

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：HIV ゲノムの逆転写制御に関するインテグラーゼの構造と感染性ウイルス粒子コア形成への関与に関する研究

研究分担者：増田貴夫（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・免疫治療学分野）

研究要旨

HIV-1 インテグラーゼ（IN）は、本来の酵素機能である組み込み過程に加え、脱殻/逆転写過程にも大きく関与している。我々は、この酵素活性非依存的機能には、N-末端ドメイン（NTD）のコンフォメーション形成を介した多量体形成が重要であることを示唆する結果を得ている。本研究では、NTD 変異体のウイルス粒子レベルでの性状解析を行い、ウイルス粒子形成への影響を検討した。さらに、IN の四量体形成時に、NTD と相互作用が推定される中央酵素活性ドメイン（CCD）のアミノ酸残基に点変異を導入した HIV IN-CCD 変異体を作成し、ウイルス複製レベルでの解析を行った。その結果、NTD 変異はウイルス粒子放出およびプロテアーゼによる Gag-pol 前駆体蛋白切断には影響せず、endogenous RT 活性は WT と同程度保持していることが明らかとなった。また、IN の NTD-CCD 間の相互作用は、HIV 感染後の cDNA 合成開始に必須であることを明らかにした。以上、IN の四量体形成における dimer-dimer インターフェースにおける NTD-CCD ドメイン間相互作用に必須な新規アミノ酸残基を同定し、本相互作用が感染性ウイルス粒子コアの形成/維持に重要である可能性が示唆された。

A. 研究目的

HIV-1 インテグラーゼ（IN）はウイルスゲノムの組み込み過程（酵素活性機能）以外にも、脱殻、逆転写過程にも関与している（酵素活性非依存的機能と呼ぶ）。これまでに我々は、HIV-1 IN の N 末端ドメイン（NTD, 1-55）の構造を規定する分子間相互作用として Tyr15 残基のベンゼン環基を介した π / π -CH 相互作用などの非共有結合が逆転写およびそれ以前の感染素過程における IN 機能発現に必須であることを明らかにしている。本研究では、NTD と相互作用が推定される Tyr15 周辺の NTD 残基および中央酵素活性ドメイン（CCD）のアミノ酸残基に点変異を導入した HIV IN-CCD 変異体を作成し、ウイルス複製レベルでの解析を行い、IN のドメイン間相互作用の重要性を検討した。

B. 研究方法

HIV-1 IN の構造情報に基づく変異体の作成と解析：HIV-1 IN NTD を種々の NMR および部分結晶構造解析結果を鋳型にして構造シミュレーションを、佐藤研究代表者および横山分担研究者との共同で行った。

構造情報に基づく変異体の作成と解析：で見いだされた IN NTD の構造を規定する分子間相互作用に重要なアミノ酸を種々のアミノ酸に置換した変異 HIV-1 クローンを作成し、single-round 感染系により変異の影響をウイルス複製レベルで評価した。

各 IN 変異体のウイルス粒子の Gag-pol 前駆体蛋白の切断パターンを gag 蛋白の各コンポーネントを認識するモノクローナル抗体（抗 p24 および抗 p17 抗体）を用いたウェスタンブロット（WB）法により解析した。

endogenous RT アッセイ：各 IN 変異体のウイルス粒子を超遠心により回収し、180pg の p24 相当のウイルス粒子を 0.05% TritonX100 で溶解後、100nM dNTPs、50mM MgCl₂ 存在下で 37 で 90 分反応させた。PK 処理後 cDNA 産物を HIV-1 特異的プライマーを用いた real-time PCR により定量した。

IN の部分結晶構造情報に基づき、IN 四量体形成における NTD との分子間相互作用に重要となるアミノ酸残基にの点変異を導入した HIV-1 クローンを作成し、single-round 感染系により変異の影響をウイルス複製レベルで評価した。

（倫理面への配慮）
該当事項無し。

C. 研究結果

Tyr15 のアミノ酸特性：Y15 を他のアミノ酸に置換した変異体（Ala, Cys, Tyr, Phe, Trp, His, もしくは Glu 計 7 種）解析結果から、殆どのアミノ酸置換変異は Ala 置換変異と同様に著しい感染低下をもたらした (Fig. 1A)、いずれも感染後の逆転写初期産物合成の低下によるものであった。 (Fig. 1B)。一方で、Tyr15 の Phe

への置換 (Y15F) は WT と同様の感染価を維持していた。Trp に置換した変異体 (Y15W) は WT 比で 4.9% 近くの感染価を保持していた (Fig. 1A)。

変異体ウイルス粒子の解析: Y15 変異 HIV のウイルス粒子の放出 (Fig. 2A) および gag 蛋白前駆体のプロセッシング (Fig. 2B) は、野性株 (WT) と比較して顕著な差を認めなかった。さらに、ウイルス粒子を用いた endogenous RT 活性はいずれも WT と差を認めなかった (Fig. 2C)。

IN-NTD Y15 近傍の点変異体の解析:

Y15 近傍のアミノ酸残基の変異体の解析から、Y15A に加え、WT 比で 0.5% 以下の感染能の低下を引き起こす K14A および D25A 変異体を新たに同定した (Fig. 3A)。また、いずれも Y15A 同様逆転写反応の逆転写初期の産物である r/U5 および最終産物である r/gag 領域の cDNA 量が顕著に減少しており (Fig. 3B、C)、ルシフェラーゼアッセイで観察された感染性との相関が見られた。さらに、gag 蛋白前駆体のプロセッシング (Fig. 3D) endogenous RT 活性はいずれも WT と差を認めなかった (Fig. 3E)。HIV-1 IN NTD の構造 (PDB ID: 1WJD) に基づくと、K14A および D25A は Y15 近傍に位置することが明らかとなった (Fig. 3F)。

IN-CCD 変異体の解析: 部分の断片の結晶構造解析の結果を基にした四量体モデルが報告されている (PDB ID: 1K6Y および PDB ID: 1EX4)。Y15 付近には CCD の W132, F181, I182, F185 といった残基が存 E11 は K186 と D25 は K188 との水素結合が示唆されている (Fig. 4B)。これら NTD 残基との相互作用が推測される CCD 残基の変異体構築し、ウイルス複製レベルでの解析をおこなったところ、Y15A と同様な表現系を示す CCD 変異体 (W131A, W132A, F181A, I182A, F185A, K186E, K187A, K188A) を同定した。

D. 考察

本研究において報告した、アラニン置換によって逆転写異常が生ずるアミノ酸残基 E11, K14, Y15, D25 は NTD-CCD 断片の結晶構造解析のモデルにおいて四量体形成時に dimer-dimer インターフェイスに存在すると考えられる残基であり (Fig. 4B)、対応する CCD 残基の変異は NTD 変異と同様な影響をもたらすことが明らかとなった。以上より機能的逆転写複合体と IN の多量体化との相関が強く示唆される。本研究結果は、HIV-1 複製前期素過程における IN の機能を規定する構造解明において重要な知見と考えられる。また、HIV 複

製阻害剤開発におけるあらたな標的となりうる分子基盤情報を提供した。

E. 結論

HIV-1 IN の四量体形成に必須と考えられるアミノ酸残基を NTD および CCD 領域内に新たに同定した。これらの残基間の水素結合および疎水性結合は、IN の感染前期課程における機能と構造維持および発現に必須な分子間相互作用と考えられる。

F. 知的所有権の取得状況

特記すべきこと無し。

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) 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.

2. 学会発表等

1) 高畑 辰郎、佐藤 洋子、長谷川 温彦、神奈木 真理、増田 貴夫 HIV-1 インテグラーゼの逆転写過程以前における非酵素的機能と構造の解析 第27回 日本エイズ学会 (神戸) 11月, 2013年

2) 佐藤 洋子、高畑 辰郎、鈴木 萌華、河合 剛太、長谷川 温彦、神奈木 真理、増田 貴夫 HIV-1 逆転写反応の試験管内再構築に向けた各種因子の検討評価 第27回 日本エイズ学会 (神戸) 11月, 2013

3) 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 (神戸) 11月, 2013

4) 柿沼 桃瑠、金原 秀一、笹田 亜麻子、長谷川 温彦、増田 貴夫、神奈木 真理 HTLV-1

感染によるI型インターフェロン応答の誘導機序 第61回 日本ウイルス学会（神戸）11月,2013年

5) 木地山 真実、長谷川 温彦、金原 秀一、秋葉 彩乃、増田 貴夫、神奈木 真理 HTLV-1感染細胞のウイルス発現抑制へのPKRの関与 第61回 日本ウイルス学会（神戸）11月,2013年

6) 秋葉 彩乃、高森 絢子、長谷川 温彦、金原 秀一、木地山 真実、増田 貴夫、神奈木 真理 HTLV-1感染者由来HTLV-1感染T細胞株のサイトカイン産生プロファイル 第61回 日本ウイルス学会（神戸）11月,2013年

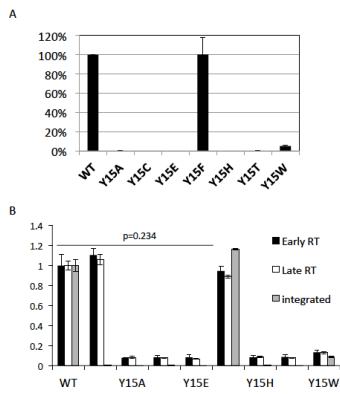


Fig. 1 IN-NTDのY15(Y15)変異体の感染性 IN-NTDのY15(Y15)変異体にアミノ酸変異を伴う点変異を導入し、Luciferase/VSV-G シンドライウイルスを作成し、293T細胞に感染させ、24時間後にウイルス遺伝子発現をLuciferase活性により評価した。WTを100%とし、各々のp24相対値を示す。(A) WTを100%とし、各々のp24相対値を示す。得られたウイルス粒子を迅速によりウイルス粒子を回収後、p24とp17抗体を用いたWB法によるp24相対値を測定した。(B) 回収されたウイルス粒子を用い、endogenous RT発現をおこない、RT/US領域のPCR産物のグルコシドパターン(上部)およびp24比でcDNA量(R/U/S)の定量解析し、WTを1とした相対値で結果を示す(下部)。(C)

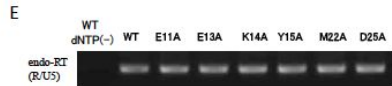
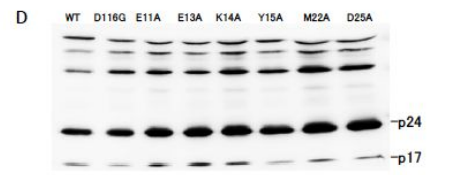
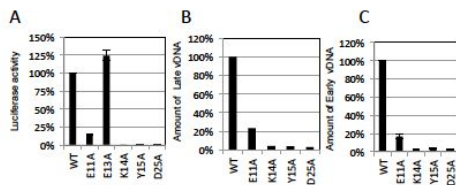


Fig. 3 IN-NTD変異体の感染性 IN-NTDのY15(Y15)変異体のアミノ酸変異を伴う点変異を導入し、Luciferase/VSV-G シンドライウイルスを作成し、293T細胞に感染させ、24時間後にウイルス遺伝子発現をLuciferase活性により評価した。WTを100%とし、各々のp24相対値を示す。(A) 感染48時間後に293T細胞を洗浄後培養液を交換し、24時間後に細胞からフェールクローロム法によってcDNAを回収した。Early (R/U/S)およびLate (R/U/S) 領域特異的なプライマーを用いたリアルタイムPCR法でcDNAを定量化した。WTを100%とし、各々のcDNA量を示す(B,C)。ウイルス粒子を迅速によりウイルス粒子を回収後、p24とp17抗体を用いたWB法によるp24相対値を測定した。(D) 回収されたウイルス粒子を用い、endogenous RT発現をおこない、RT/US領域のPCR産物のグルコシドパターンを測定した。(E) 感染したウイルス粒子のRT/US領域のPCR産物のグルコシドパターン(上部)およびp24比でcDNA量(R/U/S)の定量解析し、WTを1とした相対値で結果を示す(下部)。(F) CCD領域の構造モデルを示す。(G)

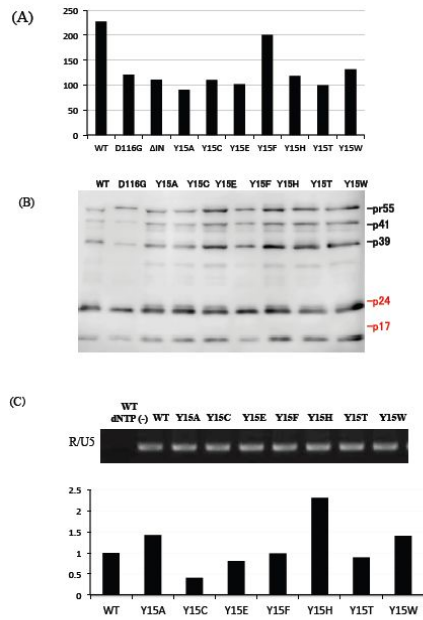


Fig. 2 CCD変異体の感染性 IN-NTDのY15(Y15)変異体にアミノ酸変異を伴う点変異を導入し、Luciferase/VSV-G シンドライウイルスを作成し、293T細胞に感染させ、24時間後にウイルス遺伝子発現をLuciferase活性により評価した。WTを100%とし、各々のp24相対値を示す。(A) WTを100%とし、各々のp24相対値を示す。得られたウイルス粒子を迅速によりウイルス粒子を回収後、p24とp17抗体を用いたWB法によるp24相対値を測定した。(B) 回収されたウイルス粒子を用い、endogenous RT発現をおこない、RT/US領域のPCR産物のグルコシドパターン(上部)およびp24比でcDNA量(R/U/S)の定量解析し、WTを1とした相対値で結果を示す(下部)。(C)

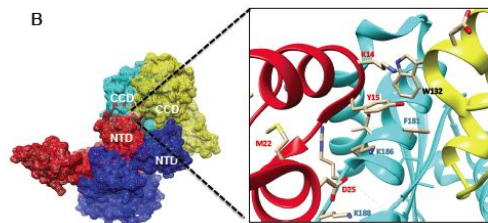
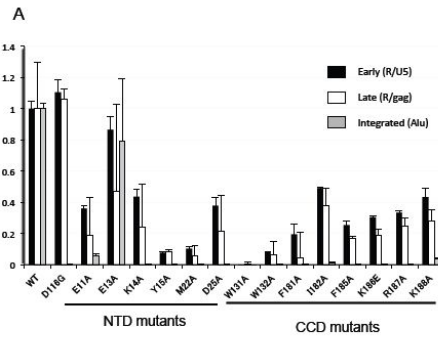


Fig. 4 IN-NTD変異体の感染性 IN-NTDのY15(Y15)変異体のアミノ酸変異を伴う点変異を導入し、Luciferase/VSV-G シンドライウイルスを作成し、293T細胞に感染させ、24時間後にウイルス遺伝子発現をLuciferase活性により評価した。WTを100%とし、各々のp24相対値を示す。(A) 感染48時間後に293T細胞を洗浄後培養液を交換し、24時間後に細胞からフェールクローロム法によってcDNAを回収した。Early (R/U/S)およびLate (R/pag) 領域特異的なプライマーを用いたリアルタイムPCR法でcDNAを定量化した。WTを100%とし、各々のcDNA量を示す(B)。ウイルス粒子を迅速によりウイルス粒子を回収後、p24とp17抗体を用いたWB法によるp24相対値を測定した。(C) 回収されたウイルス粒子を用い、endogenous RT発現をおこない、RT/US領域のPCR産物のグルコシドパターンを測定した。(D) 感染したウイルス粒子のRT/US領域のPCR産物のグルコシドパターン(上部)およびp24比でcDNA量(R/U/S)の定量解析し、WTを1とした相対値で結果を示す(下部)。(E) CCD領域の構造モデルを示す。(F)