

201319011A

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
H24-エイズ-一般-005

抗ウイルス宿主因子を基盤とする新規抗 HIV 戦略の開発・確立
に向けた系統的研究

平成 25 年度総括・分担研究報告書

平成 26 年 3 月

研究代表者 足立昭夫

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授)

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
H24-エイズ-一般-005

**抗ウイルス宿主因子を基盤とする新規抗 HIV 戦略の開発・確立
に向けた系統的研究**

平成 25 年度総括・分担研究報告書

平成 26 年 3 月

研究代表者 足立昭夫

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授)

研究組織

研究者名	分 担	所 属	役 職
足立昭夫	研究代表者	徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部	教授
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
大塚雅巳	研究分担者	熊本大学 大学院生命科学研究部	教授
徳永研三	研究分担者	国立感染症研究所 感染病理部	主任研究官
中山英美	研究分担者	大阪大学 微生物病研究所	准教授
藤田美歌子	研究分担者	熊本大学 薬学部	准教授

目 次

I. 総括研究報告書

- 抗ウイルス宿主因子を基盤とする新規抗 HIV 戦略の開発・確立 ----- 1
に向けた系統的研究
研究代表者: 足立昭夫(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)

II. 分担研究報告書

1. Vpx 関連宿主因子の抗ウイルス機序の解析 ----- 7
足立昭夫(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)
2. APOBEC3G の発現制御モジュレーターと分解阻害剤の探索 ----- 11
岩谷靖雅(名古屋医療センター 臨床研究センター)
3. 宿主因子に対する制御物質の探索と創製: 抗ウイルス宿主因子を ----- 15
擬似・制御する低分子化合物の創製
大塚雅巳(熊本大学大学院生命科学研究部)
4. 新規宿主因子 MARCH8 の HIV-1 複製抑制における分子機構の解明 ----- 19
徳永研三(国立感染症研究所感染病理部)
5. TRIM5 α による脱殻機序の解明とモジュレーターの探索 ----- 23
中山英美(大阪大学微生物病研究所)
6. 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 ----- 27
制御物質の評価: HIV-2 Vpx の SAMHD1 非依存的機能の解明
藤田美歌子(熊本大学薬学部)

III. 業績一覧(2013) ----- 31

IV. 研究論文(抜粋)

I . 総括研究報告書

研究課題：抗ウイルス宿主因子を基盤とする新規抗 HIV 戦略の開発・確立に向けた系統的研究
課題番号：H 2 4-エイズ一般-0 0 5

研究代表者：足立 昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）

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 室長）、大塚 雅巳（熊本大学大学院生命科学研究部 教授）、徳永 研三（国立感染症研究所感染病理部 主任研究官）、中山 英美（大阪大学微生物病研究所 准教授）、藤田 美歌子（熊本大学薬学部 准教授）

1. 研究目的

多剤併用療法の進歩によって HIV 感染者の予後は改善されつつある。しかし、未だ根治(eradication)には至っておらず終生にわたって服薬を継続しなければならない。HIV 感染治療が長期化するが故の懸念も増大している。これらを克服するためには、根治に繋がる戦略を見出さなければならない。既存の抗 HIV 薬はウイルスの複製を阻害するものであり、体内からウイルスは駆逐されない。特に、HIV のように慢性に持続感染するウイルスの eradication は、最終的には免疫系などの宿主のシステムに頼らざるを得ない。しかし、従来のワクチンあるいは免疫学的治療概念では、この問題をクリアすることは非常に困難であると考えられている。最近、レトロウイルスに対する細胞内宿主因子が次々と同定され、ヒトは進化の過程で多くのレトロウイルスを排除してきたという証拠が見出されている。一方で、HIV はこれらの宿主防御因子の働きを解除する遺伝子産物をコードしている。そこで、本研究班では、宿主防御因子を活用した治療戦略への基盤を創出することを目的とし、HIV 感染・増殖に関与する宿主防御因子(SAMHD1、BST-2/tetherin、TRIM5、APOBEC3、未同定因子)の抗 HIV 作用機序とウイルス遺伝子産物による解除機構の分子基盤を明らかにする研究に取り組む。また、新規抗 HIV 細胞因子の探索・同定も試みる。これらにより、従来の免疫学とは異なる抗 HIV 防御システムの全体像を明らかにし、宿主因子を利用した次世代型治療戦略や病態解明への新たな知見が輩出できると考えられる。

2. 研究方法

3 年間の計画で宿主因子を利用した治療法の開発や病態解明につながる新たな知見を輩出する。三つの主軸に沿って各研究分担者が各論を展開し、成果

や手法を共有することで研究班全体として研究を強力に推進していく。研究目的により各種の研究手法（ウイルス学、分子生物学、生化学、有機化学、計算科学、構造生物学等）を用いる。（1）宿主因子とウイルスの増殖阻止の分子機序を明らかにする。（2）抗ウイルス宿主因子の発現制御機構と分解機構について解明し、ウイルス感染による変化もしくは個体差に関する研究を行う。（3）抗ウイルス宿主因子／解除因子の相互作用を阻害、あるいは抗ウイルス宿主因子の発現制御をコントロールする分子モジュレーターや低分子化合物を探索する。さらに、各研究者の知識・経験あるいは研究材料及び班研究のメリットを最大限に生かすため、研究代表者のもとで積極的な議論を重ねるインターラクティブな研究体制をとる。

（倫理面への配慮）

本研究は、遺伝子組換え実験を含むため「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守する。また、クラス 3 の病原体 HIV を用いた実験を含むため、実験を実施する研究機関の承認を得て行う。ヒト由来臨床材料を使う研究が行われる場合は、関連機関の倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で行う。

3. 研究結果

研究代表者及び研究分担者は緊密な協力関係のもとに研究を行った。研究は順調かつ着実に進捗し、主要な成果として要約以下の成績を得た。（1）既報の宿主因子（SAMHD1 及び APOBEC3A）以外にも HIV-2 Vpx の標的分子があることを分子遺伝学的解析から明らかにした。また、Vpx の発現調節に重要なモチーフ（poly-proline motif; PPM）を同定し、その機構を解明した（翻訳過程の促進）。（2）

APOBEC3C の立体構造の解明に成功し、Vif との相互作用部位を同定した。さらに、APOBEC3F の C 末側ドメインの分子構造を決定した。これらにより、阻害化合物のデザインの基礎を構築した。また、定量 RT-PCR 法により APOBEC3 (A、B、C、DE、F、G 及び H の 7 種類) の発現量を増加させるモジュレータを複数同定した (1 型インターフェロン等)。

(3) Vpu に作用し BST-2/tetherin の抗ウイルス活性を増強させる宿主因子 SCYL2 を同定した。(4) 強い抗 HIV-1 活性を示す新規抗ウイルス因子 MARCH 8 を同定した。MARCH 8 はウイルスの細胞へのエントリー段階で働くと考えられ、現在、その詳細を解析中である。(5) カニクイザルにおける TRIM5 遺伝子型の分布や抗ウイルス機能について明らかにした。また、TRIM5 とは無関係にウイルス増殖を増強する HIV Gag-CA 変異を同定した。さらに、センダイウイルスベクターを用いた TRIM5 評価系を確立し、HIV Gag-CA の試験管内アセンブリー系の構築にも成功した。現在、抗 HIV-1 活性を示す三つの低分子化合物を詳細に検討中である。

(6) TRIM5 機能を擬似化する化合物 BMMP を合成し、抗 HIV-1 活性を持つことを確認した。また、APOBEC3 の発現量を有意に増加させる低分子化合物 SN-2 を得た。

4. 考察

本研究の目標を達成するためには、宿主細胞内防御因子 (抗 HIV 因子) とこれを無効にするウイルス解除因子 (HIV がコードする Gag、Vif、Vpx 及び Vpu) との相互作用を分子レベルで詳細に解析・解明する必要がある。また、ウイルス複製に関与する未同定因子についての探索も活発に行う必要がある。これらに鑑みると、本年度の研究により各ウイルス解除因子とその標的である宿主防御因子について、重要な学術的知見が蓄積しつつあることがわかる。HIV の複製や感染病態における宿主因子の重要性は明らかであるので、治療戦略の基盤を構成するウイルス蛋白質との相互作用機序の分子レベルでの解析を継続していく必要がある。具体的には次のようにまとめられる。(1) Vpx の細胞内標的因子 (SAMHD1 と APOBEC3A 以外) を同定する。Vpx PPM に結合する細胞因子を同定する。(2) APOBEC3 の発現調節ではインターフェロン刺激を中心とした JAK-STAT 系の活性化が深く関与する

ことが明らかになった。APOBEC3 の過剰発現が HIV 複製にどの程度の抑制効果を持つか検証する。

(3) APOBEC3 の立体構造解析が進展し、Vif との結合部位の詳細が明らかになりつつある。今後はその阻害化合物の創製が重要である。(4) MARCH 8 の作用機序の詳細を解明し、その作用を増強する戦略を構築する。(5) 試験管内 HIV Gag-CA アセンブリー系やセンダイウイルスベクター系を用い、微弱なヒト TRIM5 活性を増強させる低分子化合物を探索する。(6) BMMP 及び SN-2 の作用機序を解明し、これに基づいて nM オーダーの活性を持つ選択的な HIV 阻害剤の創製を試みる。

5. 自己評価

1) 達成度について

班研究を効果的・効率的に進めるため、班会議では充分時間をかけ研究計画と研究成果の共有化を図った。これが極めて有効に働き、研究代表者及び研究分担者間の有機的な協力体制 (共同研究等) が構築され、予想以上の成果が得られた。研究班の成立時に想定していた研究テーマの全てについて明確な進展が見られ、さらなる発展を目指した実験計画が具体的に策定可能となった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

Eradication を目標とした次世代型治療戦略に宿主細胞因子を総合的に活用するというアプローチは世界的にも評価され、これに基づく研究活動は活発化しつつある。この目標の基盤をなす宿主因子・ウイルス蛋白質相互作用の分子機序の解明には様々な先端的研究手法や先駆的情報が必須である。それぞれの研究テーマの目標は世界的にも高レベルに設定されている。したがって、本研究の学術的・国際的・社会的意義は明らかであり、当初の方向性に基づいて着実に研究を進展させることが肝要であると思われる。

3) 今後の展望について

既知の宿主防御因子 (TRIM5、APOBEC3、BST-2/tetherin 及び SAMHD1) とウイルス解除因子 (Gag、Vif、Vpx 及び Vpu) については本研究班においても精力的に研究が行われ顕著な成果が得られている。これらの研究課題の目標遂行に努めると

ともに、今後は、未同定宿主防御因子及び未同定宿主補助因子（既知の宿主防御因子とウイルス解除因子の相互作用に関与する未同定の宿主因子）の探索も極めて重要であると考え。これに関しては、本年度の成果により具体的な課題設定が可能となったので、最終年度に実験解析による検証作業を行っていく。

6. 結論

HIV感染・増殖に関与する宿主細胞防御因子の抗ウイルス作用機序とウイルス遺伝子産物による解除機構の解明に取組み、新たな学術的知見を得た。これまでに同定した因子や因子内領域は、Vpxの発現増強に関わるVpx内PPM (poly-proline motif)配列、APOBEC3とVifの相互作用部位、APOBEC3

の発現量を増加させるモジュレータ、新規抗HIV-1因子MARCH 8及びBST-2/tetherinの抗ウイルス活性を増強させる宿主因子SCYL2である。構築した評価系はTRIM5の標的であるGag-CAの試験管内アセンブリー系である。この他、創薬に繋がり得る抗ウイルス宿主因子を擬似・制御する低分子化合物として、TRIM5機能を擬似化するBMMP 及びAPOBEC3の発現量を有意に増加させるSN-2を得た。

7. 健康危険情報

該当事項なし。

8. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

該当事項なし。

研究発表

研究代表者

足立昭夫

- 1) Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yokoyama, M., Sato, H., Masuda, T., and Adachi, A. Natural single- nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. *Journal of Virology*, in press.
- 2) Miyake, A., Miyazaki, Y., Fujita, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. Role of poly-proline motif in HIV-2 Vpx expression. *Frontiers in Microbiology* 5: 24, 2014.
- 3) Miyake, A., Fujita, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Otsuka, M., Ode, H., Iwatani, Y., Sakai, Y., Doi, N., Nomaguchi, M., Adachi, A., and Miyazaki, Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. *Journal of General Virology* 95: 179-189, 2014.
- 4) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Miyakawa, K., Ryo, A., Ode, H., Iwatani, Y., Miura, T., Igarashi, T., Sato, H., and Adachi, A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *Journal of Virology* 87: 11447-11461, 2013.
- 5) Doi, N., Okubo, A., Yamane, M., Sakai, Y., Adachi, A., Nomaguchi, M. Growth potentials of CCR5-tropic/CXCR4-tropic HIV-1mt clones in macaque cells. *Frontiers in Microbiology* 4: 218, 2013.
- 6) Saito, A., Nomaguchi, M., Kono, K., Iwatani, Y., Yokoyama, M., Yasutomi, Y., Sato, H., Shioda, T., Sugiura, W., Matano, T., Adachi, A., Nakayama, E.E., and Akari, H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* 94: 1318-1324, 2013.
- 7) 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 genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15: 319-328, 2013.

研究分担者

岩谷靖雅

- 1) 岩谷靖雅、渡邊信久. 新規抗HIV薬の開発に向けて. 新分子・新材料によるメディカルエンジニアリング. 2014、印刷中.

- 2) Chaurasiya, K.R., McCauley, M.J., Wang, W., Qualley, D.F., Wu, T., Kitamura, S., Geertsema, H., Chan, D.S.B., Hertz, A., Iwatani, Y., Levin, J.G., Musier-Forsyth, K., Rouzina, I., and Williams, M.C. Oligomerization transforms human APOBEC3G from an efficient enzyme to a slowly dissociating nucleic acid binding protein. *Nature Chemistry* 6: 28-33, 2014.
- 3) Miyake, A., Fujita, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Otsuka, M., Ode, H., Iwatani, Y., Sakai, Y., Doi, N., Nomaguchi, N., Adachi, A., and Miyazaki, Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. *Journal of General Virology* 95: 179-189, 2014.
- 4) Tu, E., Swenson, L.C., Land, S., Pett, S., Emery, S., Marks, K., Kelleher, A.D., Kaye, S., Kaiser, R., Schuelter, E., Harrigan, R. on behalf of the MARCH Laboratory Group and the MARCH Study Group. Results of external quality assessment for proviral DNA testing of HIV tropism in the Maraviroc Switch collaborative study. *Journal of Clinical Microbiology* 51: 2063-2071, 2013.
- 5) Saito, A., Nomaguchi, M., Kono, K., Iwatani, Y., Yokoyama, M., Yasutomi, Y., Sato, H., Shioda, T., Sugiura, W., Matano, T., Adachi, A., Nakayama, E.E., and Akari, H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* 94: 1318-1324, 2013.
- 6) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Miyakawa, K., Ryo, A., Ode, H., Iwatani, Y., Miura, T., Igarashi, T., Sato, H., and Adachi, A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *Journal of Virology* 87: 11447-11461, 2013.
- 7) 北村紳悟、岩谷靖雅. HIV アクセサリータンパク質の機能. *ウイルス* 63: 187-198, 2013.

大塚雅巳

- 1) Miyake, A., Fujita, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Otsuka, M., Ode, H., Iwatani, Y., Sakai, Y., Doi, N., Nomaguchi, M., Adachi, A., and Miyazaki, Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. *Journal of General Virology* 95: 179-189, 2014.
- 2) Anraku, K., Fujita, M., Morii, T., Mori, Y., Okamoto, Y., and Otsuka, M. Design and synthesis of biotinylated inositol phosphates: application to the inositol phosphate-protein binding analysis. *In Inositol: Synthesis, Functions and Clinical Implications*, Nova Science Publishers, New York, pp. 193-214, 2013.
- 3) Ashizawa, T., Miyata, H., Iizuka, A., Komiyama, N., Oshita, C., Kume, A., Nogami, M., Yagoto, M., Ito, I., Oishi, T., Watanabe, R., Mitsuya, K., Matsuno, K., Furuya, T., Okawara, T., Otsuka, M., Ogo, N., Asai, A., Nakasu, Y., Yamaguchi, K., and Akiyama, Y. Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of cancer stem-like cells derived from recurrent glioblastoma. *International Journal of Oncology* 43: 219-217, 2013.

徳永研三

- 1) Koyama, T., Arias, J.F., Iwabu, Y., Yokoyama, M., Fujita, H., Sato, H., and Tokunaga, K. APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of both Alu and LINE-1 retrotransposition. *PLoS One* 8: e84228, 2013.
- 2) Tada, T., Kadoki, M., Liu, Y., Tokunaga, K., and Iwakura, Y. Transgenic expression of the human LEDGF/p75 gene relieves the species barrier against HIV-1 infection in mouse cells. *Frontiers in Microbiology* 4: 377, 2013.
- 3) 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* 15: 280-290, 2013.
- 4) Fujita, H., Iwabu, Y., Tokunaga, K., and Tanaka, Y. Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. *Journal of Cell Science* 126: 2798-2809, 2013.
- 5) 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.

中山英美

- 1) Taya, K., Nakayam, E.E., and Shioda, T. Moderate restriction of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 9:

e90969, 2014.

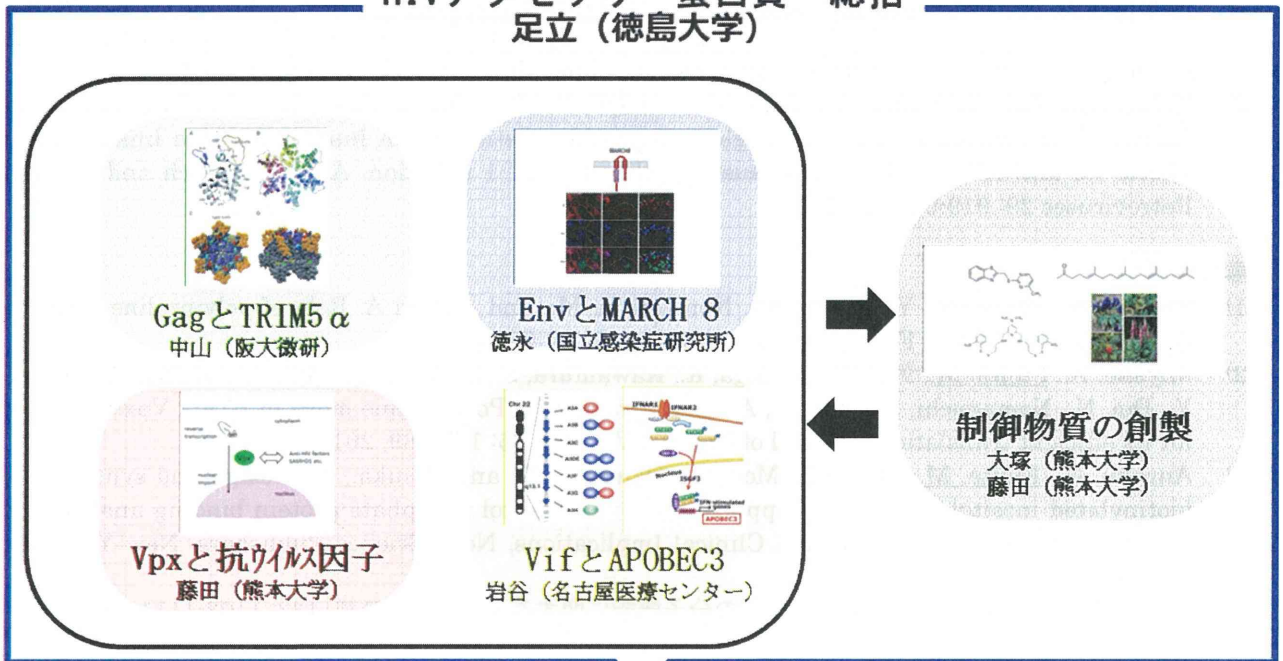
- 2) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Miyakawa, K., Ryo, A., Ode, H., Iwatani, Y., Miura, T., Igarashi, T., Sato, H., and Adachi, A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *Journal of Virology* 87: 11447-11461, 2013.
- 3) Kono, K., Takeda, E., Tsutsui, H., Kuroishi, A., Hulme, A.E., Hope, T.J., Nakayama, E.E., and Shioda, T. Slower uncoating is associated with impaired replicative capability of simian-tropic HIV-1. *PLoS One* 8: e72531, 2013.
- 4) Saito, A., Nomaguchi, M., Kono, K., Iwatani, Y., Yokoyama, M., Yasutomi, Y., Sato, H., Shioda, T., Sugiura, W., Matano, T., Adachi, A., Nakayama, E.E., and Akari, H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* 94: 1318-1324, 2013.
- 5) Nomaguchi, M., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Nakayama, E.E., Shioda, T., Yokoyama, M., Sato, H., and Adachi, A. Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15: 319-328, 2013.
- 6) Nakayama, E.E., Nakajima, T., Kaur, G., Mimaya, J.I., Terunuma, H., Mehra, N., Kimura, A., and Shioda, T. 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. *AIDS Research and Human Retroviruses* 29: 919-924, 2013.

藤田美歌子

- 1) Miyake, A., Miyazaki, Y., Fujita, M., Nomaguchi, M., and Adachi A. Role of poly-proline motif in HIV-2 Vpx expression. *Frontiers in Microbiology* 5: 24, 2014.
- 2) Miyake, A., Fujita, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Otsuka, M., Ode, H., Iwatani, Y., Sakai, Y., Doi, N., Nomaguchi, M., Adachi, A., and Miyazaki, Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. *Journal of General Virology* 95: 179-189, 2014.
- 3) Anraku, K., Fujita, M., Morii, T., Mori, Y., Okamoto, Y., and Otsuka, M. Design and synthesis of biotinylated inositol phosphates: application to the inositol phosphate-protein binding analysis. *In Inositol: Synthesis, Functions and Clinical Implications*, Nova Science Publishers, New York, pp. 193-214, 2013.
- 4) 藤田美歌子 エイズウイルスタンパク質の分子機能に関する研究. *薬学雑誌* 133: 1103-1111, 2013.

抗ウイルス宿主因子を基盤とする 新規抗HIV戦略の開発・確立に向けた系統的研究

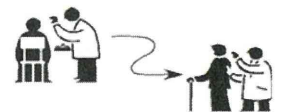
HIVアクセサリ蛋白質・総括
足立（徳島大学）



抗 HIV 宿主因子とHIV 感染に関する学術的知見を輩出



Eradication を目標にした
次世代型治療戦略の基盤創出



Ⅱ. 分担研究報告書

分担研究課題：Vpx 関連宿主因子の抗ウイルス機序の解析

研究分担者：足立昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）

研究協力者：野間口雅子（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授）

宮崎恭行（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 助教）

三宅在子（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 助教）

土肥直哉（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 特別研究員）

研究要旨

霊長類免疫不全ウイルス群のうち、HIV-2/SIVmac/SIVsmm グループに属するウイルスは、マクロファージやTリンパ球などの自然宿主細胞におけるウイルス増殖に重要な役割を果たすVpx蛋白質をコードしている(末尾の図参照)。これらのウイルスは、さらに、Vpxと構造的に類似しているVprをもコードしている。一方、HIV-1グループのウイルスはVprのみを持つ。VpxとVprのアミノ酸配列上の最も顕著な相違点は、この二つのウイルス蛋白質が連続するプロリン残基からなる特徴的なモチーフ (poly-proline motif; PPM) を持つか否かである。HIV-2/SIVmac/SIVsmm 由来 Vpx の C 末端領域には例外なく7個の連続するプロリン残基からなるPPMが存在する。ただし、種々のSIV由来VpxにはPPMがないもの、逆に、PPMが存在するVprもある。この状況を踏まえ、本研究ではHIV-2のVpx-PPMの機能的役割とその作用機構について分子遺伝学的手法により解析を行なった。要約、以下の成果を得た。

(1) PPMはHIV-2 Vpxの効率的な翻訳に必須であり、塩基配列(ピリミジン)ではなくアミノ酸配列(プロリン)依存性効果を示す。(2) PPM中のプロリン数やそれらの位置がVpx発現効率に大きく影響する。(3) PPMを持たないHIV-1/HIV-2 VprにPPMを付加してもVpr発現効率はほとんど向上しない。(4) Vpxの発現効率にはPPM以外の領域やアミノ酸配列も大きく影響する。(5) SIVmac VpxやSIVagm Vpr(GRI677)の発現もPPM依存性を示す。

A. 研究目的

HIV-2や各種SIVがコードするアクセサリー蛋白質Vpxは、HIV-1が持たないウイルス蛋白質であることや一般的な株化細胞ではウイルス複製に不必要なこともあって、専門とする研究者数も少なく、最近まで他のウイルス蛋白質のように広範かつ詳細な研究が行なわれていなかった。2011年のNature誌の連続二論文において、細胞内抗ウイルス蛋白質SAMHD1がVpxの標的蛋白質でありVpxにより分解されると報告されると、新しい研究テーマとしてVpx/SAMHD1は一躍注目されるようになった。研究分担者らはHIVの基礎研究の一環としてVpxの分子遺伝学的研究にも長期間一貫して取組み、その機能について情報を蓄積してきた (Microbiol Immunol 38:871-878, 1994; Microbiol Immunol 39:1015-1019, 1995; Arch Virol 142:177-181, 1997; Arch Virol 143:513-521, 1998; Int J Mol Med 11:641-644, 2003; Microbes Infect 5:387-395, 2003; Microbes Infect 8:10-15, 2006; J Med Invest 53:271-276, 2006; J Virol 82:7752-7756, 2008; Microbes Infect 10:1387-1392, 2008; Rev Med Virol 20: 68-76, 2010; Front Microbiol 2:115, 2011; Front Microbiol 2:132, 2011; J Gen Virol

95:179-189, 2014; Front Microbiol 5:24, 2014)。これらの研究により、研究分担者らはVpxがマクロファージや樹状細胞だけでなくT細胞におけるHIV-2/SIVmacの複製に重要であり、ウイルスゲノムの逆転写・核移行に関与していることを明らかにした。さらに、Vpx-PPMがVpxの機能そのものではなくVpxの発現制御に関わっていることも明らかにした。Vpxについて重要なことは、VpxがHIV-1とHIV-2のウイルス学的特性の差(特に病原性や伝播能)に関与している可能性があることである。本研究では、Vpx-PPMを新しい創薬ターゲットとして捉え、Vpx-PPMの機能/作用機序の詳細の解明を目指した。PPMを持つ蛋白質は原核および真核細胞中に多数存在し、PPMの翻訳過程への関与もごく最近報告されているが (Science 339:82-85, 2013; Science 339:85-88, 2013; Mol Cell 51:35-45, 2013)、これまでのところVpxを含めウイルス蛋白質についてのPPM機能解析の報告はない。

B. 研究方法

1. Vpxの発現にはN末あるいはC末にFLAG タグを持つ発現ベクター (pEF1) を用い、定法通

り、遺伝子導入された 293T 細胞での発現をウェスタンブロット法で解析した。Vpr や Vpx/Vpr キメラ蛋白質の発現には N 末 FLAG タグベクターを用いた。

2. 一連の Vpx/Vpr 変異体や Vpx/Vpr キメラ蛋白質発現ベクターは市販のキットを用いて作製した。プロウイルスゲノムの改変も同様に行なった。
3. Vpx/Vpr の試験管内転写/翻訳反応は市販のシステム (原核および真核細胞由来) を用いて行なった。
4. Vpx/Vpr mRNA の細胞内レベルは、遺伝子導入された 293T 細胞を用い、定法通りに定量 RT-PCR 法で測定した。

(倫理面への配慮)

本研究課題には遺伝子組換え実験が含まれているので、『徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会』に実験の承認を申請中である。『キメラゲノムによる HIV-1 の分子遺伝学的研究』をする間に執る拡散防止措置については文部科学大臣の確認が得られている (21 受文科振第 935 号)。

C. 研究結果

1. HIV-2 Vpx-PPM 変異プロウイルスクロンの増殖特性と発現ベクターを用いた変異 Vpx の発現量は良く相関していた。この結果から、PPM は Vpx の発現そのものを制御していることが明らかとなった。また、PPM 中のプロリン数やそれらの位置が Vpx 発現効率に大きく影響することもわかった。
2. PPM 変異体の発現量低下は蛋白質分解阻害剤によって回復せず、プロテアソーム分解やリソソーム分解によるものではなかった。さらに、変異体の細胞内 mRNA 量には異常が認められなかった。また、PPM を持たない HIV-1/HIV-2 Vpr に PPM を付加してもその発現量にほとんど影響を与えなかった。SIVagm Vpr (GRI677) には 5 個の連続するプロリンからなる PPM が存在するが、この Vpr は PPM 依存性の発現を示した。ただし、この Vpr は実質的には Vpx と見なすことができる。
3. 各種試験管内転写/翻訳系 (ウサギ網状赤血球抽出液及び大腸菌抽出液) を用いた解析から、変異体の発現量の低下は翻訳過程に起因するものであることがわかった (原核細胞および真核細胞の両者とも)。さらに、この低下はアミノ酸配列に依存するものでありコドン (核酸) 依存性はなかった。
4. SIVmac239 Vpx の細胞内発現レベルは HIV-2 Vpx (GL-AN クローン) に比べて低かったが、PPM を介した発現制御は行われていることを変異体を用いて確認した。HIV-2 Vpx と

SIVmac239 Vpx の発現レベルの差は Vpx のヘリックス 1 領域のアミノ酸配列の違いによるものであった。

5. SIVdr1 Vpx は 7 個の連続したプロリン残基からなる PPM (C 末最末端) が存在するにもかかわらず、その発現に PPM 依存性がなかった。この知見に基づいて、HIV-2 Vpx (GL-AN クローン) の PPM から C 末最末端にある 3 個のアミノ酸 (グリシン-ロイシン-バリン) に変異を導入して Vpx 発現量を調べた。グリシンおよびロイシン残基も Vpx 発現に重要であることがわかった。
6. 将来のサル個体感染実験を念頭に、マカクザル指向性 HIV-1 のゲノム中央領域 (Vpr をコードする領域) に *vpx* 遺伝子を挿入するなどして種々のプロウイルスクロンを構築したが、それらのクロンが Vpx 活性を持つ証拠は得られなかった。

D. 考察

本研究は Vpx-PPM が翻訳過程を介して HIV-2 Vpx の発現を制御していることを証明した。昨年、原核細胞と真核細胞由来蛋白質の PPM が翻訳効率の制御に重要であるとの報告があった (Science 339: 82-85, 2013; Science 339: 85-88, 2013; Mol Cell 51:35-45, 2013)。ウイルス蛋白質に関しては我々の報告が初めてである (J Gen Virol 95:179-189, 2014; Front Microbiol 5:24, 2014)。シークエンスバンクには PPM を持つ蛋白質 (ウイルス蛋白質を含む) が多数登録されており、PPM 研究は今後大きな発展が予想される。

本年度に得られた我々の結果は、以下にまとめように、Vpx の発現効率に PPM 以外の領域やアミノ酸配列も大きく影響することを示している: (1) PPM 付加だけでは Vpr の発現を促進できないこと; (2) Vpx のヘリックス 1 に起因する HIV-2/SIVmac Vpx の発現量の差; (3) SIVdr1 の Vpx-PPM と HIV-2 Vpx-PPM に関する実験結果から判明した C 末最末端のアミノ酸配列の役割。これらの事実は、Vpx 発現量に関して、PPM のプロリン残基以外のアミノ酸残基の重要性を明確に示している。ごく最近 Vpx の立体構造が明らかにされた (Nature 505:234-238, 2014)。今後は構造的視点も重要となろう。

PPM には特定の細胞因子 (原核細胞と真核細胞に共通の翻訳関連因子) が結合することが予想される。現在、将来の抗ウイルス薬の開発を視野に入れこの細胞因子の同定作業を進めている。

E. 結論

本年度、Vpx-PPM に関する研究が格段に進捗し具体的な課題が明確に提示されるに至った。

Vpx-PPM は Vpx 翻訳過程に作用することでその発現量を著しく増強させ、ウイルス複製を亢進させる。PPM の作用を減弱させればウイルス複製は減少する。PPM 結合因子の同定が喫緊の課題である。

PPM 結合因子は原核細胞と真核細胞に共通に存在し、蛋白質の翻訳に関連すると考えられるので、当面、以下の因子について解析する予定である：EIF5A、EEF2、EEF1A1、EEF1B2、EIF5B、EIF1、EIF1A、ETF1、eRF3、RPL24 および RPL26。Vpx 発現ベクターとこれらの因子の発現ベクターを 293T 細胞に共導入し、免疫共沈法により責任因子を同定する予定である（変異体は親クローンに比較して発現量が激減するので両クローンの導入量は調節する。不首尾の場合は、小麦胚芽無細胞蛋白質合成系を用いる）。

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) Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yokoyama, M., Sato, H., Masuda, T., and Adachi, A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 *pol* gene modulate viral replication ability. *Journal of Virology*, in press.
- 2) Miyake, A., Miyazaki, Y., Fujita, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. Role of poly-proline motif in HIV-2 Vpx expression. *Frontiers in Microbiology* 5: 24, 2014.
- 3) Miyake, A., Fujita, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Otsuka, M., Ode, H., Iwatani, Y., Sakai, Y., Doi, N., Nomaguchi, M., Adachi, A., and Miyazaki, Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. *Journal of General Virology* 95: 179-189, 2014.
- 4) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Miyakawa, K., Ryo, A., Ode, H., Iwatani, Y., Miura, T., Igarashi, T., Sato, H., and Adachi, A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *Journal of Virology* 87: 11447-11461, 2013.

- 5) Doi, N., Okubo, A., Yamane, M., Sakai, Y., Adachi, A., and Nomaguchi, M. Growth potentials of CCR5-tropic/CXCR4-tropic HIV-1mt clones in macaque cells. *Frontiers in Microbiology* 4: 218, 2013.
- 6) Saito, A., Nomaguchi, M., Kono, K., Iwatani, Y., Yokoyama, M., Yasutomi, Y., Sato, H., Shioda, T., Sugiura, W., Matano, T., Adachi, A., Nakayama, E.E., and Akari, H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* 94: 1318-1324, 2013.
- 7) Nomaguchi, M., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Nakayama, E.E., Shioda, T., Yokoyama, M., Sato, H., and Adachi, A. Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15: 319-328, 2013.

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、横田恭子、横山勝、佐藤裕徳、増田貴夫、足立昭夫：HIV-1 *pol*(4895-4933)の1塩基置換によるウイルス複製制御機構の解析。第61回日本ウイルス学会学術集会。2013年11月10日（日）、神戸。
- 2) 宮崎恭行、三宅在子、野間口雅子、内山恒夫、足立昭夫：In vitro 再構築系を用いたHIV-1/HIV-2 CA アセンブリーの安定性に関する解析。第61回日本ウイルス学会学術集会。2013年11月10日（日）、神戸。
- 3) 足立昭夫、土肥直哉、藤原佐知、野間口雅子：アカゲザル PBMC で効率良く増殖するHIV-1mtの構築。第61回日本ウイルス学会学術集会。2013年11月11日（月）、神戸。
- 4) 齊藤暁、大附寛幸、東濃篤徳、鈴木紗織、松田健太、高橋尚史、松岡佐織、岩谷靖雅、杉浦互、野間口雅子、足立昭夫、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：CCR5指向性を示す新規サル指向性HIV-1はサル個体に持続感染する。第61回日本ウイルス学会学術集会。2013年11月11日（月）、神戸。
- 5) 三宅在子、宮崎恭行、野間口雅子、足立昭夫：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61回日本ウイルス学会学術集会。2013年11月11日（月）、神戸。
- 6) 山本充奈美、野間口雅子、古賀涼子、岩谷靖雅、高宗暘暁、三隅将吾、大塚雅巳、足立昭

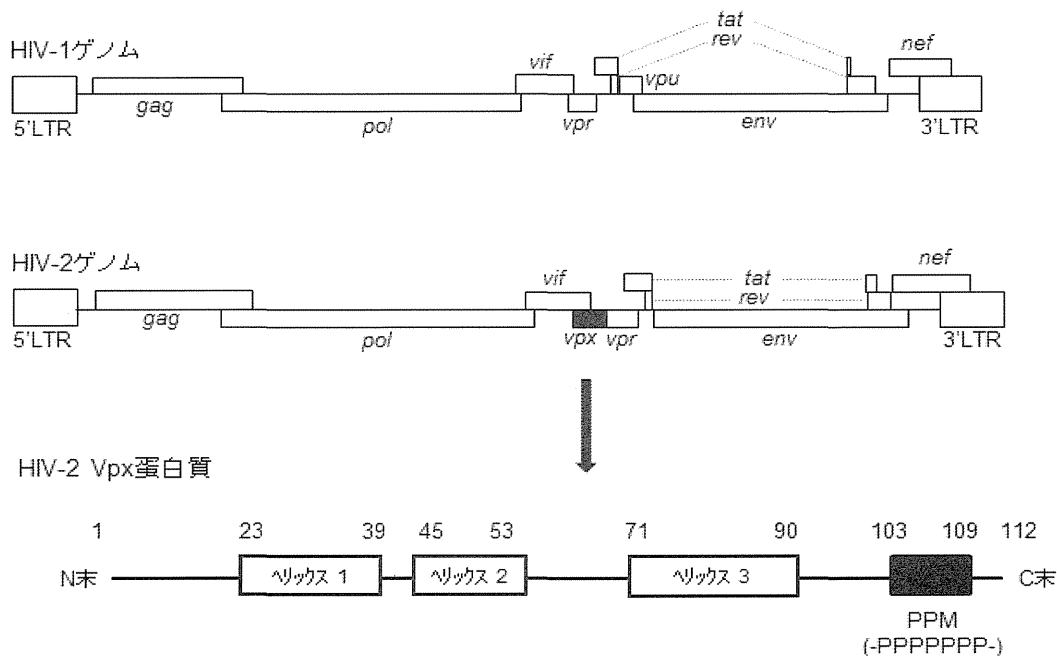
夫、藤田美歌子：マクロファージにおける SAMHD1 非依存的な HIV-2 Vpx の機能. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 11 日 (月)、神戸.

- 7) 土肥直哉、藤原佐知、酒井遥介、大久保綾香、山根瑞萌、足立昭夫、野間口雅子：R5-tropic HIV-1mt Env 適応変異の宿主細胞依存性増殖促進機構の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 10 日 (日)、神戸.
- 8) 齊藤暁、大附寛幸、東濃篤徳、鈴木沙織、松田健太、高橋尚史、松岡佐織、岩谷靖雅、杉

浦互、野間口雅子、足立昭夫、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：CCR5 指向性を示す新規サル指向性 HIV-1 はサル個体に持続感染する. 第 27 回日本エイズ学会学術集会. 2013 年 11 月 20 日 (水)、熊本.

- 9) チッフチ ハリルイブラヒム、古賀涼子、岩谷靖雅、野間口雅子、足立昭夫、大塚雅巳、藤田美歌子：SAMHD1-independent function of HIV-2 Vpx protein. 第 27 回日本エイズ学会学術集会. 2013 年 11 月 20 日 (水)、熊本.

HIV-2 Vpx の構造



分担研究課題：APOBEC3G 発現制御モジュレーターと分解阻害剤の探索

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

HIV 感染症の進行には個体差があり、宿主防御因子である APOBEC3 ファミリータンパク質の発現制御が病態進行の差に影響を与えることが報告されている。その真偽は明らかになっていないが、HIV は Vif を欠損した場合、末梢リンパ球細胞では増殖できないことから、APOBEC3 の発現制御あるいは Vif の機能を阻害することにより治療薬剤の開発につながるのではないかとということが想定されている。そこで、本分担研究では、APOBEC3 の発現制御あるいは Vif 依存的な分解に関する分子機序を明らかにすることにより、発現増強剤あるいは分解阻害剤 (Vif 阻害剤) を創製する学術的知見を見出すことを目的に研究をおこなう。本年度は、この目標に絡んだ2つの研究課題に取り組んだ。1) APOBEC3B の発現制御機構とその病態進行・感染伝播に対する効果について解析した。2) APOBEC3F タンパク質の Vif の結合に重要なくぼみ構造を詳細に解析した。これらの成果、特に2) の課題は、学術的な情報としてだけでなく、Vif 阻害剤などの創薬につながる標的部位の特性を明らかにでき、新たな治療戦略に直接つながる貴重な情報であると考えられる。

A. 研究目的

HIV感染症における多剤併用療法は飛躍的に改善したものの、治療の長期化が進み、今後、薬剤耐性ウイルスの出現や治療薬による副作用の問題など克服しなければならない課題に対処しなければならない。そのためには、少なくとも基礎研究レベルにおいて既存の薬に満足することなく、不断な治療薬開発は必要不可欠である。さらに、作用点が異なる新規薬剤は併用することにより既存薬 (例えば逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤) の投与量を抑えることができるため、副作用の軽減や薬剤耐性ウイルス出現のチャンスを下下させることが期待できる。そのため、作用機序が既存のメカニズムと異なる新規抗HIV薬の開発を強力に推進することは効果的で、かつ重要であると考えられる。本分担研究では、APOBEC3 の発現制御あるいはVif 依存的な分解に関する分子機序を明らかにすることにより、発現増強剤あるいは分解阻害剤 (Vif 阻害剤) を創製する学術的な糸口を見出すことを目的にする。

B. 研究方法

APOBEC3B に関する研究

当院通院中の日本人MSMでHIV-1感染者 (感染群)、およびハイリスク集団であるMSMでHIV-1陰性ボランティア(コントロール群)に協力をもとに、感染群203例 (血液) とコントロール群 207例 (口腔スワブ) のゲノムDNAを回収・抽出し、PCRにより遺伝子型を判定した。さらに、APOBEC3B 完全欠損型 (D/D: 欠失型アリルをDとした) あるいはホモ野生型 (I/I: 野生型アリルをI型とした) 由来のPBMCを調製し、*in vitro*におけるHIV-1の感染増殖実験を行った。APOBEC3 ファミリー (A、B、C、D、F、G、Hの7種)の mRNA量を定量 RT-PCR (RT-qPCR) 法

を用いて解析した。mRNA は CD4 陽 T 細胞より抽出した。mRNA の発現制御に関しては CD14+ MDM (Monocyte-derived Macrophage) 細胞に、インターフェロン α (IFN- α)をを添加することにより、発現量の変化を解析した。コントロールには beta-Actin の mRNA を用いた。

APOBEC3F の構造解析について

大腸菌発現系より野生型 APOBEC3F C 末端ドメイン(CTD: C-terminal Domain)を発現し、精製および結晶化を行った。X線結晶構造解析により構造を決定した。提唱された13残基に変異を導入した。APOBEC3F 変異体の Vif 依存的な分解は、両発現プラスミドを 293T 細胞内に導入し、Western Blot 法により細胞内 APOBEC3F 量を解析することで確認した。

(倫理面への配慮)

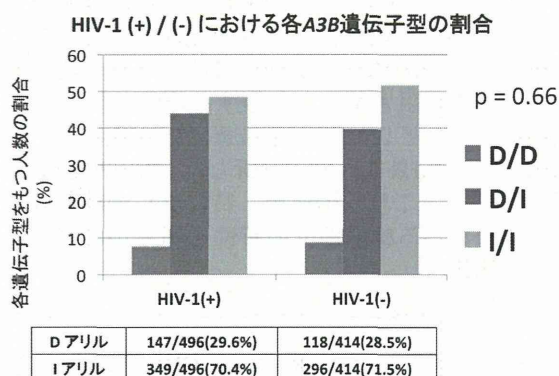
APOBEC3B の研究に関する研究では、倫理面の配慮はヘルシンキ宣言に則り、本センターの倫理委員会の承認を得た。遺伝子組換え実験に関しては「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守して行われた。本研究で使用した複製可能な組換えウイルスは大臣確認 (22受文科振第1878号) ほか、組換えDNA実験は本研究センターに機関承認 (2010-2 2012-2 ほか) され実施された。

C. 研究結果

APOBEC3B に関する研究

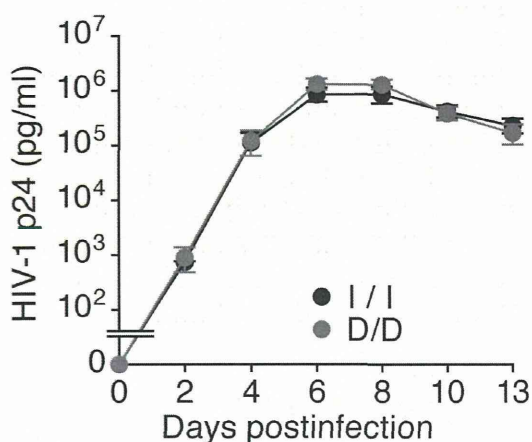
名古屋医療センター通院中の日本人 MSM で HIV-1 感染者 (感染群)、および MSM で HIV-1 陰性ボランティア(コントロール群)の協力をもとに、APOBEC3B の遺伝子型を解析した。感染群 (248例) は血液より、コントロール群 (207例)

は類粘膜よりのゲノム DNA を回収・抽出し、PCR 法により遺伝子型を判定した。その結果、感染群 (D/D 7.7%, D/I 44.0%, I/I 48.4%) とコントロール群 (D/D 8.7%, D/I 39.6%, I/I 51.7%) との間で遺伝子型の頻度に有意な差は認められなかった ($p=0.66$) (図 1)。



このことから、APOBEC3B の遺伝子型は HIV-1 感染伝播に有為な影響を与えないことが示唆された。さらに、治療開始前 CD4⁺ 細胞数および血中 HIV-1 ウイルス量 (VL) の推移についても有意差は認められず (CD4⁺: $p=0.054$; VL: $p=0.96$)、遺伝子型による病態への影響がない可能性が高いことが分かった。D/D 型あるいは I/I 型である健常者ドナーより末梢血単核球 (PBMC) を分離し、*in vitro* における HIV-1 感染増殖実験を行った結果、APOBEC3B 遺伝子型による差は認められなかった ($p=0.86$) (図 2)。

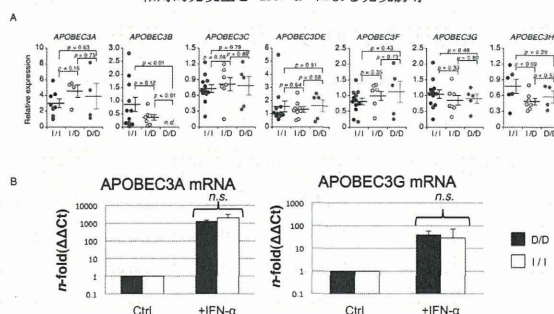
APOBEC3B 遺伝子型が異なる PBMC における HIV-1 感染増殖実験



また APOBEC3B 遺伝子欠損によって近傍の APOBEC3 ファミリーの遺伝子発現が異なっているかを検証した。その結果、他の APOBEC3

mRNA の発現量に関しては両群間 (I/I 型群, D/D 型群) で同等であった (図 3)。最後に、健常者ドナーの D/D 型あるいは I/I 型由来の単球由来マクロファージを IFN- α で刺激し、定量 PCR 法により発現誘導される APOBEC3A/G mRNA 量の変化を測定した結果、APOBEC3B 遺伝子型による誘導変化の差は認められなかった (APOBEC3A: $p=0.22$; APOBEC3G: $p=0.15$) (図 3)。以上の結果から、APOBEC3B は *in vivo* における HIV-1 の感染伝播・病態進行に影響を与えず、その遺伝子欠損の有無は重要なファクターではないことが明らかになった。

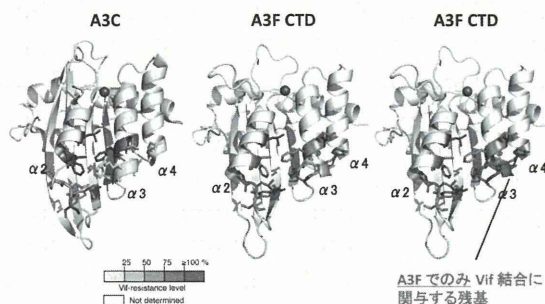
異なる APOBEC3B 遺伝子型の PBMC における APOBEC3 ファミリーの mRNA の相対的発現量と IFN- α による発現誘導



APOBEC3F の構造解析について

これまで、我々は APOBEC3C タンパク質の結晶構造を決定し、Vif 結合領域は APOBEC3C と DE、F に高度に保存されていることを報告した。しかし、最近、Bohnら (Structure. 2013) によって Vif 結合領域を含む変異型 APOBEC3F CTD の結晶構造が決定され、我々が同定した領域より拡張した Vif 結合インターフェイスが提唱された。そこで、APOBEC3F の詳細な Vif 結合インターフェイスを解明するために、野生型 (WT) APOBEC3F CTD の構造解析および Vif 結合領域の検証を行った。X 線結晶構造解析法により野生型 APOBEC3F CTD の分子構造 (2.7 Å) の決定に成功した。また、変異解析により、我々が既に報告した Vif 結合に重要な 10 残基に加えて、APOBEC3F に特有の 4 残基を同定した。

APOBEC3F (A3F) CTD と APOBEC3C (A3C) の分子構造と Vif 結合領域



これらの残基は $\alpha 2$ と 3 に囲まれる 10 残基と構造上クラスターしており、APOBEC3C と比較しごく微細に異なっていた (図 4)。一方, Bohn らによって提唱された他の領域は Vif の結合に関与しないことが明らかになった。

D. 考察

APOBEC3B と病態について

in vitro で抗 HIV 作用をもつ APOBEC3B が *in vivo* で HIV 感染伝播・病態進行に影響を与えない原因として以下 3 つが考えられる。1) 生理的な条件では APOBEC3B タンパクはウイルス粒子に取り込まれることができず抗ウイルス作用を発揮できない可能性がある。APOBEC3 ファミリータンパク質が HIV-1 感染を抑制するためにはウイルス粒子のコア内に取り込まれなくてはならない。抗 HIV-1 活性が高い APOBEC3F/G タンパク質は細胞質に局在し、ウイルスの出芽時に細胞膜上で積極的に取込まれることが知られている。一方、APOBEC3B タンパク質は核に局在し出芽の場に存在しないため、生理的な発現量ではウイルス粒子中に取り込まれないと考えられる。2) HIV が増殖する CD4 陽性細胞では HIV-1 の感染阻止に必要な APOBEC3B 量が発現していない可能性がある。APOBEC3B は B リンパ球やガン細胞に多く発現し、CD4 陽性細胞では mRNA 発現量が低いことが報告されている。これらのデータより *in vitro* における APOBEC3B の発現は過剰発現された実験系によるもので誇張された結果だと考えられる。3) D/D 型あるいは I/I 型における IFN- α 刺激後の APOBEC3A および APOBEC3G の mRNA 発現量が両遺伝子型間で同等であったことから、APOBEC3B 欠損は近傍の APOBEC3 ファミリー遺伝子の発現量に明らかな影響を与えないことがわかった。そのため、APOBEC3B 遺伝子欠損個体において HIV-1 の感染感受性に関与することが知られている APOBEC3A と APOBEC3G といった APOBEC3B 近傍の遺伝子の補償的な発現によって APOBEC3B の遺伝子型が HIV-1 の感染伝播・病態進行に影響を与えないとは考えにくい。以上のことから、APOBEC3B の抗ウイルス機構は *in vivo* において HIV-1 排除にはほとんど影響を与えないことが明らかになった。このことは、HIV-1 はウイルスの進化の過程で Vif により APOBEC3B を分解する機序を獲得しなかったという根拠にも裏付けられると考えられる。

APOBEC3F の構造解析について

Bohn らによって推定された他の領域は Vif の結合に関与しないことが分かった。また、Vif 結

合領域は APOBEC3C と APOBEC3F との間で構造学的に高度に保存されており、共通して負電荷を帯びた浅いくぼみを形成していることが明らかになった。本研究結果は、APOBEC3F を標的とした新規抗 HIV 薬の開発の一助となると期待される。

E. 結論

APBEC3B 遺伝子の完全欠失型が認められ、日本人では約 8% (ヘテロ欠失型は 44%) 存在することが分かった。さらに、MSM におけるコホート研究では、APBEC3B 遺伝子型は感染伝播 (リスク)・病態進行に有意な影響を与えないと結論づけられた。これらの結果、APBEC3B 遺伝子型の差による他の APOBEC3 遺伝子の発現制御には有為な違いは認められなかった。一方、APOBEC3F の構造解析の研究では、X 線結晶構造解析法により、APOBEC3F CTD の分子構造を決定することに成功した。さらに、APOBEC3F の Vif 結合領域を精査し、構造学的特性を明らかにした。APOBEC3F の構造学的情報から、Vif が結合する領域の“くぼみ”構造を明らかにし、阻害化合物のデザインの足場を構築したといえる。以上の結果は、学術的な情報だけでなく、Vif 阻害剤などの創薬につながる標的部位の特性を明らかにでき、新たな治療戦略に直接つながる可能性が高い。

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) Chaurasiya KR, McCauley MJ, Wang W, Qualley DF, Wu T, Kitamura S, Geertsema H, Chan DSB, Hertz A, Iwatani Y, Levin JG, Musier-Forsyth K, Rouzina I, and Williams MC. Oligomerization transforms human APOBEC3G from an efficient enzyme to a slowly dissociating nucleic acid binding protein. *Nature Chemistry*. 2014; 6:28-33.
- 2) Miyake A, Fujita M, Fujino H, Koga R, Kawamura S, Otsuka M, Ode H, Iwatani Y, Sakai Y, Doi N, Nomaguchi N, Adachi A, and Miyazaki Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. *Journal of General Virology*. 2013; 95:179-189.
- 3) Tu E, Swenson LC, Land S, Pett S, Emery S, Marks K, Kelleher AD, Kaye S, Kaiser R, Schuelter E, Harrigan R on behalf of the MARCH Laboratory Group and the MARCH Study Group. Results of external quality assessment for proviral DNA testing of HIV tropism in the Maraviroc Switch collaborative study. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013; 51: 2063-2071.

- 4) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, and Akari H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology*. 2013; 94: 1318-1324.
- 5) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, and Adachi A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *Journal of Virology*. 2013; 87: 11447-11461.
- 6) 北村紳悟, 岩谷靖雅. HIV アクセサリータンパク質の機能. ウイルス (2013). 63; p187-198
- 7) 岩谷靖雅, 渡邊信久. 新規抗 HIV 薬の開発に向けて. 新分子・新材料によるメディカルエンジニアリング. 印刷中.
2. 学会発表
国際学会
- 1) Iwatani Y. HIV-1 Invalidates Antiviral System of Cellular APOBEC3 Cytidine Deaminases. The 7th Asian Pacific Organization of Cell Biology Congress. Singapore, February 24-27 2014.
- 2) Kitamura S, Ode H, Nakashima M, Imahashi M, Naganawa Y, Kurosawa T, Yokomaku Y, Yamane T, Watanabe N, Suzuki A, Sugiura W, and Iwatani Y. The crystal structure of APOBEC3C including HIV-1 Vif-binding interface. 4th International Symposium on Diffraction Structural Biology. Nagoya, Japan, May 26-29 2013.
- 3) Imahashi M, Izumi T, Imamura J, Matsuoka K, Koyanagi Y, Takaori-Kondo A, Yokomaku Y, Naoe T, Sugiura W, Iwatani Y. A population-based matched-cohort study on insertion/deletion polymorphism of the APOBEC3B gene and risk of HIV-1. 7th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Kuala Lumpur, Malaysia, June 30 - July 3, 2013.
- 4) Kitamura S, Ode H, Nakashima M, Imahashi M, Naganawa Y, Kurosawa T, Yokomaku Y, Yamane T, Watanabe N, Suzuki A, Sugiura W, & Iwatani Y. Crystal structure of human APOBEC3C and HIV-1 Vif-binding interface American Crystallographic Association Annual Meeting Hawaii, USA, July 20-24 2013.
- おける HIV-1 Vif 結合インターフェイスの構造比較 第13回日本蛋白質科学会年会 鳥取 2013年6月12-14日
- 2) Iwatani Y. Structural features of HIV-1 Vif-binding Interface on antiviral APOBEC3 proteins. The 14th KUMAMOTO AIDS Seminar 熊本 2013年10月29-31日
- 3) 今橋真弓, 泉泰輔, 渡邊大, 今村淳治, 松岡和弘, 佐藤桂, 金子典代, 市川誠一, 小柳義夫, 高折晃史, 内海眞, 横幕能行, 白阪琢磨, 直江知樹, 岩谷靖雅, 杉浦互 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67回国立病院総合医学会金沢 2013年11月8-9日
- 4) 今橋真弓, 泉泰輔, 渡邊大, 今村淳治, 松岡和弘, 正岡崇志, 佐藤桂, 金子典代, 市川誠一, 小柳義夫, 高折晃史, 内海眞, 横幕能行, 白阪琢磨, 直江知樹, 杉浦互, 岩谷靖雅 宿主防御因子 APOBEC3B の遺伝子欠損による HIV-1 感染伝播・病勢への影響に関する研究 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸 2013年11月10-12日
- 5) 北村紳悟, 中島雅晶, 黒沢哲平, 大出裕高, 河村高志, 今橋真弓, 長縄由里子, 真野由有, 横幕能行, 渡邊信久, 杉浦互, 岩谷靖雅 抗 HIV-1 宿主因子 APOBEC3F の Vif 結合領域に関する構造学的解析 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸 2013年11月10-12日
- 6) 中島雅晶, 北村紳悟, 黒澤哲平, 大出裕高, 河村高志, 今橋真弓, 長縄由里子, 真野由有, 横幕能行, 渡邊信久, 杉浦互, 岩谷靖雅 APOBEC3F C 末端側ドメインの構造解析と HIV-1 Vif 結合インターフェイス 第27回日本エイズ学会学術集会・総会 熊本 2013年11月20-22日
- 7) 岩谷靖雅 Vif/APOBEC3 を標的とする治療薬開発の戦略 (Vif) 第27回日本エイズ学会学術集会・総会 熊本 2013年11月20-22日
- 8) 中島雅晶, 北村紳悟, 黒沢哲平, 大出裕高, 河村高志, 真野由有, 今橋真弓, 長縄由里子, 横幕能行, 渡邊信久, 杉浦互, 岩谷靖雅 APOBEC3F タンパク質上の HIV-1 Vif 結合領域の同定と構造学的解析 第36回日本分子生物学会 神戸 2013年12月3-6日

国内学会

- 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, 山根隆, 渡邊信久, 鈴木淳巨, 杉浦互, 岩谷靖雅 ヒト抗レトロウイルス因子 APOBEC3 ファミリー間に