

201421005A・B

厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業

H24-エイズ-一般-005

抗ウイルス宿主因子を基盤とする新規抗 HIV 戦略の開発・確立
に向けた系統的研究

平成 24～26 年度 総合研究報告書

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

平成 27 年 3 月

研究代表者 足立昭夫

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授)

厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業
H24-エイズ-一般-005

抗ウイルス宿主因子を基盤とする新規抗 HIV 戦略の開発・確立
に向けた系統的研究

平成 24～26 年度 総合研究報告書

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

平成 27 年 3 月

研究代表者 足立昭夫

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授)

研究組織

研究者名	分 担	所 属	役 職
足立昭夫	研究代表者	徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部	教授
岩谷靖雅	研究分担者	国立病院機構 名古屋医療センター	室長
大塚雅巳	研究分担者	熊本大学 大学院生命科学研究部	教授
徳永研三	研究分担者	国立感染症研究所 感染病理部	主任研究官
中山英美	研究分担者	大阪大学 微生物病研究所	准教授
藤田美歌子	研究分担者	熊本大学 薬学部	准教授

目 次

I. 平成 24～26 年度 総合研究報告書

抗ウイルス宿主因子を基盤とする新規抗 HIV 戦略の開発・確立 -----	1
に向けた系統的研究	

研究代表者：足立昭夫(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)

研究分担者：岩谷靖雅(名古屋医療センター 臨床研究センター)

大塚雅巳(熊本大学大学院生命科学研究部)

徳永研三(国立感染症研究所感染病理部)

中山英美(大阪大学微生物病研究所)

藤田美歌子(熊本大学薬学部)

II. 平成 24～26 年度 業績一覧 -----	5
----------------------------	---

III. 平成 26 年度 総括研究報告書

抗ウイルス宿主因子を基盤とする新規抗 HIV 戦略の開発・確立 -----	17
に向けた系統的研究	

研究代表者：足立昭夫(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)

IV. 平成 26 年度 分担研究報告書

1. HIV アクセサリー蛋白質の分子ウイルス学的解析 -----	21
足立昭夫(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)	
2. APOBEC3G の発現制御モジュレーターと分解阻害剤の探索 -----	25
岩谷靖雅(名古屋医療センター 臨床研究センター)	
3. 宿主因子に対する制御物質の探索と創製：抗ウイルス宿主因子を -----	29
擬似・制御する分子の開発	
大塚雅巳(熊本大学大学院生命科学研究部)	
4. 新規宿主因子 MARCH8 の HIV-1 複製抑制における分子機構の解明 -----	33
徳永研三(国立感染症研究所感染病理部)	

5. TRIM5 α による脱殻機序の解明とモジュレータの探索 37
中山英美(大阪大学微生物病研究所)
6. インターフェロン誘導性新規 Vpx 関連宿主因子の探索と宿主因子 41
制御物質の評価: HIV-2 Vpx の機能解析
藤田美歌子(熊本大学薬学部)

V. 研究論文抜粋

Ⅲ. 平成 26 年度 総括研究報告書

研究課題：抗ウイルス宿主因子を基盤とする新規抗 HIV 戦略の開発・確立に向けた系統的研究

課題番号：H 2 4- エイズ- 一般- 0 0 5

研究代表者：足立 昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）

研究分担者：岩谷 靖雅（(独)国立病院機構 名古屋医療センター 室長）、大塚 雅巳（熊本大学大学院生命科学研究部 教授）、徳永 研三（国立感染症研究所 主任研究官）、中山 英美（大阪大学微生物病研究所 准教授）、藤田 美歌子（熊本大学薬学部 准教授）

1. 研究目的

多剤併用療法の進歩により HIV 感染症の予後は飛躍的に改善されたが、未だ治癒状態には至らず、生涯にわたる服薬の継続が必要とされている。既存の抗 HIV 薬はウイルス複製を阻害するものであり、体内からウイルスを駆逐することはできない。長期の服薬による種々の医学的、社会的問題も顕在化している。これらの状況を克服していくためには、新しいコンセプトに基づく新しい抗 HIV 戦略が開発されなければならない。近年、強力な抗ウイルス活性を示す種々の宿主細胞因子が発見・同定され、HIV は、様々な適応変異や遺伝子組換えを経て、祖先ウイルスから進化しヒトに特化してきたことが明らかにされている。霊長類で見出されているレトロウイルスの排除機構に鑑み、本研究班は、ヒトにのみ増殖性・病原性を示す HIV の特性を規定する抗ウイルス宿主細胞因子（APOBEC3、TRIM5、BST-2/Tetherin 等）に特に着目する。本研究は、これらの宿主防御因子とその働きを解除する HIV 遺伝子産物（Vif、Gag-CA、Vpu 等）の相互作用の分子理解に基づいた次世代型治療戦略の基盤構築を目指す。

2. 研究方法

研究目標を達成するため、宿主防御因子・ウイルス解除因子の系統的解析とともに、抗 HIV 薬探索や HIV 霊長類実験感染システムの確立に向けた研究も行う。研究プロジェクトにより、各種研究手法を用いる（遺伝子工学、ウイルス学、免疫学、細胞生物学、分子生物学、生化学、有機化学、計算科学、構造生物学等）。

（倫理面への配慮）

本研究は遺伝子組換え実験を含むため、「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」を遵守して行う。クラス 3 の病原体 HIV を用いた実験や動物実験（アカゲザル感染実験）は全て実施研究機関の承認を得て行う。ヒト由来臨床材料を用いる研究を行う場合は、関連機関の倫理委員会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で実施する。

3. 研究結果

研究代表者及び研究分担者は緊密に協力・連携して各研究プロジェクトに取り組み、研究は着実に進展した。主要成果として、要約、以下の成績を得た。① *vif*mRNA/Vif の発現レベルを決定し、宿主細胞因子 APOBEC3G の抗ウイルス活性に対応する塩基配列 (SA1prox) を HIV-1 ゲノム中央部に同定した (足立)。② アカゲザルで増殖する HIV-1 (HIV-1rmt) の構築に成功し、病原性研究に必要な R5-Env (臨床分離株やサルにおいて病原性を証明された株由来) を持つ数種類の HIV-1rmt クローンも作製した (足立)。③ Gag-CA の自己重合を標的とした抗 HIV-1 薬の高速スクリーニング系を構築した (足立)。④ X 線結晶構造解析により、APOBEC3F CTD (C 末端ドメイン) の分子構造 (2.7Å) の決定に成功した (岩谷)。⑤ TRIM5 機能を擬似化する化合物 BMMP の標的宿主細胞因子として hnRNP M を同定した (大塚、藤田)。⑥ HSP70 の発現を誘導する化合物 HPH-1Trt を見出した (大塚、藤田)。⑦ 宿主細胞因子 MARCH8 が HIV-1 粒子のエントリー過程を強力に阻害することを明らかにした (徳永)。⑧ 抗ウイルス宿主細胞因子 Mx2 に感受性の HIV-1 がヒトで流行していることを明らかにした (中山)。

4. 考察

本年度も研究が順調に進捗し、種々の抗 HIV-1 宿主因子とその解除ウイルス因子に関する重要な学術的知見が集積された。上記の研究結果に対応させた考察事項を以下にまとめた。①SA1prox の同定は極めて重要な学術的知見である。APOBEC3G 発現レベルに HIV-1 が SA1prox 配列を変化させることで適応し、その複製、伝播、存続、持続を制御していることが明確に示された。②エイズのモデル感染実験に必須のアカゲザルで増殖する HIV-1rmt が作製されたことで、HIV-1 感染エイズ発症霊長類モデルの樹立に道が拓けた。③Gag-CA の重合にその構造安定性が関与していることに着目した、新しい原理に基づくスクリーニング系である。構造安定性は Differential Scanning Fluorimetry (DSF)を用いて比較する。④今後の創薬に向け極めて大きな成果である。APOBEC3F-Vif の結合に重要なくぼみ構造が明らかにされた。⑤siRNA を用いたノックダウン実験から、宿主細胞因子 hnRNP M は Gag との相互作用を介して HIV-1 粒子の感染性制御に関与していると考えられる。⑥HSP70 の発現誘導は Vif による APOBEC3G の分解阻害に働くことが報告されているので、大変有意義な研究成果である。⑦内在性発現レベルであっても、MARCH8 はウイルス粒子中への Env の取込を強力に阻害する。創薬に向け今後の研究が重要である。⑧Mx2 の抗 HIV-1 活性が主なウイルス複製の場である CD4 陽性 T 細胞で機能していないことが考えられる。実際、これらの細胞では Mx2 の発現レベルが低い陰性であることが報告されている。

5. 自己評価

1) 達成度について

極めて新規性の高い「SA1prox 配列の同定」、困難が予想され世界に先駆ける成果となった「APOBEC3F CTD の分子構造の決定」や「アカゲザル指向性 HIV-1rmt の構築」を班研究として報告できたことで、概ね目標をクリアしたと考えている。他の研究成果も新規性、独自性の観点から、学術的価値が非常に高い。APOBEC3F の分子構造は Protein Data Base (PDB) に登録されている (PDB code: 3WUS)。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

上記の通り、本研究の学術的・国際的・社会的意義は非常に高い。分子、細胞及び個体レベルの科学的知見がもたらす学術的・国際的な高評価に加え、Vif、Gag-CA や Env 阻害剤等の創薬に繋がる基盤情報を提示できたことで、社会的にも非常にインパクトの大きい研究成果である。

3) 今後の展望について

現在、治癒を目指す新しいコンセプトに基づいた新しい抗 HIV-1/AIDS 療法の開発が求められている。本研究班は、抗 HIV 宿主細胞因子と HIV 感染に関する学術的知見を輩出することで、新規の抗ウイルス戦略の基盤創出に取り組んできた。得られた成果を基に、今後更に研究を進展させていく。アカゲザル HIV-1 実験感染システムでは、宿主の免疫応答を詳細に解析し、臨床検体から得られる情報との対比の下で、Vif 等のウイルス蛋白質の機能や SA1prox と病態進行との相関解析を行なう。構造学的特性が判明したウイルス・細胞因子に関しては、*in silico*系を活用した機能阻害剤のデザインを推進し、創薬へと繋げたい。強い抗ウイルス活性を示す新規宿主細胞因子については、その分子作用機序の解明に努めて創薬の可能性を探る。

6. 結論

創薬に直結する APOBEC3F の構造決定に成功した。抗 Gag-CA 剤の高速探索系も構築した。また、ウイルス複製制御に関与する種々のウイルス・細胞因子等 (SA1prox、MARCH8、hnRNP M、BMMP 及び HPH-1Trt) を同定・解析した。更に、ウイルス複製、免疫応答、病態進行、ウイルス病原性発現機構の科学的理解に必須なアカゲザル感染実験のための HIV-1 クローンの構築にも成功した。

7. 健康危険情報

該当事項なし。

8. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1) 特許出願中(藤田、大塚ら)

発明の名称: HSP70 を誘導する金属キレーター

出願日: 2015 年 3 月 3 日

出願番号: 特願 2015-41082

研究発表

研究代表者

足立昭夫

- 1) Adachi, A., and Miura, T. 2014. Animal model studies on viral infections. *Frontiers in Microbiology* 5: 672.
- 2) Nomaguchi, M., Nakayama, E.E., Yokoyama, M., Doi, N., Igarashi, T., Shioda, T., Sato, H., and Adachi, A. 2014. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 α . *Microbes and Infection* 16: 936-944.
- 3) Doi, N., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2014. Growth properties of macaque-tropic HIV-1 clones carrying *vpx/vpr* genes from simian immunodeficiency viruses in place of their vpr regions. *Journal of Medical Investigation* 61: 374-379.
- 4) Nomaguchi, M., Doi, N., and Adachi, A. 2014. Virological characterization of HIV-2 *vpx* gene mutants in various cell systems. *Microbes and Infection* 16: 695-701.
- 5) Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., Yokoyama, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Sato, H., Masuda, T., and Adachi, A. 2014. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 *pol* gene modulate viral replication ability. *Journal of Virology* 88: 4145-4160.

研究分担者

岩谷靖雅

- 1) Sakurai, D., Iwatani, Y., Ohtani, H., Naruse, T., Terunuma, H., Sugiura, W., and Kimura, A. *APOBEC3H* polymorphisms associated with the susceptibility to HIV-1 infection and AIDS progression in Japanese. *Immunogenetics*, in press.
- 2) Mitra, M., Singer, D., Mano, Y., Hritz, J., Nam, G., Gorelick, R.J., Byeon, I.J., Gronenborn, A.M., Iwatani, Y., and Levin, J.G. 2015. Sequence and structural determinants of human APOBEC3H deaminase and anti-HIV-1 activities. *Retrovirology* 12: 3.
- 3) Imahashi, M., Izumi, T., Watanabe, D., Imamura, J., Matsuoka, K., Ode, H., Masaoka, T., Sato, K., Kaneko, N., Ichikawa, S., Koyanagi, Y., Takaori-Kondo, A., Utsumi, M., Yokomaku, Y., Shirasaka, T., Sugiura, W., Iwatani, Y., and Naoe, T. 2014. Lack of association between intact/deletion polymorphisms of the APOBEC3B gene and HIV-1 risk. *PLoS One* 9: e92861.
- 4) Shiino, T., Hattori, J., Yokomaku, Y., Iwatani, Y., and Sugiura, W.; Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. 2014. Phylodynamic analysis reveals CRF01_AE dissemination between Japan and neighboring Asian countries and the role of intravenous drug use in transmission. *PLoS One* 9: e102633.
- 5) Fujita, M., Ciftci, H.I., Yamamoto, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Iwatani, Y., and Otsuka, M. 2014. SAMHD1-independent functions of HIV-2 Vpx protein. Cold Spring Harbor Laboratory 39th Annual Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor, NY, USA. Cold Spring Harbor Laboratory 39th Annual Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor, NY, USA.
- 6) Imahashi, M., Izumi, T., Imamura, J., Matsuoka, K., Ode, H., Masaoka, T., Sato, K., Koyanagi, Y., Takaori-Kondo, A., Yokomaku, Y., Sugiura, W., and Iwatani, Y. 2014. Lack of association between intact/deletion polymorphisms of the APOBEC3B and HIV-1 risk. Cold Spring Harbor Laboratory 39th Annual Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor, NY, USA.
- 7) Nakashima, M., Kitamura, S., Kurosawa, T., Ode, H., Kawamura, T., Mano, Y., Naganawa, Y., Yokomaku, Y., Watanabe, N., Sugiura, W., and Iwatani, Y. 2014. Fine-tuned HIV-1 Vif-interaction interface of anti-retroviral cytidine deaminase APOBEC3F. Cold Spring Harbor Laboratory 39th Annual Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor, NY, USA.
- 8) Mitra, M., Singer, D., Mano, Y., Hritz, J., Nam, G., Byeon, J.L., Wu, T., Gronenborn, A.M., Iwatani, Y., and Levin, J.G. 2014. Probing the structural determinants of human restriction factor APOBEC3H antiviral and cytidine deaminase activities. Cold Spring Harbor Laboratory 39th Annual Meeting on Retroviruses.

Cold Spring Harbor, NY, USA.

大塚雅巳

- 1) Tateishi, H., Anraku, K., Koga, R., Okamoto, Y., Fujita, M., and Otsuka, M. 2014. Design and synthesis of lipid-coupled inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate derivatives exhibiting high-affinity binding for the HIV-1 MA domain. *Organic & Biomolecular Chemistry* 12: 5006-5022.
- 2) Fujita, M., Ciftci, H.I., Yamamoto, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Iwatani, Y., and Otsuka, M. 2014. SAMHD1-independent functions of HIV-2 Vpx protein. Cold Spring Harbor Laboratory 39th Annual Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor, NY, USA.

徳永研三

- 1) Kikuchi, T., Iwabu, Y., Tada, T., Kawana-Tachikawa, A., Koga, M., Hosoya, N., Nomura, S., Brumme, Z.L., Jessen, H., Pereyra, F., Piechocka-Trocha, A., Walker, B.D., Iwamoto, A., Tokunaga, K., and Miura, T.: Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein is attenuated in elite controllers. *Journal of Virology*, in press.
- 2) Zhou, D., Wang, Y., Tokunaga, K., Huang, F., Sun B, and Yang, R. 2015. The HIV-1 accessory protein Vpr induces the degradation of the anti-HIV-1 agent APOBEC3G through a VprBP-mediated proteasomal pathway. *Virus Research* 195: 25-34.
- 3) Utachee, P., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Tokunaga, K., Ikuta, K., Takeda, N., and Kameoka, M. 2014. Impact of amino acid substitutions in the V2 and C2 regions of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE envelope glycoprotein gp120 on viral neutralization susceptibility to broadly neutralizing antibodies specific for the CD4 binding site. *Retrovirology* 11: 32.
- 4) Tada, T., Zhang, Y., Koyama, T., Yamaoka, S., Fujita, H., and Tokunaga, K. 2014. Novel restriction factor MARCH8 blocks HIV-1 replication. 20th International AIDS Conference. Melbourne, Australia.

中山英美

- 1) Takeda, E., Kono, K., Hulme, A.E., Hope, T.J., Nakayama, E.E., and Shioda, T. Fluorescent image analysis of HIV-1 and HIV-2 uncoating kinetics in the presence of old world monkey TRIM5 α . *PLoS One*, in production.
- 2) Hayasaka, H., Kobayashi, D., Yoshimura, H., Nakayama, E.E., Shioda, T., and Miyasaka, M. 2015. The HIV-1 gp120/CXCR4 axis promotes CCR7 ligand-dependent CD4 T cell migration: implication of CCR7 homo- and CCR7/CXCR4 hetero-oligomer formation as a possible mechanism for up-regulation of functional CCR7. *PLoS One* 10: e0117454.
- 3) Nomaguchi, M., Nakayama, E.E., Yokoyama, M., Doi, N., Igarashi, T., Shioda, T., Sato, H., and Adachi, A. 2014. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 α . *Microbes and Infection* 16: 936-944 .
- 4) Taya, K., Nakayama, E.E., and Shioda, T. 2014. Moderate restriction of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 9: e90969.
- 5) Nakayama, E.E., Tobita, S., Sultana, T., Saito, A., Akari, H., and Shioda, T. 2014. Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. Cold Spring Harbor Laboratory 39th Annual Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor, NY, USA.

藤田美歌子

- 1) Tateishi, H., Anraku, K., Koga, R., Okamoto, Y., Fujita, M., and Otsuka, M. 2014. Design and synthesis of lipid-coupled inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate derivatives exhibiting high-affinity binding for the HIV-1 MA domain. *Organic & Biomolecular Chemistry* 12: 5006-5022.
- 2) Fujita, M., Ciftci, H.I., Yamamoto, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Iwatani, Y., and Otsuka, M. 2014. SAMHD1-independent functions of HIV-2 Vpx protein. Cold Spring Harbor Laboratory 39th Annual Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor, NY, USA.

IV. 平成 26 年度 分担研究報告書

分担研究課題：HIV アクセサリー蛋白質の分子ウイルス学的解析

研究分担者：足立昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）

研究協力者：野間口雅子（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授）

宮崎恭行（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 助教）

土肥直哉（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 特別研究員）

研究要旨

Vif の発現量・機能・構造の維持は HIV-1 複製に必須であり、宿主の抗レトロウイルス細胞因子 APOBEC3G とのパワーバランスはウイルス複製能に多大な影響をもたらす。我々は、以前、スプライシングアクセプター1 (SA1) 近傍の領域 (SA1prox と命名) のアミノ酸置換を伴わない 1 塩基置換が、HIV-1 mRNA 発現パターンを変え、ウイルス複製能が変動させることを見出していた。本研究では、SA1prox 塩基配列のウイルス複製における役割・意義を明らかにすることを目的とした。ウイルス学的解析から、SA1prox の 1 塩基置換により、*vif* mRNA/Vif 蛋白質発現量が増減すること、かつ、APOBEC3G 発現量依存的にウイルス複製能が変動することを明らかにした。また、HIV-1 シークエンスデータベースの詳細な解析から、SA1prox 内の 1 塩基置換が全ての HIV-1 グループ・サブタイプについて自然界に広く存在していることが分かった。この事実は、HIV-1 が SA1prox の塩基配列を変化させて組織・細胞内環境に適応し、ウイルス複製・存続・伝播等の最適性を確保していることを示唆している。さらに、SA1prox 内 1 塩基置換によるウイルス複製能の変動は HIV-2/SIVmac グループでも認められ、この種のウイルス群の共通の特性であることも明らかとなった。以上のことから、SA1prox 塩基配列は *vif* mRNA/Vif 蛋白質発現量を規定しており、これにより宿主の APOBEC3G 発現量に応じたウイルス複製変動をもたらす領域であると考えられた。

A. 研究目的

宿主細胞の内性抑制因子はウイルス複製を阻害するが、ウイルスはこの抑制を回避する蛋白質をコードしている。APOBEC3G は強力な抗レトロウイルス因子であり、これに拮抗する HIV-1 Vif の発現量・機能・構造の維持は、ウイルス複製に大きく影響する。

HIV-1 の遺伝子発現は厳密に制御されたプロセスであり、転写・スプライシング・mRNA の核外輸送・翻訳の素過程はお互いに影響を及ぼしあいながら進行していく。各素過程の効率の変化は、ウイルス複製に悪影響を及ぼす。

我々は、以前、ウイルス馴化実験で得られた適応変異の解析から、スプライシングアクセプター 1 (SA1) 近傍の領域内のアミノ酸置換を伴わない 1 塩基置換により、HIV-1 mRNA の発現パターンが変わり、ウイルス複製能が変動することを見出し、この領域を SA1prox と名付けた (図 1)。本研究では、SA1prox 塩基配列のウイルス複製における役割およびウイルス学的意義について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. SA1prox 変異体の構築：HIV-1/SIVcpz sequence compendium 2011/2013、および、HIV-2/SIVsmm sequence compendium 2011/2013 (Los Alamos National Laboratory; <http://www.hiv.lanl.gov>) から、当該領域内で認められる変異を抽出した。これらの変異を、HIV-1 NL4-3 株あるいは HIV-2 GL-AN 株に

site-directed mutagenesis により導入した。

2. ウイルス感染実験：ウイルスは、293T 細胞へのトランスフェクションにより調製した。ウイルス量は、逆転写酵素 (RT) アッセイで測定した。ウイルス複製能 (Multi-cycle infection) は、ヒト由来リンパ球系細胞株 (H9、CEM、CEM-SS) に等量のウイルスを接種し、培養上清中のウイルス産生量の変化を RT アッセイで測定した。ウイルス感染価 (Single-cycle infection) は、ルシフェラーゼレポーター TZM-bl 細胞に、等量のウイルスを接種後、調製した細胞粗抽出液のルシフェラーゼアッセイにより測定した。

3. ウェスタンブロットティング：Vif 発現量は、プロウイルスクローンをトランスフェクションした 293T 細胞から調製した細胞粗抽出液をウェスタンブロットティングに供し、抗 Vif 抗体を用いて検出した。APOBEC3G 発現量は、各種ヒトリンパ球系細胞株から調製した粗抽出液を用いて、抗 APOBEC3G 抗体により検出した。

4. HIV mRNA 発現：HIV mRNA 発現は、293T 細胞にプロウイルスクローンをトランスフェクション後、トータル RNA を抽出しノザンブロットティングやリアルタイム RT-PCR で解析した。これらの解析において、全ての HIV-1 mRNA 種、genomic/*gag-pol* mRNA、および、*vif* mRNA に特異的なプローブあるいはプライマーセットを使用した。

5. ウイルス産生能：H9 細胞にプロウイルスクローンを Nucleofector II を用いてトランスフェクションした。培養上清中のウイルス産生量を

HIV-1 p24 ELISA kit を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究課題には遺伝子組換え実験が含まれているので、『徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会』に実験の承認を申請中である。『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

我々は、これまでに適応変異のウイルス学的解析および HIV-1/SIVcpz compendium の解析から、SA1prox の HIV-1 株内で自然に存在する 5 種の 1 塩基置換により、HIV-1 NL4-3 株の mRNA 発現パターンとウイルス複製能とがある一定の相関性を持って変動することを見出していた。特に、*vif*mRNA 発現量が大きく変動していたため、まず、Vif 蛋白質発現量変化を調べた (図 2)。その結果、これらの 1 塩基置換により Vif 発現量が大きく増減することが分かった。Vif 発現量は、APOBEC3G に対する拮抗能に影響を及ぼすため、各種細胞株における APOBEC3G の発現量を調べ (H9、CEM、CEM-SS、M8166、MT4/R5)、その発現量が異なる細胞株における SA1prox の 1 塩基置換体 (tac、gat、cct、VI、gtg) のウイルス複製能を比較した (図 2)。APOBEC3G 発現量の低い CEM-SS 細胞では、Vif 発現量の低い置換体 (tac、gat) は親株よりも高い増殖能を示したが、APOBEC3G 発現量の高い CEM および H9 細胞では、これらの置換体の増殖能は著しく低下した。逆に、Vif 発現量の高い置換体 (cct、VI、gtg) では、CEM-SS 細胞での増殖能は親株より低下するものの、CEM および H9 細胞では親株と同程度の増殖能を示した。これらの成績から、SA1prox の 1 塩基置換体において、Vif 発現量および APOBEC3G 発現量に依存してウイルス複製能が変動することが分かった。

SA1prox の 1 塩基置換による *vif* mRNA 発現量の変動が他のレンチウイルスグループでも認められるか否かを検討するため、HIV-2/SIVsmm compendium から本領域内の変異を抽出し、HIV-2 GL-AN 株に導入した。構築した 1 塩基置換体の中には、*vif*mRNA 発現量を上げるものおよび下げるものが存在し、後者のウイルス複製能は、APOBEC3G を強く発現している H9 細胞で親株よりも低下していた。このことから、HIV-2 においても SA1prox の 1 塩基置換が *vif* mRNA 発現量に影響を及ぼし、APOBEC3G 依存的にウイルス複製能が変動することが示された。

HIV-1 SA1 近傍の領域 (約 40 塩基) ではステムループ構造 (SLSA1) が形成されることが報告されている。上述の 5 種の HIV-1 SA1prox の

1 塩基置換は、全て SLSA1 内に集中していた。そこで、SLSA1 内には *vif*mRNA 発現量を変動させる別の 1 塩基置換が存在するのではないかと考え、本領域内の 1 塩基置換を HIV-1/SIVcpz compendium から抽出した。新たに抽出した 1 塩基置換を持つプロウイルスクローンを作製後、これらのクローンの *vif*mRNA/Vif 蛋白質発現量の変動を調べた。1 塩基置換により、*vif* mRNA 発現量に変化しないものもあったが、*vif*mRNA 発現量を低下させるもの、増加させるもの、および、著しく増加させるものが認められた。Vif 蛋白質発現量はそれぞれの *vif* mRNA 発現量と良く相関していた。

Vif 発現量の著しい増加は、ウイルス感染価やウイルス産生量を低下させることが報告されている。そこで、我々が、以前に見出していた SA1prox、および、新たに見出した SLSA1 の 1 塩基置換がウイルス感染価およびウイルス産生量におよぼす影響を調べた。*vif*mRNA を低下あるいは増加させる 1 塩基置換体の多くは、ウイルス感染価およびウイルス産生量は親株と同程度であったが、1 塩基置換体の中で最も *vif*mRNA 発現量を低下させる tac では、ウイルス産生量の増加が認められた。一方、*vif*mRNA を著しく増加させる 1 塩基置換体 (cgc、ccg) において、cgc ではウイルス産生量は親株と同程度であったが、ウイルス感染価が親株に比べて低下し、ccg では逆にウイルス感染価ではなく、ウイルス産生量が低下していた。SA1 でのスプライシング効率が増加すると *vif* mRNA が出来やすくなり、その分、全長の *gag-pol* mRNA が減っていき、SA1 でのスプライシング効率の低下は逆の影響を及ぼすと考えられる。この結果、Gag/Gag-Pol と Vif との発現量のバランスが変わり、ウイルス感染価やウイルス産生量に変化していると推測されるが、今後、実験的に検証していく必要がある。

Vif 発現量を変動させる SA1prox/SLSA1 の 1 塩基置換体のウイルス複製能を、APOBEC3G 発現量の異なる細胞株で比較した。前述のように、APOBEC3G 低発現細胞株 CEM-SS や MT4/R5 では、*vif*mRNA 発現量が低下する 1 塩基置換体のウイルス複製能は親株よりも増加し、逆に、*vif* mRNA 発現量が増加する 1 塩基置換体では、これらの細胞株での増殖能は親株に比べて低下した。また、APOBEC3G 高発現細胞株 H9 では、*vif*mRNA 発現量が増加する 1 塩基置換体は親株と同程度の増殖能を示したが、*vif*mRNA 発現量が低下する 1 塩基置換体のウイルス複製能は親株よりも低下した。一方、*vif*mRNA 発現量が著しく増加する cgc や ccg は、APOBEC3G 発現量に関係なく、どの細胞株においても親株よりも増殖能が低下することが分かった。このことは、cgc でのウイルス感染価、および、ccg でのウイルス

産生量の低下がウイルス複製能に強く影響したことを示している。従って、SA1prox/SLSA1の1塩基置換によるVif発現量とGag-Pol発現量との関係、および、Vif発現量とAPOBEC3G発現量との関係によりウイルス複製能が変動すると考えられた。

D. 考察

本研究における詳細なウイルス学的解析とHIV-1シーケンスデータベースの解析により、SA1prox塩基配列がvif mRNA/Vif蛋白質発現量を規定することにより、APOBEC3G発現量依存的にウイルス複製能を変動させる役割を担うことが明らかとなった。Vif mRNA発現量を変動させる1塩基置換が、自然に存在するHIV-1のゲノム配列中に認められるということは、このような1塩基置換が個体内での複製や適応により出現してきたことを強く示唆している。個体内でのAPOBEC3G発現量やVifの機能・構造変化に応じて、Vif発現量を増減させるための適応としてSA1prox塩基配列が変化するのではないかと推測される。今後、HIV-1/アカゲザル感染システムやヒト臨床検体を用いてSA1prox塩基配列と個体内複製・病態進行との関連を調べていく必要がある。また、SIVcpzからHIV-1の出現過程においても、Vifの機能発現は必須であったと考えられるため、SA1prox塩基配列がどのように変異・適応していったか興味あるところである。

E. 結論

Vif発現量を規定し、APOBEC3G依存的にウイルス複製能を変動させるSA1proxの1塩基置換を見出した。今後、SA1prox塩基配列と個体内複製・適応や病態進行との関連、および、HIV-1出現・進化過程との関連を明らかにすることによって、HIV-1複製・適応に関わる新たな局面が拓かれると期待される。

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) Adachi, A., and Miura, T. Animal model studies on viral infections. *Frontiers in Microbiology* 5: 672, 2014.
- 2) Nomaguchi, M., Nakayama, E.E., Yokoyama,

M., Doi, N., Igarashi, T., Shioda, T., Sato, H., and Adachi, A. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5α. *Microbes and Infection* 16: 936-944, 2014.

- 3) Doi, N., Adachi, A., and Nomaguchi, M. Growth properties of macaque-tropic HIV-1 clones carrying vpx/vpr genes from simian immunodeficiency viruses in place of their vpr regions. *Journal of Medical Investigation* 61: 374-379, 2014.

- 4) Nomaguchi, M., Doi, N., and Adachi, A. Virological characterization of HIV-2 vpx gene mutants in various cell systems. *Microbes and Infection* 16: 695-701, 2014.

- 5) Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., Yokoyama, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Sato, H., Masuda, T., and Adachi, A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. *Journal of Virology* 88: 4145-4160, 2014.

2. 学会発表等

- 1) 野間口雅子、土肥直哉、酒井遥介、泉泰輔、宮崎恭行、足立昭夫：SA1proxの遺伝子配列はVif/APOBEC3G依存的にウイルス複製能を変動させる。第62回日本ウイルス学会学術集会。2014年11月10日(月)、横浜。

- 2) 酒井遥介、笹田ひかり、土肥直哉、泉泰輔、宮崎恭行、足立昭夫、野間口雅子：HIV/SIV Vpx蛋白質の発現調節に寄与する領域の解析。第62回日本ウイルス学会学術集会。2014年11月10日(月)、横浜。

- 3) 宮崎恭行、泉泰輔、野間口雅子、内山恒夫、足立昭夫：In vitro構築系を用いたHIV-1/HIV-2 CA重合能に関する解析。第62回日本ウイルス学会学術集会。2014年11月11日(火)、横浜。

- 4) 土肥直哉、宮崎恭行、酒井遥介、泉泰輔、内山恒夫、足立昭夫、野間口雅子：HIV-1 Gag-CAヘリックス7の変異がウイルス複製後期過程に及ぼす影響の解析。第62回日本ウイルス学会学術集会。2014年11月11日(火)、横浜。

- 5) 足立昭夫：抗HIV細胞因子と抗HIV戦略。第28回日本エイズ学会学術集会。2014年12月5日(金)、大阪。

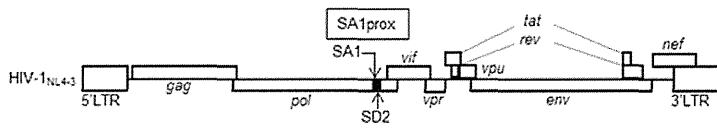


図1. HIV-1_{NL4-3} ゲノム構造。スプライシングアクセプター1 (SA1) およびスプライシングドナー2 (SD2) を矢印で、また、SA1prox 領域を黒で示した。

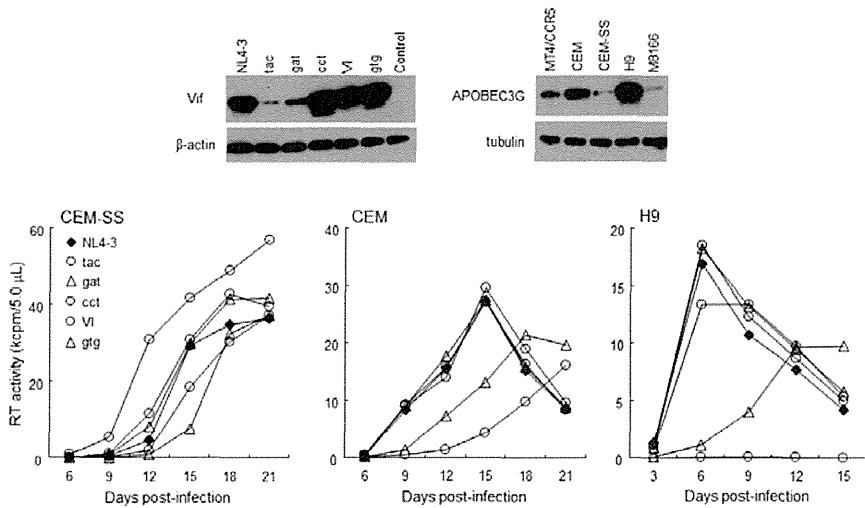


図2. SA1prox の1塩基置換が Vif 発現量に及ぼす影響と APOBEC3G 発現量依存的なウイルス複製能の変動。Vif 発現量：プロウイルスクローンをトランスフェクションした 293T 細胞から細胞粗抽出液を調製し、ウェスタンブロッティングを行い、抗 Vif 抗体を用いて検出した。APOBEC3G 発現量：各種細胞株から粗抽出液を調製し、抗 APOBEC3G 抗体を用いて検出した。ウイルス感染実験：293T 細胞へのプロウイルスクローンのトランスフェクションにより調製した等量のウイルス液を各細胞株に接種し、継時的に培養上清を回収した。ウイルス増殖は、培養上清中の RT 活性により測定した。

分担研究課題：APOBEC3G 発現制御モジュレーターと分解阻害剤の探索

研究分担者：岩谷 靖雅 ((独)国立病院機構 名古屋医療センター 臨床研究センター 室長)

研究要旨

HIV-1 は、感染細胞内において APOBEC3 を分解・不活化することによって APOBEC3 による防御システムから逃れている。HIV-1 がコードする Vif (Viral infectivity factor) タンパク質が APOBEC3 を特異的に E3 ユビキチンリガーゼ複合体にリクルートすることにより、ポリユビキチン化・プロテアソーム系を介した選択的な分解に導かれる。そのため、HIV-1 は Vif を欠損した場合、末梢リンパ球細胞では増殖できないことから、APOBEC3-Vif の結合を阻害することにより治療薬剤の開発につながるのではないかと推定されている。しかしながら、APOBEC3 および Vif の構造学的な知見は乏しく、APOBEC3 と Vif との結合における構造学的な分子基盤は不明であった。最近、我々は、APOBEC3 ファミリータンパク質のひとつ APOBEC3C の分子構造を世界で初めて決定し、Vif の結合領域および構造を明らかにした。これらの情報を基に、本研究では、HIV-1 の感染制御に重要な APOBEC3F に着目し、APOBEC3F の構造決定、および Vif の結合領域・構造を明らかにした。さらに、Guo ら(Nature 2014)によって明らかにされた Vif の部分的立体構造を活用して、Vif 分子上の APOBEC3F 結合領域・構造を明らかにした。以上の研究成果は、APOBEC3F-Vif 間の相互作用を阻害することで宿主防御機構を活用した薬の探索に道筋をつけ、抗 HIV 薬の開発 (*in silico* 創薬) に活用できる基盤情報につながると考えられる。

A. 研究目的

宿主の APOBEC3 ファミリータンパク質の生体防御機構を活用した新たな機序による抗 HIV-1 薬剤を開発につながる基礎的情報を確立することを目標としている。特に、APOBEC3F/G と HIV-1 Vif の相互作用部位の構造学的情報は必要不可欠である。しかし、これまで Vif が結合する APOBEC3 ファミリーの相互作用部位 (インターフェイス) の構造は明らかになっていなかった。2012年、我々は、HIV-1 Vif が結合する APOBEC3 タンパクとして、APOBEC3C の構造決定に成功し、HIV-1 Vif の結合領域および結合インターフェイス構造を明らかにした。これらの情報を基に、HIV-1 の感染制御に重要な APOBEC3F の Vif 結合領域を予測した。しかし、*in silico* 創薬に必要な実構造が決定されず、Vif 結合領域の構造特性の詳細は明らかになっていなかった。そこで、本研究課題では、APOBEC3F と Vif との結合の学術的理解と、APOBEC3F を活用した新規の抗 HIV 薬の開発 (*in silico* 創薬) に活用できる基盤情報を得るために、APOBEC3F および Vif の構造学的解析を行った。

B. 研究方法

大腸菌発現系より野生型 APOBEC3F C 末端ドメイン (CTD: C-terminal Domain) を発現し、精製および結晶化を行った。X線結晶構造解析により構造を決定した。APOBEC3F-Vif 結合に重要な残基の同定には、タンパク質の立体構造をベースに点

変異を導入し、293T 細胞内でおこる Vif 依存的な分解をウェスタンブロット法で解析することにより両タンパク質上で重要な残基を同定した。

一方、HIV-1 Vif の構造学的解析では、2014 年 Guo らによって報告された Vif の X線結晶構造 (PDB ID#4N9F) を基に、5残基 (RWNKP配列) を付与しモデル構造を構築した。APOBEC3F 結合に関与する既報の Vif 配列モチーフ (F1 box: ¹⁴DRMR¹⁷、F2 box: ⁷⁴TGERDW⁷⁹、F3 box: ¹⁷¹EDRWN¹⁷⁵) にアラニン置換変異を導入した。Vif 変異体による APOBEC3C あるいは APOBEC3F の分解は、両発現プラスミドを 293T 細胞内に導入し、ウェスタンブロット法による細胞内レベルを解析することで確認した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験に関しては「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」を遵守して行われた。

C. 研究結果

まず、大腸菌発現系より野生型 APOBEC3F CTD を発現し、精製および結晶化を行った。X線結晶構造解析法により野生型 APOBEC3F CTD の分子構造 (2.54 Å) の決定に成功した。構造情報は、Protein Data Base に登録した (PDB ID#3WUS)。基本構造は APOBEC/AID ファミリーに共通したコア構造を有していた。ホモログである APOBEC3C と比較した結果、極めて類似した構造をとっていた (C α root-mean-square

deviation = 2.2 Å) (図 1)。

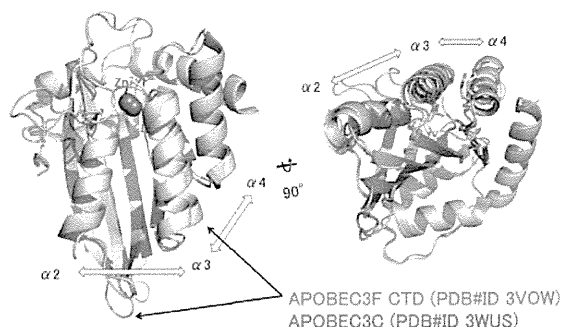


図 1 決定した APOBEC3C/F の立体構造を重ね合わせ、比較した。

これまで、Bohn らによって、Vif の結合には負電荷領域が重要で、先に我々が APOBEC3C の解析で見出した 10 残基の他に、新たに13残基が関与することが予測された(Structure 2013)。そこで、Vif 結合領域を比較した結果、Bohn らによって示唆された13残基に各々変異を導入し、Vif 依存的分解(感受性)解析した。その結果、我々が既に報告した Vif 結合に関与する 10 残基に加えて、上述 13 残基から APOBEC3F に特有の 3 残基を同定した(図2)。

Residue	Substitution to		
	A	E	K
E223	E223A	-	E223K
H227	H227A	H227E	H227K
H228	H228A	H228E	H228K
S229	S229A	S229E	S229K
P230	P230A	P230E	P230K
N268	N268A	N268E	N268K
E270	E270A	-	E270K
L291	L291A	L291E	L291K
A292	-	A292E	A292K
R293	R293A	R293E	R293K
S295	S295A	S295E	S295K
N298	N298A	N298E	N298K
G325	G325A	G325E	G325K

0 25 50 75 100 (%)
Vif-resistance level

図 2 APOBEC3F の変異型と HIV-1 Vif に依存した分解(感受性)を評価することにより、Vif の結合に重要な残基を同定した。

これら 3 残基(および既報の E324を含む 4 残基)は、 $\alpha 2$ と $\alpha 3$ に囲まれる 10 残基と構造上近接し、APOBEC3C の Vif 結合領域と比較してごく微細に異なっているだけだった。一方、Bohn らによって推定された他の領域は Vif の結合に関与しないことが分かった。また、Vif 結

合領域はAPOBEC3C と APOBEC3F との間で構造学的に高度に保存されており、共通して負電荷を帯びた浅いくぼみを形成していることが明らかになった(図3)。

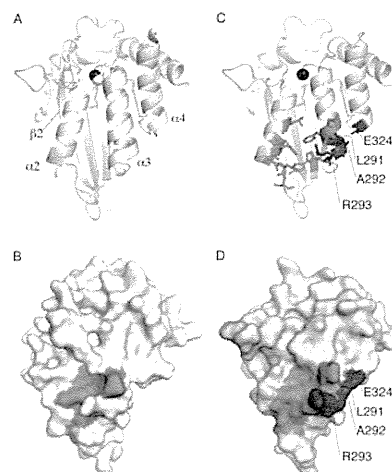


図 3 APOBEC3F CTD の Vif 結合領域の比較 A) APOBEC3C/F CTD の ribbon 表示 B) APOBEC3C の Surface 表示、Vif 結合領域を示す C)APOBEC3F CTD の ribbon 表示、Vif 結合領域を示す D) C) の surface 表示

一方、Vif 側のインターフェイスに関して点変異解析により、APOBEC3C あるいは APOBEC3F との結合に共通して重要な Vif の残基と、APOBEC3F との結合により重要な残基を同定した。これらの残基は、構造上、1 領域に集約していた(図 4)。

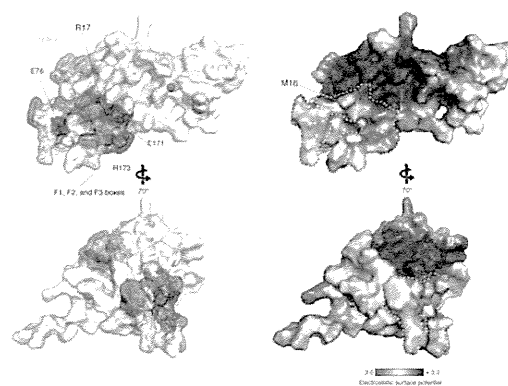


図 4 HIV-1 Vif の X 線結晶構造に APOBEC3C/F/G の結合に重要な残基をマッピングした(左)。表面電荷表示を右側に示す。

一方、APOBEC3G はいずれの Vif 変異型に対し

て感受性を示し、APOBEC3F 結合に関与する Vif 側の配列モチーフ (F1とF2、F3) は結合に関与しないことが分かった。これらの結果は、APOBEC3F が APOBEC3C よりも 4 残基分広い Vif 結合インターフェイスをもつこととよく符号する。このことから、Vif が APOBEC3C ではなく、抗 HIV-1 活性が高い APOBEC3F との結合に対してより高度に適応するように進化してきたことが考えられる。さらに、Vif は APOBEC3G に対して APOBEC3F とは全く異なる結合インターフェイスを有し、Vif はそれぞれの APOBEC3 に対して複数の結合インターフェイスを使い分けていることが示唆された。

D. 考察

変異解析により、APOBEC3C、APOBEC3F との結合に共通して重要な Vif 分子の 8 残基を同定した。これらアミノ酸は結晶構造上おおむねクラスターしていた。また、APOBEC3F との結合のみに重要な残基を見いだした。これら残基は APOBEC3C/F に共通した責任アミノ酸の周辺に位置していた。この結果は、APOBEC3C/F の Vif 結合責任アミノ酸もクラスターしていること、APOBEC3F が APOBEC3C よりも広い Vif 結合インターフェイスを持つこととよく符号する。以上のことから、APOBEC3F-Vif の結合には、疎水性親和力および静電的な親和力が重要であることが明らかになった。とりわけ、疎水的な相互作用に重要な APOBEC3F の領域は、くぼみを形成していることから、低分子化合物が結合し Vif の結合を阻害する標的ポケットになる可能性が考えられる。このようなことから、本研究課題は、HIV 研究における学術的な知見につながるだけでなく、Vif 阻害剤などの *in silico* 創薬あるいは新たな治療戦略に直接つながる情報に結びつくと考えられる。我々は、これらの構造学的な研究成果 (APOBEC3F CTD の結晶構造) を基に、*in silico* における Vif-APOBEC3F の結合阻害剤のデザインを推し進め、候補化合物を導き出し、APOBEC3F 分解阻害剤を実現化したいと考えている。

E. 結論

X 線結晶構造解析法により、APOBEC3F CTD の分子構造を決定することに成功した。さらに、APOBEC3F と Vif 両分子の結合領域を精査し、構造学的特性を明らかにした。APOBEC3F の構造学的情報から、Vif が結合する領域の“くぼみ”構造を明らかにし、阻害化合物のデザインの足場を構築したといえる。これらの研究成果は、Vif 阻害剤などの創薬につながる標的部位の特性を

具体化し、新たな治療戦略に直接つながる可能性が高い。

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) Sakurai, D., Iwatani, Y., Ohtani, H., Naruse, T., Terunuma, H., Sugiura, W., Kimura, A. *APOBEC3H* polymorphisms associated with the susceptibility to HIV-1 infection and AIDS progression in Japanese. *Immunogenetics*, in press.
- 2) Mitra, M., Singer, D., Mano, Y., Hritz, J., Nam, G., Gorelick, R.J., Byeon, I.J., Gronenborn, A.M., Iwatani, Y., Levin, J.G. Sequence and structural determinants of human APOBEC3H deaminase and anti-HIV-1 activities. *Retrovirology* 12:3, 2015.
- 3) Imahashi, M., Izumi, T., Watanabe, D., Imamura, J., Matsuoka, K., Ode, H., Masaoka, T., Sato, K., Kaneko, N., Ichikawa, S., Koyanagi, Y., Takaori-Kondo, A., Utsumi, M., Yokomaku, Y., Shirasaka, T., Sugiura, W., Iwatani, Y., Naoe, T. Lack of Association between Intact/Deletion Polymorphisms of the APOBEC3B Gene and HIV-1 Risk. *PLoS One* 9:e92861, 2014.
- 4) Shiino, T., Hattori, J., Yokomaku, Y., Iwatani, Y., Sugiura, W. Japanese Drug Resistance HIVSN: Phylodynamic analysis reveals CRF01_AE dissemination between Japan and neighboring Asian countries and the role of intravenous drug use in transmission. *PLoS One* 9:e102633, 2014.

2. 学会発表等

国際学会

- 1) Imahashi, M., Izumi, T., Imamura, J., Matsuoka, K., Ode, H., Masaoka, T., Sato, K., Koyanagi, Y., Takaori-Kondo, A., Yokomaku, Y., Sugiura, W., Iwatani, Y. Lack of Association between Intact/Deletion Polymorphisms of the *APOBEC3B* Gene and HIV-1 Risk. Cold Spring Harbor Laboratory Annual meeting on Retroviruses, May 19-24, 2014, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- 2) Nakashima, M., Kitamura, S., Kurosawa, T., Ode, H., Kawamura, T., Mano, Y., Naganawa, Y., Yokomaku, Y., Watanabe, N., Sugiura, W., Iwatani, Y. Fine-tuned HIV-1 Vif- interaction interface of anti-retroviral cytidine deaminase APOBEC3F. Cold Spring Harbor Laboratory Annual meeting on Retroviruses, 2014, May 19-24, 2014, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- 3) Nakashima, M., Kitamura, S., Kurosawa, T., Ode, H., Kawamura, T., Imahashi, Y., Yokomaku, Y., Watanabe, N., Sugiura, W., Iwatani, Y. 23rd Congress and general assembly of the international union of crystallography, Aug 5-12, 2014, Montreal, Canada.

国内学会

- 1) 重見麗、蜂谷敦子、松田昌和、今村淳治、渡邊綱正、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦互：HIV-1 感染急性期における HIV 特異的な病態バイオマーカーの探索について. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014 年 12 月 3-5 日、大阪
- 2) 芳田剛、齋藤暁、松岡和弘、大出裕高、岩谷靖雅、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、杉浦互、明里宏文：サル指向性 HIV-1 の感染個体における増殖効率を上昇させる要因. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014 年 12 月 3-5 日、大阪
- 3) 大出裕高、中島雅晶、河村高志、北村紳悟、長縄由里子、黒澤哲平、真野由有、粟津宏昭、松岡和弘、横幕能行、渡邊信久、杉浦互、岩谷靖雅：HIV-1 Vif における APOBEC3C/F 結合インターフェース. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会. 大阪、2014 年 12 月 3-5 日
- 4) 松田昌和、大出裕高、松岡和弘、蜂谷敦子、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦互：Illumina MiSeq を用いた HIV-1 近全長遺伝子配列解析の試み. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014 年 12 月 3-5 日、大阪
- 5) Ciftci Ibrahim、藤野悠那、山本充奈美、川村宗吾、岩谷靖雅、大塚雅巳、藤田美歌子：Mutational Analysis of HIV-2 Vpx concerning on ability to degrade SAMHD1. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014 年 12 月 3-5 日、大阪
- 6) 鬼頭優美子、大出裕高、松田昌和、松岡和弘、蜂谷敦子、清水宣明、今村淳二、岩谷靖雅、杉浦互、横幕能行：Maraviroc 治療失敗症例にみる envelope 領域の遺伝的多様性の解析. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2014 年 12 月 3-5 日、大阪
- 7) 中島雅晶、大出裕高、長縄由理子、黒澤哲平、真野由有、横幕能行、杉浦互、渡邊信久、岩谷靖雅. HIV-1 Vif は複数の APOBEC3 結合インターフェースをもつ. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25-27 日、横浜
- 8) 櫻井大祐、今橋真弓、岩谷靖雅、大谷仁志、成瀬妙子、照沼裕、杉浦互、木村彰方：APOBEC3H ハプロタイプと HIV-1 感染および AIDS 発症との関連. 第 59 回日本人類遺伝学会. 2014 年 11 月 19-22 日、東京
- 9) 大出裕高、松岡和弘、松田昌和、蜂谷敦子、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦互. Deep sequencing による HIV-1 臨床検体の近全長ゲノム配列解析系の構築. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月 10-12 日、横浜
- 10) 芳田剛、齋藤暁、松岡和弘、大出裕高、岩谷靖雅、杉浦互、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：*in vivo* におけるサル指向性 HIV-1 の増

殖効率を上昇させる要因. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月 10-12 日、横浜

- 11) 中島雅晶、大出裕高、河村高志、北村紳悟、長縄由里子、黒澤哲平、真野由有、粟津宏昭、松岡和弘、横幕能行、渡邊信久、杉浦互、岩谷靖雅：空間的に異なる APOBEC3 結合インターフェースをもつ HIV-1 Vif. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月 10-12 日、横浜
- 12) 大出裕高、松田昌和、蜂谷敦子、服部純子、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦互：Deep Sequencing による近全長 HIV-1 ゲノムの Quasispecies 解析と微量薬剤耐性変異の検出. 第 16 回白馬シンポジウム. 2014 年 6 月 13-14 日、熊本

分担研究課題：抗ウイルス宿主因子を擬似・制御する分子の開発

研究分担者：大塚 雅巳（熊本大学大学院生命科学研究部 教授）

研究要旨

近年、ヘテロ環化合物 BMMP が 25 μM 程度の濃度で抗 HIV-1 活性を示すことが報告された。その作用メカニズムはコアの異常脱殻誘導であることが示唆され TRIM5 の擬似化合物であると考えられるが、詳細は明らかにされていない。今回、BMMP に結合する宿主蛋白質 hnRNP M を同定し、hnRNP M が HIV-1 増殖を促進することを明らかにした。また、HSP70 蛋白質は APOBEC3G と Vif の結合を阻害することで HIV-1 増殖を阻害するという報告がある。ここでは、金属を配位して酸素を活性化するキレーター HPH-Trt 10 μM が HSP70 誘導能を持つことを見出した。さらに、Vif 結合蛋白質由来ペプチド（のり）に蛋白質を分解するもの（はさみ）を結合させたペプチド分子を設計し、「はさみ」としてテトラペプチド HGGH を創製した。

A. 研究目的

これまでに、多くの抗エイズ薬が開発され、その結果エイズの発症進行を大幅に抑えることが可能になってきた。しかし、長期服用による毒性や、薬剤耐性ウイルスの発現が問題となっている。そこで、新しいターゲットを持つ薬の開発が望まれている。ここでは、近年その実態が明らかにされてきた抗ウイルス宿主因子を擬似または制御する分子の開発を目指した。

B. 研究方法

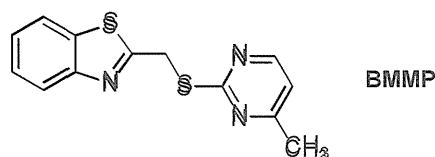
有機合成化学的手法により、化合物を合成した。評価等は、生化学的、ウイルス学的手法を用いて行った。

（倫理面への配慮）

本研究で行う組換えDNA実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律」および「熊本大学組換えDNA実験安全管理規定」を尊重して行った。

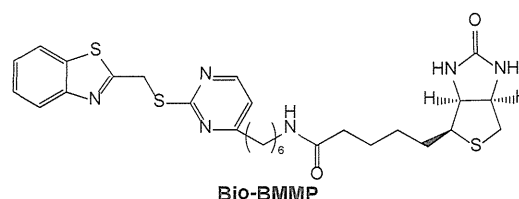
C. 研究結果

(1) 2011年、森川（北里大学）、駒野（感染研）らは化合物 BMMP が抗 HIV-1 活性を示すことを明らかにし、コアの異常脱殻誘導がその抑制メカニズムであることを示した。



しかし IC_{50} は 25 μM 程度と高くない。また、BMMP が Gag CA に作用することが示されているが、詳細は明らかになっていない。ここでは、BMMP の作用機序を明らかにしつつ、活性を向上させることを目指している。まず、作用解明の

ツールとしてビオチンが結合した BMMP (Bio-BMMP) を合成した。さらに M8166 細胞における感染実験により、Bio-BMMP が BMMP と同程度の抗 HIV-1 活性を持つことを示した。



(2) (1)で合成した Bio-BMMP をアビジン磁気ビーズに固定し、Pr55^{Gag} の発現ベクターを導入した 293T 細胞のライセートとインキュベーションした。ビーズを洗浄後に、ビーズに pull-down された蛋白質を SDS-PAGE および銀染色により解析した。その結果、強い蛋白質のバンドが見られた。バンドを切り出してトリプシン消化し、質量分析を行ったところ、この蛋白質は hnRNP (heterogeneous nuclear ribo-nucleoprotein) M4 (78K) であった。

(3) 293T 細胞内のこの hnRNP M 蛋白質を siRNA によりノックダウンし (hnRNP M1-4 の全てがノックダウンされる)、感染性クローン pNL4-3 を導入した。放出ウイルス量を p24 ELISA により調べ、p24 量を合わせて M8166/H1_{luc} 細胞に感染させ感染価を測定した。hnRNP M ノックダウン細胞から放出されるウイルスの量は少ない傾向が見られ、また感染価は顕著に低下していた。また、hnRNP M 蛋白質の発現ベクターを構築し、このベクターを導入して細胞内の hnRNP M 蛋白質を増やし、そこから放出されるウイルスのウイルス量、感染価を調べたが、これには特に変化が見られなかった。

(4) 精製されたウイルス粒子内に、全長の hnRNP