

1. HIV-2 CRF01_AB カプシド蛋白質のアミノ酸配列の特徴

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を用いて系統樹解析を行ったところ、CRF01_ABのカプシド蛋白質はグループAとグループBからほぼ等距離に位置することが明らかになった(図1)。塩基配列レベルでは、CRF01_ABのカプシド蛋白質を含むGag遺伝子はグループB由来とされていることから、CRF01_ABのカプシド蛋白質は、独自の進化を遂げている可能性が考えられた。特にカプシドのC末端部分は、グループAとグループBの間で違いがないが、CRF01_ABには特異的なアミノ酸置換が5カ所、認められた。また、TRIM5 α 感受性の決定基である119/120番目のアミノ酸はいずれもグリシンであり、CRF01_ABはTRIM5 α に対して抵抗性を示すことが予想された。

2. HIV-2 CRF01_AB カプシド蛋白質を持つウイルスのTRIM5 α 感受性

HIV-2の分子クローンであるGH123のカプシド蛋白質に相当する部分を、日本で分離されたHIV-2 CRF01_ABのNMC716とNMC842のものと置換した組換え分子クローンを作製し、得られた組換えウイルスのTRIM5 α 感受性を検討した。その結果、NMC716あるいはNMC842のカプシド蛋白質を持つ組換えウイルスは、予想通りカニクイザルTRIM5 α に強い抵抗性を示した。また、NMC716あるいはNMC842のカプシド蛋白質を持つ組換えウイルスは、GH123株のカプシド蛋白質の120番目をグリシンに置換したウイルスよりもヒトTRIM5 α に対して強い抵抗性を示した(図2)。GFP発現の組換えHIV-2を用いて感染初期過程のみの進行を定量しても、全く同様の結果が得られた。

3. HIV-2 CRF01_AB カプシド蛋白質のC末端領域アミノ酸置換の意義

HIV-2 CRF01_ABのNMC842のカプシド蛋白質の172番目のアミノ酸からC末端(230番目)のアミノ酸までをGH123のものに置換した組換えウイルスを作製し、ヒトTRIM5 α に対する感受性を検討した。その結果、C末端領域をGH123のものに置換したNMC842のカプシド蛋白質を持つHIV-2は、ヒトTRIM5 α に対する強い耐性を喪失した(図3)。従って、カプシドC末端領域のHIV-2 CRF01_AB特異的なアミノ酸置換がヒトTRIM5 α に対する強い耐性に寄与している事が明らかになった。

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(図4)。その結果、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。

D. 考察

HIVを始めとするレトロウイルスのカプシド蛋白質は、抗レトロウイルス因子TRIM5 α の標的部位であり、これまで我々やその他のグループによる研究から、カプシドの外側に位置するN末端領域の複数の部位が、ウイルスのTRIM5 α 感受性を決定していることが示されて来ている。今回、我々研究結果は、カプシドの内側に位置するカプシド蛋白質C末端領域のアミノ酸置換も、TRIM5 α に対する感受性を変化させ得ることを示している。カプシド内側に位置するC末端領域がTRIM5 α 感受性を変化させる機構としては、C末端領域のアミノ酸置換が直接TRIM5 α と接触する可能性と、間接的にN末端側のTRIM5 α と接触する部位の構造を変化させている可能性の二つが考えられる。後者の可能性が否定されている訳ではないが、HIV-2カプシドの六量体の三次元構造を予測からはC末端領域のHIV-2 CRF01_AB特異的なアミノ酸は、いずれもカプシド外部からも到達可能であった。従って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初めて示された。

一般的に、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HIV-2 CRF01_AB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。西アフリカのギニアビサウにおけるHIV-2感染者コホート研究から、HIV-2のTRIM5 α 耐性と感染者の血中ウイルス量との間には正の相関が見られた(Vaccine 2010, 28S2: B60-B67.)が、今回得られたHIV-2 CRF01_AB株のカプシド蛋白質も、強いTRIM5 α 耐性を示した。HIV-2 CRF01_ABの病原性は他のHIV-2株と比較して増大している可能性も考えられる。

E. 結論

日本で分離されたHIV-2 CRF01_ABのカプシド蛋白質は、C末端領域に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と、ヒトTRIM5 α に強い抵抗性を示すこと、が明らかになった。ま

た、CRF01_ABのカプシド蛋白質のC末端領域のユニークなアミノ酸置換は、TRIM5 α 耐性を増強することが明らかになった。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。

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, Adachi A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes Infect.* 2012

2) Zhang X, Sobue T, Isshiki M, Makino S, Inoue M, Kato K, Shioda T, Ohashi T, Sato H, Komano J, Hanabusa H, 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.* 2012;7(12):e51633.

3) Miyamoto T, Nakayama EE, Yokoyama M, Ibe S, Takehara S, Kono K, Yokomaku Y, Pizzato M, Luban J, Sugiura W, Sato H, 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.* 2012;7(10):e47757

4) Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzaki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE, Akari H. Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). *Front. Microbio.* 2012 3:314.

5) Likanonsakul S, Rattanatham T, Feangvad S, Uttayamakul S, Prasithsirikul W, Srisopha S, Nitiyanontakij R, Tengtrakulcharoen P, Tarkowski M, Riva A, Nakayama EE, Shioda T. Polymorphisms in Fas gene is associated with HIV-related lipoatrophy in Thai patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2012 Aug 20.

6) Bozek K, Nakayama EE, Kono K, Shioda T. Electrostatic potential of human immunodeficiency virus type 2 and rhesus macaque simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Front Microbiol.* 2012;3:206.

2. 学会発表等

1) E Nakayama, T Nakajima, G Kaur, H Terunuma, J-I Mimaya, H Ohtani, N Mehra, A Kimura, Tatsuo Shioda : A Naturally Occurring Single Amino Acid Substitution in Human TRIM5 α Linker Region Affects Its Anti-HIV-1 Activity and Susceptibility to HIV-1 Infection. Cold Spring Harbor Laboratory (Retroviruses)2012. May 21-26, 2012, Seattle (USA).

2) 塩田達雄 : HIV感染症に関わる宿主因子. 第14回白馬シンポジウムin京都. 2012年6月7-8日、京都.

3) Emi Nakayama, Toshiaki Nakajima, Gurvinder Kaur, Jun-ich Mimaya, Hiroshi Terunuma, Narinder Mehra, Akinori Kimura, Tatsuo Shioda : A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5 α linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection. 第11回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 2012年9月11-14日、淡路島

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、大阪.

5) 中山英美、中島敏晶、Gurvinder Kaur、三間屋純一、照沼 裕、Narinder Mehra、木村彰方、塩田達雄 : ヒトTRIM5 α リンカー領域の多型の抗HIV-1活性に及ぼす影響. 第26回エイズ学会学術集会・総会. 2012年11月24-26日、横浜.

6) 櫻木淳一、櫻木小百合、塩田達雄 : SL1 REVISITED: FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE STRUCTURE AND CONFORMATION OF HIV-1 GENOME RNA. 第26回エイズ学会学術集会・総会. 2012年11月24-26日、横浜.

7) 塩田達雄 : HIV感染症に関わる宿主因子. 大阪大学GCOEオルガネラネットワーク医学創成プログラム成果報告会. 2012年12月25-26日、淡路島

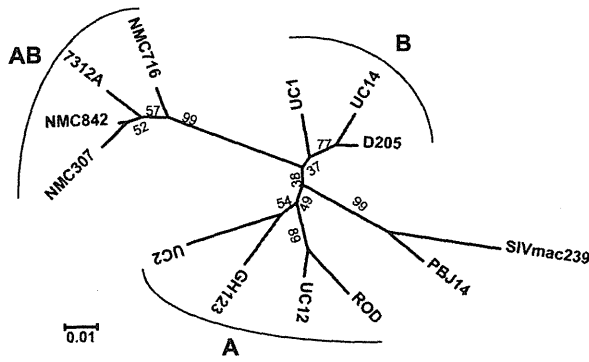


図1. HIV-2のグループAのROD、UC12、GH123、UC2 (A)、HIV-2のグループBのUC14、D205、UC1 (B)、SIV のSIVmac239とSIVsmPBJ14、そしてHIV-2 CRF01_AB の日本で分離されたNMC307、NMC716、NMC842および西アフリカで分離された7312A (AB) のカプシド蛋白質のアミノ酸配列を用いた系統樹解析。数字は1000回試行したbootstrap値を示す。

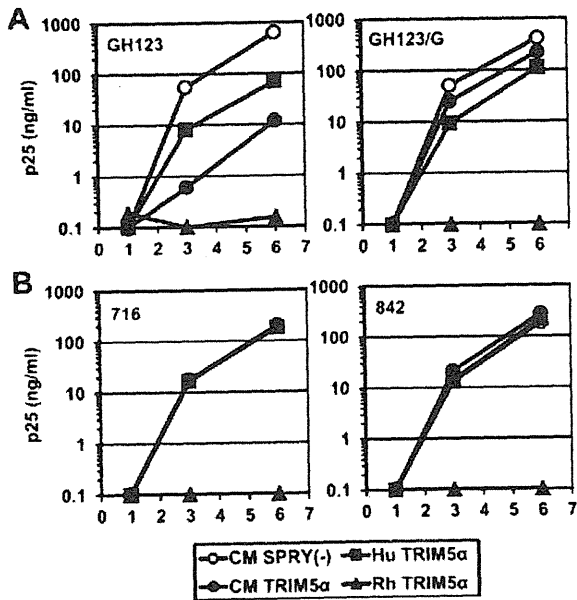


図2. HIV-2 CRF01_AB カプシド蛋白質を持つウイルスのTRIM5 α 感受性。CMはカニクイザル、Huはヒト、Rhはアカゲザルを示す。CM SPRY(-)は、PRYSRY領域を欠くカニクイザルTRIM5 α で、陰性対象となる。716はHIV-2 CRF01_ABのNMC716、842はHIV-2 CRF01_ABのNMC842のカプシド蛋白質を持つ組換えHIV-2を示す。

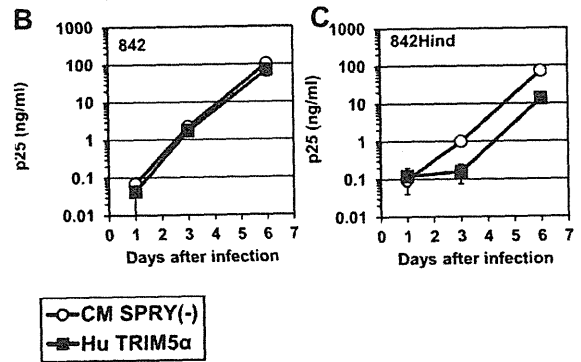


図3. HIV-2 CRF01_AB カプシド蛋白質のC末端領域アミノ酸置換のTRIM5 α 感受性に及ぼす影響。842はHIV-2 CRF01_ABのNMC842のカプシド蛋白質を持つ組換えHIV-2、842HindはNMC842のカプシド蛋白質の172番目のアミノ酸からC末端(230番目)までのアミノ酸までをGH123のものに置換した組換えウイルスを示す。Huはヒト、CM SPRY(-)は、PRYSRY領域を欠くカニクイザルTRIM5 α で陰性対象となる。

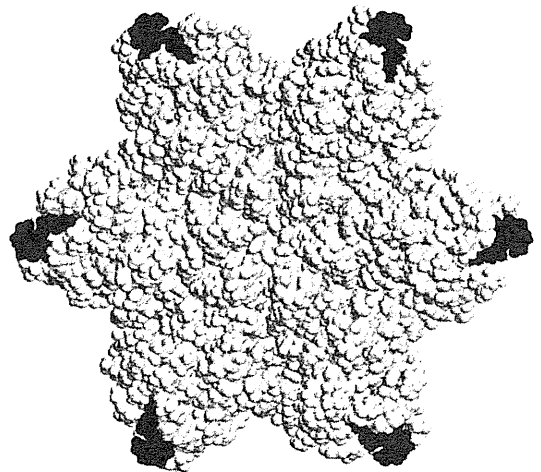


図4. HIV-2 カプシド蛋白質六量体三次元構造モデル中の、C末端領域のHIV-2 CRF01_AB 特異的アミノ酸変異の位置 (黒)。

研究課題：HIV 感染抑制因子とその解除因子の構造機能解析

- HIV-1 Vif が結合する APOBEC3 の相互作用部位（インターフェイス）の構造の解明

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

研究要旨

APOBEC3 ファミリータンパク質はシチジン脱アミノ化酵素であり、細胞においてレトロウイルスの増殖を抑制する宿主防御タンパク質である。しかし、HIV-1 はウイルス遺伝子産物 Vif を発現し APOBEC3 の分解を促進することにより、その抑制機構を解除し増殖することが知られていた。しかし、APOBEC3 および Vif の構造学的な知見は乏しく、APOBEC3 と Vif との結合における構造学的な分子基盤は不明であった。本研究において、我々は X 線結晶構造解析法により APOBEC3 ファミリータンパク質のひとつ APOBEC3C の分子構造を世界で初めて決定した。さらに、この構造情報を利用して点変異解析を行い、Vif との結合に重要な 10 個のアミノ酸残基を同定した。これらの残基は浅い“くぼみ”を形成していることが明らかになった。さらに、Vif との結合領域はほかの 2 つの APOBEC3 ファミリータンパク質においても高度に保存されていることがわかった。以上の研究は、APOBEC3-Vif の結合における構造学的分子基盤の一翼を明らかにしただけでなく、APOBEC3-Vif 間の相互作用を阻害することで宿主防御機構を活用した薬の探索に道筋をつけ、新しいエイズ治療薬の開発に向けた動きをさらに加速するものと考えられる。

A. 研究目的

宿主の APOBEC3 ファミリータンパク質の生体防御機構を活用した新たな機序による抗 HIV-1 薬剤を開発につながる基礎的情報を確立することを目標としている。特に、APOBEC3 と HIV-1 Vif の相互作用部位の構造学的情報は必要不可欠である。しかし、これまで Vif が結合する APOBEC3 ファミリーの相互作用部位（インターフェイス）の構造は明らかになっていなかった。そこで、我々は、HIV-1 Vif と APOBEC3 のタンパクの構造解明に関する研究に取り組んだ。本研究課題では、APOBEC3 ファミリーの中で、Vif に結合し、かつ最も単純な構造（単量体ドメイン構造）をもつ APOBEC3C に着目し、構造学的解析を行った。

B. 研究方法

大腸菌を利用し APOBEC3C タンパク質を大量発現し、98%以上の純度になるように精製した。X線構造解析法により、精製した A3C タンパク質の構造を決定した。HIV-1 Vif の結合に重要なアミノ酸残基の探索は、Structure-guided mutagenesis により網羅的に行った。APOBEC3F と APOBEC3DE の C 末側ドメイン (CTD) は、APOBEC3C とアミノ酸配列が高度に保存されており、同じ Vif 結合インターフェイスを保持していると示唆されていた。そのため、APOBEC3C の構造を基に、APOBEC3F と APOBEC3DE の CTD のホモロジーモデルを構築した。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

X 線構造解析により、高分解能の APOBEC3C タンパク質の分子構造を決定することに成功した。構造情報は Protein Data Bank に登録した (ID# 3VM8 と 3VOW)。Structure-guided mutagenesis により、HIV-1 Vif に結合・分解に関与するアミノ酸残基（10 残基）を同定し（図 1）、Vif 結合インターフェイスを見出した。このインターフェイスは、負電荷に偏り、疎水性側鎖を中心とした“くぼみ”を形成していることが示された（図 2）。さらに、APOBEC3F および APOBEC3DE においても、対応する 10 残基は HIV-1 Vif の結合に重要であり、類似した構造特性をもつ“くぼみ”を形成していた。以上のことから、APOBEC3C と APOBEC3F、APOBEC3DE における Vif 結合インターフェイスは、機能的にも構造的にも高度に保存されていることが明らかになった（図 3）。最後に、APOBEC3F において、10 残基中のいずれの変異体は、野生型 APOBEC3F とは異なり、Vif をもつ野生型 HIV-1 に対して強い抗ウイルス効果を示すことが分かった（図 4）。

D. 考察

今回見出した APOBEC3C 型の Vif 結合インターフェイスの構造は、Vif 側から APOBEC3-Vif の結合を考えると、Vif 側の責任領域が正電荷を帯びた DRMR モチーフが必須あるという知見から、APOBEC3C/APOBEC3F/APOBEC3DE と Vif との結合には静電的な力が重要であることが考えられる（図 5）。

E. 結論

Vifと結合するZ2型ドメインとして、APOBEC3の分子構造をはじめで決定しただけでなく、構造誘導変異誘発によりAPOBEC3においてVifとの結合に重要な10個のアミノ酸残基を見出すことができた。今回同定した10個の残基で構成されるVif結合インターフェイスは負電荷を帯びた浅い“くぼみ”を形成することも明らかになった。Vifの側からAPOBEC3とVifとの結合を考えると、Vifにおける責任領域には正電荷を帯びたDRMRモチーフが必須であるという知見から、APOBEC3C、APOBEC3F、APOBEC3DEとVifとの結合には静電的な力が重要であると思われる。

本研究成果は、APOBEC3とVifとの結合における構造学的な分子基盤の一部を明らかにしただけでなく、APOBEC3とVifとのあいだの相互作用を阻害することで宿主防御機構を活用した薬剤の探索に道筋をつけ、新しいAIDS治療薬の開発にむけた動きをさらに加速するものと期待する。

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) Hergott CB, Mitra M, Guo J, Wu T, Miller JT, Iwatani Y, Gorelick RJ, Levin JG. 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.
- 2) Jahanbakhsh F, Ibe S, Hattori J, Monavari SHR, 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*. 29:198-203, 2013.
- 3) Kitamura S, Ode H, Nakashima M, Imahashi M, Naganawa Y, Kurosawa T, Yokomaku Y, Yamane T, Watanabe N, Suzuki A, Sugiura W, Iwatani Y. The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif binding. *Nat Struct Mol Biol*. 19: 1005-1010, 2012.
- 4) Bunupuradah T, Imahashi M, Iampornsins 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.

2. 学会発表等

国外学会発表

- 1) Iwatani Y. Structure-based analysis of APOBEC3 on anti-HIV function: Gordon Research Conferences RNA Editing. Jan 6-11, 2013, Galveston, TX, USA (Invited talk)
- 2) Kitamura S, Ode H, Nakashima M, Imahashi M, Naganawa Y, Yokomaku Y, Suzuki A, Watanabe N, Sugiura W, Iwatani Y: The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif interaction. 2012 meeting on Retroviruses. May 21-26, 2012, Cold Spring Harbor, NY, USA.(talk)
- 3) Chaurasiya KR, Geertsema H, Qualley DF, Wu T, Iwatani Y, Chan D, Hertz A, Levin JG, Musier-Forsyth K, Rouzina I, Williams MC: Oligomerization of HIV-1 restriction factor APOBEC3G transforms it from a fast enzyme to a slow nucleic acid binding protein. 2012 meeting on Retroviruses. May 21-26, 2012, Cold Spring Harbor, NY, USA.(talk)
- 4) Kitamura S, Ode H, Nakashima M, Imahashi M, Naganawa Y, Yokomaku Y, Suzuki A, Watanabe N, Sugiura W, Iwatani Y: Conformational conservation of the HIV-1 Vif-binding interface of APOBEC3C, DE, F. 2012 meeting on Retroviruses. May 21-26, 2012, Cold Spring Harbor, NY, USA.(Poster)

国内学会発表

- 1) 北村紳悟、大出裕高、中島雅晶、今橋真弓、長縄由里子、黒沢哲平、横幕能行、渡邊信久、鈴木淳巨、杉浦互、岩谷靖雅：抗レトロウイルス因子 APOBEC3C の構造と HIV-1 Vif 結合インターフェイス。第35回日本分子生物学会、福岡、2012年12月
- 2) 松田昌和、服部純子、今村淳治、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦互：Plasma RNAとProviral DNAによるHIV指向性遺伝子型の比較解析。第26回日本エイズ学会、横浜、2012年11月
- 3) 鬼頭優美子、松田昌和、服部純子、伊部史朗、大出裕高、松岡和弘、今村淳治、岩谷靖雅、杉浦互、横幕能行：臨床検体由来env全長組み換えHIV-1による指向性検査法の確立。第26回日本エイズ学会、横浜、2012年11月
- 4) 伊部史朗、横幕能行、前島雅美、松岡和弘、正岡崇、岩谷靖雅、杉浦互：薬剤感受性プロファイリングに裏づけされた新規HIV-2組換え流行株CRF01_AB感染例の良好な治療経過。第26回日本エイズ学会、横浜、2012年11月
- 5) 今橋真弓、泉泰輔、今村淳治、松岡和弘、金子典代、市川誠一、高折晃史、内海眞、横幕能行、直江知樹、杉浦互、岩谷靖雅：HIV-1感染伝播・病勢に対するAPOBEC3B遺伝子型の影響に関する解析。第26回日本エイズ学会、横浜、2012年11月
- 6) 大出裕高、鈴木康二、藤野真之、前島雅美、

木村雄貴, 正岡崇志, 服部純子, 横幕能行, 鈴木淳巨, 渡邊信久, 岩谷靖雅, 杉浦互: 耐性誘導により得た高度ダルナビル耐性HIV-1プロテアーゼの構造学的解析. 第26回日本エイズ学会, 横浜, 2012年11月

7) 松岡和弘, 田邊史子, 重見麗, 服部純子, 正岡崇志, 森下了, 澤崎達也, 横幕能行, 岩谷靖雅, 杉浦互: コムギ無細胞蛋白質合成系を利用したHIV-1逆転写酵素の*in vitro* 薬剤感受性解析法の開発. 第26回日本エイズ学会, 横浜, 2012年11月

8) 岩谷靖雅, 前島雅美, 北村紳悟, 大出裕高, 中島雅晶, 今橋真弓, 長縄由里子, 黒沢哲平, 伊部史朗, 横幕能行, 杉浦互: APOBEC3Gの酵素活性非依存的な抗HIV-1作用メカニズム. 第60回日本ウイルス学会, 大阪, 2012年11月

9) 大出裕高, 鈴木康二, 藤野真之, 前島雅美, 木村雄貴, 正岡崇志, 服部純子, 横幕能行, 鈴木淳巨, 渡邊信久, 岩谷靖雅, 杉浦互: 高度ダルナビル耐性HIV-1の分子機序の解明. 第60回日本ウイルス学会, 大阪, 2012年11月

10) 中島雅晶, 北村紳悟, 大出裕高, 今橋真弓, 長縄由里子, 黒沢哲平, 横幕能行, 山根隆, 渡邊信久, 鈴木淳巨, 杉浦互, 岩谷靖雅: APOBEC3間におけるHIV-1 Vif結合インターフェイスの違い. 第60回日本ウイルス学会, 大阪, 2012年11月

11) 北村紳悟, 大出裕高, 中島雅晶, 今橋真弓, 長縄由里子, 黒沢哲平, 横幕能行, 渡邊信久, 鈴木淳巨, 杉浦互, 岩谷靖雅: APOBEC3Cの構造解析とHIV-1 Vif結合インターフェイスの同定. 第60回日本ウイルス学会, 大阪, 2012年11月 (日本ウイルス学会ポスター賞受賞発表)

12) 大出裕高, 鈴木康二, 藤野真之, 前島雅美, 木村雄貴, 正岡崇志, 服部純子, 横幕能行, 鈴木淳巨, 渡邊信久, 岩谷靖雅, 杉浦互: HIV-1プロテアーゼによるダルナビル耐性の分子機構の解明. 第50回日本生物物理学会, 名古屋, 2012年9月

13) 北村紳悟, 大出裕高, 中島雅晶, 今橋真弓, 長縄由里子, 横幕能行, 鈴木淳巨, 渡邊信久, 杉浦互, 岩谷靖雅: APOBEC3Cの結晶構造解析とHIV-1 Vif結合インターフェイスの同定. 第12回日本蛋白質科学会, 名古屋, 2012年6月

14) 岩谷靖雅: 細胞防御因子APOBEC3を活用する抗HIV治療に向けた造学的研究. 日本学術振興会回折構造生物第169委員会研究会, 東京, 2012年6月

15) 岩谷靖雅: APOBEC3のHIV-1 Vif結合インターフェイス. 第14回白馬シンポジウムin京都,

京都, 2012年5月

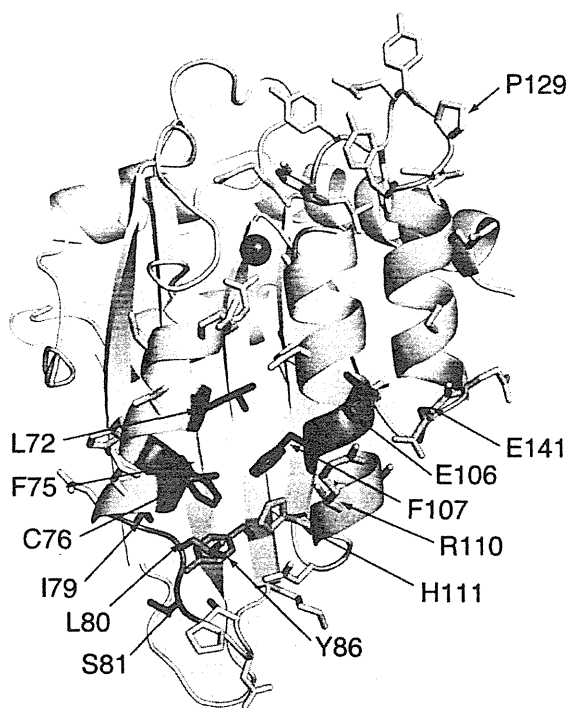


図1. X線結晶構造解析法によって決定したAPOBEC3Cタンパク質の分子構造. 二次構造表示では, Vif結合に重要な残基を示す。

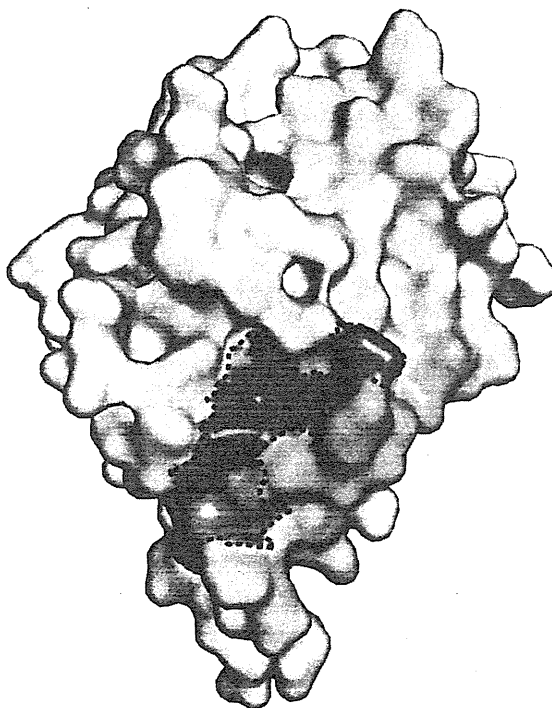


図2. タンパク質表面表示では, Vifが結合する“くぼみ”構造(点線囲内)を示す。

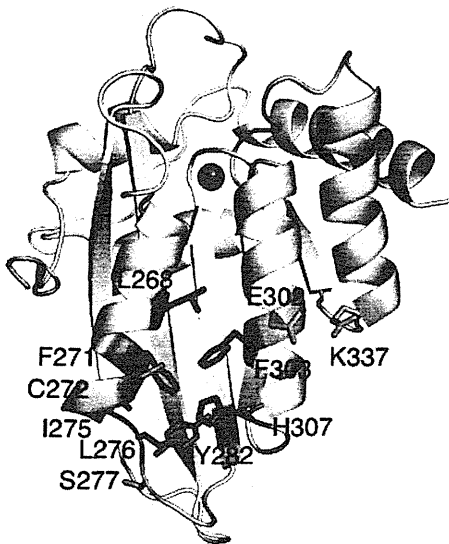
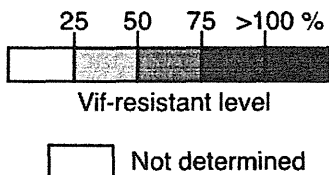
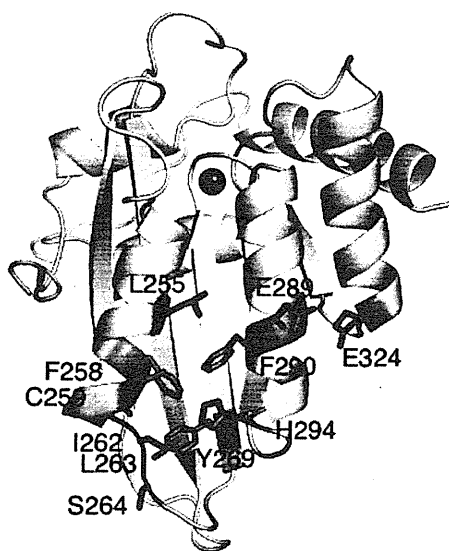


図3 APOBEC3F (上) と APOBEC3DE (下) のホモロジーモデル構造上の Vif 結合領域は構造的に高度に保存されている。

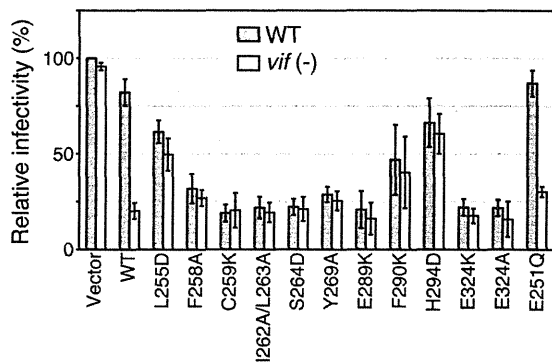


図4 LuSIV 細胞を用いた各 APOBEC3F の抗ウイルス効果を示す。Vif耐性APOBEC3Fは全て *vif* を欠損する HIV-1 だけでなく、野生型 HIV-1 に対しても同レベルの抗ウイルス効果を示した。

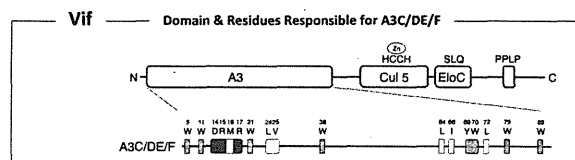


図5 Vif タンパク質配列上で APOBEC3C/F/DE への結合に重要なアミノ酸残基を示す。Vif 側の正電荷モチーフ DRMR と疎水性アミノ酸が結合に重要である。このことから、電荷的な相互作用と疎水的な相互作用が、APOBEC3C/DE/F と Vif との結合に関与すると考えられる。

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

分担研究課題：構造情報に基づいた HIV インテグラーゼの新規機能を規定する
分子間相互作用の解析

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

平成 22-23 年度の本研究班において、HIV-1 インテグラーゼ(IN)の多量体化が機能発現に重要であることを報告した。平成 24 年度は、本研究班研究の総括として、分子動力学的手法による分子構造シミュレーションによる IN の機能的多量体構造を規定する N-末端ドメイン (NTD) のアミノ酸残基間の分子相互作用を検討した。その結果、NTD 構造のコンフォメーション形成を規定する分子間内相互作用として Tyr15 と Asp25 間の水素結合を見いだした。そこで、この 2 つのアミノ酸に種々の点変異を導入した HIV-1IN 変異分子クローンを作成、ウイルス感染性への影響および組み換えタンパク質を用いた生化学的解析を行った。その結果 Tyr15 は Asp25 の Ala 置換変異により、ウイルスの複製が逆転写開始以前で顕著 (WT 比で 0.5%以下) に阻害されることを確認した。加えて、Tyr15 の合計 7 種のアミノ酸置換変異体を作成し、その性状解析を行った。その結果、Tyr15 残基の Asp25 もしくは他のアミノ酸残基間での水素結合や π - π / π -CH 相互作用などの非共有結合が逆転写およびそれ以前の感染素過程における IN 機能発現に必須であることを確認した。本研究結果は、複製前期素過程における IN の機能を規定する構造解明において重要な知見であると考えられる。

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、脱殻、逆転写過程にも関与している。過去の NMR による構造解析により、IN の N-末端ドメイン (NTD) は、2 つの異なるコンフォメーション構造 (E, D フォーム) をとり得る事が報告されている。我々は過去に Tyr15 IN 変異体が正しくフォールディングしているにも関わらず、E フォームのみをとるといふ事を NMR による構造解析により見出している。本研究では、分子動力学的手法による分子構造シミュレーションによる IN NTD 構造を規定するアミノ酸残基間相互作用の検出をこころみ、得られた構造情報を基に種々の変異体を作成し解析した。

B. 研究方法

① IN NTD の分子動力学解析：HIV-1 IN NTD を種々の NMR および部分結晶構造解析結果を鋳型にして構造シミュレーションを、佐藤研究代表者および横山分担研究者との共同で行った。

② 構造情報に基づく変異体の作成と解析：① で見いだされた IN NTD の構造を規定する分子

間相互作用に重要なアミノ酸を種々のアミノ酸に置換した変異 HIV-1 クローンを作成し、single-round 感染系により変異の影響をウイルス複製レベルで評価した。

③ リコンビナント蛋白の調整：各変異 IN 全長配列を pET-47b ベクターに挿入。His-インテグラーゼ蛋白 (rIN 蛋白) および大腸菌 (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、His-タグをプレジジョンプロテアーゼにより除去し、イオン交換カラム (HP-SP) により精製した。

④ rIN蛋白の多量体化アッセイ：精製rINを Gemin2蛋白存在下でクロスリンカー剤 (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。

(倫理面への配慮)
該当事項無し。

C. 研究結果

① IN NTD の分子動力学解析により、NTD

のコンフォメーションのうちDフォーム構造形成時に特異的と考えられる、Tyr15 と Asp25 残基間の水素結合を同定した。(図1)。

② Tyr15 と Asp25 のアミノ酸置換変異体のウイルス複製解析。Tyr15 もしくは Asp25 を Ala に置換した変異体(Y15A, D25A)は、著しい感染価の低下 (WT 比で 0.5%以下) することを確認した(図2A)。また、この感染価の低下は、逆転写初期産物 (R/U5) の産生低下と相関していた (図2B)。

③ Tyr15 を他のアミノ酸に置換した変異体 (Ala, Cys, Tyr, Phe, Trp, His, もしくは Glu 計7種) 解析結果から、殆どのアミノ酸置換変異はAla置換変異と同様に著しい感染低下をもたらした(図2A)、いずれも感染後の逆転写初期産物合成の低下によるものであった。(図2B)。一方で、Tyr15 の Phe への置換 (Y15F) は WT と同様の感染価を維持していた。Trp に置換した変異体 (Y15W) は WT 比で 4.9% 近くの感染価を保持していた(図2A)。

④ レコンビナント IN 蛋白を Gemin2 存在下で BS3 架橋反応を行い SDS-PAGE 後 WB で解析した。その結果、逆転写過程に異常をきたした Tyr15 変異体は二量体および四量体下形成能が低下していた。Y15F は WT と同様に多量体化能を維持していることを確認した (図3)。

D. 考察

HIV-1 インテグラーゼの N 末端ドメイン (NTD, 1-55) の機能的構造を規定する分子間相互作用として Tyr15 残基のベンゼン環基が機能的分子間相互作用に必須であることが確認された。特に Tyr15 残基と Asp25 もしくは他のアミノ酸残基間での水素結合に加え、ベンゼン環基を介した $\pi-\pi/\pi-CH$ 相互作用などの非共有結合が逆転写およびそれ以前の感染素過程における IN 機能発現に必須であることを確認した。本研究結果は、HIV-1 複製前期素過程における IN の機能を規定する構造解明において重要な知見と考えられる。また、HIV 複製阻害剤開発におけるあらたな標的となりうる分子基盤情報を提供した。

E. 結論

HIV-1 IN NTD 領域に存在する Tyr15 残基の Asp25 もしくは他のアミノ酸残基間との水素結合や $\pi-\pi/\pi-CH$ 相互作用などの非共有結合は、IN の感染前期課程における機能と構造維持および発現に必須な分子間相互作用である。

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. Masako Nomaguchi, Ariko Miyake, Naoya Doi, Sachi Fujiwara, Yasuyuki Miyazaki, Masaru Yokoyama, Hironori Sato, Takao Masuda, and Akio Adachi. Natural single-nucleotide polymorphisms in HIV-1 pol-integrase modulate viral replication ability. (Submitted).

2. Shuichi Kinpara, Mami Kijiyama, Ayako Takamori, Atsuhiko Hasegawa, Amane Sasada, Takao Masuda, Yuetsu Tanaka, Mari Kannagi. IFN-alpha suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling while AZT/IFN-alpha induces p53 signaling and apoptosis in infected cells. (Submitted).

2. 学会発表等

1. Satomi Ando, Yuji Murakami, Atsuhiko Hasegawa, Takao Masuda, Mari Kannagi. Unresponsiveness of dominant Tax- specific CD8⁺ T cells in rats orally infected with HTLV-1. 第41回日本免疫学会 2012年12月5-7日 (水-金), 神戸.

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, 2012年11月13-15日 (火-木)、大阪

3. 佐藤 洋子、高畑 辰郎、河合 剛太、長谷川 温彦、神奈木 真理、増田 貴夫. HIV-1 逆転写反応の試験管内再構築に向けた各種因子の検討評価. 第60回 日本ウイルス学会, 2012年11月13-15日 (火-木)、大阪.

4. 安藤 聡美、村上 悠二、長谷川 温彦、増田 貴夫、神奈木 真理. HTLV-1 経口感染ラットを

用いたペプチドパルス樹状細胞ワクチン評価系作成のための基礎的研究. 第60回 日本ウイルス学会. 2012年11月13-15日(火-木)、大阪.

5. 金原 秀一、長谷川 温彦、高森 綾子、増田 貴夫、神奈木 真理. HTLV-1感染T細胞のウイルス遺伝子発現に対するI型インターフェロンの効果. 第60回ウイルス学会 2012年11月13-15日(火-木)、大阪.

6. Ahmed Nursarat、長谷川 温彦、高森 絢子、増田 貴夫、山岡 昇司、神奈木 真理 Establishment of a human iTreg-like cell line susceptible to HIV-1 infection. 第60回ウイルス学会 2012年11月13-15日(火-木)、大阪.

7. 金原 秀一、長谷川 温彦、高森 綾子、増田 貴夫、神奈木 真理. インターフェロン α のHTLV-I遺伝子発現抑制効果. 第5回HTLV研究会. 2012年8月25-26, (土-日) 東京.

8. 笹田 亜麻子、柿沼 桃瑠、金原 秀一、山口 ちひろ、長谷川 温彦、増田 貴夫、山岡 昇司、神奈木 真理. Involvement of innate immune signaling in NF- κ B activity in ATL cells. 第71回日本癌学会総会. 9月19-20日(水-金) 札幌.

9. Shuichi Kinpara, Takao Masuda, Atsuhiko Hasegawa, Atae Utsunomiya, Masataka Nakamura, Mari Kannagi. The presence of anti-sense transcripts containing the long terminal repeat region of HTLV-1 in ATL cells. 第71回日本癌学会総会. 9月19-20日(水-金) 札幌.

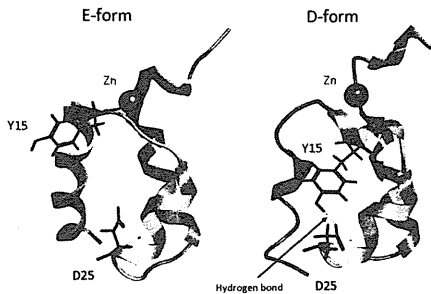


図1 IN NTDのE-form形成維持に際する分子間相互作用
HIV-1 IN NTDの分子動力学解析結果より、D-formの構造維持に重要なTyr15(Y15)-Asp25(D25)間の水素結合を見いだした。

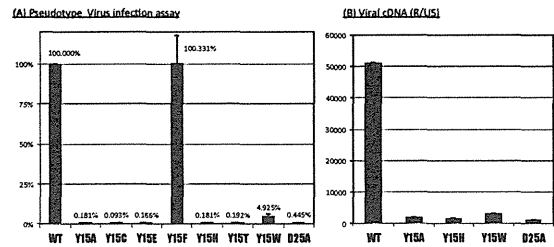


図2 IN Tyr15およびAsp25のアミノ酸置換変異体の複製レベルでの評価
(A) シュドタイプウイルスによるsingle-round感染系での評価. WTのLac活性を100%とした. (B) 感染後のcDNA合成をR/U5プライマーを用いたreal-time PCRにより定量した.

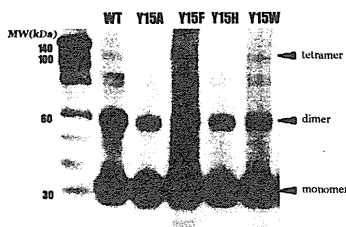


図3 レコンビナントIN蛋白を用いたIN多量体化の解析
精製レコンビナントインテグラーゼと精製レコンビナントGemin2存在下架橋剤(8S3)処理を室温で20分行い、SDS-PAGE後、インテグラーゼ抗体を用いたウェスタンブロット法によりIN蛋白の多量体化をしらべた。

研究課題：HIV の構造、増殖、変異に関する研究

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)

研究協力者：朝光かおり (名古屋市立大学大学院医学研究科 細胞分子生物学)

研究協力者：広川貴次 (産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター)

研究要旨

HIVプロウイルスからの転写過程はHIV複製の律速段階を担う重要な過程であるが、この過程はHIV由来の転写活性化因子Tatと細胞の転写伸長因子P-TEFb (Cyclin T1とCDK9の複合体) との分子間相互作用によって成立する。本研究では、計算機を用いた分子動力学(MD)シミュレーションを行い、CycT1の局所構造の動的変化とTatの活性制御について検討を行った。その結果、Tatの活性制御に重要なCycT1の局所構造の動的変化と、CycT1の分子内水素結合ネットワークを明らかにできた。これらは阻害剤開発の有効な情報となる。

A. 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(CycT1)とCDK9の複合体) によって行われている。この活性制御で重要なのはTatと直接結合するCycT1であり、CycT1がTatと直接結合することでHIVの転写は活性化される。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、我々は近年明らかにされたP-TEFb/Tat立体構造をもとにTat-CycT1の結合様式について解析を進め、CycT1のN末領域がTatの転写活性調節に関与し、特に46番目、50番目のグルタミン残基 (Q46, Q50)、176番目のフェニルアミノ酸残基 (F176) が重要であることを見出した。

最近、Tahirov(Nature 2010)らによりTat/PTEFb三量体構造X線立体構造が明らかにされた(図1)。本構造においては、CycT1は内部に10個のヘリックスをもつ構造をとり、Tatの近傍にCycT1のH1領域、H1'領域、H2'領域が存在した。我々が明らかにしたQ46,Q50はH1に、F176はH2'に存在している。立体構造の知見は、我々が明らかにした生物活性のデータと合致しており、これらのアミノ酸がTat活性調節に関与していることを改めて支持するものである。

近年、タンパク質の構造は、生体内では局所構造が揺らいでおり、その揺らぎがタンパクの活性制御と機能発現に重要であるという認識が高まりつつある。通常、立体構造で得られるタンパク質構造は、静的な状態のタンパク構造である。生体内での揺らぎは、*in silico*にて分子動力学 (MD) シミュレーションで行うことにより得られる。そこで、そこで今回は、野生型CycT1とTatの転写活性化能をした欠損したCycT1変異体 (CycT1 Q46A, CycT1Q50A, CycT1Q46AQ50A, CycT1F176A) のMD解析を行い、CycT1の局所構造とTat転写活性制御の関連性について解析することとした。こ

うして得られた情報は、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。

B. 研究方法

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(Q46A, Q50A, Q46AQ50A, F176A)の構造をもとに AMBER9 ソフトウェアにて MD シミュレーションを行った。MDはシミュレーション時間は、20ns、独立して2回シミュレーション (MD1,MD2) を行った。また解析に用いた代表構造は、MD1,MD2で得られた11ns以降のシミュレーション構造データをもとに算出した。Root Mean Square Deviation(RMSD), Root Mean Square Fluctuation (RMSF), タンパク構造の主成分解析 (PCA), 2次構造予測、水素結合の検出は市販の計算ソフトウェアを用いて実行した。

(倫理面への配慮) 特になし。

C. 研究結果

C1: MDシミュレーション

CycT1 WTとその変異体 (Q46A, Q50A, Q46AQ50A, F176A)の立体構造を用い、シミュレーション時間20ns、独立して2回、MDシミュレーションを行った。まず、MD解析におけるRMSDの変化を調べたところCycT1 WTでは、約7nsで構造が安定化するのが確認された (図1a)。変異体においてもシミュレーション7nsにはシミュレーション構造が安定化した。変異を加えても、WTと比較し特にシミュレーション構造が不安定化しないことが明らかになった。

次にCycT1アミノ酸残基毎のRMSFを計算し、アミノ酸残基の揺らぎを検討した (図1b)。その結果、WTと変異体間で特に大きな変化がないことが明らかになった。

C2: MD解析での代表構造の解析

MDシミュレーションで得られたタンパク構造群の代表構造を算出し、比較解析を行った (図3)。

まずWTには、元の構造 (3MI9_CycT1) と比較してH2'ヘリックス構造がTatとの結合面と反対方向に広がることを確認された。この領域の動的変化を変異体において確認したところ、Q46AではWTとほぼ同じであったが、Q50A, F176AではWTほどの動的変化は見られなかった。特にQ46AQ50Aにおいては、H2'の位置がほぼ3MI9_CycT1と同じであり動的変化を示していなかった。以上から、本領域は変異体毎に異なる動的変化を示し、このことがTatの活性制御に関与すると考えられた。

C3: MDシミュレーションで得られたタンパク立体構造の主成分解析

代表構造において見られたH2'の動的変化について、タンパク質構造を基にした主成分解析 (PCA) を行い更に解析した (図4)。まず、CycT1全体構造を用いたPCAにおいて、WTでは異なる2つのクラスターを形成することが確認された。しかしながら変異体においては、この傾向を示すことがなかった。次にヘリックス毎にPCAを行った。H1, H2, H3, H4, H5においては、WT、変異体ともに中央に一つの円形のクラスターを形成しており、変化が特に見られなかった。しかしながら、H2'領域のPCAでは、WTは2つのクラスターを形成していたが、変異体ではこのような傾向は見られなかった。H2'はWTにおい初期構造とは異なる構造をとることが確認された。

C4: MDシミュレーションで得られたタンパク構造の α ヘリックス構造の保持割合について

CycT1は内部に合計10個の α ヘリックス構造を持つタンパクである。そのヘリックス構造がMD解析中でどの程度保持されているか、検討を行った。その結果WT、変異体共にH5ヘリックス以外のヘリックス構造は保持されていた (図5)。H5ヘリックスについては、Q46A, Q46AQ50A変異体において一部構造が破壊されていることが確認された。以上より、H5構造の安定性を通じてQ46A, Q46AQ50A変異体はTatの活性を制御していると考えられた。

C5: CycT1で保存されていた水素結合ネットワークについて

タンパク質立体構造を安定化させるために、分子内に形成される水素結合は重要である。そこで、MD解析において異なるヘリックスを結ぶ水素結合が存在するかどうか検討した。その結果、CycT1 Q46とQ56の間、若しくはN60を中心として水素結合が高度に保持されていた (図6)。そこで、この水素結合がTatの転写活性化に重要かどうかアラニン変異体を用いて検討したところ、アラニン変異体においてTat転写活性阻害が見られた。これらのアミノ酸による水素結合ネットワークが、

Tatの転写活性化に重要であることが明らかになった。

D. 考察

近年、MD解析により、タンパク質の局所構造の動的変化がタンパク質の機能発現と生命現象に密接に関与していることが明らかになってきている。今回我々はMD解析をCycT1に適用し、野生型と転写活性化能を欠いた変異体CycT1の比較から、Tatの機能活性を制御するCycT1局所構造の動的変化と分子内水素結合ネットワークを見出した。HIV遺伝子の転写発現制御がCycT1の全体構造ではなく、部分的に形成される局所構造の動的変化がより重要であり、これらが薬剤開発のよりよいターゲットとなり得ることを示唆している。

また、Q46A変異体においてH5ヘリックスの α ヘリックス構造が一部破壊されていた。Q46A変異の影響がH1領域 (Q46が存在する領域) ではなく、離れた領域のヘリックス構造に影響を与えたこととなる。こういった知見はMDを行うことにより初めて明らかにできることであり、MDの有用性を示すとともに、今後この変異について更なる検討が待たれる。

E. 結論

- (1)CycT1のH2'領域の動的変化がTatの機能発現に重要である。
- (2)CycT1 Q46,Q56,N60を中心とする水素結合ネットワークがTatの転写活性化に重要である

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)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.*, 2012 (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* 2012 (in press).
- 3)Victoriano, AFB, Imai K, Okamoto T. The interaction between endogenous bacterial flora and the latent HIV. *Clin Vac Immunol. MiniReview.* (submitted)
- 4)Tan Gana NH, Onuki T, Victoriano AF, Okamoto T. MicroRNAs in HIV-1 infection: an integration of viral and cellular interaction at the genomic level. *Front Microbiol.* 2012;3:306. doi: 10.3389/fmicb.2012.00306. Epub 2012 Aug 24.

2. 学会発表等

(1)朝光かおり、森祐多朗、広川貴次、岡本尚：
HIV-1 TatとCyclinT1の相互作用の解析. 第26回日

本エイズ学会学術集会. 2012年11月24-26日(土-月)

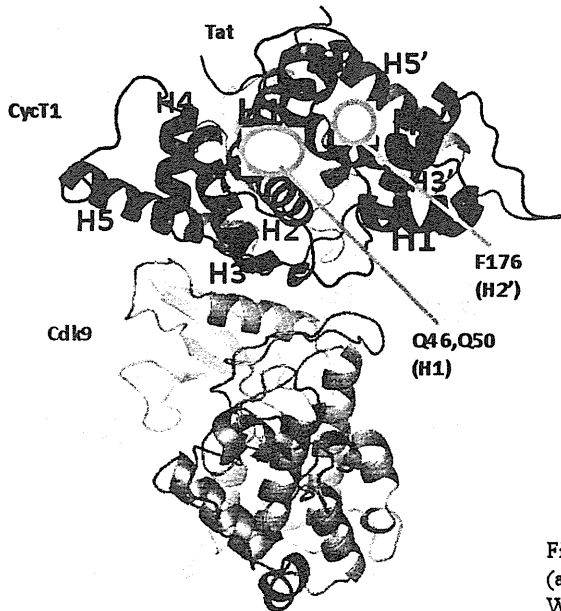


Fig1 Tat/P-Tefb(CycT1/Cdk9)構造(3MI9)
CycT1は10個の α ヘリックス構造を持つ。
Tatの近傍にはH1,H1',H2'が存在し、結合
に関与すると考えられる。Tstの制御に重要
なアミノ酸残基(Q46,Q50,F176)は、それぞ
れH1,H2'に存在する。

Fig2 MDシミュレーション

(a)RMSDの変化(b)RMSFの変化

WT、変異体間で特に大きな差異は認められなかった。

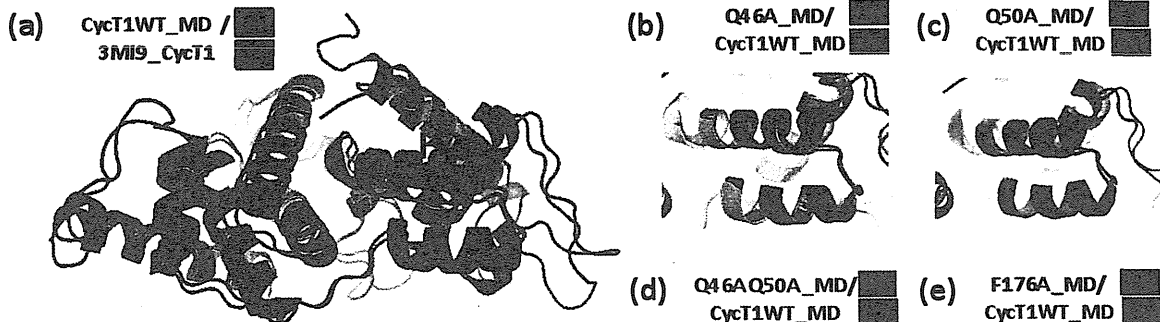
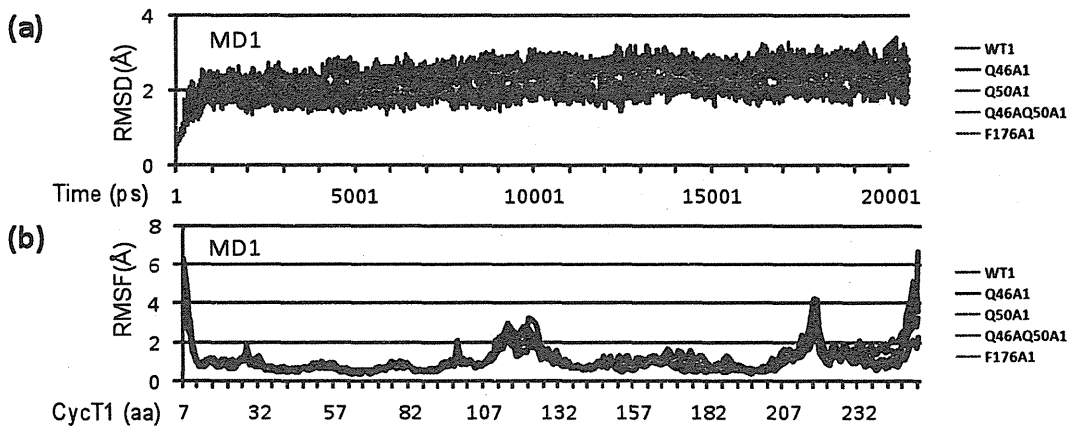


Fig3 MDシミュレーションの代表構造

(a)WT_MD(MDシミュレーションのWTの代表構造)と
3MI9_CycT1を重ね合わせたもの(b-e)変異体の代表構造と
WT_MDを重ねたH2'領域の構造。WT_MDは3MI9_CycT1と比較
して、Tat結合面から離れるようにH2'領域がシフトしている(a)。
変異体のH2'領域は、Q50A_MD、F176A_MDはWTほどシフトせ
ず(c)(e)、Q46AQ50A_MDではほとんどシフトしていない(d)。
Q46A_MDではWTとほぼ同等にシフトしている(b)。

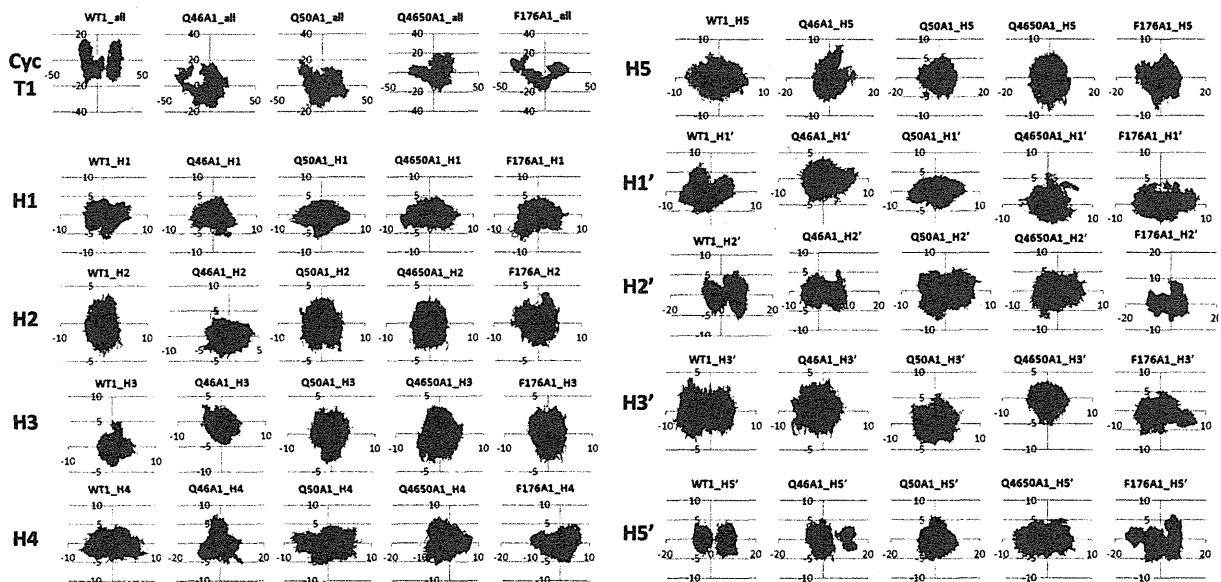


Fig.4 主成分解析(PCA)

シミュレーションで得られた構造を基に主成分解析を行った結果(横軸:第一主成分、縦軸:第二主成分)。CycT1全体では、WTで大きく2つのクラスターを形成する。H2'領域においても、WTでは2つのクラスターを形成しているが、変異体ではそのような傾向は見られない。H2'領域以外のヘリックス、特にH1領域からH5領域では中央に一つのクラスターを形成し、WTと変異体間で特に大きな差は見られない。

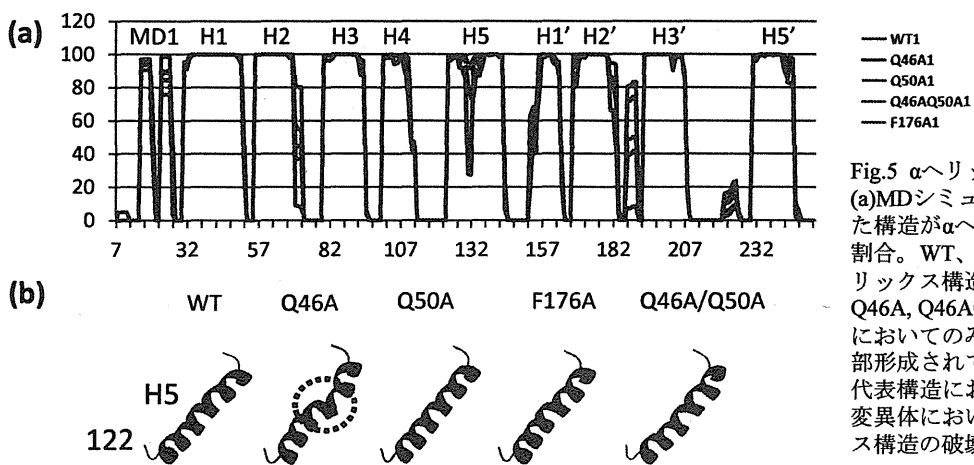


Fig.5 α ヘリックス構造保持割合
(a)MDシミュレーションで得られた構造が α ヘリックス構造を示す割合。WT、変異体においてヘリックス構造は保たれているが、Q46A、Q46A/Q50A変異体のH5領域においてのみヘリックス構造が一部形成されていなかった。(b)MD代表構造におけるH5構造。Q46A変異体において、H5の α ヘリックス構造の破壊が顕著に見られる。

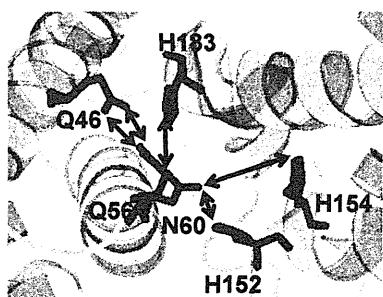


Fig.6 水素結合ネットワーク
MDシミュレーションでCycT1 Q46とQ56の間、若しくはN60を中心として水素結合が高度に保持されていた。

研究課題：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 微生物病原学分野 准教授）

研究要旨

HIV-1 インテグラーゼ (IN) の変異は、ウイルス複製前期および後期過程に影響を及ぼす。我々はウイルス馴化実験により、HIV-1 IN-C 末端領域の非常に狭い領域内 (IN-CTD (222-234)) に増殖促進変異が集中して起こることを見出した。IN-CTD (222-234) の増殖促進変異はいずれも非同義置換であったが、IN が必須のウイルス複製前期過程ではなく、ウイルス産生量の増強によりウイルス複製能を増加させることが分かった。本研究では、IN-CTD (222-234) のウイルス複製における役割・意義を明らかにすることを目的とした。詳細な変異体解析から、ウイルス産生量・複製能の増強は HIV-1 後期蛋白質発現量の増加によること、かつ、これがアミノ酸ではなく塩基配列依存的に起こることも分かった。さらに、IN-CTD (222-234) の naturally occurring synonymous single-nucleotide polymorphism を HIV-1 に導入するとウイルス産生量・複製能は増減し、これがウイルス後期蛋白質発現量とよく相関することが明らかになった。これらの結果は、IN-CTD (222-234) が塩基配列依存的に HIV-1 後期蛋白質発現量に影響を及ぼし、ウイルス産生量・複製能を変化させる領域であることを示す。

A. 研究目的

HIV-1 病原性発現機構の理解や新規抗 HIV/エイズ戦略の策定には、適切な動物モデルが必須である。しかし、HIV-1 は宿主域が狭く、実験用小動物のみならず実験用霊長類 (アカゲザルやカニクイザル) にも感染しない。したがって、霊長類モデル確立のためには、サル指向性 HIV-1 の構築が不可欠である。また、この構築過程において、宿主指向性や増殖能に影響を及ぼすウイルス側の責任領域や変異に関する重要な知見が得られると期待される。

2種のプロトタイプサル指向性 HIV-1 (X4-tropic の NL-DT5R および R5-tropic の NL-DT562) は、サル・ヒト細胞に感染可能であるが、サル細胞での増殖効率はサル病原性標準株 (SIVmac239) よりも低かった。そこで、サル細胞において NL-DT5R (5R) および NL-DT562 を馴化し、プロトタイプサル指向性 HIV-1 がどのような変異を獲得し、複製能を向上させるかを解析することを試みた。2種のプロトタイプサル指向性 HIV-1 感染細胞の長期培養により、向上した増殖能を示す馴化型ウイルスが出現した。馴化型ウイルスゲノムには複数の変異が存在するものの、増殖を促進する変異はインテグラーゼ-C 末端領域 (IN-CTD) とエンベロープ (Env) にのみ認められた。再馴化実験においても、IN-CTD と Env の増殖促進変異は再現性をもって出現し、ウイルス複製におけるこれらの領域の重要性を示唆した。5R Env では1種、NL-DT562 Env では7種の増殖促進変異を同定した。IN-CTD の増殖促進変異 (N222K、F223Y、D229E、V234I) は、HIV-1 IN アミノ酸配列 222番目から 234番目の狭い領域内 (IN-CTD (222-234)) に集中していた。また、これらの IN-CTD 変異は、サル細胞でもヒト細胞でも HIV-1 増殖効率を向上させた。さらに、これらの変異がウイルス複製前期過程に影響を及ぼすことなく、ウイルス産生

量を増加させ、その結果、ウイルス複製能の向上をもたらすことを明らかにした。本研究では、IN-CTD (222-234) のウイルス複製における役割と本領域のウイルス学的意義について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. ウイルスゲノム (5R および NL4-3) の改変とシーケンズ確認は定法に従った。HIV-1/SIVcpz 配列比較には、HIV sequence compendium 2010 (Los Alamos National Laboratory, <http://www.hiv.lanl.gov>) を用いた。
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、ヒト MT4/CCR5 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) とヒト M8166 細胞を用いた。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. ウイルス蛋白質発現量は、HIV-1 プロテアーゼ阻害剤サキナビル (SQV) 存在下もしくは非存在下でプロウイルスクローンをヒト 293T 細胞にトランスフェクション (Lipofectamine 2000, Invitrogen) し、翌日に細胞抽出液を調製しウェスタンブロッティングにより解析した。ウイルス産生量は、p24 ELISA で測定した。

(倫理面への配慮)

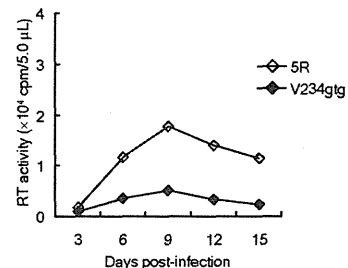
ヒト由来臨床材料を使用する研究や動物実験は行わない。組換え DNA 実験は徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会 (委員長 足立昭夫教授) の承認を得て行う。「キメラゲノムによる HIV-1 の分子遺伝学的研究」をする間に執る拡散防止措置については文部科学大臣の確認が得られている (21受文科振第935号)。

C. 研究結果

- 4種のIN-CTD変異がアミノ酸配列依存的に増殖促進するか否かを調べるため、種々のアミノ酸変異体を作製しウイルス産生量・複製能に及ぼす影響を調べた。N222、D229、V234のアミノ酸変異体において、ウイルス産生量の増減と複製能の増減とはよく相関していた。しかし、ウイルス産生量・複製能の増減とアミノ酸の性質との間に一定の関係性は見出せなかった。F223のアミノ酸変異体は、いずれもウイルス産生量を増加させたが、ウイルス複製能の増加と結びつくものは増殖促進変異F223Yのみであった。これは、F223変異によるウイルス複製前期過程の欠損に由来していることが分かり、F223がINの機能に重要であることが示された。これらの結果から、IN-CTD変異によるウイルス産生量・複製能の向上はアミノ酸配列依存的ではないと考えられた。そこで、塩基配列依存性について調べるため、4つの増殖促進変異についてコドンを変更しウイルス産生量・複製能への影響を解析した。N222K、F223Y、D229Eについてはコドンによらず、いずれも親株よりもウイルス産生量・複製能が増加していた。しかし、V234I (att)についてはV234I (atc)にするとウイルス産生量・複製能が親株と同程度にまで低下し、V234I (ata)では親株よりも増殖が促進された。このことから、IN-CTD増殖促進変異における塩基配列の重要性が示唆された。
- V234Iコドン変異体について、ウイルス粒子形成に必須のGag (p24抗体) とGag-Pol (RT抗体) の発現量をSQV存在下および非存在下で調べた。SQV非存在下での蛋白質発現パターンに各変異体間で差異はなく、プロセシングへの影響は認められなかった。SQV存在下でも非存在下でも、Pr55^{Gag}やp24、Pr160^{Gag-Pol}やRTの発現量は、ウイルス産生量・複製能の増減と相関していた。
- IN-CTD (222-234)の塩基配列がウイルス産生量・複製能に及ぼす影響をさらに調べるため、HIV-1 compendium 2010を用いてHIV-1/SIVcpzの塩基配列を比較した。まず、V234について下表にまとめた。親株が持つアミ

HIV-1/SIVcpz sequences ¹					
Amino acid frequency			Codon frequency		
Amino acid	Number	%	Codon	Number	%
V	25	13.0	GTT	24	12.5
			GTG	1	0.5
I	125	65.1	ATT	123	64.1
			ATC	2	1.0
L	40	20.8	CTT	39	20.3
			CTG	1	0.5
S	1	0.5	AGC	1	0.5
T	1	0.5	ACT	1	0.5

ノ酸/コドンを一番上の行に示し、増殖促進変異を灰色で表した。ウイルス産生量・複製能が増加する変異V234I (att)も低下する変異V234I (atc)も頻度は異なるが自然に存在することが分かった。このことは、naturally occurring synonymous single-nucleotide polymorphism (サイレントSNPと省略)によりHIV-1複製能が変動することを示唆するものと考えられた。そこで、親株 (5R) が持つV234の塩基gttをgtgに変更しウイルス複製能を調べた。その結果、アミノ酸置換を伴わない1塩基置換で複製能が著しく低下することが示された (右のグラフ)。



- HIV-1/SIVcpz塩基配列比較から、V234以外の増殖促進変異サイトN222、F223とD229にもサイレントSNPが存在することが分かった (下表)。さらに解析を進めるため、IN-CTD (222-234) 領域内からV225、Y226とP233を

HIV-1/SIVcpz sequences					
Amino acid frequency			Codon frequency		
Amino acid	Number	%	Codon	Number	%
N	175	91.1	AAT	171	89.1
			AAC	4	2.1
K	15	7.8	AAA	15	7.8
Q	2	1.0	CAA	2	1.0

HIV-1/SIVcpz sequences					
Amino acid frequency			Codon frequency		
Amino acid	Number	%	Codon	Number	%
F	192	100.0	TTT	177	92.2
			TTC	15	7.8
Y	0	0.0	TAT	0	0.0

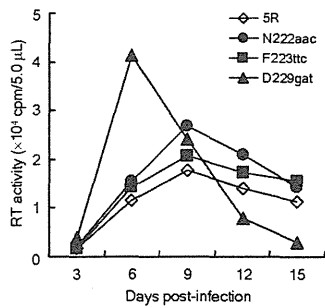
HIV-1/SIVcpz sequences					
Amino acid frequency			Codon frequency		
Amino acid	Number	%	Codon	Number	%
D	192	100.0	GAC	189	98.4
			GAT	3	1.6
E	0	0.0	GAA	0	0.0

HIV-1/SIVcpz sequences					
Amino acid frequency			Codon frequency		
Amino acid	Number	%	Codon	Number	%
V	192	100.0	GTT	171	89.1
			GTC	21	10.9

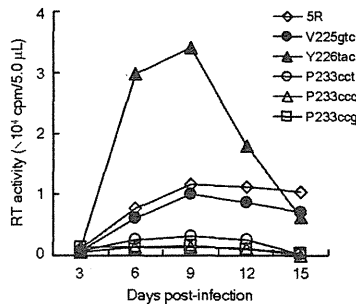
HIV-1/SIVcpz sequences					
Amino acid frequency			Codon frequency		
Amino acid	Number	%	Codon	Number	%
Y	190	99.0	TAT	189	98.4
			TAC	1	0.5
F	1	0.5	TTT	1	0.5
H	1	0.5	CAT	1	0.5

HIV-1/SIVcpz sequences					
Amino acid frequency			Codon frequency		
Amino acid	Number	%	Codon	Number	%
P	191	99.5	CCA	129	67.2
			CCT	37	19.3
			CCC	24	12.5
			CCG	1	0.5
S	1	0.5	TCA	1	0.5

選択した。親株が持つアミノ酸/コドンを一
番上の行に示し、増殖促進変異を灰色で表
した(上表)。それぞれのサイレントSNP
を導入したウイルスを作製し、複製能を
調べた。右グラフに示すように、N222aac、

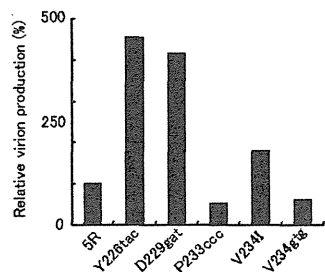


F223ttc、V225gtcではウイルス複製能は親株
(5R)と同程度であったが、サイレントSNP
変異体であるY226tac、D229gatではウイル
ス増殖能が親株に比べて向上し、逆にP233cct/
cccでは増殖能は親株よりも低下した。これらの
結果から、IN-CTD

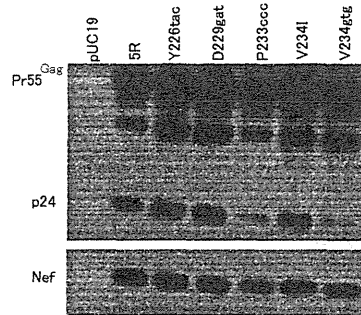


(222-234)がウイルスゲノム内のわずか1塩
基の同義置換でウイルス複製に影響を及ぼ
す領域であることが明らかとなった。さら
に、サイレントSNPによるウイルス複製能の
増減が、サル指向性HIV-1である5R特異的
なものではなく、HIV-1標準株NL4-3でも起
こることを確かめた。

- V234Iコドン変異体では、GagとGag-Pol発現
量がウイルス産生量と相関していた。感染
性ウイルス粒子の産生量が増減するため
には、GagやGag-Polのみならず、Envも
変動することが予測される。また、HIV-1
蛋白質はスプライシングにより異なるmRNA
から合成される。そこで、~9kb mRNA
から合成されるGagとGag-Pol、~4kb
mRNAから合成されるVpuとEnv、およ
び~2kb mRNAから合成されるNefにつ
いてサイレントSNPがウイルス蛋白質発
現量に及ぼす影響について調べた。V234I
は非同義置換であるが、1塩基置換で
ウイルス産生量・複製能の増加が起
こるため解析に加えた。まず、サイレント
SNPによるウイルス複製能の増減は、ウ
イルス産生量の増減(右のグラフ)とよ
く相関することを確認した。ウイルス
蛋白質



発現量の例として、Gag (p24)およびNefの解
析結果を示す。ウイルス産生量・複製能が
向上するY226tac、D229gatやV234Iでは、



Pr55^{Gag}やp24の発現量は増加し、逆に、ウ
イルス産生量・複製能が低下するP233cccや
V234Iggでは、Pr55^{Gag}やp24の発現量が減少
した。Pr160^{Gag-Pol}やRT、VpuとEnvの発現量も、
Pr55^{Gag}やp24と同様の結果を示した。対照的
に、Nefの発現量はウイルス産生量・複製能
との明確な相関は認められなかった。この
結果は、サイレントSNPがHIV-1前期蛋白質
ではなく、後期蛋白質発現量を増減させる
ことにより、ウイルス産生量・複製能を変
動させることを示す。

D. 考察

本研究において、IN-CTD (222-234)が、塩基配
列依存的にHIV-1遺伝子発現制御を制御し、ウ
イルス産生量・複製能に影響を及ぼす領域であ
ることを明らかにした。このようなIN-CTD変異がウ
イルス馴化実験により見出されたことは、ウイル
スがアミノ酸レベルだけではなく塩基レベルで
も変異・進化することを示唆するものと考えられ
た。

ウイルス複製能を減少させるサイレントSNP
を持つHIV-1の自然での存在比率は、予想される
ように低かった。一方、ウイルス複製能を増加さ
せるV234Iを持つHIV-1の存在比率はV234より
高かったが、Y226tacやD229gatを持つHIV-1の存
在比率は、親株が持つY226tatやD229gatよりも低
かった。このことは、ウイルス複製能の増強が自
然環境での生存に必ずしも適するわけではない
ことを示唆しており、宿主免疫との関連が想定さ
れた。

今後は、IN-CTD (222-234)のサイレントSNPに
よるHIV-1後期蛋白質発現制御機構の解明が課
題である。本領域は、スプライシングアクセプ
ターA1サイトとスプライシングドナーD2サイトの
間に位置している。そのため、宿主因子の結合部
位となる可能性が極めて高いと推測されるが、こ
れまでに本領域に結合する因子は報告されてい
ない。HIV-1遺伝子発現を制御する新規因子の同
定を試みたいと考えている。

E. 結論

HIV-1 遺伝子発現に関わる新規の領域を同定した。今後、IN-CTD (222-234) のサイレント SNP による HIV-1 遺伝子発現制御機構を解明できれば新たな HIV-1 制御法の確立につながると期待される。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.* 15:56-65, 2013.

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.

2. 学会発表等

1) 野間口雅子、三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、宮崎恭行、足立昭夫：HIV-1 インテグラーゼ C 末端領域の 1 塩基置換によるウイルス複製制御機構の解析。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。

2) 土肥直哉、藤原佐知、酒井遥介、松本唯、足立昭夫、野間口雅子：R5-tropic HIV-1mt NL-DT562 の Env 適応変異による増殖促進機構の解析。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) Saito, A., Kono, K., Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., Shioda, T., Adachi, A., Akari, H., Nakayama, EE, Genetic Diversity of TRIM5 Gene and HIV-1 Susceptibility in Cynomolgus Macaque (*Macaca fascicularis*). Cold Spring Harbor Retroviruses, May 21-26, 2012, New York, USA.

研究課題：HIV ゲノムの核移行制御因子の構造機能解析

研究分担者：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・ユニットリーダー）

研究要旨

HIV-1Vpr は HIV-1 ゲノムの核移行、細胞周期の G2 期 arrest および apoptosis を引き起こしウイルス複製およびエイズ発症に大きく関与する。これまで、Vpr は核輸送アダプター因子 Importin α (Imp α) との結合を介して核移行する新規核移行能を有すること、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ることを報告してきた。さらに、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 Vpr の *in vitro* での核移行およびマクロファージにおけるウイルス複製をも阻害することを報告した。

そこで本研究ではこれまでに得られている化合物の 1 つであるヘマトキシリンのリード最適化を行い、30 種類の誘導体を合成しその性状を解析した。健常人から分画したマクロファージを用いて感染阻害効果を調べた結果、50%感染阻害濃度が 1 nM 以下の有用な誘導体 23 が得られた。この化合物の細胞毒性は低く、51.4 μ M であった。また、Vpr は三つの α -helical ドメインを持っており、細胞内因子と非常に相互作用しやすい三次元構造をとっているが、セファロースビーズを用いた化合物と蛋白質の結合実験により、化合物 23 は Helix3 領域と特異的に結合することが明らかとなった。さらに、化合物 23 は Vpr が惹起する複数ある機能の中で核移行能を阻害したが、アポトーシス誘導能および G2 期停止能は阻害しなかった。

本研究によって、Vpr に結合することによりその機能を阻害する結果としてマクロファージにおけるウイルス複製をも阻害する低分子化合物ヘマトキシリン誘導体 23 の同定に成功した。

A. 研究目的

近年、多剤併用療法 (HAART 法) の確立によりエイズ発症を遅らせることが可能となった。しかし、この HAART 法には耐性ウイルスの出現と潜伏感染細胞を完全に排除できないという問題があり、エイズの根治は不可能であることから、異なる作用点を標的とした抗 HIV 薬の開発が求められている。ヒト免疫不全ウイルス 1 型(HIV-1) のアクセサリータンパク質 Vpr は核移行、細胞の G2 期停止及びアポトーシス誘導などの様々な機能を通じてウイルス複製とエイズ病態を制御している。近年我々は *in vitro* 核移行解析において Vpr の核移行を阻害する小分子化合物ヘマトキシリンが、マクロファージにおける HIV-1 の複製を抑制することを明らかにした。この成果は Vpr が新規抗 HIV-1 薬の標的になることを示唆している。

そこで本研究ではこれまでに得られている化合物の 1 つであるヘマトキシリンのリード最適化を行い、誘導体の性状を解析した。

B. 研究方法

1) 構造活性相関により誘導体を合成し、それらのウイルス阻害効果をマクロファージを用いた感染実験により調べた。マクロファージの準備は健常人由来の血液から末梢血単核球 (PBMCs) を分画し、抗-CD14抗体ビーズを用いてCD14陽性細

胞である単球を分離し、Macrophage colony stimulation factor (M-CSF)を加えて1週間培養し、最終分化マクロファージとした。

2) *in vitro* 核移行アッセイ、Vpr 発現 HeLa 細胞における Vpr の局在、細胞周期停止及びアポトーシス誘導に対する化合物の影響を調べた。

3) Vpr と化合物との結合領域を調べるため、N 末端、Helix1、Helix2、Helix3 及び C 末端領域を Flag-mRFP 融合タンパク質として真核細胞で発現・精製し、化合物を結合させたセファロースビーズを用いて結合実験を行った。

4) セファロースビーズを用いた化合物と蛋白質の結合実験は光親和性標識されたビーズに UV 照射により、化合物を結合させ、大腸菌で発現・精製した N 末端、Helix1、Helix2、Helix3 及び C 末端領域を混合し、遠心により化合物に結合した蛋白を沈殿させ、SDS-PAGE により泳動後に Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色により検出した。

(倫理面への配慮)
無し

C. 研究結果

1) 構造活性相関により、Vpr の核移行を阻害する小分子化合物へマトキシリンを基本骨格として約 30 種の誘導体を合成した (図 1)。

2) 健康人から分画したマクロファージを用いて感染阻害効果を調べた結果、50%感染阻害濃度が 1 nM 以下の有用な誘導体 23 が得られた (Table 1、図 2)。この化合物 23 の細胞毒性は低く、51.4 μ M であった。

3) Vpr は三つの α -helical ドメイン (Helix1、Helix2、Helix3) と N 末端と C 末端領域を持っており (図 3)、細胞内因子と非常に相互作用しやすい三次元構造をとっている。次に、Vpr と化合物との結合領域を調べた。化合物 23 は全長 Vpr 及び Helix3 領域と特異的に結合した (図 4)。

4) Vpr は核移行能以外にアポトーシス誘導能および G2 期停止能などを惹起する多機能性タンパク質である。そこで、Vpr の核移行能を阻害する化合物 23 の核移行以外の Vpr の機能への影響を調べた。まず、化合物 23 は *in vitro* において核移行を阻害した (図 5)。次に、アポトーシス能は、HeLa 細胞に Vpr 発現プラスミドを導入し、6 時間後に化合物を加え、24 時間後の caspase-3 の活性を指標として評価した。その結果、化合物 23 はアポトーシス誘導のいずれも阻害しなかった (図 6)。さらに、細胞周期の G2 期停止能への影響を解析した。化合物を Vpr 発現プラスミド導入 6 時間後に加え、さらに 48 時間培養後に HeLa 細胞を回収し flow cytometry 法を行った。いずれの濃度においても化合物 23 は Vpr による G2 期停止に効果を示さなかった (図 7)。

5) 化合物 23 が結合する Helix3 を Flag-mRFP 融合タンパク質として HeLa 細胞に発現させると、細胞質に局在していた (図 8)。本化合物はこれまでに報告されていない Vpr の新規機能も阻害している可能性が示唆された。

D. 考察

本研究によって、Vpr に結合することによりその機能を阻害する結果としてマクロファージにおけるウイルス複製を阻害するヘマトキシリン誘導体 23 を見出した。

これまでの我々の解析から、ヘマトキシリンは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されている。事実、化合物 23 は Vpr が惹起する複数ある機能の中で核移行能を阻害したが、アポトーシス誘導能および G2 期停止

能を阻害しなかった。以上の結果から、Vpr の核移行が創薬の標的になることが示された。この成果は、宿主因子との接点がウイルス阻害薬のターゲットになることを強く示唆している。

E. 結論

- 1) ヘマトキシリンのリード最適化を行い、30 種類の誘導体を合成した。
- 2) マクロファージを用いて感染阻害効果を調べた結果、50%感染阻害濃度が 1 nM 以下の有用な誘導体 23 が得られた。この化合物 23 の細胞毒性は著しく低く、51.4 μ M であった。
- 3) 化合物 23 は Helix3 領域と特異的に結合し
- 4) 化合物 23 は Vpr の機能の中で、核移行能を阻害したがアポトーシス誘導能および G2 期停止能を阻害しなかった。

F. 知的所有権の取得状況

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishii H, Koyama H., Hagiwara K., Miura T., Xue G., Hashimoto Y., Kitahara G, Aida Y, Suzuki M. Synthesis and biological evaluation of hematoxylin derivatives as a novel class of anti-HIV-1 reagents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 22: 1469-74, 2012.
- 2) Arainga M., Murakami H., Aida Y. Visualizing spatiotemporal dynamics of apoptosis after G1 arrest by human T cell leukemia virus type 1 Tax and insights into gene expression changes using microarray-based gene expression analysis. *BMC Genomics*. 13: 121, 2012

2. 学会発表等

- (1) Ishii H., Sekito E., Koyama H., Kyoji H., Miura T., Xue G., Yoshie Hashimoto Y., Kitahara G., Aida Y., Suzuki M. SAR studies of hematoxylin derivatives as a novel class of anti-HIV-1 agents and its photoaffinity studies using bis- azido functionalized probe. 13th Tetrahedron Symposium, Amsterdam, The Netherlands, June 26 – 29, 2012.
- (2) Aida Y: Nuclear Import process as potential antiviral target for flu and AIDS, Loveland/Jans Lab Seminar, 23rd July, School of Biomedical Sciences Monash University, Melbourne, Australia.
- (3) Murakami T, Aida Y: Visualizing Vpr-induced G2 Arrest and Apoptosis, 24th Workshop on Retroviral Pathogenesis, 2012.10.24-27 Philadelphia USA
- (4) 村上知行、間陽子: HIV Vpr による細胞周期 G2 期停止に関与する新規宿主因子の同定、第 60