

**Figure 2.** Vpr rescued TSG101 induces Gag aggregation at nuclear envelop. (A) HeLa cells were transfected with Gag or TSG101, stained with  $\alpha$ Gag/Alexa594 or  $\alpha$ TSG101/Alexa488. (B) HeLa cells were co-transfected with Gag and TSG101. (C) HeLa cells were co-transfected with Gag, TSG101 and Vpr. (D) HeLa cell were co-transfected with Gag and AIP1.

研究課題：HIV Gag 蛋白質と関連因子の治療標的構造の解明に向けた統合的研究 (H25-エイズ一般-003) (HIV 粒子パッケージングにおける Gag の機能に関する研究)

研究分担者：櫻木 淳一 (大阪大学微生物病研究所ウイルス感染制御分野 助教)

### 研究要旨

HIV の粒子形成蛋白である Gag の多様な機能の中で、ゲノムパッケージング反応に注目してヌクレオカプシド (NC) 蛋白及びそのカウンターパートであるゲノム RNA に着目して解析を試みた。ゲノムパッケージングはウイルスが感染伝播する上で最も重要なステップの一つであり、ウイルスゲノムを細胞内の多様な RNA 群から選別するその特異性・高効率性から抗ウイルス戦略における標的となる可能性がある。今年度は HIV-1 と HIV-2 で異なる可能性が示唆されてきたパッケージングのメカニズムについて、他のレンチウイルスも含めて検討した。また、多様性に富む HIV-1 の様々なサブタイプに着目し、二つのサブタイプを比較検討することで効率の良いパッケージングに働く責任領域の同定を試みた。

### A. 研究目的

ウイルス粒子に自己のゲノムを取り込むゲノムパッケージングはウイルスのアイデンティティを確立するイベントであり、その生活環で最も重要なステップの一つである。HIVを含むレトロウイルスにおいてはポジティブ一本鎖RNAゲノムの5'末端数百塩基がパッケージングシグナル (psi) として機能し、ウイルス粒子形成蛋白Gag中のヌクレオカプシド (NC) 領域と特異的に結合することによって起きると考えられる。レトロウイルスのRNAゲノムはウイルス粒子内で非共有結合を介して二量体化しており、psi内に二量体結合領域 (DLS) が存在する。パッケージングにあたってはDLS二量体の形成する特異的構造がpsiとしてNCに識別される可能性が指摘されている。

パッケージングは多種多様な細胞質内のRNA群からウイルスゲノムRNAのみを効率的かつ特異的に選別する精緻な反応であり、抗ウイルス戦略の標的となりうる。したがってHIVゲノム二量体化及びゲノムパッケージの機序及び機能的構造の解明はHIVの制圧の端緒となり、抗ウイルス剤及びワクチン開発を実施する科学的基盤を提供する。

本研究で分担者は、psiの必要十分領域に着目し、その内部の機能的構造に関して詳細な解析を行い、考察を加える。今回はpsi内に存在するGag翻訳開始コドンAUGの役割の探索、およびHIV-1のサブタイプの多様性を利用したpsiおよびNCの機能領域の検索を試みた。

### B. 研究方法

HIV-1プロウイルス型プラスミド pNL432、HIV-2プロウイルス型プラスミド pGH123、SIVmacプロウイルス型プラスミド pMA239、SIVagmプロウ

ルス型プラスミド pSA212 および HIV-1ELI 株感染細胞 DNA より PCR 増幅・クローニングした ELI 断片を母体として変異体を作成した。各プロウイルス型プラスミドの Gag もしくは Pol 領域に 7-10 アミノ酸の同義置換変異を導入し、コントロール用プラスミドとした。野生型塩基配列と同義置換変異配列をそれぞれリアルタイム PCR のプローブ標的部として、FAM, HEX, ROX 同等色素、Cy5 等で 5' 末を、ダーククエンチャーで 3' 末を標識したものを合成してプローブとして用いた。パッケージングシグナルや Gag フレーム内に機能失活を意図した変異導入した変異体を多数作成した。

293T 細胞へのコトランスフェクションにより変異体とコントロールプラスミドを導入し、上清のウイルスと細胞内の RNA をそれぞれ精製してウイルスゲノム RNA 量をリアルタイム PCR によって測定してコントロールに対する変異体のウイルス粒子内取り込み効率をパッケージング効率として算出した。

ゲノム二量体化効率を算出するためには特殊な構造の変異体群を作成し、ウイルス粒子精製・RNA 抽出及びノザンプロットを行って解析した。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮を必要とする実験は行っていない。

### C. 研究結果

1) レンチウイルスの Gag-AUG のパッケージングに果たす役割と、翻訳とパッケージングの連鎖についての検討

レトロウイルスの非スプライス型 RNA には構造蛋白 Gag、Gag-Pol 発現の鋳型としての役割と、パッケージされるゲノムとしての役割がある。従ってゲノムパッケージングのメカニズムとして翻訳鋳型となった RNA がパッケージされる (シス型)、

翻訳鋳型はパッケージされず、パッケージ専用のRNAが存在する（トランス型）、パッケージされるRNAは翻訳の有無に因らない（ランダム型）の3通りの様式が考えられる（図1）。翻訳とパッケージングの関係を調べるために非翻訳型RNAのパッケージング効率をも調べる事が可能な実験系を構築し、解析を行った。

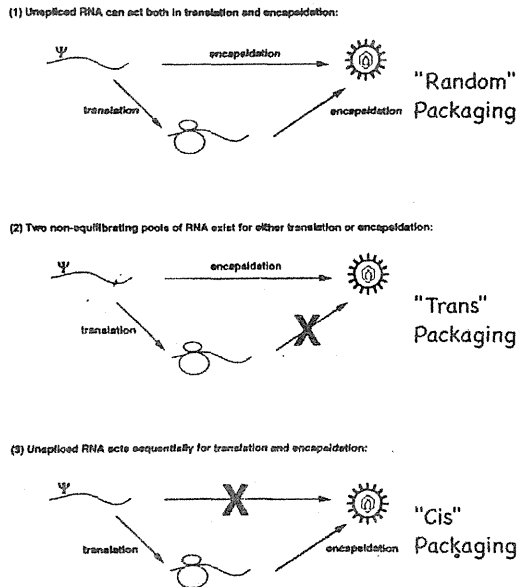


FIG. 1. Possible sorting mechanisms involved in translation and encapsidation of full-length retroviral RNA. JOURNAL OF VIROLOGY, Apr. 1999, p. 3023-3031

図1・レトロウイルスパッケージングの様式

霊長類レンチウイルスのGag-AUGはpsi内に存在し、psiのRNA二次構造モデルでは上流のCGUと相補鎖形成している。HIV-1においてこの相補鎖形成を妨げる置換変異をGag-AUGに導入した（UGC/CAG/CAU）結果、ゲノムパッケージング効率が60%程度に低下した。一方CGUとの相補鎖形成を妨げない変異をGag-AUGに導入して（ACG/GUG）このpsiの二量体形成能を測定すると効率低下は見られず、パッケージング能も野生株と同等であった（図2）。

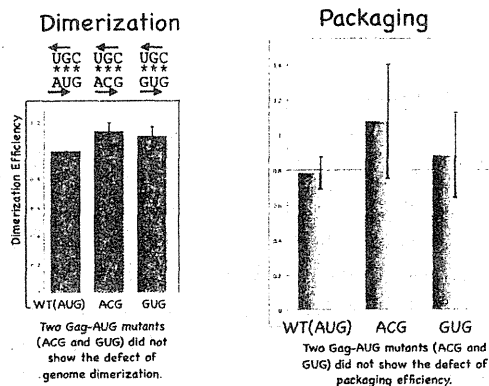


図2・HIV-1Gag-AUG変異体の二量体化及びパッケ

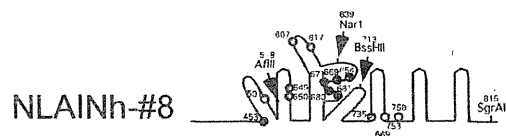
ーシング効率の計測

HIV-2, SIVmac, SIVagmに関しても同様にGag-AUGにACG/GUG変異体を作成してパッケージング能を測定した結果、程度の差はあるがどの変異体も効率の低下が観察された。しかしながらGag発現を途中で止めたいくつの変異体においてはパッケージング効率の低下は観察されず、完全Gagの翻訳鋳型であることとパッケージングの対象となることは独立であると考えられた。

2) HIV-1サブタイプ間クロスパッケージングの解析によるpsi機能領域の探索

以前の解析において遺伝的距離の近さにもかかわらず、サブタイプBとDのクロスパッケージング効率（Bの粒子にDのpsiを持ったゲノムが取り込まれる効率）が悪いこと報告していた。今回はこの効率低下の責任領域がどこにあるのかを組換え体を作成して調べた。

サブタイプBとDのpsiでは14カ所の塩基が異なっていた。組換え実験の結果中央部のPBS下流の4塩基がD型だとパッケージング効率の減少が起ることが判明した（図3）。



Psi

1 : GGTGTTTCTG GTCAGGAGG AATGAGTGT GCGAGCTTTC TGGTATGTA GCGAGGAGG TGTATTAGG TGTATAA TGTGTTGAG  
1 : GGTGTTTCTG GTCAGGAGG AATGAGTGT GCGAGCTTTC TGGTATGTA GCGAGGAGG TGTATTAGG TGTATAA TGTGTTGAG  
91 : TTTTCTGAGT ATGTTGTTGTC GGTGTTTCTG GTCAGGAGG TGTATTAGG TGTATAA TGTGTTGAG TGTATAA TGTGTTGAG  
91 : TTTTCTGAGT ATGTTGTTGTC GGTGTTTCTG GTCAGGAGG TGTATTAGG TGTATAA TGTGTTGAG TGTATAA TGTGTTGAG  
81 : GGTGTTTCTG GTCAGGAGG AATGAGTGT GCGAGCTTTC TGGTATGTA GCGAGGAGG TGTATTAGG TGTATAA TGTGTTGAG  
81 : GGTGTTTCTG GTCAGGAGG AATGAGTGT GCGAGCTTTC TGGTATGTA GCGAGGAGG TGTATTAGG TGTATAA TGTGTTGAG  
71 : AATGAGTGT GCGAGCTTTC TGGTATGTA GCGAGGAGG TGTATTAGG TGTATAA TGTGTTGAG TGTATAA TGTGTTGAG  
71 : AATGAGTGT GCGAGCTTTC TGGTATGTA GCGAGGAGG TGTATTAGG TGTATAA TGTGTTGAG TGTATAA TGTGTTGAG

図3・パッケージングに影響を及ぼすサブタイプD由来の領域

パッケージングのトランス因子であるNC蛋白の配列に関して、B型とD型の間には8アミノ酸の違いがあるため、NCをD型に組み換えたウイルスを作成して同様の解析を行った。その結果D型NCを持つウイルスでもB型と同様にD型psiのパッケージング効率低下が見られた。

#### D. 考察

HIV-1ではこれまでの定説を裏付け、Gag翻訳とパッケージングは独立した事象として存在していると考えられた。HIV-2に関しては議論があったが、1型と同様にランダムパッケージング様式を支持する結果であった。SIVに関してはこれまで報告がなかったがHIVと同様の様式と考えられた。

なお、霊長類レンチウイルスではGag-AUGが翻訳ではなくpsiの機能構造に重要な役割を果たしていること、また、Gag-AUGがCGUと相補鎖を形成していると仮定して、その相補鎖を維持した変異導入によってもパッケージング能が低下したことから、HIV-2とSIVに関してはGag-AUG周辺の構造が従来予測されてきた二次構造モデルとは異なる可能性が考えられた。

サブタイプ間クロスパッケージの結果から示唆されたパッケージング能低下に関わる領域はPBS下流の狭い領域であった。PBS付近は従来パッケージングには関係しないと考えられており、この結果は非常に興味深い。PsiとNCのサブタイプ型を一致させてもD型のパッケージング不全は回復しなかったが、過去の文献でD型の複製能が特に低いといった指摘は無く、D型の他のウイルス因子が補償に働いている可能性も考えられ興味深い。

## E. 結論

霊長類レンチウイルスのパッケージング解析の結果から、すべてのウイルスにおいてGag翻訳とゲノムパッケージングは独立した事象であることが示唆された。またGag-AUGはすべてのウイルスのpsiの中で機能的構造を維持するために重要な役割を果たしていると考えられた。

サブタイプ間クロスパッケージングの結果からこれまで指摘の無かったPBS下流域にパッケージング効率を規定する領域が存在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) 櫻木 淳一 HIVの複製プロセス～ウイルスゲノムを中心として～

ウイルス 63, 175-186, 2013

2) Sudo S, Haraguchi H, Hirai Y, Gatanaga H, Sakuragi J, Momose F, Morikawa Y. Efavirenz enhances HIV-1 gag processing at the plasma membrane through Gag-Pol dimerization. J Virol. 87, 3348-60, 2013

### 2. 学会発表等

1) Sakuragi J. Relationship between genome packaging and Gag translation of various mammal retroviruses. 25th Workshop on Retroviral Pathogenesis. August 7-10, 2013, Reykjavik, Iceland.

2) Sakuragi J. Virology. Training Course, The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity Sep 10-13, 2013, Awaji, Japan.

3) 櫻木淳一・夏井洋和・櫻木小百合・塩田達雄 レンチウイルスの Gag 開始コドンおよび翻訳とゲノムパッケージングに関する解析 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 10 日～12 日 神戸。

4) 櫻木淳一・櫻木小百合・塩田達雄 HIV サブタイプ比較によるゲノムパッケージングに関する解析 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会 2013 年 11 月 20 日～22 日 熊本。

5) 櫻木淳一・夏井洋和・櫻木小百合・塩田達雄 レトロウイルスの GagAUG および翻訳とゲノムパッケージングに関する解析 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日～6 日 神戸。

**研究課題:** HIV Gag 蛋白質と関連因子の治療標的構造の解明に向けた統合的研究

研究分担者: 玉村 啓和 (東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授)

**研究要旨**

我々は有機合成化学・ケミカルバイオロジーを巧みに用いて、Gag を標的とする治療標的部位の探索、候補因子の特定に関する研究を行っている。本研究の目的は Gag に関連する抗 HIV 活性リード化合物の創出、候補分子の構造活性相関の情報基盤の提供、Gag 機能制圧、等である。今年度の研究成果は、1) カプシドタンパク質(CA)を網羅するペプチドライブラリーをすべて合成した。2) Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loop の環状ペプチド誘導体を合成した。3) 候補化合物の細胞内導入法を検討し、oligo-Arg 技術に加えて、stapling 技術の有用性を見出した。

**A. 研究目的**

ウイルスタンパク質 Gag からプロセッシングにより生じるカプシド (CA) に着目し、部分ペプチドライブラリーから抗 HIV-1 活性を有する配列を探索し、それぞれの CA 部分ペプチドの抗 HIV-1 活性および細胞毒性について検討を行う。これにより、候補分子の構造活性相関の情報を得、Gag 機能制圧研究をおこなう。

**B. 研究方法**

1) CA 部分ペプチドライブラリーの設計、合成

全長 231 残基の CA タンパク質を N 末端側から 15 残基ずつに分割し、Sample 1~Sample 23 の CA 部分ペプチドライブラリーを設計した (表 1)。また、この分割の際に活性モチーフの分断を回避するため、5 残基ずつのオーバーラップ部分を設けた。さらに、スペーサーとして Gly、octa-Arg や 2-iodoacetamide との reaction point として Cys を導入した (図 1)。

表 1. CA 部分ペプチドの配列

	Sequence
S1	H <sub>2</sub> N-PIVQNLQGQMVHQAIGC-CONH <sub>2</sub>
S2	Ac-HN-VHQAISRTLNAWVKGC-CONH <sub>2</sub>
S3	Ac-HN-NAWVKVVEEKAFSPEGC-CONH <sub>2</sub>
S4	Ac-HN-AFSPEVPMFSALSEGC-CONH <sub>2</sub>
S5	Ac-HN-SALSEGATPQDLNTMGC-CONH <sub>2</sub>

S6	Ac-HN-DLNTMLNTVGGHQAAGC-CONH <sub>2</sub>
S7	Ac-HN-GHQAAMQMLKETINEGC-CONH <sub>2</sub>
S8	Ac-HN-ETINEEAAEWDRLHPGC-CONH <sub>2</sub>
S9	Ac-HN-DRLHPVHAGPIAPGGC-CONH <sub>2</sub>
S10	Ac-HN-IAPGQMREPRGSDIAGC-CONH <sub>2</sub>
S11	Ac-HN-GSDIAGTTSTLQEQIGC-CONH <sub>2</sub>
S12	Ac-HN-LQEQIGWMTHNPPIPGC-CONH <sub>2</sub>
S13	Ac-HN-NPPIVGEIYKRWIIGC-CONH <sub>2</sub>
S14	Ac-HN-KRWIILGLNKIVRMYGC-CONH <sub>2</sub>
S15	Ac-HN-IVRMYSPTSILDIRQGC-CONH <sub>2</sub>
S16	Ac-HN-LDIRQGPKEPFRDYVGC-CONH <sub>2</sub>
S17	Ac-HN-FRDYVDRFYKTLRAEGC-CONH <sub>2</sub>
S18	Ac-HN-TLRAEQASQEVKNWMGC-CONH <sub>2</sub>
S19	Ac-HN-VKNWMTETLLVQNANGC-CONH <sub>2</sub>
S20	Ac-HN-VQANPDSKTILKALGC-CONH <sub>2</sub>
S21	Ac-HN-ILKALGPGATLEEMMG <sup>+</sup> C-CONH <sub>2</sub>
S22	Ac-HN-LEEMMTASQVGGPGGC-CONH <sub>2</sub>
S23	Ac-HN-VGGPGHKARVLGC-CONH <sub>2</sub>

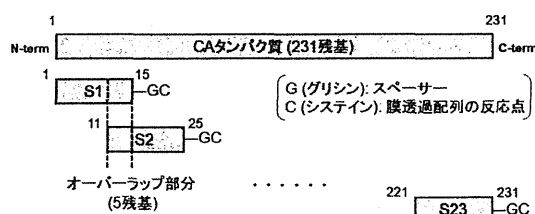


図 1. CA 部分ペプチドライブラリーの設計

CA 部分ペプチドは、Fmoc 固相合成法により合成した。合成の際に NovaSyn<sup>®</sup> TGR resin (novabiochem 社製) を用いて部分ペプチドの C 末端をアミド化し、最後に N 末端をアセチル化した。固相合成後、TFA によるアミノ酸側鎖の脱保護および脱樹脂を行った。その後、HPLC で精製を行い、ESI-TOF MS により目的物を同定した。合成スキームを図 2 に示す。

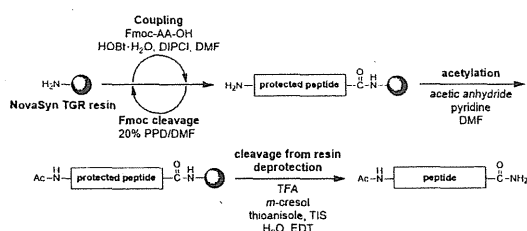


図 2. CA 部分ペプチドの合成スキーム

合成した CA 部分ペプチドを細胞内へ導入するため、細胞膜透過性を有する octa-Arg 配列を付加した (Sample 1L~23L)。octa-Arg の N 末端にあるクロロアセチル基と CA 部分ペプチドの C 末端に導入した Cys のチオール基との化学選択的反応により合成した (ligation)。また、細胞膜透過性 CA 部分ペプチドに対するコントロールとして、C 末端の Cys のチオール基を 2-iodoacetamide でキャッピングしたコントロール

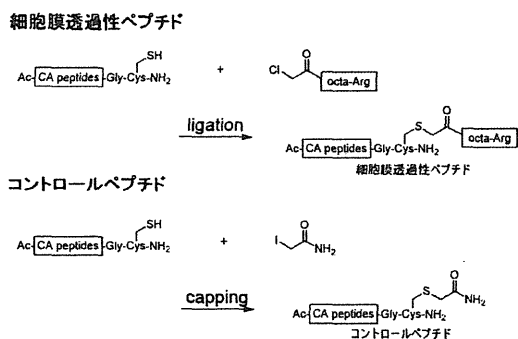


図 3. 細胞膜透過性 CA 部分ペプチドのおよびコントロールペプチドの分子設計

ペプチド (Sample 1C~23C) も合成した (capping) (図 3)。

## 2) Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loop の環状ペプチド誘導体の合成

S9, S10 は CypA binding loop であることから、阻害活性をもつことが考えられる。しかし、S9, S10 がループの途中で分断しているため活性が出ない可能性がある。そこで、新たな部分ペプチドを設計し、同様に合成を行った(図 4)。

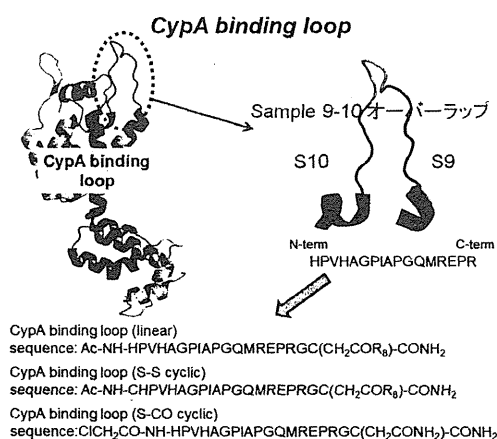


図 4. Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loop の環状ペプチド誘導体

## 3) 候補化合物の細胞内導入法としての stapling 技術の検討

近年、二次構造を維持した状態のペプチドを共有結合で架橋することにより、細胞膜を透過することができる stapling 技術が報告されている。さらに、このステイプルペプチド (staple peptide) は生体内の酵素にも安定であり、新しいペプチド医薬として期待されている。そこで、これから見いだされる CA 部分ペプチド由来の候補化合物の細胞内導入に応用できるかどうかを評価するため、ペプチド性インテグラーゼ阻害剤をリード化合物として、生体内安定性や細胞膜透過性の向上を目的と

したステイプルペプチドの検討を行った。側鎖にアリル基を有する非天然アミノ酸としてアルキルタイプとエーテルタイプの側鎖を有する2種類のアミノ酸を合成した。それらアミノ酸をペプチド性インテグラーゼ阻害剤のペプチド鎖2カ所にそれぞれ導入し、オレフィンメタセシス反応により架橋し、二次構造を安定化したステイプルペプチドを合成した(図5)。これらのペプチドの構造評価のためのCDスペクトルの測定、抗HIV活性試験、細胞膜透過性実験を行った。

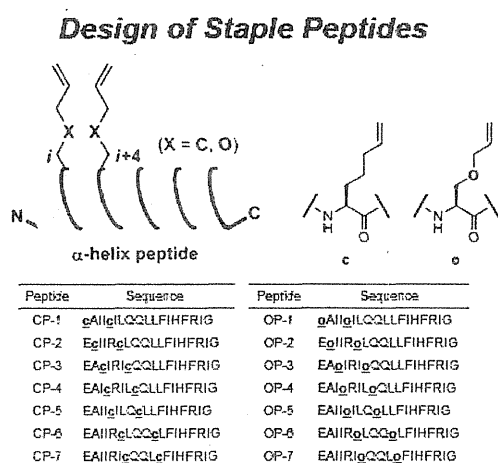


図5. ペプチド性インテグラーゼ阻害剤を基にしたステイプルペプチドのデザイン

(倫理面への配慮)

今年度の研究に関して、倫理面に該当する事項はない。

### C. 研究結果

#### 1) CA部分ペプチドライブラリーの設計、合成

今年度、CA部分ペプチドライブラリーの合成をすべて終了した。合成した細胞膜透過性CA部分ペプチド1L-23LのESI-TOF MSのデータと収率を表2に示した。ほぼすべてのペプチドで収率よく、合成することができた。

表2. 細胞膜透過性CA部分ペプチド1L-23LのESI-TOF MSデータと収率

	calcd. for [M+H <sup>+</sup> ]	found	yield (%)
1L	3140.77	3141.84	57
2L	3226.86	3226.87	13
3L	3239.78	3239.99	34
4L	3131.68	3132.78	51
5L	3041.60	3041.65	64
6L	3048.63	3048.59	20
7L	3207.70	3207.65	82
8L	3316.73	3316.81	51
9L	3071.72	3071.69	85
10L	3104.70	3104.74	81
11L	3027.63	3027.64	62
12L	3267.77	3269.01	74
13L	3301.92	3301.87	49
14L	3410.04	3411.28	42
15L	3298.87	3298.82	34
16L	3339.86	3341.06	83
17L	3485.90	3485.91	32
18L	3297.78	3297.74	56
19L	3267.79	3267.83	35
20L	3118.80	3119.05	57
21L	3080.72	3080.79	43
22L	2970.54	2970.54	86
23L	2597.54	2597.47	69

#### 2) Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loopの環状ペプチド誘導体の合成

本環状ペプチド誘導体に関しても同様に収率よく、合成することができた。また、同定はESI-TOF MS測定により行った。

#### 3) 候補化合物の細胞内導入法としてのstapling技術の検討

octa-Argペプチドを付与したインテグラーゼ(IN)阻害活性ペプチド中のPhe6, Ile7, Phe9,

Ile11 が阻害活性の発現に重要であると考えられる。このペプチドに、アルキルタイプとエーテルタイプの側鎖を有する 2 種類の非天然アミノ酸を導入し、ステイプルペプチドを合成した。側鎖に酸素原子を含んでいる非天然アミノ酸の方はオレフィンメタセシス反応の効率が大幅に低下した。このことから、アルキルタイプの非天然アミノ酸の方がステイプルペプチド合成に適していると考えられた。また、CD スペクトルより、側鎖を架橋していないリニアペプチドよりも側鎖を架橋したステイプルペプチドの方がより高い $\alpha$ -ヘリックス性を有していた。抗 HIV 活性試験の結果では、いくつかのステイプルペプチドが活性を示した。また、蛍光基を導入したステイプルペプチドは、イメージングにより細胞膜透過性を有することが明らかになった。

#### D. 考察

有機合成化学・ケミカルバイオロジーの巧みな技術を用い、Gag を標的とする治療標的部位の探索のための目的化合物等を順調に設計、合成できた。

##### 1) CA 部分ペプチドライブラリーの設計、合成

カプシドタンパク質(CA)を網羅するペプチドライブラリーのすべてを、抗 HIV 活性試験に供与できる十分量合成した。現在、分担研究者である村上博士に活性評価を依頼中である。

##### 2) Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loop の環状ペプチド誘導体の合成

本環状ペプチド誘導体についても同様に抗 HIV 活性試験に供与できる十分量合成した。現在、分担研究者である村上博士に活性評価を依頼中である。

##### 3) 候補化合物の細胞内導入法としての細胞内導入法の検討

ステイプル化により、細胞内で高い IN 阻害活性を有する Vpr 断片ペプチドを見出

した。これにより、細胞内導入法として細胞内導入法の有用性を示した。

#### E. 結論

Gag を標的とする治療標的部位の探索、抗 HIV 活性リード化合物の創出、候補分子の構造活性相関の情報基盤の提供を目指して、今年度は十分な研究成果を得た。具体的には、有機合成化学・ケミカルバイオロジーを巧みに用いて、1) カプシドタンパク質(CA)を網羅するペプチドライブラリーの合成、2) Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loop の環状ペプチド誘導体の合成、3) stapling 技術による候補化合物の細胞内導入法の確立等を行った。

抗ウイルス活性の測定実験に関して、国立感染症研究所エイズ研究センター、村上努室長、藤野真之博士にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

#### F. 知的所有権の取得状況

該当事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 玉村啓和. ペプチドミメティックスを活用した抗HIV剤の創製. MEDCHEM NEWS(日本薬学会 医薬化学部会)、24(1)巻 頁14~19、2014年
- 2) Narumi T, Takano H, Ohashi N, Suzuki A, Furuta T, Tamamura H. Isostere-Based Design of 8-Azacoumarin-type Photolabile Protecting Groups: A Hydrophilicity Increasing Strategy for Coumarin-4-ylmethyls. *Org. Lett.* in press.
- 3) Hashimoto C, Narumi T, Otsuki H, Hirota Y, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, Tamamura H. A CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitor: Pharmacokinetics. *Bioorg. Med. Chem.* 21(24): 7884–7889, 2013.
- 4) Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Nakahara T, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. CXCR4-derived Synthetic Peptides Inducing Anti-HIV-1 Antibodies. *Bioorg. Med. Chem.* 21(22): 6878–6885, 2013.
- 5) Otsuki H, Hishiki T, Miura T, Hashimoto C, Narumi T, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S, Igarashi T. Generation of a Replication-competent Simian-human Immunodeficiency Virus, the Neutralisation Sensitivity of Which can be Enhanced in the



Presence of a Small Molecule CD4 Mimic. *J. Gen. Virol.* 94(12): 2710–2716, 2013.

6) Nomura W, Aikawa H, Ohashi N, Urano E, Metifiot M, Fujino M, Maddali K, Ozaki T, Nozue A, Narumi T, Hashimoto C, Tanaka T, Pommier Y, Yamamoto N, Komano J, Murakami T, Tamamura H. Cell-Permeable Stapled Peptides Based on HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Product. *ACS Chem. Biol.* 8(10): 2235–2244, 2013.

7) Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Tsutsumi H, Haseyama M, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. Anti-HIV-1 Peptide Derivatives Based on the HIV-1 Co-receptor CXCR4. *ChemMedChem* 8(10): 1668–1672, 2013.

8) Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Ohashi N, Fujino M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Multimerized CHR-derived Peptides as HIV-1 Fusion Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 21(15): 4452–4458, 2013.

9) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors: Lead Optimization Studies of the Aromatic Substituents. *Bioorg. Med. Chem.* 21(9): 2518–2526, 2013.

10) Narumi T, Aikawa H, Tanaka T, Hashimoto C, Ohashi N, Nomura W, Kobayakawa T, Takano H, Hirota Y, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Low Molecular Weight CXCR4 Ligands with Variable Spacers. *ChemMedChem* 8(1): 118–124, 2013.

11) Ohashi N, Nomura W, Narumi T, Tamamura H. Peptide-based Ligand Screening and Functional Analysis of Protein Kinase C. *Biopolymers: Peptide Science* 100(6): 613–620, 2013.

## 2. 学会発表等

(1) Tamamura H. Peptide-based Chemical Biology & Medicinal Chemistry. Joint Symposium between Chulalongkorn University and IBB/TMDU on Biomedical Materials and Engineering. Oct 25, 2013, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

(2) Tamamura H. Peptide-based Chemical Biology for the Elucidation of a Dimerization State of a GPCR CXCR4 and the Development of Recognition Probes for Cancerous Cells. The 17th Korean Peptide Protein Society Symposium. Nov 29, 2013, Seoul National University, Seoul, Korea.

(3) 玉村啓和:ケミカルバイオロジーとペプチド科学. 第17回ペプチドフォーラム—ケミカルバイオロジーを先導する明日のペプチド科学:新しい接点と可能性を探る—. 2013年6月18日、東京.

(4) 玉村啓和:HIV感染防止 AIDS発症防止についての基礎研究. 東京コンソーシアム教員研究セミナー—大学院紹介講演会「疾患予防」—. 2013年7月11日、東京.

(5) 玉村啓和:ターゲットタンパク質を特異的に認識するプローブの創製. 生命分子機能研究会2013 学術集会「生命分子・ペプチド創薬の医療へのインパクト」. 2013年9月19-20日、長浜.

(6) 玉村啓和:種々の作用点をターゲットとした抗HIV剤の創製. 平成25年度厚生労働科学研究

費補助金 創薬基盤推進研究事業 第42回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「新しい作用機構の抗ウイルス薬開発への取り組み—ウイルス感染症に挑む—」. 2013年12月9日、東京.

(7) Nomura W, Ohashi N, Métifiot M, Fujino M, Pommier Y, Murakami T, Tamamura H. Stapled Peptides as HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Products. The 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium/the 50th Japanese Peptide Symposium. Nov 6 -8, 2013, Osaka, Japan.

(8) Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Honda Y, Ohashi N, Fujino M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Multimerized C34-Related Peptides as HIV-1 Fusion Inhibitors. The 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium/the 50th Japanese Peptide Symposium. Nov 6 -8, 2013, Osaka, Japan.

(9) 橋本知恵、野村 渉、鈴木貴晴、鳴海哲夫、駒野 淳、村上 努、山本直樹、玉村啓和:HIV-1外被タンパク質 gp41-CHR 三量体構造を模倣した膜融合阻害剤の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第8回年会. 2013年6月19-21日、東京.

(10) 松本大地、橋本知恵、高野 皓、藤野真之、相川春夫、野村 渉、村上 努、山本直樹、玉村啓和:ウイルスカプシド配列を基にした抗 HIV-1ペプチドの創製. 日本ケミカルバイオロジー学会 第8回年会. 2013年6月19-21日、東京.

(11) 松本大地、橋本知恵、藤野真之、野村 渉、村上 努、山本直樹、玉村啓和:フォワードケミカルジェネティクスをウイルスカプシドに応用した抗 HIV-1ペプチドの創製. 第57回日本薬学会関東支部大会. 2013年10月26日、東京.

(12) 野村 渉、橋本知恵、鳴海哲夫、藤野真之、村上 努、玉村啓和:HIV-1外被タンパク質 gp41-CHR の二量体構造を基盤とした膜融合阻害剤の有用性. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013年11月20-22日、熊本.

## 研究課題：Gag ペプチドを用いた Gag 機能部位の研究

分担研究者：村上 努（国立感染症研究所 エイズ研究センター 室長）

共同研究者：玉村啓和（東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授）

研究要旨：我々は、Gag 機能部位を明らかにするための基盤的研究として、ペプチド化学的手法によって合成した HIV-1 Gag 部分ペプチドの細胞内導入による HIV 複製制御の可能性を検討している。今年度はまず、HIV-1 MA 部分ペプチドライブラリーのスクリーニングから得られた MA 部分ペプチド 2C の抗ウイルス活性スペクトルと作用機序の検討を行った。その結果 2C は、1) MLV Env や VSV-G を介した HIV-1 コアの侵入を阻害しない、2) HIV-1 はサブタイプに関わらず一部の例外はあるがその感染を阻害する、3) HIV-2 や SIV の感染は阻害しない、4) time-of-addition 実験の結果から、その作用点は HIV-1 の CD4 結合後膜融合に至る過程である、と推定された。加えて、HIV-1 CA 部分ペプチドライブラリーの抗 HIV-1 活性を指標としたスクリーニングも実施した。その結果、X4、R5 HIV-1 のいずれのウイルスに対しても阻害活性を示す部分ペプチドが、1) 細胞膜透過性を付与しないペプチドのみ、2) 細胞膜透過性を付与したペプチドのみ、3) その両方のペプチドで阻害活性を示すという 3通りの阻害パターンがあることが明らかになった。

### A. 研究目的

Gag に関連する治療標的構造の解明／抗 HIV 活性リード化合物の開発につながる Gag 機能部位の同定と Gag 蛋白質による HIV 複製制御機構の解明を目的とする。期待される成果は、Gag 部分ペプチドの抗 HIV 活性評価およびその作用機序の解明による Gag 機能部位および治療標的候補因子の特定である。

### B. 研究方法

(1) 各種 Env によるシュードタイプ HIV-1 の作製および感染実験：

293T 細胞に Env(-) の HIV-1 と HIV-1 (NL4-3) Env、A-MLV Env または VSV-G を共導入し、これらの Env によるシュードタイプ HIV-1 を作製した。得られたシュードタイプ HIV-1 を試験ペプチドまたはコントロール薬剤の存在下で TZM-bl 細胞に感染させ、感染 2 日後の luciferase 活性を測定することによって試験ペプチドの各種 Env によるシュードタイプ HIV-1 の侵入阻害活性を検討した。

(2) MA 部分ペプチド (2C) に関しては、その作用点を推定するためいわゆる”Time-of-addition”実験を HIV-1 (NL4-3) Env を TZM-bl 細胞に感染させる系で行った。なお、コントロール薬剤として、吸着阻害剤 DS5000、

sCD4、CXCR4 阻害剤 AMD3100、HIV-1 膜融合阻害剤 T-20 (Enfuvirtide) と AZT を使用した。

(3) CA 部分ペプチド (CA の N 末より 15 残基ずつ 5 残基ずつオーバーラップさせて合成した。Octa-Arg を C 末に付与した細胞膜透過性ペプチドと付与しないコントロールペプチドのセット) を調製し、標的細胞 MT-4 と X4 HIV-1 である NL4-3 の感染系もしくは、標的細胞 PM1/CCR5 と R5HIV-1 である NL(AD8) の感染系で抗 HIV-1 活性および細胞毒性を MTT 試験によって測定した。なお NL(AD8) の感染系では、一部の部分ペプチドの抗 HIV-1 活性の評価を感染細胞培養上清中の p24 (CA) ELISA によっても評価した。

(倫理面での配慮)

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

### C. 研究結果

(1) MA 部分ペプチド 2C による各種 Env によるシュードタイプ HIV-1 の感染阻害を検討実験：2C は HIV-1 (NL4-3) Env でシュードタイプした HIV-1 の TZM-bl 細胞への感染を用量依存的に阻害したが、A-MLV Env または VSV-G でシュードタイプした HIV-1 の感染を 12.5  $\mu$ M においてもほ

とんど阻害しなかった (図1)。

(2) MA 部分ペプチド 2C の抗ウイルススペクトルの検討: 2C はサブタイプ A, B, C の primary isolates に対して抗ウイルス活性を示したが、一部活性を示さない例外も認められた。興味深いことに、2C は HIV-2, Maraviroc 耐性 HIV-1 (感染研エイズ研究センター・吉村先生 data) や SIVmac239 に対して抗ウイルス活性を示さなかった。

(3) MA 部分ペプチド 2C の作用点: Time-of-addition 実験の結果、2C が抗 HIV-1 活性を示す作用点は、その作用点は HIV-1 の CD4 結合後膜融合に至る過程である、と推定された (図2)。

(4) CA 部分ペプチドの抗 HIV-1 活性: X4、R5 HIV-1 のいずれのウイルスに対しても阻害活性を示す部分ペプチドが、1) 細胞膜透過性を付与しないペプチドのみ (19C)、2) 細胞膜透過性を付与したペプチドのみ (1L, 6L)、3) その両方のペプチドで阻害活性を示す (15C, 15L) という3通りの阻害パターンを示す部分ペプチドがあることが明らかになった (表1、表2)。

#### D. 考察

(1) 予備的実験の結果も総合すると、MA 部分ペプチド 2C は、標的細胞側に作用し、おそらくウイルスの CD4 結合直後の過程を阻害することが推定される。

(2) CA 部分ペプチドの fragment 15 は CA の NTD と CTD の連結領域であり、HIV-1 コアのアセンブリーなどに重要という報告もあり、このペプチドの作用機序に興味もたれる。

#### E. 結論

(1) MA 部分ペプチド 2C は HIV-1 の侵入過程の解析に有用なプローブと考えられる。

(2) 抗 HIV-1 活性を有する CA 部分ペプチドが複数得られた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Nakahara T, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H: CXCR4-derived synthetic peptides inducing anti-HIV-1 antibodies. *Bioorg Med Chem* 21(22):

6878-6885, 2013.

2) Nomura W, Aikawa H, Ohashi N, Urano E, Métifiot M, Fujino M, Maddali K, Ozaki T, Nozue A, Narumi T, Hashimoto C, Tanaka T, Pommier Y, Yamamoto N, Komano J, Murakami T, Tamamura H: Cell-Permeable stapled peptides based on HIV-1 Integrase Inhibitors derived from HIV-1 gene products. *ACS Chemical Biology* 8(10): 2235-2244, 2013.

3) Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Tsutsumi H, Haseyama M, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H: Anti-HIV-1 Peptide derivatives based on the HIV-1 co-receptor CXCR4. *Chem Med Chem* 8(10): 1668-1672, 2013.

4) Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Ohashi N, Fujino M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H: Multimerized CHR-derived peptides as HIV-1 fusion inhibitors. *Bioorg Med Chem* 21(15): 4452-4458, 2013.

5) Takemura T, Kawamata M, Urabe M, Murakami T: Cyclophilin A-dependent restriction to capsid N121K mutant human immunodeficiency virus type 1 in a broad range of cell lines. *J Virol* 87(7): 4086-4090, 2013.

##### 2. 学会発表

1) 林 浩司、竹村太地郎、藤野真之、百瀬文隆、森川裕子、村上 努. HIV-1 複製過程における Rab7 の機能解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月10日-12日

2) 野村 渉、鳴海哲夫、橋本知恵、藤野真之、村上 努、玉村啓和. HIV-1 外被タンパク質 gp41-CHR の二量体構造を基盤とした膜融合阻害剤の有用性. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2012年11月20日-22日

3) 村上 努、橋本知恵、藤野真之、鳴海哲夫、野村 渉、山本直樹、玉村啓和. HIV-1 特異的侵入阻害剤として機能する MA 部分ペプチドの抗ウイルス活性作用機序の検討. 第27回日本エイ

該当事項なし。

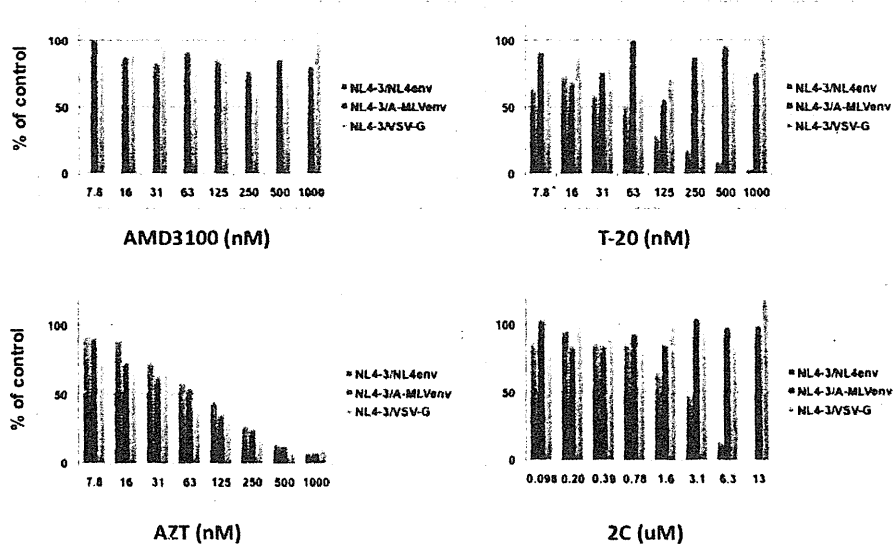
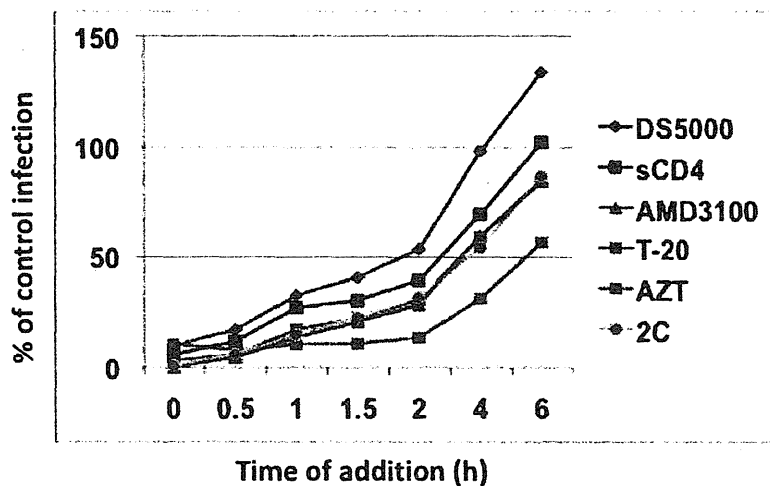


図1. MA部分ペプチド2CはHIV Env特異的にウイルスの標的細胞への侵入を阻害する



標的細胞: TZM-bl

ウイルス: NL4-3/NL4env (pseudovirion)

図2. MA部分ペプチド2CはHIV-1 侵入におけるCD4結合後膜融合に至る過程を阻害する

表1. CA部分ペプチド(コントロールペプチド)の抗HIV-1および細胞毒性

CA ペプチド	MT-4細胞		PM1/CCR5細胞	
	NL4-3 (X4 HIV-1)		NL(AD8) (R5 HIV-1)	
	EC50 (μM)	CC50 (μM)	EC50 (μM) (p24 ELISA)	CC50 (μM)
1C	>50	>50	ND	ND
2C	39% inh at 50 μM	>50	ND	ND
3C	32	>50	ND	ND
4C	>50	>50	ND	ND
5C	>50	>50	ND	ND
6C	35	>50	ND	ND
7C	>50	>50	ND	ND
8C	23	>50	ND	ND
9C	>50	>50	ND	ND
10C	>50	>50	ND	ND
11C	>50	>50	ND	ND
12C	>50	>50	ND	ND
13C	>50	>50	ND	ND
14C	>22	22	ND	ND
15C	47	>50	27 (8.3)	>50
16C	38	>50	ND	ND
17C	>50	>50	ND	ND
18C	>50	>50	ND	ND
19C	18	>50	22 (5.0)	>50
20C	>50	>50	ND	ND
21C	>50	>50	ND	ND
22C	>50	>50	ND	ND
23C	>50	>50	ND	ND
15RF1	20	>50	21(>50)	>50
CypAC	>50	>50	ND	ND
NZT	0.064	>50	0.3 (0.20)	>100
AMD3100	0.033	>50	>50 (>50)	>50
SC H-D (Microbicide)	>5	>5	0.014 (0.0067)	>5

表2. CA部分ペプチド(細胞膜透過性付与ペプチド)の抗HIV-1および細胞毒性

CA ペプチド	MT-4細胞		PM1/CCR5細胞	
	NL4-3 (X4 HIV-1)		NL(AD8) (R5 HIV-1)	
	EC50 (μM)	CC50 (μM)	EC50 (μM) (p24 ELISA)	CC50 (μM)
11	6.5	>50	6.2 (1.6)	>50
21	8.8	>50	>50	>50
31	50	>50	>50	>50
41	41	>50	>50	>50
51	35	>50	>50	>50
61	12	>50	13 (4.3)	>50
71	>50	>50	>50	>50
81	15	>50	>50 (>50)	>50
91	>50	>50	ND	ND
101	35	>50	>50	>50
111	>50	>50	ND	ND
121	>50	>50	ND	ND
131	>35	35	ND	ND
141	>9	9	ND	ND
151	4.6	9.3	1.2 (1.0)	18
161	33	>50	>50	>50
171	>25	25	ND	ND
181	>50	>50	ND	ND
191	>50	>50	>50	>50
201	33	>50	>50	>50
211	>50	50	ND	ND
221	>50	>50	>50	>50
NZT	>50	>50	ND	ND
15RF1	>41	41	0.46 (0.68)	20
CypM1	38	>50	>50	>50
CypM1	7.1	>50	>50	>50
CypM1	32	>50	>50	>50
NZT	0.064	>50	0.3 (0.20)	>100
AMD3100	0.033	>50	>50 (>50)	>50
SC H-D (Microbicide)	>5	>5	0.014 (0.0067)	>5

### 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
佐藤 裕徳					
Burwitz B, Wu H, Reed J, Hammond K, Newman L, Bimber B, Nimiyongskul F, Leon E, Maness N, Friedrich T, Yokoyama M, Sato H, Matano T, O'Connor D, Sacha J.	Tertiary mutations stabilize CD8+ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus.	J Virol			in press
Nomaguchi M, Miyake A, Doi N, Fujiwara S, Miyazaki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Yokoyama M, Sato H, Masuda T, Adachi A.	Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability.	J Virol			in press
Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno S, Yamamoto N, Ryo A.	The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions.	Retrovirology			
Motozono C, Yokoyama M, Sato H, Ueno T.	Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths.	Microbes and Infection	S128 6-457 9	00266-9	2013
Koyama T, Arias JF, Iwabu Y, Yokoyama M, Fujita H, Sato H, Tokunaga K.	APOBEC3G Oligomerization is associated with the inhibition of both Alu and LINE-1 retrotransposition.	PLoS One	8	e84228	2013
Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H,	Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors.	J Virol	87	11447-61	2013

Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A.					
Sato H, Yokoyama M, Toh H.	Genomics and computational science for virus research.	Front Microbiol	4	42	2013
Tsuchiya K, Ode H, Hayashida T, Kakizawa J, Sato H, Oka S, Gatanaga H.	Arginine insertion and loss of N-linked glycosylation site in HIV-1 envelope V3 region confer CXCR4-tropism.	Sci Rep	3	2389	2013
Yuan Y, Yokoyama M, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato H, Yusa K.	Structure and dynamics of the gp120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1JR-FL to maraviroc.	PLoS One	8	e65115	2013
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.	J Gen Virol	94	1318-24	2013
Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov I, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S.	Conformational epitope consisting of the V3 and V4 loops as a target for potent and broad neutralization of simian immunodeficiency viruses.	J Virol	87	5424-36	2013
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	15	319-28	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. (NM and YM equally contributed to this work).	Microbes Infect	15	56-65	2013.
Kamiyama H, Kakoki K, Shigematsu S, Izumida M, Yashima Y, Tanaka Y, Hayashi H,	CXCR4-tropic, but not CCR5-tropic, human immunodeficiency virus infection is inhibited by the	AIDS Res Hum Retroviruses	29	279-88	2013



Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N, Sano T, Shidoji Y, Kubo Y.	lipid raft-associated factors, acyclic retinoid analogs, and cholera toxin B subunit.				
野間口 雅子					
Nomaguchi M, Miyake A, Doi N, Fujiwara S, Miyazaki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Yokoyama M, Sato H, Masuda, T, Adachi, A.	Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 <i>pol</i> gene modulate viral replication ability.	J Virol			in press
Miyake A, Miyazaki Y, Fujita M, Nomaguchi M, Adachi A.	Role of poly-proline motif in HIV-2 Vpx expression.	Front Microbiol	25	24	2014
Miyake A, Fujita M, Fujino H, Koga R, Kawamura S, Otsuka M, 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.	J Gen Virol	95	179-89	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, Adachi A.	Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors.	J Virol	87	11447-61	2013
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.	Front Microbiol	4	218	2013
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.	J Gen Virol	94	1318-24	2013
Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A,	Systemic biological analysis of the mutations in two distinct	Microbes Infect	15	319-28	2013

Akari H, Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, Adachi A.	HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells.				
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
塩田 達雄					
Taya K, Nakayam EE, Shioda T.	Moderate restriction of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages.	PLoS One			Accepted.
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.	J Virol	87	11447-61	2013
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
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.	J Gen Virol	94	1318-24	2013
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	15	319-28	2013

Nakayama EE, Nakajima T, Kaur G, Mimaya JI, Terunuma H, Mehra N, Kimura A, <u>Shioda T.</u>	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	29	919-24	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
増田 貴夫					
Nomaguchi M, Miyake A, Doi N, Fujiwara S, Miyazaki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Yokoyama M, Sato H, <u>Masuda T, Adachi A.</u>	Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability.	J Virol			in press
Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, Masuda T, Tanaka Y, Utsunomiya A, Kannagi M.	Interferon-alpha (IFN-alpha) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN-alpha combined with zidovudine induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells.	Retrovirology	10	52	2013
梁 明秀					
Furukawa A, Sugase K, Morishita R, Nagata T, Kodaki T, Takaori-Kondo A, Ryo A, Katahira M.	Quantitative Analysis of Location- and Sequence-Dependent Deamination by APOBEC3G Using Real-Time NMR Spectroscopy.	Angew Chem Int Ed Engl			in press
Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno S, Yamamoto N, <u>Ryo A.</u>	The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions.	Retrovirology			in press
Nomaguchi M,	Generation of rhesus	J Virol	87	11447-61	2013

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.	macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors.				
蝦名 博貴					
Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y.	Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus	Sci Rep	3	2510	2013
間 陽子					
Murakami T, Aida Y	Visualizing 1 Vpr-induced G2 arrest and apoptosis	PloS One	9	e86840	2014
櫻木 淳一					
櫻木 淳一	HIVの複製プロセス～ウイルスゲノムを中心として～	ウイルス	63	175-86	2013
Sudo S, Haraguchi H, Hirai Y, Gatanaga H, Sakuragi J, Momose F, Morikawa Y.	Efavirenz enhances HIV-1 gag processing at the plasma membrane through Gag-Pol dimerization.	J Virol	87	3348-60	2013
玉村 啓和					
Narumi T, Takano H, Ohashi N, Suzuki A, Furuta T, Tamamura H.	Isostere-Based Design of 8-Azacoumarin-Type Photolabile Protecting Groups: A Hydrophilicity Increasing Strategy for Coumarin-4-ylmethyls.	Org Lett			in press
Hashimoto C, Narumi T, Otsuki H, Hirota Y, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, Tamamura H.	A CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitor: Pharmacokinetics.	Bioorg Med Chem	21	7884-89	2013
Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Nakahara T, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H.	CXCR4-derived Synthetic Peptides Inducing Anti-HIV-1 Antibodies.	Bioorg Med Chem	21	6878-85	2013
Otsuki H, Hishiki T,	Generation of a	J Gen Virol	94	2710-16	2013