

HIV-1 放出抑制剤を目指したイノシトールリン脂質誘導体. 第 26 回日本エイズ学会. 2012 年 11 月 24 日 (土)、横浜.

4) 藤野悠那、三宅在子、古賀涼子、川村宗吾、大出裕高、岩谷靖雅、野間口雅子、足立昭夫、大塚雅巳、宮崎恭行、藤田美歌子 : HIV-2 Vpx 富プロリン領域の機能. 第 26 回日本エイズ学会. 2012 年 11 月 24 日 (土)、横浜.

5) 藤田美歌子、古賀涼子、金丸陽亮、江島智彦、園田祥子、安楽健作、田口 祐、井上純一郎、大塚雅巳 : 亜鉛フィンガー蛋白質阻害剤による NF- $\kappa$ B 活性化経路の遮断. 第 30 回メディスナルケミストリーシンポジウム. 2012 年 11 月 28 日 (水)、東京.

6) 園田祥子、安楽健作、古賀涼子、田口 祐、井上純一郎、岡本良成、藤田美歌子、大塚雅巳 : 亜鉛フィンガー蛋白質阻害剤 SN-1 の作用機序解明を目指した研究. 第 29 回日本薬学会九州支部大会、2012 年 12 月 8 日 (土)、熊本.

7) 築葉晃一、工藤康太、舛田岳史、安楽健作、大塚雅巳 : PH ドメインタンパク質と結合し膜に移動させる *myo* イノシトール誘導体の合成. 第 29 回日本薬学会九州支部大会、2012 年 12 月 8 日 (土)、熊本.

8) 川田代康介、岡本良成、佐谷秀行、大塚雅巳 : 人工亜鉛キレーターを持つ ADAM ファミリーメタロプロテアーゼ阻害剤の合成. 第 29 回日本薬学会九州支部大会、2012 年 12 月 9 日 (日)、熊本.

9) 田中亜友美、岸田明日美、小畑恵美子、岡本良成、梅澤一夫、大塚雅巳 : ファルネシルトランスフェラーゼの特異的阻害を目的とした亜鉛キレーターの設計及び合成. 第 29 回日本薬学会九州支部大会、2012 年 12 月 9 日 (日)、熊本.

分担研究課題：Tetherin と Vpu の分子機序の解析：HIV-1 Vpu による抗 tetherin 作用機序の解析  
研究分担者：徳永 研三（国立感染症研究所感染病理部 主任研究官）  
研究協力者：小山 貴芳（国立感染症研究所感染病理部 協力研究員）

#### 研究要旨

HIV-1 アクセサリー蛋白 Vpu は抗ウイルス宿主因子 BST-2/tetherin を不活化するがその分子作用機序については不明な点が多い。抗 BST-2/tetherin 機能に関与する Vpu 補助因子としてこれまでにユビキチン複合体構成蛋白  $\beta$ TrCP が報告されているが、それ以外に未知の宿主因子が存在する可能性も示唆されている。今回我々はそのような宿主因子の探索に加え BST-2/tetherin の *in vivo* における存在意義の検討により以下の結果を得た。(1) プロテオーム解析により 9 種類の候補蛋白を同定した。(2) 同定した 9 種類の候補蛋白の発現ベクターを作製しそれを用いて、既知の Vpu 結合蛋白 Scamp3 を含めた免疫沈降実験を行った結果、2 種類の候補蛋白が Scamp3 と同程度に Vpu と相互作用を示すことが明らかになった。(3) 細胞内局在性を検討した結果、Scamp3 のみが Vpu と共局在した。(4) HIV/AIDS 患者のマクロファージにおける BST-2/tetherin の発現レベルを解析した結果、CD4 を指標とした病態進行との間に逆相関の関係が認められた。

#### A. 研究目的

BST-2/tetherin は細胞膜表面で、HIV-1 をはじめとするエンベロープウイルスのウイルス粒子を細胞表面で繋ぎ止めてウイルスの細胞外放出を抑制する強力な抗ウイルス宿主因子である。HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpu はそれを細胞表面からダウンレギュレートさせることによりウイルス粒子放出を促進させる。我々は以前、Vpu の抗 BST-2 活性には、Vpu の細胞質領域にある 52/56 番目のリン酸化セリンとユビキチン複合体構成蛋白  $\beta$ TrCP との相互作用が BST-2 の機能阻害には必要であるが、 $\beta$ TrCP 依存性は部分的であることを報告した。この結果より Vpu は  $\beta$ TrCP 以外の cofactor を要求性する可能性が考えられることから、我々は HIV-1 Vpu が BST-2/tetherin を downregulate するのに必要な  $\beta$ TrCP 以外の宿主補助因子をプロテオーム解析により探索・同定することを目的とした。また HIV-1 感染者由来の末刺激または刺激後の末梢血リンパ球、あるいはマクロファージより抽出した RNA を用いて BST-2/tetherin の mRNA 発現レベルと病態進行の相関性の有無を調べ、*in vivo* における抗ウイルス蛋白としての BST-2/tetherin の重要性を検証した。

#### B. 研究方法

##### 1. 発現プラスミド DNA 構築

$\beta$ TrCP 結合不全変異体 [Vpu2/6] 及び CT 欠失変異体 [Vpu $\Delta$ CT] Vpu 発現ベクターとして以前作製した pCA-Vpu2/6-HA-RRE 及び

pCA-Vpu $\Delta$ CT-HA-RRE を鋳型に PCR を行い、増幅断片をまず pFC15K HaloTag CMVd1 vector (Promega) の PvuI/XhoI site に挿入して作製した。次に、レンチウイルスベクター版の作製のために、上記発現ベクターを鋳型として Vpu-HaloTag 領域を PCR 増幅した後、レンチウイルストランスファーベクター pWPI-GFP の PmeI site に挿入して作製した。また後述のプロテオーム解析において候補に挙げられた 9 種類の蛋白について HA タグ付き発現ベクターを構築した。作製した各発現ベクターの遺伝子配列は ABI3130 シークエンサー (ABI) により確認した。

##### 2. レンチベクターによるトランスダクションとプロテオーム解析

Vpu2/6 または Vpu  $\Delta$ CT-HaloTag 発現レンチトランスファーベクター、パッケージングベクター及び水疱性口炎ウイルス G 蛋白 (VSV-G) 発現ベクターを 293T 細胞へコトランスフェクションし、48 時間後に上清中のウイルス量を p24 ELISA Kit (Advanced BioScience Lab) により定量した。HeLa 細胞に MOI 3 で transduce して、48 時間後に一部細胞を回収して、CyFlow (Partec 社) を用いたフローサイトメトリーにより、レンチベクターに挿入されている GFP の発現を指標としてトランスダクション効率を確認した。同時に一部の細胞に細胞溶解液を加え、それを用いて SDS-PAGE を行った。抗 Vpu 抗体及び抗 HaloTag 抗体 (Promega) によるウェスタンブロットにより、Vpu の発現を確認した。安定発現細胞を樹立して、

それぞれ 10 cm dish 10 枚ずつで大量培養した後、CHAPS バッファーで細胞を溶解した。それらの細胞溶解物を用いて HaloLink Resin (Promega) による沈降反応を行った。沈降物をそれぞれ SDS-PAGE により分離して、ゲルの銀染色 (MS キット; Wako) を行った。Vpu2/6 に存在、Vpu $\Delta$ CT には存在しないバンドの有無を確認して、各バンドを切り出した後、LC-MS/MS (Aproscience) による候補蛋白の同定を行った。

### 3. 蛍光抗体法

直径 13 mm のガラスカバースリップ (Nunc) 上の HeLa 細胞に GFP 付加 Vpu-RRE 発現ベクター、Rev 発現ベクター、及び 9 種類の候補蛋白発現ベクターをコトランスフェクションした。24 時間後に細胞を 4% パラフォルムアルデヒド固定、0.05% サポニン処理した後、抗 HA ポリクローナル抗体で一次抗体処理した。次に Cy3 標識抗マウス抗体または Cy5 標識抗ウサギ抗体 (Jackson ImmunoResearch Lab) の二次抗体処理による間接蛍光抗体法により、DMRB 顕微鏡 (Leica) を用いて細胞内局在性を観察した。

### 4. 免疫沈降実験

HA タグ付加候補蛋白発現ベクターと、FLAG タグ付加 Vpu-RRE 発現ベクター+Rev 発現ベクターを 293T 細胞にコトランスフェクションして 36 時間培養した。細胞溶解液を加えて遠心した上清を用いて、抗 Flag 抗体ビーズ (Sigma) による免疫沈降反応を行った。抗 HA タグ・モノクローナル抗体を用いた沈降物のウェスタンブロット (IP-Western) 法により、Vpu と候補蛋白との相互作用を検討した。

### 5. Real-time RT-PCR 実験

東大医科研の岩本愛吉先生と立川愛先生の御協力により、また豪州王立パース病院の Simon Mallal 所長及び David Nolan 博士の御協力により HIV/AIDS 患者検体を得た。そのうち東大医科研サンプルより 32 人と王立パース病院サンプルより 24 人の未刺激末梢血リンパ球より、または東大医科研サンプル 14 人の刺激末梢血リンパ球あるいはそれらをマクロファージに分化させてそれぞれインターフェロン $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) 処理/未処理したものから、RNAqueous Kit (Ambion) を用いてトータル RNA を単離した。段階希釈したコントロール (GAPDH) 及び標的遺伝子のスタンダードプラスミドとそれぞれのプライマー及び

Taq-man プローブ 2 色 (GAPDH, Cy5; BST-2/tetherin, HEX)、QuantiTect Multiplex RT-PCR (Qiagen) を用いて Mx3005P (Stratagene) による real-time RT-PCR を行い、標準曲線の linearity を確認した。患者検体における各遺伝子の発現レベルを multiplex real-time RT-PCR により定量した。

[倫理面への配慮] 遺伝子組換え実験は、国立感染症研究所・組換え DNA 実験安全委員会において平成 20 年 4 月 30 日付け承認番号・機 20-16 により、また大臣確認 (平成 20 年 10 月 21 日、国文科振第 31 号、感染研承認番号 大 20-10) により承認を得たプロトコールに従って行われた。また患者検体を用いた実験は、国立感染症研究所・ヒトを対象とする医学研究倫理審査において、平成 24 年 3 月 15 日付け承認番号 347 また平成 24 年 7 月 2 日付け承認番号 348 により承認を得たプロトコールに従って行われた。

## C. 研究結果

### 1. Vpu 補助因子候補蛋白の同定.

これまで Vpu の補助因子を探索するために、従来の免疫沈降反応による沈降物の SDS-PAGE で得られたバンドを切り出してプロテオーム解析を行っていたが、抗体の非特異的反応によって無関係な蛋白が共沈するケースが多く認められた。今回、我々はそれを避けるために、抗体フリーの HaloTag/HaloTag リガンド法で行い、更に細胞への導入に当たってはレンチベクターを用いて Vpu 発現細胞を樹立することにより大量調整することとした。Vpu 発現レンチベクター (Vpu2/6 または Vpu $\Delta$ CT) を HeLa 細胞に感染させて Vpu の発現をフローサイトメトリー及びウェスタンブロットにより確認した。安定発現細胞を大量培養した後、細胞を溶解して HaloLink Resin による沈降反応を行い、銀染色を行った。その結果、7 本の特異的なバンドが検出された。これらのバンドのプロテオーム解析を行ない、9 つの Vpu 補助因子候補の同定に成功した。

### 2. Vpu と宿主候補蛋白の相互作用の検討.

同定した 9 つの候補蛋白の cDNA を作製し、それをもとに HA タグ付加発現ベクターを作製した。それら候補蛋白の各々あるいは先頃 Vpu 結合蛋白であることが報告された Scamp3 の発現ベクターと、FLAG タグ付加 Vpu-RRE 発現ベクタ

一及び Rev 発現ベクターとのコトランスフェクション後、抗 Flag 抗体ビーズを用いた IP-Western 法を行った。その結果、9 種類候補蛋白においてのうちの 2 つと Scamp3 が Vpu と結合することが明らかになった。

**3. Vpu とその補助因子候補蛋白の細胞内局在性.** HeLa 細胞への候補蛋白発現ベクター（9 種類 + 上記 Scamp3）単独のトランスフェクション、あるいは GFP-Vpu 発現ベクターとのコトランスフェクションを行い、間接蛍光抗体法により両者の細胞内共局在の有無を検討した。各候補蛋白の単独の発現においては、各々の蛋白の本来の局在性（核、細胞質、または両方）が認められた。Vpu との共発現においてそうした局在性が変化することはなく、9 種類候補蛋白は Vpu との共局在を示さなかった。一方、ER-ゴルジ体に局在する Scamp3 のみが Vpu と共局在することが明らかになった。

**4. HIV/AIDS 患者における BST-2/tetherin の遺伝子発現レベルと病態進行の相関性.**

HIV-1 感染者において BST-2/tetherin の mRNA 発現レベルが高いほど、CD4 陽性細胞数が多い、つまり病態進行が遅いか否かについて検討した。日本及び豪州の HIV/AIDS 患者それぞれ 32 名・24 名の未刺激末梢血リンパ球、または日本の 14 名の患者の刺激リンパ球とマクロファージ（それぞれ IFN $\alpha$ +/-）よりトータル RNA を抽出し、コントロールの house-keeping gene として GAPDH を、抗ウイルス宿主因子として BST-2/tetherin を標的に real-time RT-PCR を行った。まず未刺激リンパ球においては、BST-2/tetherin 発現レベルと CD4 陽性細胞数の間に全く相関性は認められなかった。刺激リンパ球およびマクロファージの両方において IFN $\alpha$  処理により BST-2/tetherin の mRNA の発現レベルが上昇することが分かった。マクロファージにおいては CD4 細胞数を指標とした病態進行と BST-2/tetherin の発現レベルが逆相関を示した。更にその傾向は IFN- $\alpha$  処理によって一層強まることが明らかになった。

#### D. 考察

今回のプロテオーム解析により得られた 9 つの Vpu 補助因子候補蛋白のうち 2 つの候補蛋白と Scamp3 が Vpu と相互作用することが明らかに

なり、これらの蛋白が Vpu の機能に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。しかしながら細胞内局在性において、Vpu と共局在したのは Scamp3 のみであったことから、今回我々が見出した 2 つの候補蛋白は間接的に Vpu の機能に関与していることが考えられた。今後は Vpu と結合することが判明した Scamp3 を含む 3 つの候補蛋白についてジーンサイレンシング実験を行い、実際に Vpu のウイルス産生促進能を低下させるか否かを検証し、影響がない場合でも Vpu の他の機能（ex. CD4 低下能）に関与する可能性を検討する予定である。HIV/AIDS 患者由来マクロファージにおける遺伝子発現解析の結果、BST-2/tetherin の発現レベルが病態進行と逆相関の関係にある可能性が示唆された。今後更に患者検体数を増やして解析を行い、今回の結果の再現性を確認することとしている。

#### E. 結論

- 1) Vpu の宿主補助因子候補として今回プロテオーム解析により 9 種類の蛋白を同定しそのうち 2 つと既知の Scamp3 が Vpu と相互作用を示した。
- 2) HIV-1 感染者マクロファージにおける BST-2/tetherin の遺伝子発現レベルは病態進行と逆相関傾向を示した。

#### F. 知的所有権の取得状況

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tokunaga, K. HIV-1 Vpu and BST-2/tetherin: Enemies at the Gates. *Current HIV Research* 10: 275-276. 2012.
- 2) Arias, J.A., Iwabu, Y., and Tokunaga, K. Sites of action of HIV-1 Vpu in BST-2/tetherin downregulation. *Current HIV Research* 10: 283-291. 2012.
- 3) Fujita, H., Fujimoto, K., Tokunaga, K., and Tanaka, Y. Intracellular Logistics of BST-2/Tetherin. *Current HIV Research* 10: 321-326. 2012.
- 4) Arias, J.A., Koyama, T., Kinomoto, M., and Tokunaga, K. Retroelements versus APOBEC3

family proteins: No great escape from the magnificent seven. *Frontiers in Microbiology* 3, 275, 2012.

- 5) Zheng, Y.-H., Jeang, K.-T., and Tokunaga, K. Host Restriction Factors in Retroviral Infection: Promises in Virus-Host Interaction. *Retrovirology* 9:112 2012.
  - 6) Koyama, T., Sun, B., Tokunaga, K., Tatsumi, M., and Ishizaka, Y. DNA damage aids HIV-1 infection of macrophages by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology* 10:21, 2013.
  - 7) Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Hiyoshi-Yoshidomi, Y., Hashimoto, M., Tokunaga, K., and Suzu, S. Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins. *Microbes and Infection*, in press.
- 5) 菊地正、岩部幸枝、立川(川名)愛、古賀道子、野村滋、細谷紀彰、Zabrina L. Brumme、Heiko Jessen、Anthony D. Kelleher、Martin Markowitz、Florenca Pereyra、Alicja Trocha、Bruce D. Walker、岩本愛吉、徳永研三、三浦聡之：HIV-1 elite controllerにおける HIV-1 Vifの抗 APOBEC3G 活性の低下。第 59 回日本ウイルス学会総会（大阪）2012. 11.
  - 6) 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（福岡）2012. 12.

## 2. 学会発表

- 1) T. Kikuchi, Y. Iwabu, A. Kawana-Tachikawa, M. Koga, N. Hosoya, S. Nomura1, Z.L. Brumme, H. Jessen, A. Kelleher, M. Markowitz, F. Pereyra, A. Trocha, B.D. Walker, A. Iwamoto, K. Tokunaga, and T. Miura: Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein from elite controllers is attenuated compared to those from untreated chronic progressors or those from individuals with acute infection. XIX International AIDS Conference, Washington D.C., USA, 2012. 7.
- 2) 張延昭、岩部幸枝、立川(川名)愛、中村仁美、David Nolan、Simon Mallal、長谷川秀樹、山岡昇司、岩本愛吉、徳永研三：HIV-1 感染者における抗ウイルス宿主因子の発現レベルと病態進行との相関性の有無。第 59 回日本ウイルス学会総会（大阪）2012. 11.
- 3) 小山貴芳、Juan F. Arias、岩部幸枝、徳永研三：HIV-2 Vpx に不活化される抗ウイルス宿主因子の探索。第 59 回日本ウイルス学会総会（大阪）2012. 11.
- 4) Juan F Arias、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 59 回日本ウイルス学会総会（大阪）2012. 11.

分担研究課題：TRIM5 $\alpha$ による脱殻機序の解明とモジュレータの探索  
研究分担者：中山 英美（大阪大学微生物病研究所 准教授）

#### 研究要旨

アカゲザル、カニクイザルの TRIM5 $\alpha$ は強い抗 HIV-1 作用を示すが、ヒトの TRIM5 $\alpha$ の抗 HIV-1 作用は強くない。一方でヒト TRIM5 $\alpha$ は、HIV-2 には若干の、NIH3T3 指向性マウスレトロウイルス (N-MLV) に対しては強い抗ウイルス活性を持っている。われわれはこれまでに、TRIM5 $\alpha$ の抗ウイルス活性の種特異性は、TRIM5 $\alpha$ の PRYSPYR ドメイン内のわずかなアミノ酸の違いによることを明らかにしてきた。TRIM5 $\alpha$ は PRYSPRY ドメインを介してウイルスのコアと相互作用していることが考えられ、弱い抗 HIV-1 活性しか持たないヒト TRIM5 $\alpha$ も、HIV-1 のコアと何らかの機構で強く結合することができれば、HIV-2 や N-MLV のように強い抗ウイルス活性を発揮するようになる可能性を秘めていると考えられる。そこで、低分子化合物 3000 種類のスクリーニングを行ったところ、HIV-1 ベクター由来のルシフェラーズの活性が低くなる化合物 16 種類を見いだし、それらの化合物は 2.5 $\mu$ M の濃度では細胞傷害性を示さないことを確認した。

#### A. 研究目的

TRIM5 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ は強い抗HIV-1作用を示すが、ヒトのTRIM5 $\alpha$ の抗HIV-1作用は強くない、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 $\alpha$ 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 $\alpha$ に対してはHIV-1よりも感受性を示す。また、ヒトTRIM5 $\alpha$ は、NIH3T3指向性マウスレトロウイルス (N-MLV) に対しては強い抗ウイルス活性を持っている。

われわれはこれまでに、TRIM5 $\alpha$ の抗ウイルス活性の種特異性は、TRIM5 $\alpha$ のPRYSPYRドメイン内のわずかなアミノ酸の違いによることを明らかにしてきた。TRIM5 $\alpha$ はPRYSPRYドメインを介してウイルスのコアと相互作用していることが考えられ、弱い抗HIV-1活性しか持たないヒトTRIM5 $\alpha$ も、HIV-1のコアと何らかの機構で強く結合することができれば、HIV-2やN-MLVのように強い抗ウイルス活性を発揮するようになる可能性を秘めていると考えられる。そこで、本研究ではヒトTRIM5 $\alpha$ の効果を増強する低分子化合物を探索することを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 1. 低分子化合物の抗HIV-1活性に及ぼす影響

ヒト TRIM5 $\alpha$ を発現するセンダイウイルスベクタ

ーを感染多重度 10 で感染後、一晚培養して TRIM5 $\alpha$ を過剰発現させたヒト CD4 陽性 T 細胞株 MT4 (3x10<sup>4</sup>個)に、Analyticom 社の低分子化合物ライブラリー (3000 種類、国立感染症研究所・武部豊博士から供与) を 2.5 $\mu$ M の濃度で 2 時間作用させた。陰性コントロールとして溶媒 DMSO のみ、陽性コントロールとしてカプシドに結合し抗 HIV-1 活性を示すことが知られている同じ濃度のサイクロスポリン A を添加した細胞を用意した。水疱性口内炎ウイルスの G タンパク質をエンベロープに持ち、ルシフェラーズ遺伝子を Nef の代わりに発現できる HIV-1 ベクターを p24 抗原量として 5ng 感染させ、3 日間 37 度で細胞を培養した後、細胞溶解液中のルシフェラーズ活性をプロメガ社の Blight and Glo Assay kit を用いて測定した。

##### 2. 低分子化合物の細胞増殖に及ぼす影響

上記と同様に低分子化合物を作用させた MT4 細胞の、細胞増殖能をロッシュ社の Cell Proliferation reagent WST-1 を用いて測定した。

#### C. 研究結果

##### 1. 低分子化合物の抗HIV-1活性に及ぼす影響

図 1 に示すように、2 回の独立した実験でサイクロスポリンAの添加よりも低いルシフェラーズ活性を示した低分子化合物が16種類見いだされた。図には示していないが、逆に10倍程度ルシフェラーズ活性が増強される化合物も複数見られた。次に、図 2 に示すように、センダイウイルスを感染させてTRIM5 $\alpha$ を過剰発現させていないMT4細胞を用いた実験を繰り返した結果、サイクロスポリンAはセンダイウイルス非感染細胞を用いた場合に抗HIV-1活性が強く観察されるのに対して、今回検討した低分子化合物は、センダイウイルス非感染細胞での効果はセンダイウイルス感染 (TRIM5 $\alpha$ 過剰発現) 細胞での効果より減弱して見

られるものと、TRIM5 $\alpha$ の過剰発現がなくても同様に抗HIV-1効果を示すものに分けられた。

## 2. 低分子化合物の細胞増殖の及ぼす影響

HIV-1の感染は細胞の増殖能に依存しており、HIV-1ベクターから発現してくるルシフェラーズの活性は、低分子化合物が細胞傷害性を持つ場合に低くなる可能性がある。そこで、細胞増殖をCell Proliferation Reagentを用いて測定したところ、上記の16種類の化合物は細胞増殖には全く影響を及ぼさないことが明らかとなった。

## D. 考察

ルシフェラーズ活性が10倍程度に増強する化合物もあり、実験条件は至適な範囲であったと考えられる。

本研究で用いた2.5 $\mu$ Mの濃度という比較的低い濃度で抗HIV-1活性を示す化合物を得られたのは、リード化合物としては有望であると考えられる。

ヒトTRIM5 $\alpha$ を発現するセンダイウイルスを感染させた細胞でスクリーニングを行ったのは、TRIM5 $\alpha$ を過剰発現させ分子数を増やすことにより、HIV-1カプシドとTRIM5 $\alpha$ の架橋力が弱い化合物も抗HIV-1活性を増強する化合物として認知できることを想定し、想定通りにセンダイウイルス非感染細胞においては抗HIV-1作用が弱く見られる化合物が認められた。その一方で予想に反してTRIM5 $\alpha$ を過剰発現させていない細胞においても同様の抗HIV-1活性を示す化合物もあった。今回はルシフェラーズ遺伝子をレポーターとして持つHIV-1ベクターをスクリーニングに用いたため、後者はHIV-1感染とは関係なく、ルシフェラーズ活性を阻害している可能性も現段階では否定できない。今後は更に詳しい作用機序の解明が必要である。

## E. 結論

低分子化合物3000種類のスクリーニングを行ったところ、HIV-1ベクター由来のルシフェラーズの活性が低くなる化合物16種類を見だし、それらの化合物は2.5 $\mu$ Mの濃度では細胞傷害性を示さないことを確認した。

## 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., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Nakayama E.E., Shioda, T., Yokoyama, M., Sato, H., Adachi, A. Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genome occurred during replication in macaque cells.

*Microbes and Infection*, in press.

2) Nakayama, E.E., Nakajima, T., Kaur, G., Mimaya, J.I., Terunuma, H., Mehra, N., Kimura, A., Shioda, T. A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5 $\alpha$  linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*, in press.

3) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., 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 and Infection* 15: 56-65, 2013.

4) Miyamoto, T., Nakayama, E.E., 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 $\alpha$ . *PLOS ONE*. 7:e47757, 2012

5) Saito, A., Kawamoto, Y., Higashino, A., Yoshida, T., Ikoma, T., Suzuki, Y., Ami, Y., Shioda, T., Nakayama, E.E., Akari, H. Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). *Frontiers in Microbiology* 3:314, 2012

6) Likansakul, S., Rattanatham, T., Feangvad, S., Uttayamakul, S., Prasithsirikul, W., Srisopha, S., Nitiyanontakij, R., Tengtrakulcharoen, P., Tarkowski, M., Riva, A., Nakayama, E.E., Shioda, T. Polymorphisms in Fas gene is associated with HIV-related lipodystrophy in Thai patients. *AIDS Research and Human Retroviruses* 29: 142-150, 2013.

7) Bozek, K., Nakayama, E.E., Kono, K., Shioda, T. Electrostatic potential of human immunodeficiency virus type 2 and rhesus macaque simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Frontiers in Microbiology* 3:206, 2012.

### 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 $\alpha$  Linker Region Affects Its Anti-HIV-1 Activity and Susceptibility to HIV-1 Infection. Cold Spring Harbor Laboratory (Retroviruses)2012. May 21-26, 2012, NY(USA).

2) Emi Nakayama, Toshiaki Nakajima, Gurvinder Kaur, Jun-ich Mimaya, Hiroshi Terunuma, Narinder



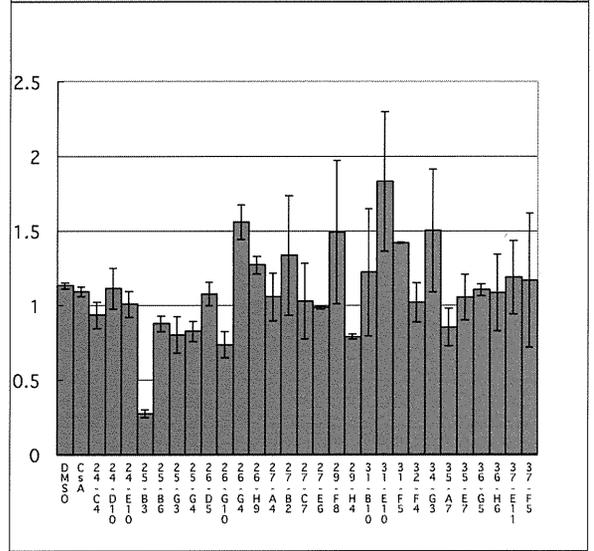
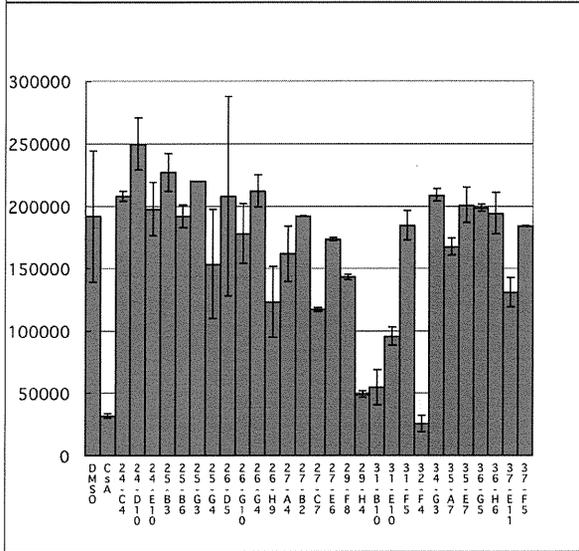
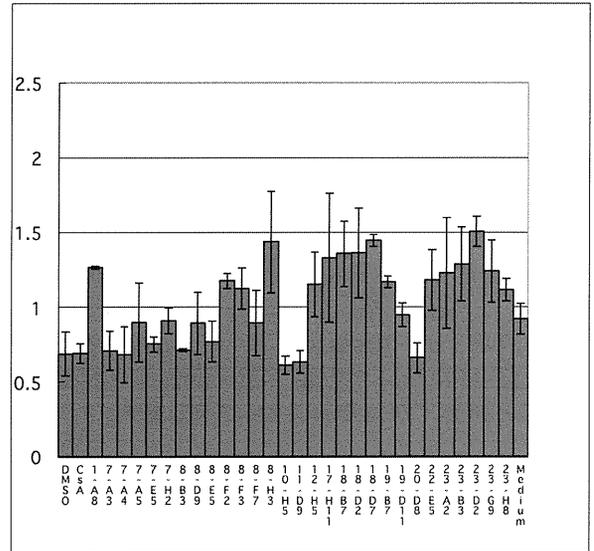
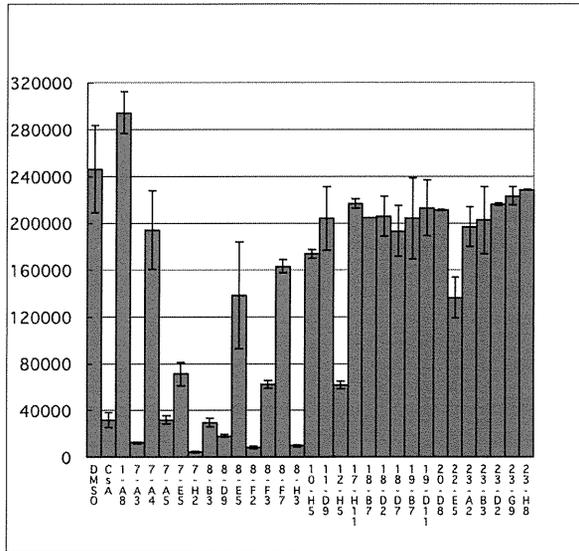


図2 センダイウイルス非感染細胞における低分子化合物の影響。縦軸はリンフェレース活性を表す。DMSOは溶媒のみの場合、CsAはサイクロスポリン添加の場合を示す。一部の化合物の結果のみを掲載。

図3 低分子化合物の細胞増殖に及ぼす影響。縦軸はCell Proliferation Reagentを添加後1時間の450nmの吸光度を表す。一部の化合物の結果のみを掲載。

分担研究課題: インターフェロン誘導性新規Vpx関連宿主因子の探索と宿主因子制御物質の評価: HIV-2 VpxのSAMHD1非依存的機能の解明

研究分担者: 藤田 美歌子 (熊本大学薬学部附属創薬研究センター 准教授)

#### 研究要旨

2011年、HIV-2 Vpxの標的宿主蛋白質として抗ウイルス宿主因子SAMHD1が報告された。本研究において、VpxはSAMHD1依存的にウイルス増殖性を付与するほか、T細胞中でSAMHD1非依存的にウイルス増殖に関わることを見出した。このSAMHD1非依存的機能には少なくともVpx内アミノ酸C<sup>87</sup>が関わることを示唆しており、マクロファージにおいてもこの機能が重要であると推測される。

#### A. 研究目的

HIV-2はVprに加えてその類似蛋白質Vpxも持つ。筆者らは、マクロファージにおいては、Vpxがウイルスポストエントリーのゲノム逆転写過程までに必須であることを明らかにした (Fujita *et al.*, *J. Virol.* 82:7752, 2008)。また、カニクイザル由来T細胞株HSC-Fにおいては、Vpxが主にウイルスゲノム核移行を促進することを示した (Ueno *et al.*, *Microbes Infect.* 5:387, 2003; Fujita *et al.*, *J. Virol.* 82:7752, 2008)。さらに、Vpxの全長にわたる点変異体19個を作製し、ウイルス増殖性付与に必要なアミノ酸も明らかにした (Fujita *et al.*, *Microbes Infect.* 10:1387, 2008)。一方2011年には、Vpxの機能は抗ウイルス宿主因子SAMHD1をプロテアソーム分解することにより発現される、という報告があり (Laguette *et al.*, *Nature* 474:654, 2011; Hrecka *et al.*, *Nature* 474:658, 2011) (図1)、注目を集めた。本研究では、これを検証するとともに、VpxのSAMHD1非依存的機能の解明を目指した。

#### B. 研究方法

既に報告した、HIV-2 GL-AN株Vpx点変異体の健常人由来マクロファージやHSC-F細胞における活性を、SAMHD1分解の惹起という観点から見直した。また、293T細胞から得られた野生株GL-ANウイルス、そのVpx欠損体、およびVpx点変異体を健常人由来PBLに感染させ、増殖性をRTアッセイにより調べた。SAMHD1の発現ベクター (pcDNA hSAMHD1、名古屋医療センター 岩谷靖雅博士により供与)と、Vpxの発現ベクター (pEF-Fvpx)またはその変異体を293T細胞に共導入した後、細胞内のSAMHD1発現量をウエスタンブロット法により調べた。また、FLAGタグを持つVpxの発現ベクター (pEF-Fvpx)またはその変異体、およびHAタグを持つVpxの発現ベクター (pEF-Hvpx)またはその変異体を293T細胞に共導入した後、細胞をTNEバッファーでライシスした。HAタグを持つVpxを免疫沈降し、FLAG抗体を用いてウエスタンブロットを行うことで、Vpxの多量体化を解析した。

#### (倫理面への配慮)

本研究において、倫理面の配慮が必要な実験は行っていない。

#### C. 研究結果

(1) VpxがSAMHD1を分解するためには、VpxがSAMHD1とともに宿主蛋白質DCAF1と結合することで、ユビキチンリガー複合体が形成されなければならないことが知られる。このVpxとSAMHD1との結合にはVpxの15番目のグルタミン酸(E<sup>15</sup>)が、DCAF1との結合には76番目のグルタミン(Q<sup>76</sup>)がそれぞれに必須であることが知られる。また、詳細は不明であるものの、24番目のトリプトファン(W<sup>24</sup>)が、VpxによるSAMHD1の分解に必要なことも報告されている。筆者らが既に行った、GL-AN点変異体シリーズの増殖性を見直したところ、E<sup>15</sup>、W<sup>24</sup>、Q<sup>76</sup>の変異体(E15G、W24L、Q76A)はマクロファージで全く増殖していなかった (図2)。これは、Vpxがマクロファージ中でSAMHD1依存的機能を発現することを示唆する。

(2) GL-AN点変異体シリーズのHSC-F細胞における増殖性を見直した。E15GやQ76Aは野生株とほぼ同様に増殖していた (図2)。カニクイザルのSAMHD1やDCAF1との結合に用いられるアミノ酸がE<sup>15</sup>やQ<sup>76</sup>であるかどうかについては報告がないが、E<sup>15</sup>付近に増殖に必要なアミノ酸は見当たらない。また、HSC-F細胞中のSAMHD1蛋白質の発現量は検出限界以下であることがわかった (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部野間口雅子、足立昭夫による私信)。これらのことから、VpxはHSC-F中でSAMHD1依存的機能をほとんど発揮せず、SAMHD1非依存的に増殖を促進することが推定される。

(3) 293T細胞から得られたウイルスをPBLに感染させることにより、PBL中のE15G、W24L、Q76Aの増殖性は野生株よりは低下しているが、Vpx欠損体よりは高いことがわかった。このことは、VpxがPBL中でSAMHD1依存的機能とSAMHD1非依

存的機能の両方を発揮していることを示唆する。

(4) Vpx蛋白質の中央部付近に位置する39番目のヒスチジン(H<sup>39</sup>)および49番目のトリプトファン(W<sup>49</sup>)の変異体(H39L、W49L)は、マクロファージやHSC-FでVpx欠損体と全く同様の増殖性を示していた(図2)。また、これらの変異体はPBLではVpx欠損体よりもわずかに高い増殖性を示した。これらより、H<sup>39</sup>やW<sup>49</sup>が細胞にかかわらず、機能発現に重要な働きをすることが示唆された。

(5) Vpx蛋白質のC末端付近に位置する82番目のヒスチジン(H<sup>82</sup>)、87番目のシステイン(C<sup>82</sup>)、94番目のヒスチジン(H<sup>94</sup>)の変異体(H82A、C87A、H94A)は、HSC-F中でVpx欠損体と同様の増殖性を示していた(図2)。また、マクロファージ中では、H82AとC87Aは野生株とVpx欠損体の中間の性質を示し、H94Aは野生株と同様の増殖性を示していた。PBLではこれら3つの変異体は野生株とVpx欠損体の中間の性質を示した。

(6) 細胞内で、Vpxの存在下におけるSAMHD1の分解を観察する系の確立を試みた。まず、SAMHD1の発現ベクター(pcDNA hSAMHD1)とVpxの発現ベクター(pEF-Fvpx、N末端にFLAGタグを持つVpxの発現ベクター)を1:9、1:1、9:1で293T細胞に導入したが、SAMHD1の分解が観察されなかった。Vpxの発現量が多過ぎることが原因と考え、pEF-Fvpxの導入量を減らしてみたところ、pcDNA hSAMHD1:pEF-Fvpxを54:1で導入した時に再現良くSAMHD1の分解が観察された。

(7) pGL-ANの点変異体のシリーズを所有しているが、この変異をpEF-Fvpxに導入し、pEF-Fvpxの変異体のシリーズを完成させた。この変異Vpxを用いてSAMHD1の分解を調べている。実験は現在進行中であるが、E15G、W24L、Q76Aは報告通りに、SAMHD1を分解しないことを観察することができた。一方、少なくともC87Aは野生株と同様、SAMHD1を分解することがわかった。(5)で述べたように、C87AはHSC-F細胞ではVpx欠損体と同様の増殖性を示し、PBLで中間型の増殖性を示す。これらのことから、C<sup>87</sup>はSAMHD1非依存的経路に関わることが推測される。また、C87Aはマクロファージでも中間型の増殖性を示すことから、Vpxはマクロファージ中における効率的なウイルス増殖にもSAMHD1非依存的機能が重要な役割を担うことが予想される。

(8) (2)で述べたようにHSC-F細胞中でVpxのSAMHD1依存的機能がほとんど発揮されないと推定される。これを完璧に証明するために、Vpx

のE<sup>15</sup>でカニクイザルSAMHD1と結合することを示したいと考えた。そのため、VpxとSAMHD1の結合を観察する系の立ち上げを試みた。すなわち、pcDNA hSAMHD1とpEF-Fvpxをそれぞれ293T細胞に導入し、細胞をライシスして2種類のライセートを調整した。片方の蛋白質を抗体ビーズで沈降させ、もう一方の蛋白質溶液を加えてインキュベートした。ビーズを洗浄し、ウエスタンブロットを行った。しかし、再現良く、結合を観察することができなかった。

(9) (7)で述べたようにC<sup>87</sup>はSAMHD1非依存的経路に関わると考えられるが、このアミノ酸がどのような働きをしているのか知りたい。そこで、ウイルス粒子中における、野生型VpxとC87A変異体の環境(結合蛋白質など)の違いを調べようと考えた。そこで、pGL-St( $\Delta$ Vpx)とpEF-Fvpx(N末端にFLAGタグを持つVpxの発現ベクター)またはpEF-Hvpx(N末端にHAタグを持つVpxの発現ベクター)を293T細胞に共導入した。培養上清を0.45  $\mu$ Mフィルターを通した後、Viro-Ademebeadsを用いてウイルス粒子を取り出した。それをライシスしてウエスタンブロットを行った。ビリオンに取り込まれたタグ付きVpxをタグの抗体で沈降させ、結合している蛋白質を解析する予定であった。しかし、N末端にFLAGやHAタグを持つVpxはビリオンにほとんど取りこまれなかった。

(10) Vpxの多量体化を観察する系を立ち上げた。すなわち、pEF-Fvpxまたはその変異体、およびpEF-Hvpxまたはその変異体を293T細胞に共導入した後、細胞をTNEバッファーでライシスした。HAタグを持つVpxを免疫沈降し、FLAG抗体を用いてウエスタンブロットを行った。その結果、Vpxの多量体化を観察することができた。現在、変異体解析を行っているが、C87Aは野生株と同様に多量体化することを見出している。

#### D. 考察

今後は、SAMHD1非依存的機能の実態を明らかにしなければならない。本研究から、Vpxはカニクイザル由来T細胞株HSC-F中でSAMHD1依存的機能をほとんど発揮せず、SAMHD1非依存的に増殖を促進することが推定される。一方、筆者らは、HSC-Fにおいて、Vpxが主にウイルスゲノム移行を促進することを既に明らかにしている(Ueno *et al.*, *Microbes Infect.* 5:387, 2003; Fujita *et al.*, *J. Virol.* 82:7752, 2008)。これらのことを考え合わせると、SAMHD1非依存的機能とウイルスゲノム移行促進能が関係している可能性が高い。従って、まずVpx変異体(特にC87A)のHSC-F細胞における細胞内局在を調べたいと考え、現在AcGFP1と

Vpxの融合蛋白質の発現ベクターを構築中である。

また、HIV-1はVprを持つが、HIV-2はVprに加えて類似蛋白質Vpxも持つ。なぜ、HIV-2は似た蛋白質を2つ持つのだろうか。HIV-1 VprはSAMHD1分解機能を持たない（HIV-1では逆転写酵素の活性が高いためSAMHD1を持つ必要がない）が、G<sub>2</sub>アレスト惹起能を持つ。このG<sub>2</sub>アレスト惹起能のウイルス学的意義ははっきりしていないが、これまでに知られるどのHIV/SIVにも保存されていることから、重要な機能であることが推定される。HIV-2ではVprがG<sub>2</sub>アレスト惹起能を持つ。SIVagmではVprがG<sub>2</sub>アレスト惹起能とSAMHD1分解機能の両方を持つことから、この2つの機能は1つの蛋白質で発揮できると言える。むしろ、G<sub>2</sub>アレスト惹起能とSAMHD1非依存的機能を1つの蛋白質で持つことが不可能なのではないか。実際、ヘリックス3からC末端ループにかけての塩基性クラスター（C<sup>87</sup>に対応するアミノ酸のあたり）がG<sub>2</sub>アレスト惹起能に重要であることが知られる。

#### E. 結論

(1) VpxはSAMHD1依存的にウイルス増殖性を付与するほか、SAMHD1非依存的機能を持つことを見出した。

(2) ヒトPBLで、VpxはSAMHD1依存的機能と非依存的機能の両方を発揮する。カニクイザル由来T細胞株HSC-Fでは、VpxはSAMHD1依存的機能をほとんど発揮せず、SAMHD1非依存的に機能すると考えられる。ヒトマクロファージでは、VpxはSAMHD1依存的機能のほか、非依存的機能も重要であると考えられる。

(2) VpxのSAMHD1非依存的機能には少なくともVpx内アミノ酸C<sup>87</sup>が関わる。

(3) VpxのC<sup>87</sup>は多量化には関わらない。

(4) SAMHD1非依存的機能とウイルスゲノム核移行促進能が関係している可能性が高い。

#### 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., [Fujita, M.](#), Miyazaki, Y., [Adachi A.](#) Viral tropism. *Frontiers in Microbiology* 3: 281, 2012.

2) [Fujita, M.](#), Nomaguchi, M., [Adachi, A.](#), [Otsuka M.](#) SAMHD1-dependent and -independent functions of HIV-2/SIV Vpx protein. *Frontiers in Microbiology* 3: 297, 2012.

##### 2. 学会発表等

1) 三宅在子、藤野悠那、古賀涼子、川村宗吾、大出裕高、岩谷靖雅、野間口雅子、足立昭夫、大塚雅巳、藤田美歌子、宮崎恭行:Vpx 発現における C 末端ポリプロリンモチーフの機能の解析. 第60回日本ウイルス学会. 2012年11月14日(水)、大阪.

2) 藤田美歌子、野間口雅子、古賀涼子、藤野悠那、大塚雅巳、足立昭夫 : SAMHD1 非依存的な HIV-2 Vpx の機能. 第60回日本ウイルス学会. 2012年11月14日(水)、大阪.

3) 立石 大、安楽健作、大塚雅巳、藤田美歌子 : HIV-1 放出抑制剤を目指したイノシトールリン脂質誘導体. 第26回日本エイズ学会. 2012年11月24日(土)、横浜.

4) 藤野悠那、三宅在子、古賀涼子、川村宗吾、大出裕高、岩谷靖雅、野間口雅子、足立昭夫、大塚雅巳、宮崎恭行、藤田美歌子 : HIV-2 Vpx 富プロリン領域の機能. 第26回日本エイズ学会. 2012年11月24日(土)、横浜.

5) 藤田美歌子、古賀涼子、金丸陽亮、江島智彦、園田祥子、安楽健作、田口 祐、井上純一郎、大塚雅巳: 亜鉛フィンガー蛋白質阻害剤による NF-κB 活性化経路の遮断. 第30回メディスナルケミストリーシンポジウム. 2012年11月28日(水)、東京.

6) 園田祥子、安楽健作、古賀涼子、田口 祐、井上純一郎、岡本良成、藤田美歌子、大塚雅巳 : 亜鉛フィンガー蛋白質阻害剤 SN-1 の作用機序解明を目指した研究. 第29回日本薬学会九州支部大会、2012年12月8日(土)、熊本.

7) 藤田美歌子 : エイズウイルス蛋白質の分子機能に関する研究 第29回日本薬学会九州支部大会学術奨励賞、2012年12月8日(土)、熊本.

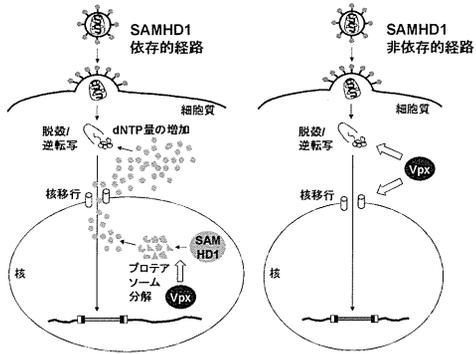


図1 VpxのSAMHD1依存的機能と非依存的機能 (SAMHD1の分解が核内で行われているかについては議論がある。)

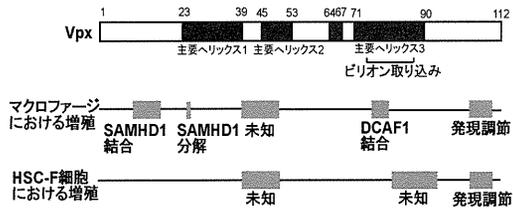


図2 Vpxの機能領域

### Ⅲ. 業績一覽(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
足立 昭夫					
Nomaguchi M, Doi ., Fujiwara S, Saito A, Akari H, Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, Adachi A.	Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells.	Microbes Infect.		in press	2013
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.	15	56-65	2013
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	ra73	2012
Nomaguchi M, Fujita M, Miyazaki Y, Adachi A.	Viral tropism.	Front. Microbio.	3	281	2012
Fujita M, Nomaguchi M, Adachi A, Otsuka M.	SAMHD1-dependent and -independent functions of HIV-2/SIV Vpx protein.	Front. Microbio.	3	297	2012
Nomaguchi M, Doi N, Matsumoto Y, Sakai Y, Fujiwara S, Adachi A.	Species tropism of HIV-1 modulated by viral accessory proteins.	Front. Microbio.	3	267	2012
岩谷 靖雅					
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.	171	346-355	2013

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
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
Bunupuradah T, Imahashi M, Iampornsint 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
Imahashi M, Nakashima M, Iwatani Y.	Antiviral mechanism and biochemical basis of the human APOBEC3 family	Front. Microbio.	3	250	2012
大塚 雅巳					
Abe M, Eto M, Yamaguchi K, Yamasaki M, Misawa J, Yoshitake Y, Otsuka M, Harano K.	Clathrate formation of Diels-Alder adduct of phencyclone and acenaphthylene. Key role of CH/ $\pi$ and bidentate CH/O interactions of the phenanthrene ring in construction of host framework.	Tetrahedron	68	3566-3576	2012
Yamakawa N, Suemasu S, Okamoto Y, Tanaka K, Ishihara T, Asano T,	Synthesis and biological evaluation of derivatives of 2-{2-fluoro-4-[(2-oxocyclop	J. Med. Chem.	55	5143-5140	2012

Miyata K, Otsuka M, Mizushima T.	henyl) methyl]phenyl}propanoic acid: nonsteroidal anti-inflammatory drugs with low gastric ulcerogenic activity.				
Fujita M, Nomaguchi M, Adachi A, Otsuka M.	SAMHD1-dependent and -independent functions of HIV-2/SIV Vpx protein.	Front. Microbio.	3	297	2012
Suemasu S, Yamakawa N, Ishihara T, Asano T, Tahara K, Tanaka K, Matsui H, Okamoto Y, Otsuka M, Takeuchi K, Suzuki H, Mizushima T.	Identification of a unique nsaid, fluoro-loxoprofen with gastroprotective activity.	Biochem. Pharmacol.	84	1470-1481	2012
Sharma RK, Otsuka M, Gaba G, Mehta S.	Inhibitors of transcription factor nuclear factor-kappa beta (NF- $\kappa$ B)-DNA binding.	RSC Adv.	3	1282-1296	2013
徳永 研三					
Tokunaga K.	HIV-1 Vpu and BST-2/tetherin: Enemies at the Gates.	Current HIV Res.	10	275-276	2012
Arias JA, Iwabu Y, Tokunaga K.	Sites of action of HIV-1 Vpu in BST-2/tetherin downregulation.	Current HIV Res.	10	283-291	2012
Fujita H, Fujimoto K, Tokunaga K, Tanak, Y.	Intracellular Logistics of BST-2/Tetherin.	Current HIV Res.	10	321-326	2012
Arias JA, Koyama T, Kinomoto M, Tokunaga K.	Retroelements versus APOBEC3 family proteins: No great escape from the magnificent seven.	Front. Microbiol.	3	275	2012
Zheng Y-H, Jeang K-T, Tokunaga K.	Host Restriction Factors in Retroviral Infection: Promises in Virus-Host Interaction.	Retrovirology	9	112	2012
Koyama T, Sun B, Tokunaga K, Tatsumi M, Ishizaka Y.	DNA damage aids HIV-1 infection of macrophages by overcoming integrase inhibition.	Retrovirology	10	21	2013
Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M,	Characteristics of IFITM, the newly identified	Microbes Infect.		in press	2013

Hiyoshi-Yoshidomi Y, Hashimoto M, Tokunaga K, Suzu S.	IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins.				
中山 英美					
Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, Adachi A.	Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells.	Microbes Infect.		in press	2013
Nakayama EE, Nakajima T, Kaur G, Mimaya J, Terunum, H, Mehra N, Kimura A, Shioda T.	A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5 $\alpha$ linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection.	AIDS Res. Hum. Retroviruses		in press	2013
Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akar, 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.	15	56-65	2013
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 lipodystrophy in Thai patients.	AIDS Res. Hum. Retroviruses	29	142-150	2013
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 cauboxyl-terminus of human immunodeficiency virus type 2 circulating recombinant form 01_AB capsid protein affects sensitivity to human TRIM5 $\alpha$ .	PLoS One	7	e47757	2012
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 ( <i>Macaca fascicularis</i> ).	Front. Microbio.	3	314	2012

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. Microbio.	3	306	2012
藤田 美歌子					
Nomaguchi M, Fujita M, Miyazaki Y, Adachi A.	Viral tropism.	Front. Microbio.	3	281	2012
Fujita M, Nomaguchi M, Adachi A, Otsuka M.	SAMHD1-dependent and -independent functions of HIV-2/SIV Vpx protein.	Front. Microbio.	3	297	2012

#### IV. 研究論文(抜粹)