

研究課題：HIV Gag の致死の変異の解析

研究分担者：野間口 雅子（徳島大学大学院ヘルスパイオサイエンス研究部 准教授）

研究要旨

HIV-1 Gag-capsid (CA) の機能・構造の維持は、ウイルス複製にとって決定的に重要である。Gag-CA の機能・構造維持に関わるアミノ酸部位の同定は、ウイルス複製を制御するための標的の選定に役立つ。一方、HIV-1 はヒト細胞・個体での増殖に適応・進化しており、極めて高い宿主指向性を示す。従って、HIV-1 と SIV の CA アミノ酸配列において、SIV CA とは異なる HIV-1 固有のアミノ酸部位・領域は、HIV-1 がヒト細胞での増殖に適応してきた結果であり進化的脆弱部位となり得る。本研究では、HIV/SIV CA アミノ酸配列比較を基に、HIV-1 固有のアミノ酸部位への変異導入（1 アミノ酸置換）を行いウイルス複製に及ぼす影響を解析した。その結果、ウイルス複製後期過程のみに悪影響を及ぼす変異（S149N）および、ウイルス複製前期過程を著しく阻害する致死変異（Q50Y、K70R、R82L、I135Q）を同定した。今後、これらの変異がウイルス複製素過程に及ぼす影響を詳細に解析することにより、これらの CA アミノ酸部位のウイルス複製における役割を明らかにし、HIV-1 の弱点および制御法の確立に寄与する知見を得る。

A. 研究目的

ウイルスの蛋白質は、宿主における複製に必須の機能・構造を有している。機能・構造維持に重要な部位や、これらの変異によるウイルス複製減弱化に関する知見は、HIV-1複製制御のための基盤情報となる。

HIV-1 Gag-capsid(CA)は、ウイルス複製や宿主指向性の決定に重要な役割を持つ。レンチウイルス間（HIVやSIV）において、CAによって形成されるウイルスコアの形態は円錐型/コーン型でよく似ているが、HIVやSIVの宿主指向性は大きく異なる。この要因の1つはCAのアミノ酸配列の違いにある。CAには、HIV/SIVでよく保存された領域と各ウイルス固有の配列を持つ領域とが存在する。HIV-1 CA固有の配列・領域は、HIV-1がヒト細胞で効率良く増殖するために適応してきた結果、必然的に獲得したものであり、進化的脆弱部位となり得る。本研究では、HIV/SIV CAのアミノ酸配列比較に基づき、HIV-1の致死変異を探索し、ウイルスの弱点部位に関する情報を収集することを目的とした。

B. 研究方法

1. HIV-1 CA変異体の構築：HIV/SIV CAの配列は、HIV sequence compendium 2013 (Los Alamos National Laboratory, <http://www.hiv.lanl.gov>)の情報を基に比較し、HIV-1 CA固有のアミノ酸をSIV型のアミノ酸に置換した。親株はHIV-1標準株であるNL4-3を用い、変異導入は、QuickChange site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies Inc.) により行った。導入された変異は、

BigDye terminator v1.1 cycle sequencing kit (Life Technologies Corporation) を用いて確認した。

2. ウイルス複製能 (Multi-cycle replication) の測定：ウイルスストックの調製は、ヒト293T細胞へのプロウイルスクロンのトランスフェクション(リン酸カルシウム法)により行った。ウイルス量は培養上清中の逆転写酵素 (RT) 活性あるいはp24 ELISAにより測定した。等量のウイルスをヒトリンパ球由来H9細胞に接種し、培養上清中のウイルス量の変化を経時的に調べた。
3. ウイルス感染価 (Single-cycle infectivity) の測定：等量のウイルスをTZM-bl細胞 (Tat発現によりルシフェラーゼを発現するレポーター細胞) に接種した。感染1日後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来臨床材料を使用する研究や動物実験は行わない。組換えDNA実験は徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会 (委員長 足立昭夫教授) の承認を得て行う。「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

以前、我々はサル細胞・個体で効率良く増殖するサル指向性HIV-1を構築するための一環として、サルTRIM5 α (CAを標的とする内在性HIV-1複製抑制因子) に対して抵抗性を示すHIV-1 CAの作製に

取組んだ。HIV/SIV CAアミノ酸配列比較と *in silico*構造解析とを組み合わせ、CAへの変異導入解析を行った結果、サルTRIM5 α による複製抑制の回避に寄与するアミノ酸部位を同定することができた。このサルTRIM5 α 抵抗性HIV-1 CAの構築過程で、サル細胞でのウイルス増殖にとって致命的なCA変異（8ヶ所）を見出した。致命的変異は、CAの β -hairpin (L6P、Q13L)、ヘリックス3(Q50Y)、ヘリックス4 (K70R、R82L、L83Q)、ヘリックス7(I135Q)、およびインタードメインリンカー領域(S149N)に存在した。これらの変異がヒト細胞での増殖に及ぼす影響を調べるため、HIV-1標準株(NL4-3)にCA変異を導入し、H9細胞でのウイルス増殖特性を調べた(図1)。その結果、複製能が減弱するもの(L6P、L83Q、S149N)と複製が検出できないもの(Q13L、Q50Y、K70R、R82L、I135Q)があることが分かった。

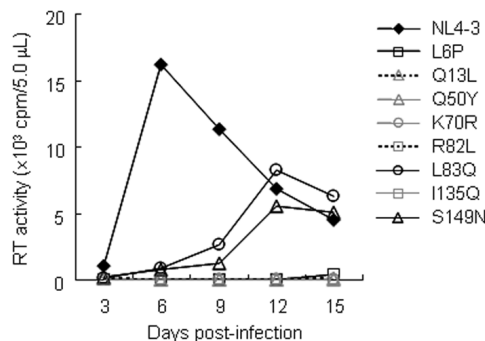


図1. HIV-1 (NL4-3) CA変異体のH9細胞での増殖特性。ウイルスストックは、293T細胞へのプロウイルスクローンのトランスフェクションにより調製した。等量のウイルス(10^4 RT units)を、H9細胞(10^5)に接種し、培養上清中のウイルス産生量をRTアッセイで測定した。

表1. CA変異体のウイルス産生量

| 変異 | ウイルス | |
|-----------|------------------|---------------------|
| | 産生量 ¹ | p24/RT ² |
| NL4-3(親株) | 1.000±0.000 | 1.000±0.000 |
| Q50Y | 0.633±0.040 | 1.070±0.060 |
| K70R | 0.500±0.042 | 0.011±0.003 |
| R82L | 0.241±0.105 | 0.810±0.084 |
| L83Q | 0.329±0.232 | 0.953±0.230 |
| I135Q | 0.127±0.087 | 0.006±0.000 |
| S149N | 0.485±0.080 | 0.952±0.292 |

¹NL4-3のRT活性を1としてCA変異体のウイルス産生量を相対値で表した。

²NL4-3のRTに対するp24の比を1としてCA変異体のp24/RT値を相対値で表した。

293T細胞へのプロウイルスクローンのトランスフェクションにより産生されるウイルス量をNL4-3およびCA変異体で比較した(表1)。CA変異体のウイルス産生量は、親株に比べていずれも低下していた。さらに、K70RおよびI135Qはウイルス粒子中のRT活性に対するp24量が親株に比べて著しく低く、コア形成に何らかの異常があることが示唆された。

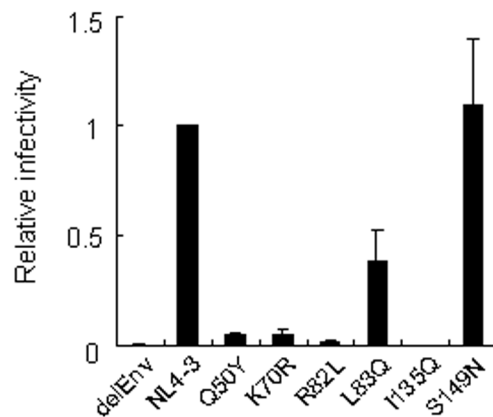


図2. HIV-1 (NL4-3) CA変異体のウイルス感染価。ウイルスは、293T細胞へのプロウイルスクローンのトランスフェクションにより調製した。等量のウイルス(2×10^4 RT units)をT2M-b1細胞(4×10^3)に接種後、細胞を回収しルシフェラーゼ活性を測定した。感染価は、NL4-3のルシフェラーゼ活性を1として、変異体の活性を相対値で表した。

次に、CA変異体の感染価をT2M-b1細胞で調べた(図2)。H9細胞において、ウイルス複製が検出不能な変異体(図1、Q50Y、K70R、R82L、I135Q)は、T2M-b1細胞での感染価も親株に比べて著しく低く、これらの変異は、複製前期過程に強く影響を及ぼすことが示唆された。K70RおよびI135Qは、親株に比べてウイルス粒子のp24/RT値が著しく低いことから(表1)、コア形成に何らかの異常があり、その結果、複製前期過程が阻害されているのではないかと推測された。これらの変異体(Q50Y、K70R、R82L、I135Q)については、電子顕微鏡による粒子の形態観察を試行中である。一方、H9細胞において、複製能が減弱する変異体(図1、L83Q、S149N)では、L83QはT2M-b1細胞において、親株の50%程度の感染価を持っていた。S149Nの感染価は親株と同程度であり、この変異が複製前期過程には何ら影響しないことを示した。H9細胞におけるS149Nの複製能低下は、複製後期過程への影響によるものと考えられた。

D. 考察

サル指向性HIV-1構築の過程で見出したCAの致死変異は、HIV-1のヒト細胞でのウイルス増殖においても抑制的に働いた。各CA変異のHIV-1 group Mにおける頻度を調べた(HIV-1 compendium 2013, 178 strains)。その結果、Q50(94%)、K70(100%)、R82(100%)、L83(64%)、I135(97%)、S149(98%)であり、これらのアミノ酸は保存性が高く、かつ、SIV CAの対応するアミノ酸とは異なることから、これらがHIV-1複製において重要な役割を担うかもしれないと考えられた。さらに、HIV/SIV CAアミノ酸配列比較により、HIV-1とSIVで異なるアミノ酸部位について、新たな変異体(16種)を構築しており、今後、複製能に及ぼす影響を検討していく。

HIV-1 CAのQ63A/67A二重変異体では、核移行過程が阻害されることが報告されている。今後、致死変異(Q50Y、K70R、R82L、L83Q、I135Q、S149N)について、ウイルス複製のどの素過程が阻害されているのかを詳細に解析していく必要がある。これにより、HIV-1 CAの機能・構造維持に関与するアミノ酸部位のウイルス複製における役割を明らかにする。

E. 結論

HIV/SIV CAのアミノ酸配列比較からHIV-1固有のアミノ酸部位を選択、SIV型のアミノ酸に置換することにより、HIV-1 CAの致死変異を同定することができた。HIV-1がヒト細胞・個体での増殖に適応してきたことを考えると、HIV-1固有のアミノ酸部位は進化的脆弱部位となり得ることが推測される。これらのアミノ酸部位の情報を集積し、ウイルス複製における役割を明らかにすることにより、今後、新しいHIV-1制御法の確立に発展することが期待される。

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, Adachi A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 *pol* gene modulate viral replication ability. *J Virol.*, in press.

2) 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.

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, Miyazaki Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. *J Gen Virol.* 95:179-189, 2014.

4) 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.* 87:11447-11461, 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. *Front Microbiol.* 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 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.* 94:1318-1324, 2013.

7) 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.* 15:319-328, 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10-12日(日-火)、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10-12日(日-火)、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10-12日(日-火)、神戸．

4)齋藤暁、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61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月10-12日(日-火)、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 10-12 日 (日-火) 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 10-12 日 (日-火) 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 10-12 日 (日-火) 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 20-22
日 (水-金) 熊本 .

9)モッフチ ハリルイブラハム、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 20-22 日 (水-金) 熊本 .