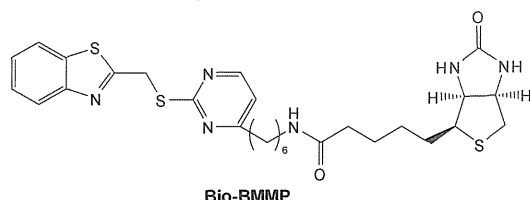


C. 研究結果

(1) BMMPの作用機序を明らかにするためにビオチン化BMMP (Bio-BMMP) の合成を行った。すなわちN-(5-プロモペンチル)フタルイミドを出発原料とし、9段階、総収率10%でBio-BMMPを合成した。化合物の構造は、NMR、Massスペクトルなどにより確かめた。



(2) ビオチンメチルエステル (市販) は 20 μ M で抗 HIV-1 活性を全く示さなかった。それに対して、20 μ M の BMMP、Bio-BMMP、ピリミジン環の 4 位に 6-アミノヘキシル基を持つ BMMP (Bio-BMMP 構造の左側の部分) は、ほぼ似た抗 HIV-1 活性を持っていた。このように、Bio-BMMP においても抗 HIV-1 活性は保持され、その活性発現はビオチン部位によるものでなく、BMMP 部位によるものであることが示された。Bio-BMMP のビオチンの導入部位は間違っていなかったと言える。

(3) Bio-BMMP を BIACORE のセンサーチップに固定化し、CA 蛋白質との相互作用の検出を試みたが、相互作用は観察されなかった。この際、還元剤存在下で検出を試みたのであるが、酸化状態においては相互作用が見られる可能性もあり、現在調べている。

(4) BMMPの誘導体を8種類合成した。すなわち、ピリミジン環のメチル基を持たないもの、5位にメチル基を持つもの、4,6-位にジメチル基を持つもの、4位にトリフルオロメチル基、ヒドロキシル基、メトキシ基、アミノ基を持つものを合成した。また、ベンゾチアゾール環の6位にメチル基を持つものも合成した。化合物の構造は、NMR、Massスペクトルなどにより確かめた。

(5) (4)で合成したもののうち、ピリミジン環のメチル基を持たないものと4,6-位にジメチル基を持つものについては既に抗 HIV-1 活性を調べた。その結果、メチル基を持たないものは全く活性を示さず、4,6-位にジメチル基を持つものは活性が弱いことがわかった。

(6) 別のプロジェクトで、SN-2 が還元されて生じたジチオール化合物 (SN-1) が TRAF6 蛋白質の亜鉛フィンガー部位に結合し、構造が変化してユ

ビキチン化を受けづらくなる、ということを示した。APOBEC3G も亜鉛フィンガー蛋白質であるため、SN-2 は同じように作用していることが予想され、現在調べている。

(7) (6)で予想している作用機序を明らかにするため、ビオチン化 SN-2 の合成を現在進めている。

(8) GGA の誘導体である GGOH (アセトン部位がヒドロキシル基に変わったもの) を購入し、GGOMe (アセトン部位がメトキシ基に変わったもの) を合成した。化合物の構造は、NMR、Massスペクトルなどにより確かめた。

D. 考察

(1) Bio-BMMPを用いたBIACORE実験は今後も進め、CA蛋白質と相互作用するのか明らかにしたい。また、Bio-BMMPを使ってプロテオミクスの実験を行い、標的蛋白質を同定することも行う予定である。今後も引き続き、BMMPの構造活性相関的研究により活性向上を目指しながら、作用機序の解明を目指したい。その後、明らかにした作用機序に基づいて、できるだけ合理的に化合物の最適化を進めていきたいと考えている。

(2) SN-2の作用機序の解明を、引き続き進めたい。その後、選択的で強い活性を持つように、できるだけ合理的に構造を改変したい。

(3) GGAの誘導体の合成を引き続き進めたい。またGGAがどのようにHSP70蛋白質を誘導するかについては不明の点が多いため、その作用機序の解明も目指していきたい。その後、明らかにした作用機序に基づいて、できるだけ合理的に化合物の最適化を進めていきたいと考えている。

E. 結論

TRIM5 α の擬似化合物BMMPの作用機序解明のためのツールであるBio-BMMPを創ることができた。また、種々のBMMP誘導体の合成にも成功している。APOBEC3G分解抑制剤SN-2に関しては、作用機序に関わる知見を得た。また、APOBEC3Gを分解抑制することが期待されるGGAの誘導体も合成した。今後もこれらの研究を続け、優れた抗ウイルス宿主因子を擬似・制御する低分子化合物を創り出したい。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ashizawa, T., Miyata, H., Iizuka, A., Komiyama, M., 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* 43:219-27, 2013.

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* 95:179-89, 2014.

2. 学会発表等

1) Anraku, K., Tateishi, H., Fujita, M., Morii, T., Mori, Y., Okamoto, Y., Otsuka, M. Inositol phosphates in calcium signaling and HIV replication: Design, synthesis and functional analysis. (Plenary Lecture by M. Otsuka) Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft, Annual Meeting, 2013年10月11日

2) 山本充奈美、野間口雅子、古賀涼子、岩谷靖雅、高宗暢暁、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

3) 高宗暢暁、山本充奈美、原田圭輔、藤田美歌子、大塚雅巳、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾：HIV アクセサリータンパク質 Nef 翻訳に重要な Nef2 mRNA の 5'非翻訳領域。第 61 回日本ウイルス学会学術集会。2013 年 11 月 10 日

4) 藤野悠那、古賀涼子、大塚雅巳、藤田美歌子：HIV-2 Vpx 蛋白質の多量化の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会。2013 年 11 月 10 日

5) 立石大、安楽健作、古賀涼子、岡本良成、藤田美歌子、大塚雅巳：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の合成と評価。第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム。2013 年 11 月 20 日

6) 古賀涼子、江島智彦、金丸陽亮、田口祐、柴田佑里、井上純一郎、大塚雅巳、藤田美歌子：NF- κ B シグナル伝達分子に対する亜鉛フィンガー蛋白質阻害剤の作用。第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム。2013 年 11 月 21 日

7) 加茂真宏、岡本良成、大塚雅巳、藤田美歌子：ウイルスコアの脱殻過程における作用を目指した新規抗 HIV 薬の創製。第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム。2013 年 11 月 21 日

8) 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

9) 高宗暢暁、山本充奈美、原田圭輔、藤田美歌子、大塚雅巳、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾：Nef2 mRNA の 5'非翻訳領域に含まれる Nef 翻訳に重要な cis 領域。第 27 回日本エイズ学会学術集会。2013 年 11 月 20 日

10) 加茂真宏、岡本良成、大塚雅巳、藤田美歌子：ウイルスコアの脱殻過程における作用を目指した新規抗 HIV 薬の創製。第 30 回日本薬学会九州支部大会。2013 年 12 月 7 日

11) 古賀涼子、江島智彦、金丸陽亮、田口祐、柴田佑里、井上純一郎、大塚雅巳、藤田美歌子：NF- κ B シグナル伝達分子に対する亜鉛フィンガー蛋白質阻害剤の作用。第 30 回日本薬学会九州支部大会。2013 年 12 月 7 日

12) 井田智弓、岡本良成、藤田美歌子、黒崎博雅、大塚雅巳：ペプチド性 DNA 切断分子の設計と合成。第 30 回日本薬学会九州支部大会。2013 年 12 月 8 日

13) 立石大、安楽健作、古賀涼子、岡本良成、藤田美歌子、大塚雅巳：HIV-1 Gag のイノシトールリン脂質結合部位を標的とした膜移行阻害剤の合成。日本薬学会第 134 年会。2014 年 3 月 28 日(予定)

14) 加茂真宏、岡本良成、大塚雅巳、藤田美歌子：ウイルスコアの脱殻促進を目指した新規抗 HIV 薬の創製。日本薬学会第 134 年会。2014 年 3 月 29 日(予定)

15) 田中亜友美、岡本良成、藤田美歌子、梅澤一夫、玉野井冬彦、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指した亜鉛キレーター設計及び合成。日本薬学会第 134 年会。2014 年 3 月 29 日(予定)

16) 古賀涼子、江島智彦、金丸陽亮、田口祐、柴田佑里、井上純一郎、大塚雅巳、藤田美歌子：亜

鉛フィンガー蛋白質阻害剤による NF- κ B 活性化
阻害とそのメカニズムの検討日本薬学会第 134
年会. 2014 年 3 月 30 日(予定)

分担研究課題： 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

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： 多田 卓哉（国立感染症研究所感染病理部 協力研究員）

研究要旨

RING フィンガー型 E3 ユビキチンリガーゼである MARCH8 は MHC-II や CD86 等、種々の膜蛋白をダウンレギュレートする宿主膜蛋白である。我々は今回作製した MARCH8 発現レンチベクターが全くトランスダクション能を持たないことに着目して本宿主因子の抗 HIV-1 活性を検証することとした。まず MARCH8 が樹状細胞やマクロファージにおいて高発現していることを明らかにした。HIV-1 感染抑制において MARCH8 は複製後期に影響を与えず複製前期をブロックしていることを見出した。MARCH8 の変異体解析により RING-CH ドメイン及び C 末側アミノ酸 237-242 番目が抗 HIV-1 活性に重要な領域であることが分かった。経時的な逆転写産物コピー数の測定により MARCH8 はおそらく HIV-1 のエントリーを阻害していると考えられた。更に MARCH8 ノックダウン細胞から産生された HIV-1 の感染性が著明に上昇することを見出した。これらの結果より、MARCH8 は HIV-1 感染を阻害する新規抗ウイルス宿主因子であることが明らかとなった。

A. 研究目的

MARCH 蛋白質ファミリーは RING フィンガー型 E3 ユビキチンリガーゼ活性を有し、これまでヒトで 11 種類が同定されている。MARCH ファミリーのひとつ MARCH8 は MHC-II、CD86、TRAIL receptor 1、CD98 等の膜蛋白をダウンレギュレートする機能を有することが近年報告されている。我々は先頃 MARCH8 がトランスフェリンレセプターをダウンレギュレートすること、更にそれは MARCH8 によるトランスフェリンレセプターのユビキチン化とその後のライソゾーム分解によるものであることを報告した (J. Cell Sci. 126:2798-2809, 2013)。この機能解析を行う過程において、MARCH8 発現レンチベクターを作製したところ、その感染効率が極めて低いことを見出した。本研究では MARCH8 が HIV-1 の感染を阻害する可能性を検証し、更に MARCH8 による HIV-1 複製抑制の分子機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 発現プラスミド DNA の構築

以前作製した MARCH8 哺乳類発現ベクターを鋳型にして増幅した MARCH8 の PCR 増幅断片を pWPI レンチベクターに挿入して MARCH8 発現レンチベクターを構築した。また pLVTHM ノックダウンレンチベクターに MARCH8 の標的配列を挿入して MARCH8 shRNA 発現レンチ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 シークエンサーにより確認した。

2. レンチウイルスによる MARCH8 のトランスダクション及びフローサイトメトリー

GFP を同時発現する MARCH8 発現レンチベクターとパッケージングベクター及び水泡性口炎ウイルス G 蛋白 (VSV-G) 発現ベクターをヒト胎児腎細胞 293T 細胞へコトランスフェクションした。48 時間後に回収した培養上清を新たに用意した 293T 細胞に添加して培養した。48 時間後に CyFlow を用いたフローサイトメトリーにより GFP 発現を定量化した。

3. リアルタイム RT-PCR 実験

MARCH8 mRNA の内在性発現レベルを細胞別に調べるため、種々の細胞株や末梢血リンパ球、マクロファージ、樹状細胞からトータル 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を用いてリアルタイム RT-PCR を行い、標準曲線の直線性を確認した後、各検体における各遺伝子の発現レベルを定量化した。

4. ウイルス産生/感染実験

VSV-G または HIV-1 エンベロープ発現ベクターと Env 変異型ルシフェラーゼレポーター HIV-1 プロウイルス DNA を、MARCH8 哺乳類発現ベクター (野生型及び変異体) または空ベクターと共にコトランスフェクションして、293T 細胞へコトランスフェクションした。48 時間後に上清中の p24 量を測定してウイルスの産生性を検討した。

更に 48 時間後に細胞溶解液を調製した。それを用いてルシフェラーゼ活性を測定して感染性を検討した。

5. 遺伝子サイレンシング実験

MARCH8 shRNA (またはコントロール shRNA) 発現レンチベクター、パッケージングベクター及び 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 p24 量を定量した。ヒト肝臓癌細胞株 HepG2 に shRNA レンチベクターを導入した。MARCH8 をノックダウンした HepG2 細胞から産生された HIV-1 を、MAGIC5 インディケーター細胞に感染させ、 β -gal アッセイを行うことにより、ウイルスの感染効率を定量した。

6. 逆転写産物の定量実験

MARCH8 の有無により産生された HIV-1 を 293T 細胞に感染させて、経時的 (4、8、24、48 時間後) にサンプリングした細胞から DNA を抽出し、それを用いたリアルタイム PCR により、初期逆転写産物・後期逆転写産物・2-LTR (核移行 DNA) のコピー数を定量した。

[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 25 年 9 月 13 日付け承認番号・機 25-53 により、また大臣確認 (大臣確認通知番号: 平成 25 年 4 月 12 日付 24 受文科振第 3049 号および平成 25 年 9 月 20 日付 25 受文科振第 1849 号) 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. MARCH8 の細胞種別発現プロファイル

各種細胞株及び初代培養細胞から抽出したトータル RNA を用いてリアルタイム RT-PCR により、MARCH8 の発現プロファイルについて検討した。その結果、細胞株においては中程度の発現レベルを示すものが多いのに対し、樹状細胞あるいは (由来するドナーによっては) マクロファージにおいて MARCH8 が非常に高いレベルで発現していることが明らかになった。

2. MARCH8 発現レンチベクターのトランスダクション能の欠如

トランスフェリンレセプターが MARCH8 によりダウンレギュレートされることを報告 (J. Cell Sci. 126:2798-809, 2013) した際に、レンチベクターによる MARCH8 の安定発現細胞株の樹立を試みた。しかし全く安定発現細胞株が得られない為、

トランスダクション効率をフローサイトメトリーで検討したところ、MARCH8 発現レンチベクターの感染が殆ど成立しないことが明らかになった (図 1)。

3. MARCH8 発現による HIV-1 感染抑制

トランスフェクション後の HIV-1 粒子産生量に MARCH8 の発現は影響せず、むしろ産生されたウイルスの感染性に影響を与える事が分かった。従ってこの蛋白質が HIV-1 の複製前期段階を抑える新規抗ウイルス宿主因子である可能性が示唆された。また MARCH8 の抗ウイルス活性はエンベロープの種類に依らないこと、また宿主膜蛋白である BST-2/tetherin を不活化する HIV-1 アクセサリー蛋白 Vpu には影響を受けないことが分かった。

4. 抗 HIV-1 活性における MARCH ファミリー間の比較及び MARCH8 の責任領域の同定

他の MARCH ファミリーメンバーについて MARCH8 と同様に抗ウイルス活性を有しているか否かを見当した結果、MARCH3 では抗ウイルス活性が認められず、MARCH8 と同じ系統樹グループに属する MARCH1 は partial な活性を示し、最も強い抗ウイルス活性を示したのは MARCH8 であった。また MARCH8 の変異体解析により、N 末端側の細胞質内領域に存在する RING-CH ドメイン及び C 末端側の細胞質内領域の 237-242 番目のアミノ酸が重要であることが明らかになった。

5. MARCH8 による HIV-1 複製前期の抑制

ウイルス複製のどの過程で MARCH8 による抑制効果が認められるのかについて検討するため、MARCH8 発現細胞または対照細胞から産生された HIV-1 を感染させた細胞より継時的に抽出した DNA を用いて、初期及び後期逆転写産物または 2-LTR コピー数をリアルタイム PCR により検討した。その結果、初期逆転写において既に MARCH8 の抑制効果が認められたことから、MARCH8 はエントリーの段階で HIV-1 感染を抑制している可能性が考えられた。

6. MARCH8 による HIV-1 複製前期の抑制

上記の一連の実験においては、MARCH8 の抗ウイルス活性は、全て過剰発現実験系で行われたため、HepG2 細胞における MARCH8 の遺伝子サイレンシング実験を試みた。その結果、MARCH8 ノックダウン細胞から産生された HIV-1 の感染性が著明に上昇したことから、内在的な発現レベ

ルにおいて MARCH8 は十分な抗ウイルス活性を示すことが確認できた。

D. 考察

宿主膜蛋白 MARCH8 の抗ウイルス活性の研究は、この蛋白の細胞生物学的な解析を行う過程において作製した MARCH8 発現レンチベクターのトランスダクションが全く成立しなかったことが契機となった。本研究の一連の実験結果において、MARCH8 が樹状細胞およびマクロファージにおける強力な抗ウイルス宿主因子として機能している可能性が示唆された。今後、HIV-1 感染阻害活性における MARCH8 の作用点及びその分子機構について詳細に検討する必要がある。現在、我々はウイルスのエントリー効率の確実な評価を行うために、MARCH8 存在/非存在下で β -lactamase 融合型 Vpr を取り込ませた HIV-1 を用いた β -lactamase アッセイを行っている。また MARCH8 発現細胞から産生された HIV-1 の超遠心ペレットを用いたウエスタンブロットまたは ELISA 法により、HIV-1 ウイルス粒子へのエンベロープの取り込み効率も調べる予定である。更に MARCH8 と HIV-1 エンベロープとの間で相互作用が認められるか否かについて、両者の変異体（後者ではエンベロープに共通のモチーフを標的）を作製し、それらを用いた間接蛍光抗体法または FRET 法により検討する。同時に、既に立体構造が明らかになっている HIV-1 gp41 の細胞内領域と MARCH8 の RING-CH ドメインとのドッキングシミュレーションを行うことにしている。

E. 結論

- 1) MARCH8 発現レンチベクターはトランスダクション能が無かったことから、MARCH8 が抗ウイルス宿主因子である可能性が考えられた。
- 2) MARCH8 の mRNA 発現は、樹状細胞およびマクロファージで特に高いレベルを示した。
- 3) ウイルス産生細胞で MARCH8 を発現させた場合、複製後期（ウイルス産生量）に影響を与えず、複製前期（ウイルス感染性）をブロックすることが明らかになった。
- 4) 変異体解析により MARCH8 の N 末側にある RING-CH ドメイン及び C 末側アミノ酸 237-242 番目が HIV-1 感染抑制に重要であることが分かった。
- 5) 逆転写産物のコピー数を経時的に比較検討し

た結果、MARCH8 はおそらく HIV-1 のエントリーを阻害していると考えられた。

6) 上記の過剰発現実験系に矛盾せず、遺伝子サイレンシング実験においても MARCH8 の HIV-1 抑制能を確認することができた。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) 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.
- 2) 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 Infect.* 15:280-290, 2013.
- 3) 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. *J. Cell Sci.* 126:2798-2809, 2013.
- 4) 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. *Front. Microbiol.* 4:377, 2013.
- 5) 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.

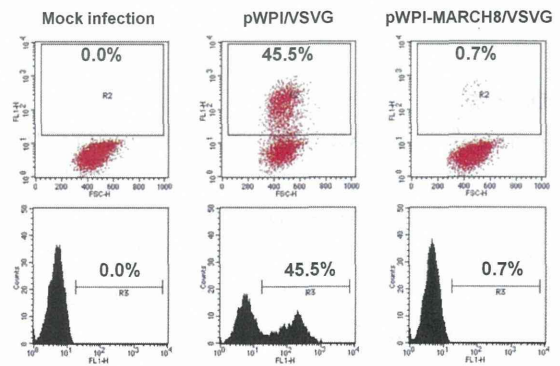
学会発表

- 1) Fujita, H., Iwabu, Y., Tokunaga, K., Tanaka, Y.: MARCH8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. The 35th Naito Conference: "The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles", Sapporo, Japan, 2013.7.
- 2) Koyama, T., Tada, T., Fujita, H., Tokunaga, K.:

Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 protein inhibits HIV-1 infection. *Frontiers of Retrovirology Conference 2013*, Cambridge, UK, 2013. 9.

- 3) 小山貴芳、多田卓哉、藤田英明、徳永研三：新規宿主因子 MARCH8 は HIV-1 感染を抑制する。第 61 回日本ウイルス学会総会（神戸）2013. 11.
- 4) 張延昭、小山貴芳、多田卓哉、山岡昇司、徳永研三：SAMHD1 非依存的な HIV-1 複製阻害に関与する IFN 誘導性抗ウイルス宿主因子の探索。第 61 回日本ウイルス学会総会（神戸）2013. 11.
- 5) Juan F Arias、小山貴芳、岩部幸枝、横山勝、佐藤裕徳、徳永研三：APOBEC3G の二量体化は LINE-1 転移抑制に重要である。第 61 回日本ウイルス学会総会（神戸）2013. 11.
- 6) 亀岡正典、Piraporn Utachee、Panada Isarangkura-na-ayuthaya、徳永研三、生田和良、武田直和：HIV-1 CRF01_AE 株が gp120 CD4 結合部位を認識する単クローン抗体に対して中和抵抗性を示す分子機構。第 61 回日本ウイルス学会総会（神戸）2013. 11.
- 7) 大久保麻佳、植崎彩香、萩森政頼、山口泰史、藤井佑樹、藤原俊幸、徳永研三、藤田英明：亜鉛輸送体 ZIP14 の細胞内輸送および機能発現制御に関する基礎的解析。第 30 回日本薬学会九州支部大会（長崎）2013. 12.
- 8) 小山貴芳、多田卓哉、藤田英明、徳永研三：膜貫通蛋白 MARCH8 による HIV-1 感染阻害。第 36 回日本分子生物学会（神戸）2013. 12.
- 9) Koyama, T, Arias, J.F., Iwabu, Y., Yokoyama, M., Fujita, H., Sato, H., and Tokunaga, K. APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of Alu and LINE-1 retrotransposition. *Keystone Symposia "Mobile Genetic Elements and Genome Evolution"*, Santa Fe, USA, 2014.3.

[図 1]



分担研究課題：TRIM5 α 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 α は強い抗 HIV-1 作用を示すが、ヒトの TRIM5 α の抗 HIV-1 作用は強くない。一方でヒト TRIM5 α 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 α の抗ウイルス活性の種特異性は、TRIM5 α 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 α 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 α 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、ヒト TRIM5 α の抗 HIV-1 作用を増強し得る低分子化合物のスクリーニングを初年度より行っているが、初年度に 3000 化合物のライブラリーから出発して、現在 3 つの候補化合物部に絞り込まれた。

また 2014 年の 10 月に分裂しないマクロファージでインターフェロンにより誘導され HIV-1 感染を阻害することが報告された MX2 について検討し、盛んに分裂する T 細胞においても強い抗ウイルス効果を発揮することを明らかとした。この結果から、MX2 の発現あるいは作用を増強させることがエイズの新たな治療戦略として成り立ち得ることが示された。

A. 研究目的

1. TRIM5 α の効果を増強する低分子化合物の探索

TRIM5 α はアカゲザルの抗HIV1型 (HIV-1) 因子として2004年に同定された。レトロウイルスに対する自然免疫を担う重要な因子であるが、そのウイルス感染阻害の分子機構は明らかにされていない。今のところ、TRIM5 α は細胞質内に存在し、侵入してきたウイルスのカプシドを認識してコアを破壊することにより、感染を阻害すると考えられている。アカゲザル、カニクイザルのTRIM5 α は強い抗HIV-1作用を示すが、ヒトのTRIM5 α の抗HIV-1作用は強くない、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 α 感受性が異なり、カプシド蛋白質120番目のアミノ酸がプロリンなら感受性、グルタミン、アラニンあるいはグリシンなら耐性を示し、ヒトTRIM5 α に対してはHIV-1よりも感受性を示す。また、ヒトTRIM5 α 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。

弱い抗HIV-1活性しか持たないヒトTRIM5 α 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 α 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、昨年度3000化合物のライブラリーから16種類の候補化合物を得た。本年度は候補化合物の絞り込みを行った。

2. MX2タンパク質の抗ウイルス作用の検討

2013年10月24日に、Natureに2つの論文が掲載された (Gorjon, et al. Nature 502:559-562, 2013、Kane, et al. Nature 502:563-566, 2013)。どちらもマクロファージにおいてインターフェロンにより発現が誘導されるMX2がHIVの感染を阻害すること発見したというものだったが、Gorjonらは、抗ウイルス活性はHIV-2およびサル免疫不全ウイルス (SIV) に対しては見られないと報告したのに対して、KaneらはHIV-2やSIVに対してもMX2は抗ウイルス活性を示すことを報告した。しかし、いずれの報告でも、HIV-1のカプシドのサイクロフィリンA結合領域の変異によりMX2の抗ウイルス活性からHIV-1が逃避できることが示された。従って、MX2の抗ウイルス作用には、サイクロフィリンAやTRIM5 α 等の他の宿主因子の関与が予想される。本研究ではカプシド配列の異なるウイルスに対するMX2タンパク質の抗ウイルス活性を改めて検討し、脱殻過程の詳細解明の糸口を探るとともに、分裂しないマクロファージでHIV-1感染を阻害するMX2がエイズの新たな治療戦略の標的と成り得るか否かを明らかに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 α 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 α を過剰発現させたヒト CD4 陽性 T 細胞株 MT4 (3×10^4 個) に、Analyticom 社の低分子化合物を 2.5 μ 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フィリン 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、Green Fluorescence Protein (GFP) 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、GFP 陽性細胞数を FACS にて測定した。また、NL43 株を同様に感染させ、3 日後の培養上清中の p24 抗原量を ELISA にて測定した。

2. MX2タンパク質の抗ウイルス作用の測定

ヒトMX2タンパク質を発現するセンダイウイルスベクターを構築し、ヒトCD4陽性MT4細胞に感染させ、MX2過剰発現細胞におけるHIV-1、HIV-2、SIVの増殖を、培養上清中のカプシド抗原量をELISAにて測定して検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験は「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、大臣確認および機関承認を得て行った。

C. 研究結果

1. 低分子化合物の抗HIV-1活性に及ぼす影響

昨年度、ルシフェラーゼ活性を指標に選んだ候補化合物の多くは、GFP陽性細胞数を指標にした single round assayでも、ウイルス増殖そのものを指標にした multiple replication assay (図1)でも、抗ウイルス活性を示すことはなかった。強いウイルス増殖抑制効果を示した化合物は3つのみであった。これらの化合物は培養1日目の細胞増殖試験 (MTT assay) では細胞増殖への影響は見られなかった。

2. MX2タンパク質の抗ウイルス作用の測定

図2に示すように、センダイウイルスベクターで発現させたMX2タンパク質はHIV-1(NL43株のvifをSIVmac239のものと同置換したプロトタイプのサル指向性HIV-1mt)の増殖を感染後3日目で99.8%抑制し、極めて強い抗HIV-1活性をMX2タンパク質が持っていることが確認された。HIV-2(GH123株)およびSIVmac239に対する感染抑制効果は95%ほどで、抗HIV-1効果ほどではないが十分な抗ウイルス効果があった。カプシドのN末端から数えて4番目と5番目の α ヘリックスの間のループ(L4/5)はサイクロフィリンAとの結合部位で、TRIM5 α の感受性や、脱殻速度に関与することを我々はこれまでに示してきた。NL43株のL4/5をSIVmac239のものと同置換したNL4/5vifSはサイクロフィリンAとの結合性を失い、サルTRIMCypを回避することのできるHIV-1mtであるが、MX2による感染抑制効果はサイクロフィリンAが結合しないHIV-2やSIVと同様の94%であった。

D. 考察

1. 低分子化合物の抗HIV-1活性に及ぼす影響

残念ながら、ルシフェラーゼ活性を指標に選んだ候補化合物の多くは、HIV-1の増殖そのものに抑制効果を発揮しているのではなく、ルシフェラーゼ活性を阻害しているものがほとんどであった。一方で、強いウイルス増殖抑制効果を見せる化合物も3つあった。これらの化合物は培養1日目の細胞増殖試験 (MTT assay) では細胞増殖への影響は見られなかったが、3日から6日の培養で、細胞傷害性が見られた。現在の実験系で用いている化合物の濃度は2.5 μ Mと、やや濃い濃度で作用させている。今後は感染阻止と細胞傷害性の乖離が見られる濃度での測定が必要である。また、細胞傷害性の強い化合物は、これまでの実験系では抗ウイルス効果を検討できていない。In vitroでTRIM5 α とカプシドの結合を測定できる系の構築が必要である。

2. MX2タンパク質の抗ウイルス作用の測定

MX2タンパク質はマクロファージの中で作用する因子として同定されたが、過剰発現させれば盛んに分裂するT細胞においても強い抗ウイルス効果を発揮することが明らかとなった。従って、MX2の発現あるいは作用を増強させることがエイズの新たな治療戦略として成り立ち得ることが示された。サイクロフィリンAと結合するHIV-1に対する抗ウイルス作用のほうが、結合しないHIV-1mt, HIV-2, SIVよりも強く見られることから、MX2の抗ウイルス作用にはサイクロフィリンAが関わっている、あるいは、MX2とL4/5が直接相互作用している可能性が示唆される。今後は、カプシドとMX2、MX2とサイクロフィリンAの結合を中心に、MX2の抗ウイルス効果のメカニズムを解析していく予定である。また、TRIM5 α とも相互作用し得るか否かも検討していく予定にしている。

E. 結論

初年度に3000化合物のライブラリーから出発したヒトTRIM5 α の抗HIV-1作用のモジュレーター探索は3つの候補化合物に絞り込まれた。

分裂しないマクロファージで HIV-1 感染を阻害する MX2 が盛んに分裂する T 細胞においても強い抗ウイルス効果を発揮することが明らかとなり、MX2 の発現あるいは作用を増強させることがエイズの新たな治療戦略として成り立ち得ることが示された。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taya K, Nakayama EE, 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 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, 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 AE, Hope TJ, Nakayama EE, 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 EE, 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* 94:1318-24, 2013.
- 5) 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 and Infection* 15:319-28, 2013.
- 6) Nakayama EE, Nakajima T, Kaur G, Mimaya JI, Terunuma H, Mehra N, Kimura A, 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* 29:919-24, 2013.

2. 学会発表等

- 1) Akatsuki Saito, Emi E. Nakayama, Tatu Shioda, Tomoyuki Yoshida, Atsunori Higashio, Saori Suzuki, Yoshi Kawaoka, Hirofumi Akari. Diversity of antiretroviral host factor TRIM5 gene in macaque monkeys. *Retroviruses* 2013, 2013年5月20日-25日、Cold Spring Harbor, NY
- 2) Ken Kono, Eri Takeda, Hiromi Tsutui, Ayumu Kuroishi, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, Emi

E. Nakayama, Tatsu Shioda. Slower uncoating has a deleterious effect on replication of the simian-tropic HIV-1. *Retroviruses* 2013, 2013年5月20日-25日、Cold Spring Harbor, NY

- 3) Eri Takeda, Ken Kono, Hiromi Tsutsui, Ayumu Kuroishi, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, Emi E Nakayama, Tatsu Shioda: Slower uncoating is associated with impaired replicative capability of simian-tropic HIV-1. 第12回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 2013年9月10-13日、淡路島
- 4) Kahoru Taya, Emi E Nakayama, Shioda Tatsu: Moderate restriction of macrophage tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages. 第12回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 2013年9月10-13日、淡路島
- 5) 武田英里、河野健、Hulme Amy E.、Hope Thomas J.、中山英美、塩田達雄：可視化ウイルスをつかったHIV-2カプシドコアの脱核速度測定法の確立。第61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月10-12日、神戸
- 6) 田谷かほる、中山英美、塩田達雄：マクロファージ指向性 HIV-1も、マクロファージおよび単球において SAMHD1 による増殖抑制を受けている。第27回日本エイズ学会学術集会 2013年11月20-22日、熊本

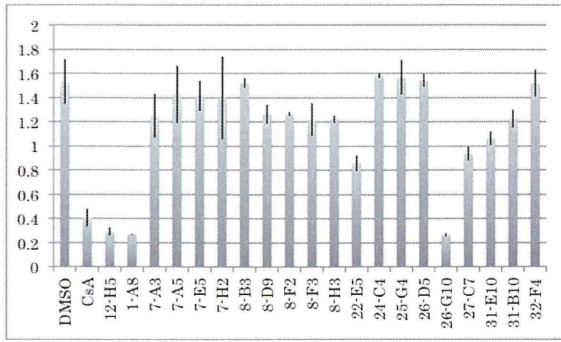


図1. ヒトTRIM5 α 発現センダイウイルス感染細胞における低分子化合物の影響。縦軸は3日目の培養上清のカプシド抗原ELISAの値(OD450)。DMSOは溶媒のみの場合、CsAはサイクロスポリン添加の場合を示す。

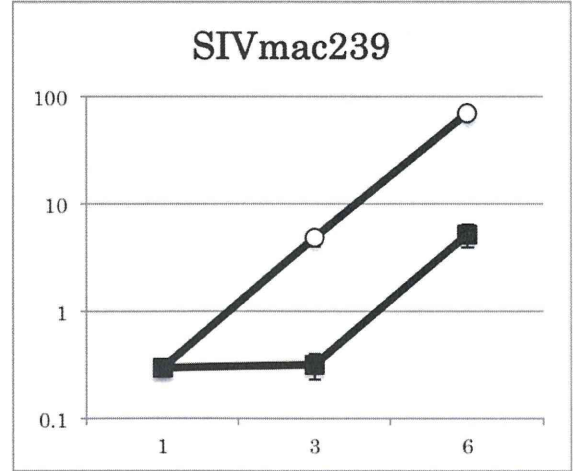
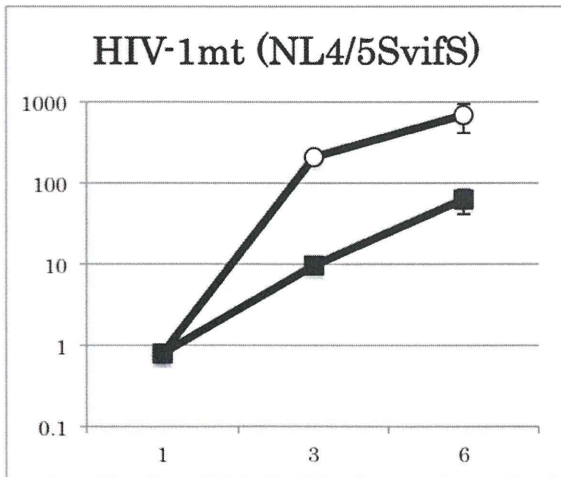
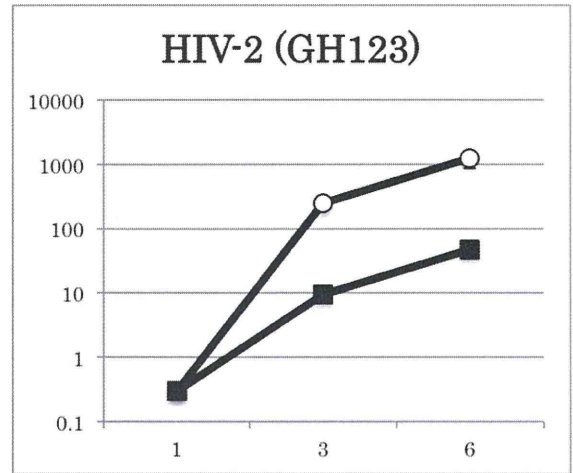
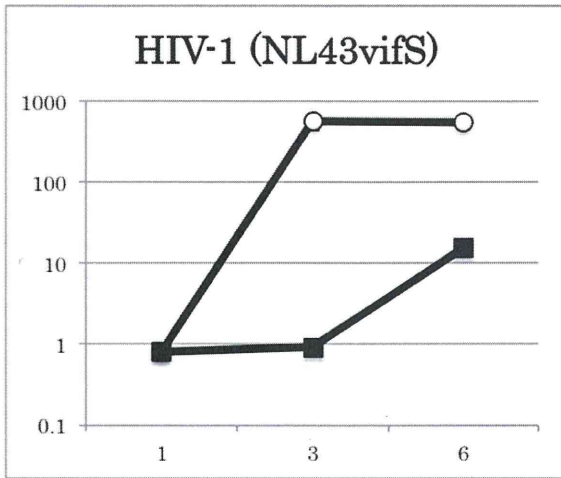


図2 HIV-1, HIV-2, SIVの増殖
■はヒトMX2発現細胞、○はSPRYドメイン欠損TRIM発現細胞(抗ウイルス因子陰性コントロール)での増殖を示す。縦軸はカプシド抗原量(ng/mL), 横軸は感染後の日数を示す。

分担研究課題：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の標的蛋白質として、抗ウイルス宿主因子SAMHD1が報告された。昨年度、VpxがSAMHD1依存的にウイルス増殖性を付与するほか、SAMHD1非依存的にウイルス増殖に関わることを示唆するデータを得た。今年度は、引き続きその機能解明に取り組んでいる。

A. 研究目的

HIV-2はVprに加えてその類似蛋白質Vpxも持つ。我々は、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（Ueno *et al.*, *Microbes Infect.* 5:387, 2003; Fujita *et al.*, *J. Virol.* 82:7752, 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（Laguet *et al.*, *Nature* 474:654, 2011; Hrecka *et al.*, *Nature* 474:658, 2011）、注目を集めた。しかし昨年度、我々は、VpxがSAMHD1依存的にウイルス増殖性を付与するほか、SAMHD1非依存的にウイルス増殖に関わることを示唆するデータを得た。今年度は、引き続きVpxのSAMHD1非依存的機能の解明を目指した。

B. 研究方法

Vpxの点変異体のシリーズ（全長にわたる点変異体19個）を用いてSAMHD1分解活性を調べ、そのウイルス増殖能と比較する。それにより、SAMHD1非依存的機能だけを持たない変異体を見出すことができれば、この変異体を用いてSAMHD1非依存的機能の解明を目指す。

（倫理面への配慮）

本研究で行う組換えDNA実験は、「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」および「熊本大学組換えDNA実験安全管理規定」を尊重して行った。

C. 研究結果

(1) 昨年度、FLAGタグをN末端に持つVpxの発現ベクターであるpEF-Fvpxの変異体19種類のシリーズを完成させた。これらのベクターを293T細胞に導入し、lysis後にウエスタンブロットを行うことで、変異Vpx蛋白質の発現量を調べた。その結果、変異体間で発現量に違いが見られた。また、変異体によっては、近い位置にバンドが2本見られた。フォスタグゲルを用いた電気泳動およびウエスタンブロットにより、上のバンドは変異Vpxのリン酸化体由来であることを確認した。なお、野生株Vpxにも少量のリン酸化体が存在することが認められ、分画キットを用いた実験で、リン酸化Vpxは細胞骨格結合蛋白質として存在することが示された。

(2) 昨年度、Vpx存在下におけるSAMHD1の分解を観察する系を立ち上げた。この際、野生株Vpxの量が多過ぎるとSAMHD1の分解が見られないことを見出し、pcDNA hSAMHD1（SAMHD1の発現ベクター）3.24 µgとpEF-Fvpx 0.06 µgを293T細胞に導入することにした。この条件で、変異Vpx存在下でのSAMHD1の発現量を調べた。その結果、野生株Vpxの他、P4L、E43G、C87A、H94A、P103A、P109A変異体存在で、SAMHD1の発現量が顕著に低下していた。また、pEF-Fvpxを1.9 µgに増やして用いた系でも、同様の実験を行った。この場合においては野生株Vpx存在下でSAMHD1は分解せず、N33S、H39L、P109A変異体存在下で、SAMHD1の発現量の顕著な低下が見られた。N33S、H39L変異体の発現量は野生株と比べて低く、このベクター量でSAMHD1の分解に適した量の変異Vpxを発現したことによると考えられる。

(3) (2)で示したように、これまでにP4L、N33S、H39L、E43G、C87A、H94A、P103A、P109A変異体がSAMHD1分解能を持つことがわかった。その他の変異体については、変異Vpx蛋白質の量が分解に適していないだけで、用いるVpx発現ベクターの量を変えれば分解能を示す可能性もある。そこで現在、ベクターの量を1.9 µgから0.0075 µgにまで細かく変えて実験を行っている。なお、P10L

については既の実験を修了しており、この条件では分解能が見られない、という結論に達している。

(4) 昨年度、Vpx-Vpx間相互作用を観察する系を立ち上げた。この実験系で、野生株Vpxにおいては相互作用が見られていた。19種類の変異体のシリーズおよびポリプロリンモチーフのそれぞれのプロリンをアラニンに変えた変異体について調べたところ、S63A、P106A、P109Aにおいて、相互作用が顕著に減弱していた。(2)で述べたようにP109A変異体は蛋白質の量の多少に関わらずSAMHD1分解活性を示すが、これはP109Aが多量化をほとんどしないためにユビキチンライゲース錯体（この錯体内ではVpxは単量体で存在することが示されている）を形成しやすいためであると予想される。すなわち、野生株Vpxは、蛋白質内の発現量が多いと多量体化が進み、ユビキチンライゲース錯体を形成できなくてSAMHD1分解活性を持たない可能性がある。なお、Vpxおよびその変異体の多量化を、Blue Native PAGEおよびゲル濾過を用いて調べることを現在試みている。

(5) 変異体Vpxをウイルス粒子に取り込ませる実験を行うために、昨年度、pGL-St (Δ Vpx) と pEF-Fvpxを293T細胞に共導入し、培養上清からViro-Ademebeadsを用いてウイルス粒子を取り出した。その結果、N末端にFLAGタグを持つVpxは粒子と取り込まれないことを見出した。今回、C末端にFLAGタグを持つVpxおよび、NまたはC末端にHAタグを持つVpxがウイルス粒子に取り込まれるかどうか検討したところ、これら3種類のタグを持つVpxは取り込まれることを示した。

D. 考察

得られた結果を、これまでに明らかにした変異ウイルスの増殖性と比較した。その結果、P10L変異体にはSAMHD1分解活性が全く見られないが、ウイルスはマクロファージで中間型の増殖性を示していた。また、C87AおよびP109A変異体は十分なSAMHD1分解活性を持ち、かつ野生株Vpxとほぼ同等の発現量を示すが、マクロファージで野生型に比べて増殖性が低下していた。これら変異体の増殖性の低下は、PMA分化THP-1細胞でも見られた（徳島大学 足立、野間口による）。このことは、マクロファージでもVpxがSAMHD1非依存的機能を発揮することを示す。現在、これらの変異蛋白質とPMA分化THP-1細胞抽出液を用いて、SAMHD1非依存的機能に関わる蛋白質の同定を行うことを試みている。

なお、ポリプロリンモチーフは、single round replication assayではマクロファージや樹状細胞に

おけるウイルス前期過程に関与しないことが報告されていることから、P109A変異体の増殖低下は後期過程における増殖低下ではないかと予想し、実験を進めている。

E. 結論

昨年度、VpxはT細胞中でSAMHD1非依存的機能を発揮することを示したが、マクロファージでもSAMHD1非依存的機能を発現することが明らかとなった。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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. 薬学雑誌 133:1103-1111, 2013.

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* 95:179-89, 2014.

3) 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. 学会発表等

1) Anraku, K., Tateishi, H., Fujita, M., Morii, T., Mori, Y., Okamoto, Y., Otsuka, M. Inositol phosphates in calcium signaling and HIV replication: Design, synthesis and functional analysis. (Plenary Lecture by M. Otsuka) Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft, Annual Meeting, 2013年10月11日

2) 山本充奈美、野間口雅子、古賀涼子、岩谷靖雅、高宗暢暁、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

3) 高宗暢暁、山本充奈美、原田圭輔、藤田美歌子、大塚雅巳、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾：HIV アクセサリータンパク質 Nef 翻訳に重要な Nef2 mRNA の5'非翻訳領域。第61回日本ウイルス学会学術集会。2013年11月10日

- 4) 藤野悠那、古賀涼子、大塚雅巳、藤田美歌子：HIV-2 Vpx 蛋白質の多量化の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 10 日
- 5) 立石大、安楽健作、古賀涼子、岡本良成、藤田美歌子、大塚雅巳：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の合成と評価. 第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 2013 年 11 月 20 日
- 6) 古賀涼子、江島智彦、金丸陽亮、田口祐、柴田佑里、井上純一郎、大塚雅巳、藤田美歌子：NF- κ B シグナル伝達分子に対する亜鉛フィンガー蛋白質阻害剤の作用. 第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 2013 年 11 月 21 日
- 7) 加茂真宏、岡本良成、大塚雅巳、藤田美歌子：ウイルスコアの脱殻過程における作用を目指した新規抗 HIV 薬の創製. 第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 2013 年 11 月 21 日
- 8) 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
- 9) 高宗暢暁、山本充奈美、原田圭輔、藤田美歌子、大塚雅巳、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾：Nef2 mRNA の 5'非翻訳領域に含まれる Nef 翻訳に重要な cis 領域. 第 27 回日本エイズ学会学術集会. 2013 年 11 月 20 日
- 10) 加茂真宏、岡本良成、大塚雅巳、藤田美歌子：ウイルスコアの脱殻過程における作用を目指した新規抗 HIV 薬の創製. 第 30 回日本薬学会九州支部大会. 2013 年 12 月 7 日
- 11) 古賀涼子、江島智彦、金丸陽亮、田口祐、柴田佑里、井上純一郎、大塚雅巳、藤田美歌子：NF- κ B シグナル伝達分子に対する亜鉛フィンガー蛋白質阻害剤の作用. 第 30 回日本薬学会九州支部大会. 2013 年 12 月 7 日
- 12) 井田智弓、岡本良成、藤田美歌子、黒崎博雅、大塚雅巳：ペプチド性 DNA 切断分子の設計と合成. 第 30 回日本薬学会九州支部大会. 2013 年 12 月 8 日
- 13) 立石大、安楽健作、古賀涼子、岡本良成、藤田美歌子、大塚雅巳：HIV-1 Gag のイノシトールリン脂質結合部位を標的とした膜移行阻害剤の合成. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 28 日 (予定)
- 14) 加茂真宏、岡本良成、大塚雅巳、藤田美歌子：ウイルスコアの脱殻促進を目指した新規抗 HIV 薬の創製. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 29 日 (予定)
- 15) 田中亜友美、岡本良成、藤田美歌子、梅澤一夫、玉野井冬彦、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指した亜鉛キレーター設計及び合成. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 29 日 (予定)
- 16) 古賀涼子、江島智彦、金丸陽亮、田口祐、柴田佑里、井上純一郎、大塚雅巳、藤田美歌子：亜鉛フィンガー蛋白質阻害剤による NF- κ B 活性化阻害とそのメカニズムの検討. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 30 日 (予定)

Ⅲ. 業績一覽(2013)

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, Miyake A, Doi N, Fujiwara S, Miyazaki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Yokoyama M, Sato H, Masuda, T, <u>Adachi, A.</u>	Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 <i>pol</i> gene modulate viral replication ability.	Journal of Virology	88	in press	2014
Miyake A, Miyazaki Y, Fujita M, Nomaguchi M, <u>Adachi A.</u>	Role of poly-proline motif in HIV-2 Vpx expression.	Frontiers in Microbiology	5	24	2014
Miyake A, Fujita M, Fujino H, Koga R, Kawamura S, Otsuka M, Ode H, Iwatani Y, Sakai Y, Doi N, Nomaguchi M, <u>Adachi A.</u> , Miyazaki Y.	Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation.	Journal of General Virology	95	179-189	2014
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, <u>Adachi A.</u>	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
Doi N, Okubo A, Yamane M, Sakai Y, <u>Adachi A.</u> , Nomaguchi M.	Growth potentials of CCR5-tropic/CXCR4- tropic HIV-1mt clones in macaque cells.	Frontiers in Microbiology	4	218	2013
Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, <u>Adachi A.</u> , Nakayama EE, 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

Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, <u>Adachi A.</u>	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
岩谷 靖雅					
Chaurasiya KR, McCauley MJ, Wang W, Qualley DF, Wu T, Kitamura S, Geertsema H, Chan DSB, Hertz A, <u>Iwatani Y</u> , Levin JG, Musier-Forsyth K, Rouzina I, Williams MC.	Oligomerization transforms human APOBEC3G from an efficient enzyme to a slowly dissociating nucleic acid binding protein.	Nature Chemistry	6	28-33	2014
Miyake A, Fujita M, Fujino H, Koga R, Kawamura S, Otsuka M, Ode H, <u>Iwatani Y</u> , Sakai Y, Doi N, Nomaguchi N, Adachi A, Miyazaki Y.	Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation.	Journal of General Virology	95	179-189	2014
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 <u>the MARCH Laboratory Group</u> 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
Saito A, Nomaguchi M, Kono K, <u>Iwatani Y</u> , Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, 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
Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda	Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major	Journal of Virology	87	11447-11461	2013

T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, <u>Iwatani Y</u> , Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A.	anti-HIV-1 restriction factors.				
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					
Ashizawa T, Miyata H, Iizuka A, Komiyama M, Oshita C, Kume A, Nogami M, Yagoto M, Ito I, Oishi T, Watanabe R, Mitsuya K, Matsuno K, Furuya T, Okawara T, <u>Otsuka M</u> , Ogo N, Asai A, Nakasu Y, Yamaguchi K, 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	2013
Miyake A, Fujita M, Fujino H, Koga R, Kawamura S, <u>Otsuka M</u> , Ode H, Iwatani Y, Sakai Y, Doi N, Nomaguchi M, Adachi A, Miyazaki Y.	Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation.	Journal of General Virology	95	179	2014
徳永研三					
Koyama T, Sun B, <u>Tokunaga K</u> , Tatsumi M, Ishizaka Y.	DNA damage aids HIV-1 infection of macrophages by overcoming integrase inhibition.	Retrovirology	10	21	2013
Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Hiyoshi-Yoshidomi Y, Hashimoto M, <u>Tokunaga K</u> , Suzu S.	Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins.	Microbes and Infection	15	280-290	2013
Fujita H, Iwabu Y, <u>Tokunaga K</u> , 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

Tada T, Kadoki M, Liu Y, <u>Tokunaga K</u> , 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
Koyama T, Arias JF, Iwabu Y, Yokoyama M, Fujita H, Sato, H, <u>Tokunaga K</u> .	APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of both Alu and LINE-1 retrotransposition.	PLoS ONE	8	e84228	2013
中山 英美					
Taya K, <u>Nakayama EE</u> , Shioda T.	Moderate restriction of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages.	PLoS One	9	e90969	2014
Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, <u>Nakayama EE</u> , Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, 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
Kono K, Takeda E, Tsutsui H, Kuroishi A, Hulme AE, Hope TJ, <u>Nakayama EE</u> , Shioda T.	Slower Uncoating Is Associated with Impaired Replicative Capability of Simian-Tropic HIV-1.	PLoS One	8	e72531	2013
Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, <u>Nakayama EE</u> , 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
Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, <u>Nakayama EE</u> , Shioda T,	Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque	Microbes and Infection	15	319-328	2013