

20/226003B

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
課題番号 H22-エイズ-一般-003

HIV の構造、増殖、変異に関する研究

平成 22～24 年度 総合研究報告書

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)

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
課題番号 H22-エイズ-一般-003

HIV の構造、増殖、変異に関する研究

平成 22～24 年度 総合研究報告書

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)

目 次

I. 研究組織	
II. 平成 22 ～ 24 年度 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）	
III. 業績一覧（2010 ～ 2012）	7
IV. 刊行物別刷り（抜粋）	31

I. 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

II. 平成22～24年度 総括研究報告書

研究課題：HIV の構造、増殖、変異に関する研究

課題番号：H22-エイズ一般-003

研究代表者：佐藤裕徳（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 室長）

研究分担者：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・大学院生命科学部 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。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。本研究により、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 蛋白質の致死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

HIV の治療標的となる弱点を知るために、以下の研究を進めた。 A. HIV の抗 HIV 因子耐性構

造の研究、 B. HIV 複製機構の研究、 C. 抗 HIV 因子の研究。いずれも分子生物学、ウイルス学、構造生物学などの実験的手法に計算科学の技術を取り入れて解析した。

A. HIV の抗 HIV 因子耐性構造の研究

(A-1) HIV Gp120 の抗体耐性構造の研究 (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) TRIM5 α とカプシドの構造機能の研究 (塩田)

HIV 感染抵抗性因子である TRIM5 α と、その標的分子であるウイルスカプシドの双方の機能構造相関の詳細を明らかにする。また TRIM5 α の抗 HIV 作用の分子機構の解明を試みる。これらの目的のために HIV カプシドの変異の TRIM5 α の感受性に及ぼす影響を解析する。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する。また、ヒト TRIM5 α の遺伝的多型の抗 HIV 活性への影響を検討する。

(A-3) HIV-1 のサル TRIM5 α 抵抗性研究 (野間口)

HIV-1 の宿主指向性や増殖能を変動させる新規領域や変異を特定し、HIV-1/エイズ発症サルモデルの確立に役立つ。HIV-1 の馴化実験による増殖促進変異の同定、および構造情報に基づきサル TRIM5 α 抵抗性の HIV-1 Gag-CA 設計を行った。

B. HIV 複製機構の研究

(B-1) HIV-1 インテグラーゼの新規機能と機能構造の研究 (増田)

HIV-1 インテグラーゼはウイルスゲノムの脱殻、逆転写にも関与している。本研究では、これらインテグラーゼの新規機能を規定する構造を同定することを目的とする。NMR と分子動力学解析 (研究代表者との共同) 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。

(B-2) HIV ゲノムの転写制御因子の構造機能の研究 (岡本)

HIV プロウイルスからの転写過程は HIV 転写活性化因子 Tat と細胞の転写伸長因子 P-TEFb (Cyclin T1/CDK9) との分子間相互作用によって成立する。

本研究では、CycT1 立体構造をもとにした解析と分子動力学 (MD) シミュレーションを駆使し、CycT1 と Tat の結合様式と Tat 独特の活性制御機構を明らかにする。CycT1 立体構造から、Tat の結合と活性制御に関与する CycT1 のアミノ酸を予測し、それらの変異体を用いてその妥当性について検討した。MD 解析は Tat/PTEFb 構造 (PDB_ID:3MI9) の CycT1 構造と活性を失った CycT1 変異体構造を用いシミュレーションを行った。

(B-3) HIV ゲノムの核移行制御因子の構造機能の研究 (間)

HIV のマクロファージにおける増殖を昂進する Vpr 機能の分子基盤解明と阻害剤探索を目的とする。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、さらに構造活性相関により最適化を行い、誘導体の性状を解析した。

C. 抗 HIV 因子の研究

(C-1) HIV 感染抵抗性因子の構造機能の研究 (岩谷)

宿主の APOBEC3 ファミリー 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ように、HIV-1 Vif が結合する APOBEC3 のインターフェイスの構造を解明することを目的とした。APOBEC3C タンパク質の分子構造決定には、X線結晶構造解析法を利用した。Vif 結合領域の決定には結晶構造情報に基づいた点変異導入と表現型の解析 (Structure-Guided Mutagenesis) を行った。

(C-2) HIV-1 Gag 部分ペプチドの抗 HIV 作用の研究 (村上)

ペプチド化学的手法による HIV-1 Gag 部分ペプチドの細胞内導入による HIV 複製制御の可能性を検証するため、HIV-1MA および CA 部分ペプチドライブラリーの抗 HIV-1 活性を指標としたスクリーニングを行った。細胞膜透過性を付与した MA および CA 部分ペプチドライブラリーについて標的細胞 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 R5 HIV-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。また、HIV-1 の複製におけるサイクロフィリン A (CypA) の役割に解明のため CypA 非依存的に増殖する変異株の分離と解析を行った。Jurkat 細胞を用いてサイクロスポリンを添加条件下で CypA 非依存的に増殖する HIV-1 変異株の誘導を行った。

(C-3) 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)

HIV アクセサリータンパク質と宿主抗レトロウイルス因子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、この相互作用を標的とした新規治療法の有用性を検討する。無細胞タンパク質合成法およびアルファスクリーン法を用い、HIVアクセサリタンパク質と相互作用する宿主因子の網羅的に同定した。次に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. HIVの抗HIV因子耐性構造の研究

(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 感受性カプシドは97番目と119番目のアミノ酸間の水素結合の形成頻度が低下し、ヘリックス4/5ループ(L4/5)が安定した。カプシド120番目のアミノ酸ならびに173番目から後のC末端領域もTRIM5 α 感受性に影響した。ヒトTRIM5 α のリンカー部分の249番目のグリシンからアスパラギン酸への多型は抗HIV作用を減弱させた。

(A-3) サルTRIM5 α 抑制回避に寄与する4つのGag-CAアミノ酸サイトを同定した。IN-C末端領域内に1塩基レベルでHIV-1遺伝子発現を制御し、複製能を増減させる新規領域が存在することを明らかにした。

B. HIV複製機構の研究

(B-1) HIV-1インテグラーゼN末ドメインのコンフォメーションを規定するTyr15とAsp25残基間相互作用を見出した。HIV-1インテグラーゼのTyr15とAsp25の維持は、感染初期の進行に必須であることを明らかにした。

(B-2) CycT1立体構造解析から、Tat活性に重要なCycT1アミノ酸残基(Q46, Q50, F176)を見出した。MD解析によりCycT1の局所構造(H2')の動的変化と分子内水素結合ネットワークがTat活性を制御していることを見出した。

(B-3) 一般的な核移行と異なり、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importin α の核外輸送因子CASが関与していることを明らかにした。Vprとimportin α との結合を阻害して核移行過程を阻害するHematoxininを同定し、その最適化誘導体

23(IC₅₀ 0.001 μ M)を得た。ケミカルアレイ法により、Vpr結合化合物としてSIP-1誘導体(IC₅₀ 0.5 μ M)を同定した。

C. 抗HIV因子の研究

(C-1) 高分解能のAPOBEC3Cタンパク質の分子構造を決定することに世界で初めて成功した。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、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を見いだした。結合インターフェイスはAPOBEC3DEとAPOBEC3Fにおいても高度に保存されていることが明らかになった。

(C-2) 1) MAおよびCA部分ペプチドのどちらにおいてもX4、R5 HIV-1のいずれのウイルスに対してもEC50: 1 mM以下で阻害活性を示すフラグメントを見出した。2) Capsid N121K変異HIV-1株が細胞内のCypA濃度が様々な各種細胞株においてCypA依存的な複製抑制を受けることを明らかにした。

(C-3) HIVタンパク質Vpu、Vif、Vpxと相互作用するリン酸化・ユビキチン化関連因子を多数同定した。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が明らかとなった。

4. 考察

A. HIVの抗HIV因子耐性構造の研究

(A-1) 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。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。

(A-2) 本研究からTRIM5 α 感受性の決定基はカプシドのL4/5、120番目のアミノ酸とC末端領域であることが示唆される。C末端領域はカプシドの内側に存在するものの、6量体の構造からは外部からも接触可能であり、TRIM5 α が直接結合する可能性もある。また、ヒトTRIM5 α のリンカー部分の249番目の多型は抗HIV作用を減弱させた。(A-3) 分子ウイルス学的解析と*in silico*構造解析を有機的に組み合わせることで、HIV-1宿主指向性や増殖能に関わるウイルスの責任領域を特

定することができた。サル TRIM5 α 抵抗性 Gag-CA の構築に成功した。これは、不明な点の多い TRIM5 α と Gag-CA との相互作用や抑制機構の解明に貢献する。IN-C 末端領域の 1 塩基置換による HIV-1 遺伝子発現・複製能の制御機構の解明は今後の検討課題である。これらの研究課題の進展は、新たな HIV-1 複製制御法の確立に役立つと期待される。

B. HIV 複製機構の研究

(B-1) Tyr15 と Asp25 もしくは他のアミノ酸残基間との水素結合や π - π / π -CH 相互作用などの非共有結合は、HIV-1 インテグラーゼの機能構造を規定する重要な分子間相互作用と考えられた。HIV-1 インテグラーゼの Tyr15 と Asp25 残基は、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。

(B-2) Tat と CycT1 の間で独特の結合様式が存在し、Tat の活性制御を行っている。Tat の活性制御に重要な CycT1 アミノ酸残基が存在する。CycT1 分子内の H2' ヘリックス領域の動的変化が Tat の機能発現に重要である。抗 Tat 薬創薬のターゲットとして重要な構造であると考えられた。

(B-3) Vpr の新規核移行機序を明らかにした。さらに Vpr の機能を阻害する結果としてマクファージにおけるウイルス複製を阻害する低分子化合物の同定と最適化に成功した。ヘマトキシリンとその誘導体はマクファージにおけるウイルス複製を核移行過程で Vpr 依存的に阻害することが立証された。さらに、ケミカルアレイ法により得られた Vpr 結合化合物がウイルス複製を阻害することも明らかとなった。以上の結果から、Vpr 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。

C. 抗 HIV 因子の研究

(C-1) APOBEC3C 型の Vif 結合インターフェイスの構造は、Vif 側から A3-Vif の結合を考えてみると、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/3F/3DE 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。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期待できる。

(C-2) 1) MA および CA 部分ペプチドの抗 HIV 活性の作用機序に興味をもたれるが現在検討中である。2) N121K 変異 HIV-1 株は、CypA の HIV-1 複製における役割の解明や関連宿主因子の探索のための有用なツールになると期待される。本研究により、新たな抗 HIV 戦略の基礎となる抗 HIV 活性を有す

るウイルス蛋白質部分ペプチドを発見し、ウイルス抑制因子の探索に有用な変異株の誘導・作出に成功した。

(C-3) HIV アクセサリータンパク質の翻訳後修飾に着目することで、その制御機構や HIV 複製との関連を機能的に結びつけることができた。単なるウイルス学的な成果のみならず、新規の薬剤標的としての可能性を提示するものであり、医学的有用性も高いと考えられる。本研究を通じて、HIV アクセサリータンパク質の機能を正や負に制御する様々な宿主因子ネットワークの存在、およびそのウイルス複製における機能的意義について一部解明することができた。得られた知見をもとに、宿主因子を標的とする薬剤開発に向けた構造生物学的な検証を進めたい。

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

間陽子

出願番号：特願 2009-158179

発明者： 閻陽子、鈴木正昭、石井英樹、鈴木辰徳、松田剛

発明の名称：Vpr タンパク質の検出方法及び検出用試薬

出願人：独立行政法人理化学研究所

出願日：平成 21 年 7 月 2 日

増田貴夫

特許番号：特許第 4562290 号

発明者：増田貴夫、神奈木真理

発明の名称：インテグラーゼ N-末端領域を標的としたウイルス感染阻害剤

出願人：独立行政法人科学技術振興機構

出願日：平成 22 年 4 月 25 日

村上努

出願番号：特願 2010-262330

発明者：村上努、江原岳、松田智昌、三浦博

発明の名称：ウイルスおよびその成分を除去するための材料

出願人：国立感染症研究所、DIC 株式会社

出願日：平成 22 年 11 月 25 日

以後、

国内優先権主張出願番号：特願 2011-254977 (出願日：2011 年 11 月 22 日)

発明の名称：ヒト免疫不全ウイルス除去或いは不活性化用高分子基材

基礎出願番号：特願 2010-262330 (出願日：2010 年 11 月 25 日)

岡本尚

出願番号：特願 2010-177176(特許出願中)

発明者：岡本尚、朝光かおり、鈴木、宮田

発明の名称：HIV 複製阻害剤

【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知見を見いだすことが出来た。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 の生活環に關与する RNA ヘリケースの解析

有海康雄(熊本大学 エイズ学研究センター 准教授)

(目的) RNA ヘリケースは宿主やウイルス mRNA の代謝に關与している。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 に関与する 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所・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 γ 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。

4. 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。

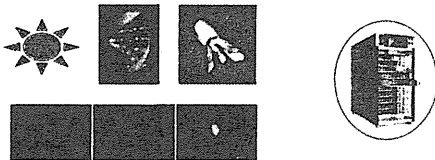
目的

新たな治療標的の探索



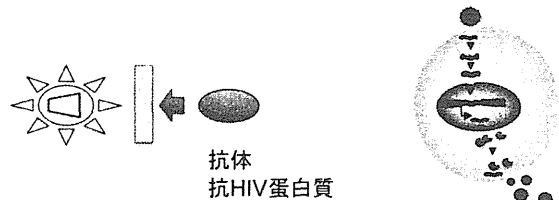
方法

実験と計算科学の併用



研究戦略

1. HIVの“抗HIV因子耐性構造”の研究
2. HIV複製機構の研究
3. 抗HIV因子の研究

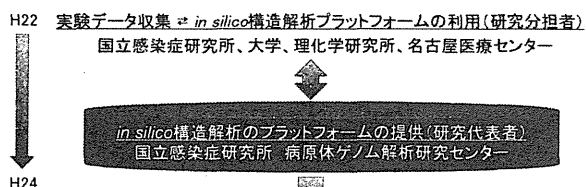


結論

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

組織: 研究代表者+分担者8名+研究協力者(4名)



効果: エイズの病原体そのものの構造、性質、変化に関する新知見が蓄積し、抗HIV薬やワクチンの開発、HIV感染の動物モデル構築等を有効に進めるための科学的根拠と方法が示される

III. 業績一覽 (2010~2012)

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
研究代表者					
佐藤 裕徳					
<u>Nomaguchi M</u> , <u>Yokoyama M</u> , Kono K, Nakayama EE, <u>Shioda T</u> , Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, <u>Sato H</u> , <u>Adachi A</u>	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
Kamiyama H, Kakoki K, Shigematsu S, Izumida M, Yashima Y, Tanaka Y, Hayashi H, Matsuyama T, <u>Sato H</u> , Yamamoto N, Sano T, <u>Shidoji Y</u> , <u>Kubo Y</u> .	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
Ode H, Nakashima M, Kitamura S, Sugiura W, <u>Sato H</u> .	Molecular dynamics simulation in virus research.	Front Microbiol.	3	258	2012
<u>Yokoyama M</u> , Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, <u>Sato H</u> .	Structural Dynamics of HIV-1 envelope gp120 outer domain with V3 loop.	PLoS One	7	e37530	2012
<u>Sakuragi JJ</u> , Ode H, Sakuragi S, <u>Shioda T</u> , <u>Sato H</u> .	A proposal for a new HIV-1 DLS structural model.	Nucleic Acids Res.	40	5012-22	2012
Miyamoto T, Nakayama EE, <u>Yokoyama M</u> , Ibe S, Takehara S, Kono K, Yokomaku Y, Pizzato M, Luban J, Sugiura W, <u>Sato H</u> , <u>Shioda T</u> .	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
Iijima S, Lee YJ, Ode H, Arold S, Kimura N, <u>Yokoyama M</u> , <u>Sato H</u> , Tanaka Y, Strebel K,	A Noncanonical mu-1A-Binding Motif in the N Terminus of HIV-1 Nef Determines Its Ability To	J. Virol.	86	3944-51	2012

Akari H.	Downregulate Major Histocompatibility Complex Class I in T Lymphocytes.				
Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, <u>Sato H</u> , Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, <u>Ryo A</u> .	Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis.	J. Proteomics	75	4863-73	2012
<u>Sakuragi JI</u> , Ode H, Sakuragi S, <u>Shioda T</u> , <u>Sato H</u>	A proposal for a new HIV-1 DLS structural model.	Nucleic Acids Res.	40(11)	5012-22	2012
Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Mwimanzi P, Ueno T, <u>Adachi A</u> , Ode H, <u>Sato H</u> , Fackler OT, Okada S, Suzu S.	The Identification of a Small Molecule Compound That Reduces HIV-1 Nef-Mediated Viral Infectivity Enhancement.	PLoS One	6 (11)	e27696	2011
Kamiyama H, <u>Kubo Y</u> , <u>Sato H</u> , Yamamoto N, Fukuda T, Ishibashi F, Iwao M.	Synthesis, structure-activity relationships, and mechanism of action of anti-HIV-1 lamellarin α 20-sulfate analogues.	Bioorg Med Chem.	Oct	20	2011
Nishitsuji H, <u>Yokoyama M</u> , <u>Sato H</u> , Yamauchi S, Takaku H.	Identification of amino acid residues in HIV-1 reverse transcriptase that are critical for the proteolytic processing of Gag-Pol precursors.	FEBS Lett.	4; 585 (21)	3372-7	2011
Obuchi M, <u>Yokoyama M</u> , Horimoto E, Obara M, Iwai M, <u>Sato H</u> , Sata T, Takizawa T.	Low hemagglutinin-titer strains of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus circulated in Toyama Prefecture, Japan, during the 2009-2011 influenza seasons.	Jpn J Infect Dis.	64 (5)	448-50	2011
Miyamoto T, <u>Yokoyama M</u> , <u>Shioda T</u> , <u>Sato H</u> , Nakayama E.	A single amino acid of human immunodeficiency virus type 2 capsid protein affects conformation of two external loops and viral sensitivity to TRIM5 α	PLoS One	6(7)	e22779	2011

Yoshii H, Kamiyama H, Goto K, Oishi K, Katunuma N, Tanaka Y, Hayashi H, Matsuyama T, <u>Sato H</u> , Yamamoto N, <u>Kubo Y</u> .	CD4-independent human immunodeficiency virus infection involves participation of endocytosis and cathepsin B.	PLoS One	6(4)	e19352	2011
Shibata J, Sugiura W, Ode H, <u>Iwatani Y</u> , <u>Sato H</u> , Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F, Tanaka H.	Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case.	Antiviral Res.	90 (1)	33-41	2011
Kobayashi T, Ode H, Yoshida T, Sato K, Gee P, Yamamoto SP, Ebina H, Strebel K, <u>Sato H</u> , Koyanagi Y.	Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility.	J. Virol.	85	932-45	2011
SahBandar IN, Takahashi K, <u>Motomura K</u> , Djoerban Z, Firmansyah I, Kitamura K, <u>Sato H</u> , Pohan HT, Sato S.	The Indonesian variants of CRF33_01B: Near-full length sequence analysis.	AIDS Res Hum Retroviruses	27 (1)	97-102	2011
Ode H, <u>Yokoyama M</u> , Kanda T, <u>Sato H</u> .	Identification of folding preferences of cleavage junctions of HIV-1 precursor proteins for regulation of cleavability.	J. Mol. Model	17 (2)	391-9	2011
Inagaki N, Takeuchi H, <u>Yokoyama M</u> , <u>Sato H</u> , <u>Ryo A</u> , Yamamoto H, Kawada M, Matano T	A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins.	Retrovirology	7	90	2010
Kono K, Song H, Yokoyama Y, <u>Sato H</u> , <u>Shioda T</u> , Nakayama E.	Multiple sites in the N-terminal half of human immunodeficiency virus type	Retrovirology	7	72	2010

	2 capsid contribute to rhesus monkey TRIM5 α susceptibility				
Onyango C, Leligdowicz A, <u>Yokoyama M</u> , <u>Sato H</u> , Song H, Nakayama EE, <u>Shioda T</u> , de Silva T, Townend J, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S Cotton M.	HIV-2 Capsids Distinguish High and Low Virus Load Patients in a West African Community Cohort.	Vaccine	28 Suppl 2	B60-7	2010
Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, <u>Sato H</u> , Takiguchi M, Oka S.	Impact of human leukocyte antigen-B*51-restricted cytotoxic T-lymphocyte pressure on mutation patterns of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance.	AIDS	24	F15-22	2010
Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, <u>Sato H</u> , Takiguchi M, Oka S.	Combination of V106I and V179D polymorphic mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to efavirenz and nevirapine but not etravirine.	Antimicrob Agents - Chemother	54	1596-602	2010
<u>Yokoyama M</u> , Mori H, <u>Sato H</u> .	Allosteric regulation of HIV-1 reverse transcriptase by ATP for nucleotide selection.	PLoS One	5	e8867	2010
研究分担者					
塩田 達雄					
<u>Nomaguchi M</u> , <u>Yokoyama M</u> , Kono K, Nakayama EE, <u>Shioda T</u> , Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, <u>Sato H</u> , <u>Adachi A</u>	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
Zhang X, Sobue T, Isshiki M, Makino S, Inoue M, Kato K, <u>Shioda T</u> , Ohashi T, <u>Sato H</u> , Komano J,	Elicitation of Both Anti HIV-1 Env Humoral and Cellular Immunities by Replicating Vaccinia Prime Sendai Virus Boost Regimen and Boosting	PLoS One.	7(12)	e51633	2012

Hanabusa H, Shida H.	by CD40Lm.				
Miyamoto T, Nakayama EE, <u>Yokoyama M</u> , Ibe S, Takehara S, Kono K, Yokomaku Y, Pizzato M, Luban J, Sugiura W, <u>Sato H</u> , <u>Shioda T</u> .	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
Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzaki Y, Ami Y, <u>Shioda T</u> , Nakayama EE, Akari H.	Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (<i>Macaca fascicularis</i>).	Front. Microbio.	3	314	2012
Likanonsakul S, Rattanatham T, Feangvad S, Uttayamakul S, Prasithsirikul W, Srisopha S, Nitiyanontakij R, Tengtrakulcharoen P, Tarkowski M, Riva A, Nakayama EE, <u>Shioda T</u> .	Polymorphisms in Fas gene is associated with HIV-related lipoatrophy in Thai patients.	AIDS Res Hum Retroviruses.	Aug 20		2012
Bozek K, Nakayama EE, Kono K, <u>Shioda T</u> .	Electrostatic potential of human immunodeficiency virus type 2 and rhesus macaque simian immunodeficiency virus capsid proteins.	Front Microbiol.	3	206	2012
Ohishi M, Nakano T, Sakuragi S, <u>Shioda T</u> , Sano K, <u>Sakuragi JI</u> .	The relationship between HIV-1 genome RNA dimerization, virion maturation and infectivity.	Nucleic Acids Res.	39 (8)	3404-17	2011
Miyamoto T, <u>Yokoyama M</u> , Kono K, <u>Shioda T</u> , <u>Sato H</u> , Nakayama EE.	A Single Amino Acid of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Capsid Protein Affects Conformation of Two External Loops and Viral Sensitivity to TRIM5 α .	PLoS One	6(7)	e22779	2011
Saito A, <u>Nomaguchi M</u> , Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee YJ,	Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in	Microbes and Infection	13(1)	58-64	2011

Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, <u>Shioda T</u> , Yasutomi Y, <u>Adachi A</u> , Matano T, Akari H.	cynomolgus monkeys with minimal modifications.				
Nakayama EE, <u>Shioda T</u> .	Anti-retroviral activity of TRIM5 (alpha)	Reviews in Medical Virology	20	77-92	2010
Maegawa H, Miyamoto T, <u>Sakuragi JI</u> , <u>Shioda T</u> , Nakayama EE.	Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5alpha depends on combination of host and virus.	Virology	399	212-20	2010
Onyango CO, Leligdowicz A, <u>Yokoyama M</u> , <u>Sato H</u> , Song H, Nakayama EE, <u>Shioda T</u> , Silva T, Townend J, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S, Cotton M.	HIV-2 Capsids Distinguish High and Low Virus Load Patients in a West African Community Cohort.	Vaccine	28S2	B60-B67	2010
Wichukchinda N, Nakajima T, Saipradit N, NakayamaEE, Ohtani H, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, <u>Shioda T</u> , KimuraA.	TIM1 haplotypes may control the disease progression to AIDS in a HIV-1-infected female cohort in Thailand.	AIDS	24 (11)	1625-31	2010
Uttayamakul S, Likanonsakul S, Manosuthi W, Wichukchinda N, Kalambhaheti T, Nakayama EE, <u>Shioda T</u> , Khusmith S.	Effects of CYP2B6 G516T polymorphisms on plasma efavirenz and nevirapine levels when co-administered with rifampicin in HIV/TB co-infected Thai adults.	AIDS Research and Therapy	7	8	2010
Kuroishi A, Bozek K, <u>Shioda T</u> , Nakayama EE.	A single amino acid substitution of the human immunodeficiency virus type 1 capsid protein affects viral sensitivity to TRIM5alpha.	Retrovirology	7(1)	58	2010
<u>Sakuragi JI</u> , Sakuragi S,	Direct correlation between	Microbes	12	1002-11	2010

Ohishi M, <u>Shioda T.</u>	genome dimerization and recombination efficiency of HIV-1.	Infection	(12-13)		
Kono K, Song H, <u>Yokoyama M</u> , <u>Sato H</u> , <u>Shioda T</u> , Nakayama EE.	Multiple sites in the N-terminal half of simian immunodeficiency virus capsid protein contribute to evasion from rhesus monkey TRIM5alpha-mediated restriction.	Retrovirology	7(1)	72	2010
野間口 雅子					
<u>Nomaguchi M</u> , <u>Yokoyama M</u> , Kono K, Nakayama EE, <u>Shioda T</u> , Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, <u>Sato H</u> , <u>Adachi A.</u>	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	15	56-65	2013
Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Tokarev A, Quinn G, Kimura H, <u>Nomaguchi M</u> , <u>Adachi A</u> , Yamamoto N, Guatelli J, <u>Ryo A.</u>	Interferon-induced SCYL2 limits release of HIV-1 by triggering PP2A-mediated dephosphorylation of the viral protein Vpu.	Science Signaling	5	ra73	2012
<u>Nomaguchi M</u> , <u>Adachi A.</u>	HIV-1 Vpr and G2 cell cycle arrest.	Future Microbiol.	6	375-8	2011
Doi N, Fujiwara S, <u>Adachi A</u> , <u>Nomaguchi M.</u>	Rhesus M1.3S cells suitable for biological evaluation of macaque-tropic HIV/SIV clones.	Front. Microbio.	2	115. doi:10.33 89 /fmicb.2 011.0011 5	2011
<u>Nomaguchi M</u> , Fujita M, <u>Adachi A.</u>	The fourth major restriction factor against HIV/SIV.	Front. Microbio.	2	132. doi:10.33 89 /fmicb.2 011.0013 2	2011
Adachi S, <u>Adachi A</u> , <u>Nomaguchi M.</u>	Commentary on a new era of investigating 3D structure-based human-virus protein network dynamics.	Front. Microbio.	2	186. doi:10.33 89 /fmicb.2 011.0018	2011

				6	
Miyazaki Y, Miyake A, Nomaguchi M, Adachi A.	Structural dynamics of retroviral genome and the packaging.	Front. Microbio.	2	264. doi:10.3389/fmicb.2011.00264	2011
足立 昭夫 (初年度)					
Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee Y-J, Hayakawa T, Kono K, Nakayama E E, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H.	Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications.	Microbes and Infection	13	58-64	2011
Jere A, Fujita M, Adachi A, Nomaguchi M.	Role of HIV-1 Nef protein for virus replication <i>in vitro</i> .	Microbes and Infection	12	65-70	2010
Yamashita T, Nomaguchi M, Miyake A, Uchiyama T, Adachi A.	Status of APOBEC3G/F in cells and progeny virions modulated by Vif determines HIV-1 infectivity.	Microbes and Infection	12	166-71	2010
Nagao T, Yamashita T, Miyake A, Uchiyama T, Nomaguchi M, Adachi A.	Different interaction between HIV-1 Vif and its cellular target proteins APOBEC3G/APOBEC3F.	The Journal of Medical Investigation	57	89-94	2010
Fujita M, Otsuka M, Nomaguchi M, Adachi A.	Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions.	Reviews in medical Virology	20	68-76	2010
Nomaguchi M, Adachi A.	Virology as biosystematics: towards understanding the viral infection biology.	Frontiers in Microbiology	1	2. doi: 10.3389/fmicb.2010.00002	2010
Doi N, Fujiwara S, Adachi A, Nomaguchi M.	Growth ability in various macaque cell lines of HIV-1 with simian cell-tropism.	The Journal of Medical Investigation	57	284-92	2010
Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Fujita M, Adachi A.	Site-directed mutagenesis of HIV-1 <i>vpu</i> gene demonstrates two clusters of replication-defective mutants	Frontiers in Microbiology	1	116. doi: 10.3389/fmicb.2010.0011	2010