

研究課題：HIV 粒子脱殻における Gag の機能に関する研究

研究分担者：塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所 教授）

研究要旨

ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）は非常に狭い宿主域を持ち、ヒトとチンパンジー以外の動物には感染できない。HIV-1の動物実験モデルを作製することを目的として、我々は先にHIV-1のVifおよびGagに種々の改変を行い、カニクイザルの細胞でも増殖できる改変HIV-1株の作出に成功した（Kuroishi et al. (2009) *Retrovirology* 6: 70）。しかし、この改変HIV-1株はカニクイザル細胞で増殖できる代わりに、ヒト細胞での増殖能が著しく低下していた。また、その増殖能低下は、主に感染初期過程が効率良く進行しないことによるものであった。この改変HIV-1株のヒト細胞における増殖能低下の原因を明らかにする目的で、我々はこの改変HIV-1の感染後の脱殻の速度を、ウイルスコアとコア内のGFP融合Vprとの解離を蛍光顕微鏡で観察するin situ uncoating assayを用いて測定した。その結果、この改変HIV-1の脱殻の速度は、野生型HIV-1と比較して明らかに遅くなっていた。また、この改変HIV-1をヒトT細胞株で長期経代してヒト細胞での増殖能がある程度回復した復帰変異株はGagのカプシド領域内にアミノ酸の変異が認められた（Kuroishi et al. (2010) *Retrovirology* 7: 58）が、この復帰変異株では、脱殻の速度がほぼ野生型HIV-1程度まで回復していた。これらの結果から、カニクイザル細胞での増殖能を獲得した改変HIV-1のヒト細胞での増殖能低下は、脱殻速度に低下に起因する可能性が考えられた。

A. 研究目的

TRIM5 α はアカゲザルの抗ヒト免疫不全ウイルス1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作用は弱く、その結果としてヒトでのHIV-1感染は拡大を続けている。HIV-1がヒトとチンパンジー以外の動物に感染できないために動物実験が成り立たず、その結果、HIV-1感染症の病態解明やワクチン開発に遅れが生じている。

我々は先にTRIM5 α の標的であるHIV-1のGag中のカプシドおよびもう一つの抗HIV-1因子であるAPOBEC3Gをプロテアソーム分解に導くVifに改変を行い、カニクイザルの細胞でも増殖できる改変HIV-1株（NL-4/5S6/7SvifS）の作出に成功した（Kuroishi et al. (2009) *Retrovirology* 6: 70）。しかし、NL-4/5S6/7SvifSはカニクイザル細胞で増殖できる代わりに、ヒト細胞での増殖能が著しく低下していた。また、その増殖能低下は、主に感染初期過程が効率良く進行しないことによるものであった。本研究は、NL-4/5S6/7SvifSがヒト細胞においてその感染初期過程が効率良く進行しない分子機構の詳細を解明する事を目的とした。

B. 研究方法

1. ウイルスの増殖能の測定

2X10⁵個のヒト株化T細胞CEM-SSにカプシドタンパク質20ngのHIV-1あるいはその変異体を感染させ、経時的に培養液を回収して、その上清中に含まれるカプシドタンパク質量をELISA法で測定した。また、感染初期過程のみの進行を定量するために、GFPを発現する組換えHIV-1ウイルスを水疱性口内炎ウイルスのGタンパク質を用いてCEM-SS細胞に感染させ、1日後にフローサイトメーターでGFP発現細胞数を測定した。

2. In situ uncoating assay

Campbellらの方法によった（Campbell et al. (2007) *Virology* 360: 286-293）。具体的には、まず、Env遺伝子にフレームシフト変異を導入したHIV-1プロウイルスDNAと蛍光色素dTomatoで標識したSrc遺伝子のN末端15アミノ酸、GFPで標識したVpr、水疱性口内炎ウイルスのGタンパク質をそれぞれ発現するプラスミドを293細胞に導入して組み換えウイルスを回収した。得られた組み換えウイルスをHeLa細胞に感染させ、経時的に固定してカプシドタンパク質をCy5標識抗体で染色し、GFP、dTomato、Cy5それぞれの色素を励起して蛍光顕微鏡にて検出した。得られた画像をdeconvolution処理をして不明瞭な蛍光シグナルを除去し、細胞内のそれぞれの蛍光シグナルの数を測定した。正しくエンヴェロップが外れて細胞質内に侵入したと考えられるdTOMATOの蛍光を含まないGFPシグナルのうち、脱殻前と考えられるCy5シグナルを有するシグナルを数えて、脱殻速

度を計算した。

C. 研究結果

1. ウイルスの増殖能

NL-4/5S6/7SvifS (図1A)は、HIV-1 NL43株のカプシドのコア外側に位置する85番目から93番目(4/5)と120番目から125番目のアミノ酸(6/7)並びにVif遺伝子全長をサル細胞で効率よく増殖できるSIVmac239(S)のものと交換して作製した組み換えウイルスである。しかしヒト細胞CEM-SSにおいては、図1Bに示すように、野生株のカプシドを持つHIV-1(NL-VifS)と比較して、その増殖能は顕著に低下していた。NL-4/5SG116E6/7SvifSは、NL-4/5S6/7SvifSをCEM-SS細胞で長期経代して増殖能がある程度復帰した株で(図1B)、カプシドの変異を導入した二カ所の間にあたる116番目のアミノ酸がグリシン(G)からグルタミン酸(E)に置換していた。

NL-4/5S6/7SvifSのヒト細胞での増殖能の低下が、感染初期過程に主要な欠陥があることを確認するために、GFPを発現する組換えHIV-1ウイルスを水疱性口内炎ウイルスのGタンパク質を用いてCEM-SS細胞に感染させ、1日後にフローサイトメーターでGFP発現細胞数を測定した(図2)。その結果、NL-4/5S6/7SvifS感染CEM-SS細胞では、野生型のカプシドを持つHIV-1と比較して感染初期過程の進行が約3分の1以下に低下していた。一方、NL-4/5SG116E6/7SvifSでは、感染初期過程の進行は野生型のカプシドを持つHIV-1の半分程度まで回復していた。

2. In situ uncoating assay

NL-4/5S6/7SvifSがヒト細胞においてその感染初期過程が効率良く進行しない分子機構の詳細を解明するために、in situ uncoating assayを行い、NL-4/5S6/7SvifSとNL-4/5SG116E6/7SvifSのヒトHeLa細胞での脱殻速度を測定して、野生型カプシドを持つHIV-1の脱殻速度と比較した。図3にその結果を示す。感染後0時間(16C、2時間の吸着直後)において、野生型カプシドを持つHIV-1、NL-4/5S6/7SvifS、NL-4/5SG116E6/7SvifSはいずれも、約75%のGFPシグナル(コア内のVpr)がCy5のシグナル(カプシド)と一致していた。感染後1時間において、野生型カプシドを持つHIV-1とNL-4/5SG116E6/7SvifSでは40%未満のGFPシグナルがCy5シグナルと一致していたが、NL-4/5S6/7SvifSでは50%以上のGFPシグナルがCy5シグナルと一致していた。同様の傾向は感染後2時間においても観察されたが、4時間後には、いずれのウイルスも約30%のGFPシグナルがCy5シグナルと一致していた。一方、エンドソームの融合阻害剤であるBafiromycin Aを添加した場合は、感染後4時間経過した時点でも0時間とほぼ同様の約75%のGFPシグナルがCy5シグナルと一致し

ており、水疱性口内炎ウイルスのGタンパク質によって正しく細胞質内に侵入したコアについて解析できることが確認された。

D. 考察

カプシドとVifに変異を持ち、サルのTRIM5 α やAPOBEC3G等の抗HIV-1因子の攻撃を回避してカニクイザル細胞で増殖できるようになったNL-4/5S6/7SvifSが、ヒト細胞においてはその感染初期過程が効率良く進行しない分子機構を解明するために、in situ uncoating assayを用いて脱殻速度を測定した。その結果、NL-4/5S6/7SvifSでは脱殻速度の明らかな低下が観察された。一方、NL-4/5S6/7SvifSをCEM-SS細胞で長期経代して増殖能がある程度復帰したNL-4/5SG116E6/7SvifSでは、脱殻速度はほぼ野生型のカプシドを持つHIV-1と同程度まで回復していた。従ってNL-4/5S6/7SvifSのヒト細胞における増殖能の低下は、NL-4/5S6/7SvifSの脱殻速度の低下に起因する可能性が考えられた。

NL-4/5S6/7SvifSの脱殻速度の低下がどのように増殖能の低下をもたらすかは、現状では明らかではない。Hulmeらは、逆転写酵素阻害剤に用いてHIV-1の逆転写を阻害すると、脱殻の速度が低下すると報告している(Hulme et al., PNAS, (2011), 108:9975-9980)。しかし我々が野生型のカプシドを持つHIV-1やNL-4/5S6/7SvifSのヒト細胞における逆転写の進行を経時的に解析すると、感染後8時間まではNL-4/5S6/7SvifSの逆転写は野生型カプシドを持つHIV-1よりもむしろ効率良く進行していたが、逆転写産物の核移行は、明らかに障害されていた。一方、NL-4/5SG116E6/7SvifSでは、感染後8時間までの逆転写産物の蓄積はむしろ野生型のカプシドを持つHIV-1より低下していた。以上の結果からHIV-1の脱殻速度の低下が必ずしも逆転写の進行を妨げるわけではないことが考えられる。最近、HIV-1のカプシドは、核孔タンパク質であるRanBP2と相互作用して逆転写産物の核移行の直前まで逆転写産物を結合している可能性が提示された。今後、HIV-1の脱殻が実際に核の近傍で生じているか否か、in situ uncoating assayをさらに改良して検討していく予定である。

E. 結論

カニクイザル細胞で増殖できるようになったNL-4/5S6/7SvifSが、ヒト細胞においてはその感染初期過程が効率良く進行しない分子機構を解明するために、in situ uncoating assayを用いて脱殻速度を測定した。その結果、NL-4/5S6/7SvifSでは脱殻速度の明らかな低下が観察された。一方、NL-4/5S6/7SvifSをCEM-SS細胞で長期経代して増殖能がある程度復帰した

NL-4/5SG116E6/7SvifSでは、脱殻速度はほぼ野生型のカプシドを持つHIV-1と同程度まで回復していた。従ってNL-4/5S6/7SvifSのヒト細胞に置ける増殖能の低下は、NL-4/5S6/7SvifSの脱殻速度の低下に起因する可能性が考えられた。これらの結果から、HIV-1の脱殻過程も抗HIV-1戦略の新しい標的となり得ることが示唆された。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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*. 2013 Nov;87(21):11447-11461.

2) 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*. 2013 Aug 13;8(8):e72531.

3) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiyama W, Matano T, Adachi A, Nakayama E, 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*. 2013;94(Pt 6):1318-24.

4) 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*. 2013;15(4):319-28.

5) 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 Res Hum Retroviruses*. 2013 Jun;29(6):919-24.

6) Taya K, Nakayama EE, Shioda T. Moderate restriction of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. 2014 Accepted.

1) Eri Takeda, Ken Kono, Hiromi Tsutsui, Ayumu Kuroishi, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, Emi E Nakayama, Tatsuo 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

2) Kahoru Taya, Emi E Nakayama, Shioda Tatsuo: 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

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10-12日、神戸

4) 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

5) 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20-22日、熊本

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・総会 2013年11月20-22日、熊本

2. 学会発表等

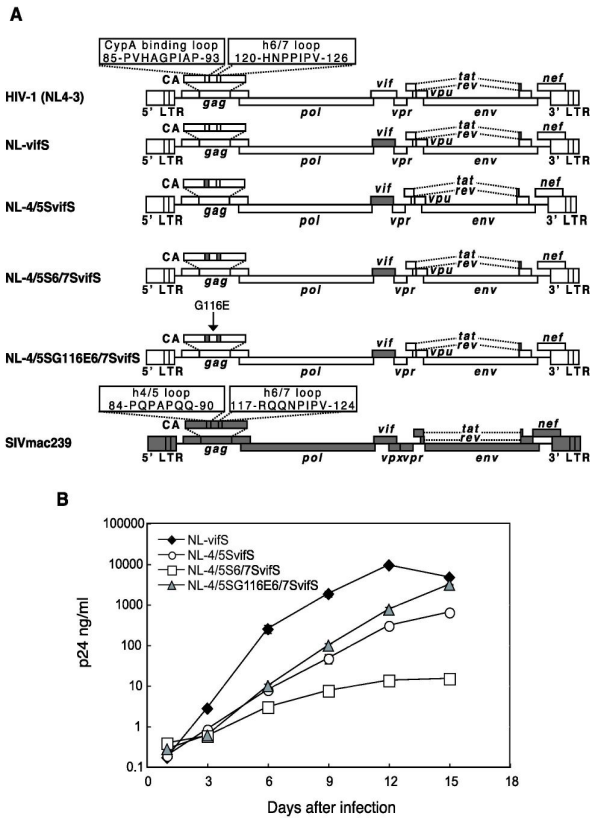


図1. HIV-1およびその改変ウイルス (A) ゲノム構造。白四角はHIV-1、灰色四角はSIVmacのゲノムを示す。(B) ヒト株化T細胞CEM-SSでの各ウイルスの増殖。野生株と同じカプシドを持つNL-vifS(黒菱形)、NL-4/5S6/7SvifS(白四角)、NL-4/5SG116E6/7SvifS(灰色三角)の増殖をカプシドタンパク質 (P24) 量で示す。

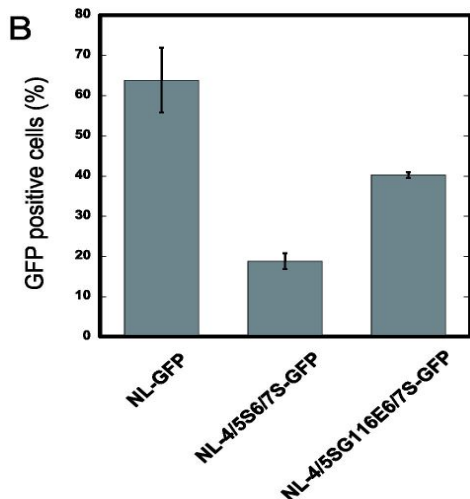


図2. HIV-1およびその改変ウイルスの感染初期

過程の解析。GFPを発現する各組換え HIV-1 ウィルスを水疱性口内炎ウイルスの G タンパク質を用いて CEM-SS 細胞に感染させ、1 日後にフローサイトメーターで GFP 発現細胞数を測定した。GFP 陽性細胞の割合を示す。

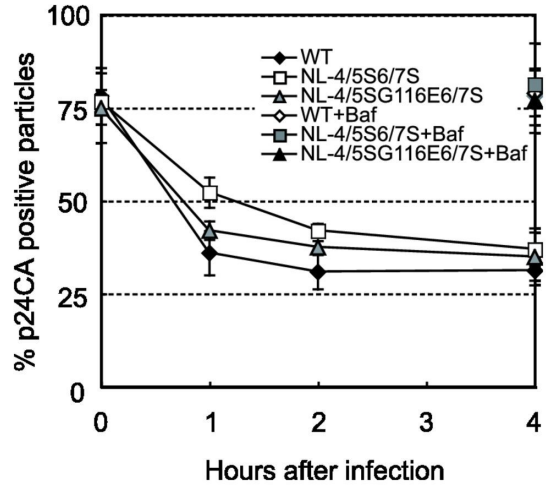


図3. In situ uncoating assay. HIV-1 プロウイルス DNA と蛍光色素 dTomato で標識した Src の N 末端 15 アミノ酸、GFP で標識した Vpr、水疱性口内炎ウイルスの G タンパク質をそれぞれ発現するプラスミドを 293 細胞に導入して組み換えウイルスを回収した。得られた組み換えウイルスを HeLa 細胞に感染させ、経時的に固定してカプシドタンパク質を Cy5 標識抗体で染色し、GFP、dTomato、Cy5 それぞれの色素を励起して蛍光顕微鏡にて検出した。正しくエンヴェロップが外れて細胞質内に侵入したと考えられる dTOMATO の蛍光を含まない GFP シグナルのうち、脱殻前と考えられる Cy5 シグナルを有するシグナルを数えて、脱殻速度を計算した。Baf: Bafilomycin A.