作成し、二量体化能・パッケージング能・ウイルス増殖能・ゲノム組換え能等の解析を行った。

（結果）HIV-1 ゲノム二量体化能と組換え能の厳密な一致を初めて明らかにした。DLS 内にこれまでに報告のない長距離相互作用を見だし、新規 DLS 構造モデルを提唱した。また新規二量体結合面の存在を示唆して、二量体形成の素過程の考察を行った。

（考察）DLS の構造は粒子形成過程に伴い非常にダイナミックに遷移している可能性が考えられる。各ステップにおいて NC との相互作用が重要と考えられ、その作用機序の解明が急がれる。

（結論）HIV-1DLS に関して、機能構造的に様々な新発見を見出すことが出来た。今後も解析を続け、この領域を新規抗エイズ療法の標的とするための可能性を追求する。

2. HIV-1 の生活環に関する RNA ヘリケースの解析

有海康雄（熊本大学 エイズ学研究中心 准教授）

（目的）RNA ヘリケースは宿主やウイルス mRNA の代謝に関与している。また、抗 HIV-1 因子である MOV10 も P-body に局在する RNA ヘリケースである。しかしながら、これら抗 HIV-1 因子の P-body 局在の意義や作用機序については未だ不明な点が多い。そこで、RNA ヘリケースの HIV-1 の生活環における役割について解析を試みた。

（方法）宿主の RNA ヘリケース及び HIV-1 分子クローンを共発現させ、HIV-1 粒子産生や HIV-1 粒子内へのパッケージングについて解析した。また、RNA ヘリケースの HIV-1 Tat 及び Rev 機能への影響をレポーターアッセイにより解析した。そして、両者の細胞内局在や結合について解析を行った。さらに LINE-1 のレトロトランスポジション能に与える影響についても HIV-1 と比較検討した。

（結果）平成 23 年度：(1)異なる DEAD-box RNA ヘリケース DDX1、DDX3、DDX5、DDX17、DDX21、そして DDX56 は HIV-1 Rev と結合し、Rev の機能を増強させた。

(2)DDX3のみが HIV-1 Tat と共局在し、Tat の機能を増強させた。平成 24 年度：HIV-1 感染により、P-body 形成は影響しなかった。一方、P-body に局在する RNA ヘリケース MOV10 と DDX6 が HIV-1 粒子中に取り込まれたが、MOV10 のみ HIV-1 の感染性を顕著に抑制した。また、MOV10 がレトロトランスポゾン LINE-1 のレトロトランスポジション能も抑制することを見出した。

（考察）P-body に局在する RNA ヘリケース MOV10 及び DDX6 は、HIV-1 粒子内にパッケージングされるが、

その生物学的な意義は不明である。また、抗 HIV-1 因子 APOBEC3G も同様に P-body に局在し、HIV-1 粒子内に取り込まれるので、これら HIV-1 に関する P-body 因子の P-body 局在の意義とさらなる HIV-1 生活環における役割について明らかにしていきたい。

（結論）異なる宿主 RNA ヘリケースが、HIV-1 と相互作用し、HIV-1 増殖を制御していることが示唆された。

3. 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・大学院生命科学研究部・薬学生化学分野 准教授）

これまで HIV 粒子プロテオーム解析を推進してきており、その特色は、HIV 粒子に取り込まれ感染複製過程に必要な細胞性因子を同定できる点にある。三隅は、HIV の脱殻機構に関与する Pin1 や ERK2 を同定できたほか、ウイルス粒子内の tRNA^{Lys3} 取り込み量を制限する新規 HIV 複製制御因子として GAPDH を発見することができた。

4. インターフェロンによる HIV-1 増殖抑制メカニズムの解明

久保 嘉直（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染防御因子解析学研究室 准教授）

インターフェロン（IFN）による HIV-1 増殖抑制機構は未だ不明な点が多い。IFN によって発現が誘導される tetherin は、cell-free 感染に加え、in vivo での主要な HIV-1 増殖の経路である cell-to-cell 感染も抑制することを明らかにした。また、IFN γ による HIV-1 増殖抑制に必須な宿主感染防御因子として IFIEF を同定した。IFN 誘導因子による HIV-1 増殖抑制機構の解明は、新規 AIDS 治療法の開発に貢献する。

3. 分子動力学法の応用研究

横山勝（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）

計算機を用いて蛋白質の溶液中での構造動態を近似する分子動力学法について研究し、HIV の Gag カプシド蛋白質や Env Gp120 蛋白質の構造解析に応用した。HIV の Trim5 α や抗体への感受性を制御する構造要因を特定した。

研究代表者

佐藤 裕徳

- 1) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, EE., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. (NM and YM equally contributed to this work). *Microbes and Infection*, in press.
- 2) Kamiyama, H., Kakoki, K., Shigematsu, S., Izumida, M., Yashima, Y., Tanaka, Y., Hayashi, H., Matsuyama, T., Sato, H., Yamamoto, N., Sano, T., Shidoji, Y., and Kubo, Y. CXCR4-tropic, but not CCR5-tropic, human immunodeficiency virus infection is inhibited by the lipid raft-associated factors, acyclic retinoid analogs, and cholera toxin B subunit. *AIDS Res Hum Retroviruses*. in press.
- 3) Ode, H., Nakashima, M., Kitamura, S., Sugiura, W., and Sato, H. Molecular dynamics simulation in virus research. *Front Microbiol.* 3: 258, 2012.
- 4) Yokoyama, M., Naganawa, S., Yoshimura, K., Matsushita, S., and Sato, H. Structural Dynamics of HIV-1 envelope gp120 outer domain with V3 loop. *PLoS One* 7: e37530, 2012.
- 5) Sakuragi, J., Ode, H., Sakuragi, S., Shioda, T., and Sato, H. A proposal for a new HIV-1 DLS structural model. *Nucleic Acids Res.* 40: 5012-5022, 2012.
- 6) Miyamoto, T., Nakayama, EE., Yokoyama, M., Ibe, S., Takehara, S., Kono, K., Yokomaku, Y., Pizzato, M., Luban, J., Sugiura, W., Sato, H., and Shioda, T. The Carboxyl-Terminus of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Circulating Recombinant form 01_AB Capsid Protein Affects Sensitivity to Human TRIM5 α . *PLoS One.* 7: e47757, 2012.
- 7) Iijima, S., Lee, YJ., Ode, H., Arold, S., Kimura, N., Yokoyama, M., Sato, H., Tanaka, Y., Strebel, K., and Akari, H. A Noncanonical μ -1A-Binding Motif in the N Terminus of HIV-1 Nef Determines Its Ability To Downregulate Major Histocompatibility Complex Class I in T Lymphocytes. *J. Virol.* 86: 3944-3951, 2012.
- 8) Matsunaga, S., Sawasaki, T., Ode, H., Morishita, R., Furukawa, A., Sakuma, R., Sugiura, W., Sato, H., Katahira, M., Takaori-Kondo, A., Yamamoto, N., and Ryo, A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J. Proteomics.* 75: 4863-4873, 2012.

研究分担者

塩田 達雄

- 1) Bozek, K., Nakayama, EE., Kono, K., and Shioda, T. Electrostatic potential of human immunodeficiency virus type 2 and rhesus macaque simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Front Microbiol.* 3: 206, 2012.
- 2) Likanonsakul, S., Rattanatham, T., Feangvad, S., Uttayamakul, S., Prasithsirikul, W., Srisopha, S., Nitiyanontakij, R., Tengtrakulcharoen, P., Tarkowski, M., Riva, A., Nakayama, EE., and Shioda, T. Polymorphisms in Fas gene is associated with HIV-related lipotrophy in Thai patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.* Aug 20, 2012.
- 3) Saito, A., Kawamoto, Y., Higashino, A., Yoshida, T., Ikoma, T., Suzaki, Y., Ami, Y., Shioda, T., Nakayama, EE., and Akari, H. Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). *Front. Microbio.* 3: 314, 2012.
- 4) Miyamoto, T., Nakayama, EE., Yokoyama, M., Ibe, S., Takehara, S., Kono, K., Yokomaku, Y., Pizzato, M., Luban, J., Sugiura, W., Sato, H., and Shioda, T. The Carboxyl-Terminus of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Circulating Recombinant form 01_AB Capsid Protein Affects Sensitivity to Human TRIM5 α . *PLoS One.* 7(10): e47757, 2012.
- 5) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, EE., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes Infect.* Nov 1, 2012.
- 6) Zhang, X., Sobue, T., Isshiki, M., Makino, S., Inoue, M., Kato, K., Shioda, T., Ohashi, T., Sato, H., Komano, J., Hanabusa, H., and Shida, H. Elicitation of Both Anti HIV-1 Env Humoral and Cellular Immunities by Replicating Vaccinia Prime Sendai Virus Boost Regimen and Boosting by CD40Lm. *PLoS One.* 7(12): e51633, 2012.

岩谷 靖雅

- 1) Kitamura, S., Ode, H., Nakashima, M., Imahashi, M., Naganawa, Y., Kurosawa, T., Yokomaku, Y., Yamane, T., Watanabe, N., Suzuki, A., Sugiura, W., and Iwatani, Y. The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif binding. *Nat Struct Mol Biol.* 19: 1005-1010, 2012
- 2) Hergott, C.B., Mitra, M., Guo, J., Wu, T., Miller, J.T., Iwatani, Y., Gorelick, R.J., Levin, J.G. Zinc finger function of HIV-1 nucleocapsid protein is required for removal of 5'-terminal genomic RNA fragments: A paradigm for RNA removal reactions in HIV-1 reverse transcription. *Virus Res.* in press, 2012
- 3) Jahanbakhsh, F., Ibe, S., Hattori, J., Monavari, S.H.R., Matsuda, M., Maejima, M., Iwatani, Y., Memarnejadian, A., Keyvani, H., Azadmanesh, K., Sugiura, W. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Iran: genomic evidence of CRF35_AD predominance and CRF01_AE infection among individuals associated with injection drug use. *AIDS Res Hum Retroviruses.* in press, 2012
- 4) Bunupuradah T., Imahashi M., Iampornsinn T., Matsuoka K., Iwatani Y., Puthanakit T., Ananworanich J., Sophonphan J., Mahanontharit A., Naoe T., Vonthanak S., Phanuphak P., Sugiura W., On Behalf Of The Predict Study Team. Association of APOBEC3G genotypes and CD4 decline in Thai and Cambodian HIV-infected children with moderate immune deficiency. *AIDS Res Ther.* 9: 34, 2012
- 5) Imahashi M., Nakashima M., Iwatani Y. Antiviral mechanism and biochemical basis of the human APOBEC3 family. *Front Microbiol.* 2: 250, 2012.

野間口 雅子

- 1) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes Infect.* in press.
- 2) Miyakawa, K., Sawasaki, T., Matsunaga, S., Tokarev, A., Quinn, G., Kimura, H., Nomaguchi, M., Adachi, A., Yamamoto, N., Guatelli, J., and Ryo, A. Interferon-induced SCYL2 limits release of HIV-1 by triggering PP2A-mediated dephosphorylation of the viral protein Vpu. *Sci. Signal.* 5: ra73, 2012.

間 陽子

- 1) Ishii, H., Koyama, H., Hagiwara, K., Miura, T., Xue, G., Hashimoto, Y., Kitahara, G., Aida, Y., and Suzuki, M. Synthesis and biological evaluation of hematoxylin derivatives as a novel class of anti-HIV-1 reagents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22:1469-1474, 2012.

岡本 尚

- 1) Cueno, M. E., Imai, K., Okamoto, T., Ochiai, K. Overlapping glycosylation sequon influences the glycosylation pattern of a chimeric protein expressed in tomato leaf and callus. *J. Biotechnology*, in press.
- 2) Imai, K., Ochiai, K., and Okamoto, T. Microbial interaction between HIV-1 and anaerobic bacteria producing butyric acid: its implication is AIDS progression. *Future Medicine* in press.
- 3) Imai K., Victoriano AF, Ochiai K, T. Okamoto. Microbial Interaction of Periodontopathic Bacterium *rphyromonasgingivalis* and HIV-Possible Causal Link of Periodontal Diseases to AIDS Progression. *Curr HIV Res.* in press.
- 4) Tan, Gana, N. H., Onuki, T., Victoriano, A. F. B., and Okamoto, T. MicroRNAs in HIV-1 infection: an integration of viral and cellular interaction at the genomic level. *Frontiers in Microbiology*, in press.
- 5) Cueno, ME., Imai, K., Ochiai, K., Okamoto, T. Cytokinin dehydrogenase differentially regulates cytokinin and indirectly affects hydrogen peroxide accumulation in tomato leaf. *J Plant Physiol.* 169 : 834-838, 2012.
- 6) Imai, K., Yamada, K., Tamura, M., Ochiai, K., Okamoto, T. Reactivation of latent HIV-1 by a wide variety of butyric acid-producing bacteria. *Cell Mol Life Sci.* 69: 2583-2592, 2012.

増田 貴夫

高畑 辰郎、横山 勝、佐藤 裕徳、河合 剛太、佐藤 洋子、長谷川 温彦、神奈木 真理、増田 貴夫。
HIV-1 インテグラーゼの逆転写過程以前における機能を規定する N 末端ドメイン構造の解析。第 60 回
日本ウイルス学会 (2012/11. 大阪)

村上 努

- 1) Takemura T, Kawamata M, Urabe M, and Murakami T. Cyclophilin A-dependent restriction to capsid N121K mutant Human Immunodeficiency Virus Type 1 in a broad range of cell lines. *J. Virol.* in press.
- 2) Narumi, T., Aikawa, H., Tanaka, T., Hashimoto, C., Ohashi, N., Nomura, W., Kobayakawa, T., Takano, H., Hirota, Y., Murakami, T., Yamamoto, N., and Tamamura, H. Low-molecular-weight CXCR4 ligands with variable spacers. *Chem Med Chem* doi: 10.1002/cmdc. 201200390, 2012.
- 3) Narumi, T., Tanaka, T., Hashimoto, C., Nomura, W., Aikawa, W., Sohma, A., Itotani, K., Kawamata, M., Murakami, T., Yamamoto, N., and Tamamura, H. Pharmacophore-based small molecule CXCR4 ligands. *Bior Med Chem Lett* 22: 4169-4172, 2012.

梁 明秀

- 1) Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Tokarev A, Quinn G, Kimura H, Nomaguchi M, Adachi A, Yamamoto N, Guatelli J, Ryo A. Interferon-induced SCYL2 limits release of HIV-1 by triggering PP2A-mediated dephosphorylation of the viral protein Vpu. *Sci Signal.* 5(245): ra73, 2012.
- 2) Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J Proteomics.* 75(15): 4863-73, 2012.
- 3) Furukawa A, Okamura H, Morishita R, Matsunaga S, Kobayashi N, Ikegami T, Kodaki T, Takaori-Kondo A, Ryo A, Nagata T, Katahira M. NMR study of xenotropic murine leukemia virus-related virus protease in a complex with amprenavir. *Biochem Biophys Res Commun.* 425(2): 284-9, 2012.
- 4) Narita Y, Murata T, Ryo A, Kawashima D, Sugimoto A, Kanda T, Kimura H, Tsurumi T. Pin1 interacts with the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and regulates viral DNA replication. *J Virol*, in press.

研究協力者

櫻木 淳一

- 1) Efavirenz enhances HIV-1 Gag processing at the plasma membrane through Gag-Pol dimerization. Sho Sudo, Hiyori Haraguchi, Yoko Hirai, Hiroyuki Gatanaga, Jun-ichi Sakuragi, Fumitaka Momose, and Yuko Morikawa. *J.Virol.* published ahead of print 9 Jan., doi:10.1128/JVI.02306-12, 2013.
- 2) Sakuragi JI, Ode H, Sakuragi S, Shioda T, Sato H. A proposal for a new HIV-1 DLS structural model. *Nucleic Acids Res.* Jun;40(11): 5012-5022, 2012.

有海 康雄

- 1) Yagita Y, Kuse N, Kuroki K, Gatanaga H, Carlson JM, Chikata T, Brumme ZL, Murakoshi H, Akahoshi T, Pfeifer N, Mallal S, John M, Ose T, Matsubara H, Kanda R, Fukunaga Y, Honda K, Kawashima Y, Ariumi Y, Oka S, Maenaka K, Takiguchi M. Distinct HIV-1 escape patterns selected by cytotoxic T cells with identical epitope specificity. *J. Virol.* 87:2253-2263, 2013.
- 2) Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. PML tumor suppressor protein is required for HCV production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430:592-597, 2013.
- 3) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. *Virus Res.* 167:74-85, 2012.
- 4) Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Development of hepatitis C virus production reporter-assay systems using two different hepatoma cell lines. *J. Gen. Virol.*

93:1422-1431, 2012.

- 5) Osugi K, Suzuki H, Nomura T, Ariumi Y, Shibata H, Maki M. Identification of the P-body component PATL1 as a novel ALG-2-interacting protein by in silico and far-Western screening of proline-rich proteins. *J. Biochem.* 151:657-666, 2012.
- 6) Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Virus Genes* 44:374-381, 2012.

三隅 将吾

- 1) Takamune, N., Irisaka, Y., Yamamoto, M., Harada, K., Shoji, S., and Misumi, S. Induction of extremely low protein expression level by fusion of C-terminal region of Nef.
- 2) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 59 : 245-253, 2012.
- 3) Kishimoto, N., Onitsuka, A., Kido, K., Takamune, N., Shoji, S., and Misumi, S. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase negatively regulates human immunodeficiency virus type 1 infection. *Retrovirology* 9:107, 2012.

久保 嘉直

- 1) Kohno T, Kubo Y, Yasui K, Haraguchi M, Shigematsu S, Chua KJ, Matsuyama T, Hayashi H. Serum starvation activates NF-kB through G protein beta2 subunit-mediated signal. *DNA Cell Biol.* 31:1636-1644, 2012.
- 2) Kamiyama H, Kakoki K, Shigematsu S, Izumida M, Yashima Y, Tanaka Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N, Sano T, Shidoji Y, Kubo Y. CXCR4-tropic, but not CCR5-tropic, human immunodeficiency virus infection is inhibited by the lipid raft-associated factors, acyclic retinoid analogs, and cholera toxin B subunit. *AIDS Res.Hum.Retroviruses*, in press, 2013.
- 3) Kubo Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N. Retrovirus entry by endocytosis and cathepsin proteases. *Adv.Virol.* 2012:640894, 2012.

横山 勝

- 1) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, EE., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. (NM and YM equally contributed to this work). *Microbes and Infection*, in press.
- 2) Yokoyama, M., Naganawa, S., Yoshimura, K., Matsushita, S., and Sato, H. Structural Dynamics of HIV-1 envelope gp120 outer domain with V3 loop. *PLoS One* 7: e37530, 2012.
- 3) Miyamoto, T., Nakayama, EE., Yokoyama, M., Ibe, S., Takehara, S., Kono, K., Yokomaku, Y., Pizzato, M., Luban, J., Sugiura, W., Sato, H., and Shioda, T. The Carboxyl-Terminus of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Circulating Recombinant form 01_AB Capsid Protein Affects Sensitivity to Human TRIM5α. *PLoS One.* 7: e47757, 2012.

結論

以下を治療標的とする論理基盤を得た

1. HIVの”抗HIV因子”耐性構造
 - ・低荷電量V3をもつGp120 outer domain構造
 - ・カプシドN末h4/5Lとh6/7L構造
2. HIV複製制御因子
 - ・インテグラーゼN末D-form構造
 - ・Vpr/核輸送担体NPI-1相互作用
 - ・Tat/CycT1相互作用
3. 抗HIV因子
 - ・APOBEC3のVif結合表面構造
 - ・IFN誘導性SCYL2蛋白質
 - ・MA蛋白質アセンブル領域

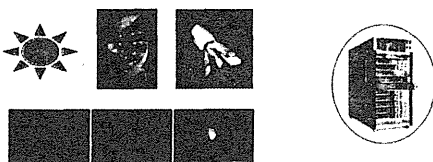
目的

新たな治療標的の探索



方法

実験と計算科学の併用



II. 分担研究報告書

研究課題：HIV-1 Gp120 の抗体耐性構造の研究

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 室長）

研究協力者：横山勝（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

HIV の抗体耐性構造の解析を進めた。計算科学の手法を取り入れて解析を進めた点に方法論としての特色がある。Gp120 V3 ループの荷電量が低下するだけで、(1) Gp120 表面の受容体結合領域（中和エピトープ領域）の構造と揺らぎが劇的に変化すること、(2) HIV は抗 V3 抗体や抗 CD4 結合部位抗体の中和作用に抵抗性となること、(3) 中和エピトープ領域のアミノ酸残基の多様性が減ずるを見出した。V3 荷電は Gp120 outer domain の表面構造を制御する能力をもつこと、低荷電 V3 をもつと Gp120 は抗体耐性構造をとることがわかった。

A. 研究目的

HIVは、ヒトで増殖する際に自然・獲得免疫の標的となる。しかし、HIVは免疫を巧みに逃れ、種々の細胞蛋白質と相互作用しながら大量の子孫ウイルスを恒常的に産生し、持続感染を成立させる。この間、ウイルスの生存に必須の性質を維持するために、HIV蛋白質の致命的構造変化をもたらす変異は淘汰されると推察される。HIVの生存に必須で変化の制約が強く働く構造が特定されれば、その構造はHIVの進化的な弱点となり、感染の予防・治療標的となりうる。HIV蛋白質の必須機能としては、宿主免疫からの逃避に必須の機能、及びヒト細胞での複製に必須の機能が想定される。しかし、HIVの生活環には未だ不明な点が多く、ウイルスの生存に必須の機能、及びその機能発現に必要な構造と変化の許容度など、HIV感染の予防・治療標的となりうる分子構造を解明するための基礎科学情報は不足している。

我々は、これらHIVの構造、増殖、変異に関わる未解決課題の解明、さらにはHIV感染の予防・治療標的となりうる構造の解明を目標として、計算科学 (Computational Science) の諸技術を活用した基礎ウイルス学研究を実施している。計算機を駆使して科学上の問題を解決する計算科学は、近年、実験/観測と理論の間を補間する第三の科学形態として急速に進展し、広範な分野で応用されている。計算科学を用いると、実験では難しい事象の解析が可能となる。例えば結晶構造解析ではわからない生理的条件下 (37°C、1気圧、溶液中) での蛋白質構造の動的特性を近似できる。この情報は、個々の蛋白質に固有の物理化学的性質や生物学的機能の理解に役立ち、延いてはウイルスの性質や変化を構造レベルで理解するのに役立つ。その際、計算科学と実験科学が一体となり、予測と検証を効率的に進めることで、相乗効果が見込まれる。そこで本研究では、実験に計算科学の手法を取り入れて、HIVの抗体耐性構造の解析を進めた。

B. 研究方法

HIV-1の抗体抵抗性の発現機構の解明を目的として、Gp120 outer domainの分子動力学解析、中和実験、多様性解析を実施した。ホモロジーモデリングによりV3組換えGp120 outer domainの構造モデルを構築し、分子動力学法により37°C、1気圧、水溶液中の構造動態を30ns追跡した。経時的に得た40,000構造を用い、アミノ酸残基の平均構造と揺らぎを求め、V3荷電量の変化がouter domain構造と動的特性に及ぼす影響を解析した。MAGIC5細胞を用いてV3組換えHIVの抗体感受性を測定した。公共データベースの配列を用いて、V3荷電量の異なるGp120グループの多様性を解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え生物等を用いる実験については、実施機関の承認、あるいは文部科学大臣の承認を得ている。

C. 研究結果

以下の点を見出した。

V3 ループの荷電量が低下するだけで、(1) Gp120 表面の受容体結合領域（中和エピトープ領域）の構造と揺らぎが劇的に変化すること (図1)、(2) HIV はV3抗体や抗CD4結合部位抗体の中和作用に抵抗性となる (図2)、(3) 中和エピトープ領域のアミノ酸残基の多様性が減ること (図3)。

D. 考察

HIV-1 Env V3ループにはGp120の表面構造と動的性質を制御する能力があることがわかった。V3ループの荷電量が低下すると、中和エピトープ領域の構造と揺らぎが変化し、エピトープマスキングにつながることを示唆された。マスキングのしくみは不明であるが以下の推察をしている。すなわち、低荷電V3をもつと中和エピトープがGp120三量体の中心を向くことで抗体がアクセスしに

くい構造となる、と考えている。

自然界では主に低荷電V3をもつHIV (R5ウイルス) が維持されることから、この低荷電V3依存的なGp120構造の維持はHIVの持続感染に必要と考えられる。本知見は、HIVが中和抵抗性やCCR5指向性を維持するために必要なGp120構造の解明につながる。さらにはGp120を標的とする感染阻害剤やワクチン抗原を設計する際の情報基盤となる。

E. 結論

V3荷電はGp120 outer domainの表面構造を制御する能力をもつこと、低荷電V3をもつとGp120は抗体耐性構造をとることがわかった。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, EE., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. (NM and YM equally contributed to this work). *Microbes and Infection*, in press.
- 2) Kamiyama, H., Kakoki, K., Shigematsu, S., Izumida, M., Yashima, Y., Tanaka, Y., Hayashi, H., Matsuyama, T., Sato, H., Yamamoto, N., Sano, T., Shidoji, Y., and Kubo, Y. CXCR4-tropic, but not CCR5-tropic, human immunodeficiency virus infection is inhibited by the lipid raft-associated factors, acyclic retinoid analogs, and cholera toxin B subunit. *AIDS Res Hum Retroviruses*. in press.
- 3) Ode, H., Nakashima, M., Kitamura, S., Sugiura, W., and Sato, H. Molecular dynamics simulation in virus research. *Front Microbiol.* 3: 258, 2012.
- 4) Yokoyama, M., Naganawa, S., Yoshimura, K., Matsushita, S., and Sato, H. Structural Dynamics of HIV-1 envelope gp120 outer domain with V3 loop. *PLoS One* 7: e37530, 2012.
- 5) Sakuragi, J., Ode, H., Sakuragi, S., Shioda, T., and Sato, H. A proposal for a new HIV-1 DLS structural model. *Nucleic Acids Res.* 40: 5012-5022, 2012.
- 6) Miyamoto, T., Nakayama, EE., Yokoyama, M., Ibe, S., Takehara, S., Kono, K., Yokomaku, Y., Pizzato, M., Luban, J., Sugiura, W., Sato, H., and Shioda, T. The Carboxyl-Terminus of Human Immunodeficiency Virus Type 2

Circulating Recombinant form 01_AB Capsid Protein Affects Sensitivity to Human TRIM5 α . *PLoS One.* 7: e47757, 2012.

- 7) Iijima, S., Lee, YJ., Ode, H., Arold, S., Kimura, N., Yokoyama, M., Sato, H., Tanaka, Y., Strebel, K., and Akari, H. A Noncanonical mu-1A-Binding Motif in the N Terminus of HIV-1 Nef Determines Its Ability To Downregulate Major Histocompatibility Complex Class I in T Lymphocytes. *J. Virol.* 86: 3944-3951, 2012.
- 8) Matsunaga, S., Sawasaki, T., Ode, H., Morishita, R., Furukawa, A., Sakuma, R., Sugiura, W., Sato, H., Katahira, M., Takaori-Kondo, A., Yamamoto, N., and Ryo, A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J. Proteomics.* 75: 4863-4873, 2012.

2. 学会発表等

- 1) 横山勝、佐藤裕徳：分子動力学計算による HIV-1 gp120 の構造解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会。2012 年 11 月 13-15 日 (火-木)、大阪。
- 2) 高畑辰郎、横山勝、佐藤裕徳、河合剛太、佐藤洋子、長谷川温彦、神奈木真理、増田貴夫：HIV-1 インテグラーゼの逆転写過程以前における機能を規定する N 末端ドメイン構造の解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会。2012 年 11 月 13-15 日 (火-木)、大阪。
- 3) Arias Juan F、小山貴芳、岩部幸枝、横山勝、佐藤裕徳、長谷川秀樹、徳永研三：APOBEC3G による *Alu* 転移抑制の分子生物学的および構造学的解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会。2012 年 11 月 13-15 日 (火-木)、大阪。
- 4) 櫻木淳一、大出裕高、櫻木小百合、塩田達雄、佐藤裕徳：HIV ゲノム RNA 二量体化シグナルの新規構造モデル。第 60 回日本ウイルス学会学術集会。2012 年 11 月 13-15 日 (火-木)、大阪。
- 5) 横山勝、佐藤裕徳：HIV-1 gp120 における V1/V2 ドメインと V3 ドメインの配置。第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会、2012 年 11 月 24-11 月 26 日 (土-月)、横浜
- 6) 横山勝、佐藤裕徳：HIV-1 gp120 分子モデルにより示唆される中和逃避メカニズム。第 35 回日本分子生物学会年会、12 月 11-14 日 (火-金)、福岡。
- 7) 小山貴芳、Juan F Arias、横山勝、佐藤裕徳、徳永研三：APOBEC3G の抗 *Alu* レトロ転移活性に寄与するアミノ酸の同定。第 35 回日本分子生物学会年会、12 月 11-14 日 (火-金)、福岡。

図 1

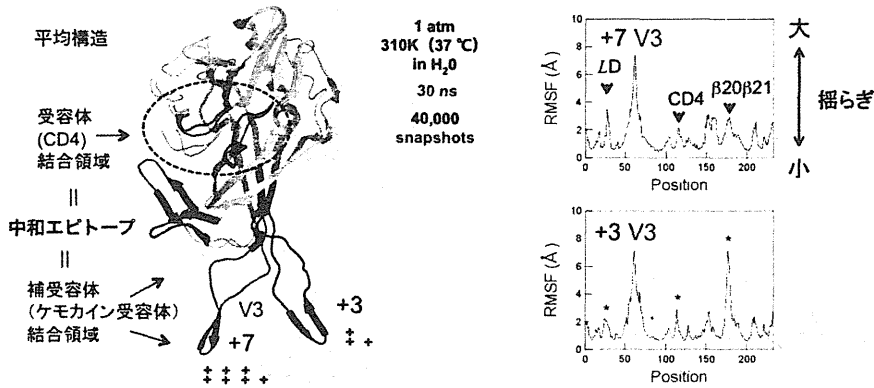
Gp120 outer domainの分子動力学解析



Gp120 V3 loopの総荷電量が変化すると...

A. 機能性ループの立体配置が変わる

B. 機能性ループの揺らぎが変わる



MD simulation of the identical gp120 outer domain carrying a V3 loop with net charge of +7 or +3. (A) Superposition of the averaged structures obtained with the 40,000 snapshots obtained from 10–30 ns of MD simulations using ptraj module in Amber 9. Red and Blue ribbons: loops of Gp120_{LAI-NH1V3} and Gp120_{LAI-TH09V3} with V3 net charges of +7 and +3, respectively. (B) Distribution of RMSF in the gp120 outer domain. The RMSF values indicate the atomic fluctuations of the main chains of individual amino acids during 10–30 ns of MD simulations. The numbers in the horizontal axes indicate amino acid positions at the outer domain. The numbers indicate amino acid positions at the outer domain (amino acids 1 to 233 correspond to amino acids 256 to 489 in the gp120 of HIV-1_{LAI})

図 2

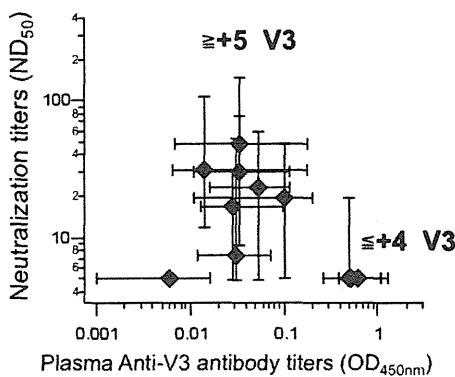
V3組換えウイルスの中和感受性試験



Gp120が低荷電V3をもつと...

A. 抗V3抗体に耐性となる

B. 抗CD4結合部位抗体に耐性となる



PLoS ONE. 12;3:e3206, 2008

| 単クローン抗体* | | ND ₅₀ (μg/ml) | |
|----------|-------------------------|--------------------------|-------|
| | | +7 V3 | +3 V3 |
| 49G2 | CD4bs mAb human IgG1 | 0.224 | >10 |
| 42F9 | CD4bs mAb human IgG1 | 0.934 | >10 |
| 3D6 | CD4bs mAb human IgG1 | 0.444 | >10 |
| 4C11 | CD4bi mAb human IgG2 | >20 | >10 |
| 8D11 | human IgG1 | >20 | >10 |

* 松下先生(熊本大)より分与

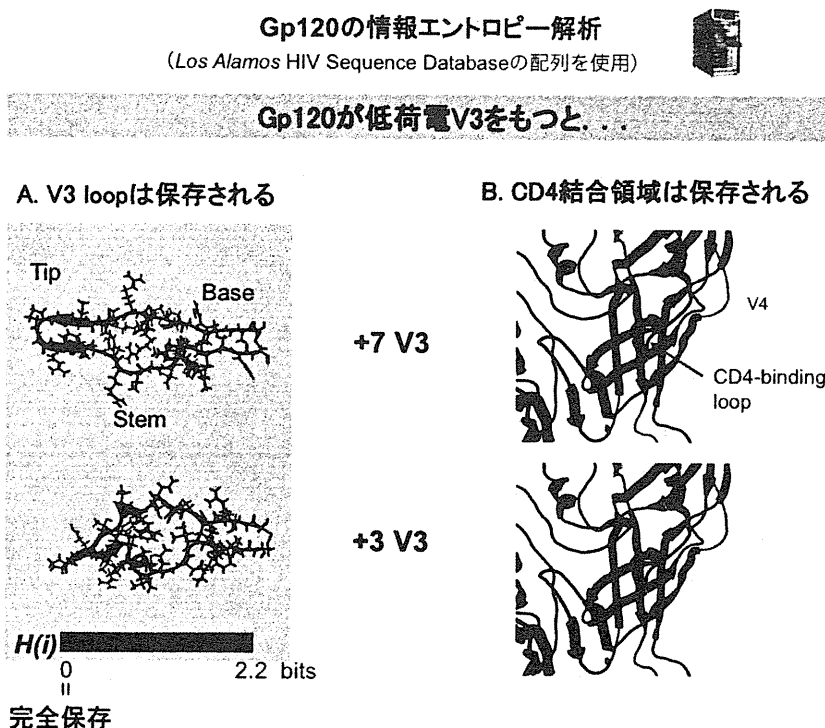
Neutralization sensitivity of the isogenic V3 recombinant HIV-1 to anti-gp120 monoclonal antibodies.

* CD4bs recognizes neutralization epitope in the Gp120 outer domain before CD4 binding.

CD4bi recognizes neutralization epitope induced in Gp120 after CD4 binding.

The effect of each antibody on viral infectivity was tested in duplicate in MAGIC5 assay.

図 3



Diversity of the gp120 subpopulations carrying a V3 loop with net charge of +7 or +3.

Full-length gp120 sequences of the HIV-1 CRF01_AE were extracted from a public database, and divided into subgroups on the basis of the net charge of the V3 loop (+2~+8). The divided sequences were used to calculate the Shannon entropy, $H(i)$ within each subpopulation, and the $H(i)$ values were plotted on the 3-D structure of gp120 (PDB code: 2B4C). (A) Distribution of $H(i)$ around the V3 loop. (B) Distribution of $H(i)$ around the CD4 binding site.

References

Yokoyama, M., Naganawa, S., Yoshimura, K., Matsushita, S., and Sato, H. Structural Dynamics of HIV-1 envelope gp120 outer domain with V3 loop. PLoS One 7: e37530, 2012.

Naganawa S, Yokoyama M, Shiino T, Suzuki T, Ishigatsubo Y, Ueda A, Shirai A, Takeno M, Hayakawa S, Sato S, Tochikubo O, Kiyoura S, Sawada K, Ikegami T, Kanda T, Kitamura K, Sato H. Net positive charge of HIV-1 CRF01_AE V3 sequence regulates viral sensitivity to humoral immunity. PLoS One 3:e3206, 2008 .(The first two authors contributed equally)

研究課題：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

HIV-2 CRF01_AB は、日本で分離された HIV-2 のグループ A ウイルスとグループ B ウイルスとのグループ間の組換えウイルスであり、HIV-2 では世界で始めて報告されたグループ間組換え流行株である。日本でこれらの株が分離された 3 名の感染者は、いずれもエイズ病態進行が早く血中のウイルス量も高かった（J Acquir Immune Defic Syndr (2010) 54: 241-247.）。我々は、これらの HIV-2 CRF01_AB 株の TRIM5 α の標的となるカプシド蛋白質について検討したところ、CRF01_AB のカプシド蛋白質はユニークなアミノ酸配列を持ち、系統樹解析からはグループ A とグループ B からほぼ等距離に位置すること、CRF01_AB のカプシド蛋白質を持つ組換え HIV-2 はヒト TRIM5 α に強い抵抗性を示すこと、が明らかになった。TRIM5 α 感受性の決定基である 119/120 番目のアミノ酸は CRF01_AB のカプシド蛋白質ではグリシンであり、TRIM5 α に対する強い耐性と一致していたが、カプシド内の組換えウイルスの解析から CRF01_AB のカプシド蛋白質の C 末端領域にも TRIM5 α 耐性を増強する配列が存在することが明らかになった。CRF01_AB のカプシド蛋白質六量体の三次元構造モデルの解析から、この CRF01_AB 特異的な C 末端領域のアミノ酸は、いずれもカプシド外部からでも N 末端領域六量体間の間隙から到達可能であり、TRIM5 α がカプシド蛋白質の N 末端領域のみならず、C 末端領域とも直接相互作用をしている可能性が示された。

A. 研究目的

TRIM5 α はアカゲザルの抗 HIV1 型 (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てコアを破壊することにより、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。一方、HIV 2 型 (HIV-2) の場合は、分離株により TRIM5 α 感受性が異なり、カプシド蛋白質 120 番目のアミノ酸がプロリンなら感受性、グルタミン、アラニンあるいはグリシンなら耐性を示し、ヒト TRIM5 α に対しては HIV-1 よりも感受性を示す。

HIV-2 CRF01_AB は、日本で分離された HIV-2 のグループ A ウイルスとグループ B ウイルスとのグループ間の組換えウイルスであり、HIV-2 では世界で始めて報告されたグループ間組換え流行株である。HIV-2 の感染者は、HIV-1 の感染者と比較して、血中のウイルス量が低くエイズ病態の進行が緩やかであることが知られているが、日本でこれらの株が分離された 3 名の感染者は、いずれもエイズ病態進行が早く血中のウイルス量も高かった（J Acquir Immune Defic Syndr (2010) 54: 241-247.）。そこで、本研究では HIV-2 CRF01_AB 株の TRIM5 α 感受性を評価することを目的とした。

B. 研究方法

1. HIV-2/SIVカプシド蛋白質の系統樹解析

CLUSTALW version 2.1. を用いて HIV-2 のグループ A の 4 株 (ROD, UC12, GH123, UC2)、HIV-2 のグループ B の 3 株 (UC14, D205, UC1)、SIV の 2 株 (SIVmac239, SIVsmPBJ14)、そして HIV-2 CRF01_AB の 4 株 (日本で分離された NMC307, NMC716, NMC842 および西アフリカで分離された 7312A) のカプシド蛋白質のアミノ酸配列のアラインメントを作成し、近隣結合法にて系統樹を作成した。

2. ヒト TRIM5 α による抗 HIV-2 作用の検討

株化 T 細胞 MT4 に、MT4 から得た ヒト 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、HIV-2 GH123 あるいは CRF01_AB のカプシド蛋白質を持ち GFP を発現する組換え HIV-2 ウイルスを水疱性口内炎ウイルスの G タンパク質を用いて、内在性 TRIM5 α の発現のないネコ細胞 CRFK に MT4 から得られた ヒト TRIM5 α を強制発現させた細胞に導入して、フローサイトメーターで GFP 発現細胞数を測定した。

3. HIV-2カプシドの三次元構造予測

最近報告された HIV-1 カプシドの六量体の三次元構造をもとにホモロジーモデリング法で HIV-2 カプシドの六量体の三次元構造を予測し、C 末端領域の HIV-2 CRF01_AB 特異的なアミノ酸の部位を図示した (佐藤研究代表者との共同研究による)。

C. 研究結果