

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 プロウイ

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 のプローブ標的部位として、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ことが可能な実験系を構築し、解析を行った。

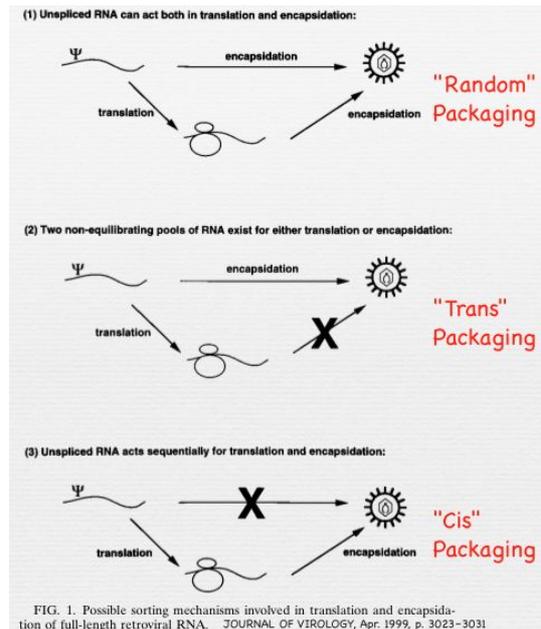


図1・レトロウイルスパッケージングの様式

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)。

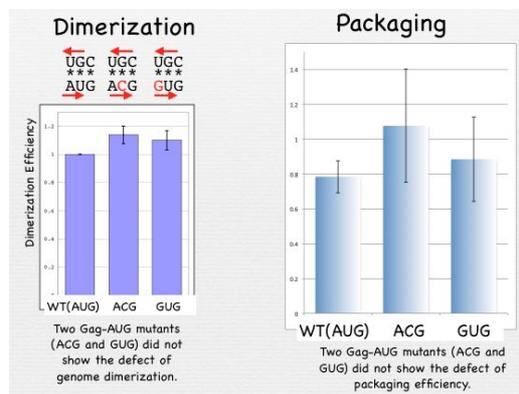


図2・HIV-1Gag-AUG変異体の二量体化及びパッケ

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か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きることが判明した(図3)。

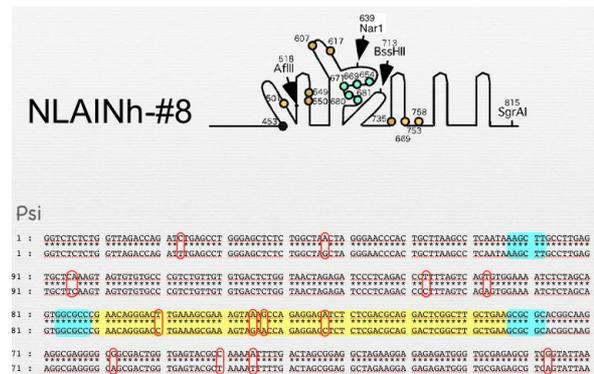


図3・パッケージングに影響を及ぼすサブタイプD由来の領域

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。