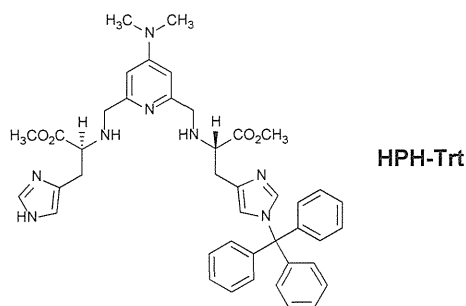


M 蛋白質は取り込まれていなかったが、開裂して生じた小さな蛋白質の存在が確認された。現在、検討を続けている。

(5) 多数の BMMP の誘導体を既に合成した。現在、評価を行っている。

(6) 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を高久 (千葉工大) らが行った。また、彼らはプロスタグランジン A₁ が HSP70 を誘導するとともに抗 HIV 効果を示すことも報告しているが、プロスタグランジン A₁ は様々な作用を持つため薬剤としては副作用が強いと考えられる。そこで今回、新しい HSP70 蛋白質誘導剤の創製を目指した。これまで HSP70 誘導剤としてはゲラニルゲラニルアセトン (GGA) が良く知られ、これは胃薬セルベックスとして知られている。今回は、GGA の誘導体をいくつか合成した。また、過酸化水素が HSP70 を誘導することが知られるが、これは当然のことながら毒性が強く、薬としては使用できない。そこで、我々が既に合成した、金属を配位して酸素を活性化する一連のキレターに着目した。これら GGA、その誘導体、金属キレターの HSP70 誘導能を種々の細胞を用いて調べた。そのうち HPH-1Trt (10 μM) が、T 細胞株 HSC-F において HSP70 を誘導することを見出した。HPH-1Trt は M8166 細胞や H9 細胞においては HSP70 を誘導しなかった。なお、神経細胞株 PC12 においてもこの誘導が見られた。現在 HPH-1Trt の抗 HIV 効果を検討中である。



(7) 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考えた。このような分子は合成が容易で、かつ Vif を特異的に分解すると考えられる。



今回ははさみとして、テトラペプチド HGGH を設計した。HGGH は金属と錯体を形成して酸素を活性化すると考えられるからである。そこで HGGH を有機化学的手法により合成し、その性質を調べた。その結果、金属、過酸化水素、アスコルビン酸などの存在下で、ブレオマイシン (抗癌剤として実際に使用されており、酸素を活性化して DNA を切断することが抗癌活性を示す作用機序であることが知られる) と同様に DNA 切断を行うことを示し、酸素活性化能力を持つことを明らかにした。現在、この分子が Vif を分解または変性させるかどうか調べている。

D. 考察

BMMP 研究においては、hnRNP M 蛋白質が HIV-1 増殖を促進する宿主因子であることを初めて明らかにした。現在、そのメカニズムと、この蛋白質と BMMP との関わりを調べている。その過程で BMMP の直接の標的蛋白質が明らかになり、今後の分子設計が容易になると考えられる。また、HSP70 誘導剤 HPH-1Trt を見出したが、これは弱いストレスを与えるものであると考えられ、広く自然免疫賦活分子としても期待される。HPH を持つ新規ペプチド分子は、新しい概念の機能分子と考えており、今後研究を続けたい。

E. 結論

抗ウイルス宿主因子を擬似・制御する分子に関して、いくつかの基礎的知見を得た。

F. 知的所有権の取得状況

特許出願準備中 (藤田美歌子、大塚雅巳、黒崎博雅、タハ ファロウク シェハタ アリ、平尚未: 酸素活性化能を持ち HSP70 を誘導する金属キレター)

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tateishi, H., Anraku, K., Koga, R., Okamoto, Y., Fujita, M., and Otsuka, M. 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, 2014.

2. 学会発表等

1) Fujita, M., Ciftci, H.I., Yamamoto, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Iwatani, Y., Otsuka, M.: SAMHD1-independent functions of HIV-2 Vpx protein. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Retroviruses. 2014年5月20日 (月)、Cold Spring Harbor, USA.

- 2) 藤野悠那、山本充奈美、Halil Ibrahim Ciftci、島垣和功、古賀涼子、大塚雅巳、藤田美歌子：HIV-2 Vpxにおける亜鉛フィンガーおよびC末端ポリプロリンモチーフの役割. 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) 加茂真宏、立石大、岡本良成、森川裕子、大塚雅巳、藤田美歌子：Gagに作用する抗HIV化合物BMMPの作用機序解明と活性改良の検討. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10日（月）、横浜.
- 4) 古賀涼子、江島智彦、金丸陽亮、田口祐、柴田佑里、井上純一郎、大塚雅巳、藤田美歌子：TRAF6ポリユビキチン化を抑制する低分子化合物のシグナル伝達阻害と抑制メカニズムに関する検討. 第37回日本分子生物学会年会. 2014年11月26日（水）、横浜.
- 5) 山本充奈美、藤野悠那、古賀涼子、チップチハリル、三隅将吾、大塚雅巳、藤田美歌子：HIV-2 Vpxにおける亜鉛フィンガー、ポリプロリンモチーフの役割と翻訳後修飾の意義. 第37回日本分子生物学会年会. 2014年11月26日（水）、横浜.
- 6) Ciftci Halil Ibrahim、藤野悠那、古賀涼子、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. 2014年12月4日（木）、大阪.
- 7) 立石大、安楽健作、村尾直樹、古賀涼子、岡本良成、大塚雅巳、藤田美歌子：HIV-1放出阻害を目指したイノシトールリン脂質誘導体の創製. 第28回日本エイズ学会学術集会. 2014年12月5日（金）、大阪.
- 8) 加茂真宏、立石大、岡本良成、森川裕子、大塚雅巳、藤田美歌子：Gagに作用する抗HIV剤BMMPの作用機序解明と活性改良の試み. 第28回日本エイズ学会学術集会. 2014年12月5日（金）、大阪.
- 9) モハメド オスマン ラドワン、古賀涼子、岡本良成、藤田美歌子、大塚雅巳：A novel zinc chelating inhibitor of NF- κ B activation: Biotin modification and docking study. 第31回日本薬学会九州支部大会. 2014年12月7日（日）、福岡.
- 10) 加茂真宏、立石大、山本充奈美、岡本良成、森川裕子、三隅将吾、大塚雅巳、藤田美歌子：抗HIV剤BMMPの作用機序解明と構造改変の試み. 日本薬学会第135年会. 2015年3月26日（木）、神戸（予定）.
- 11) チップチハリル イブラヒム、Aysenur Erdogan、Emre Arkan、古賀涼子、大塚雅巳、藤田美歌子、Mahmut Kus、Mustafa Can：カルバゾールとフェノチアジン誘導体の設計・合成および抗ガン活性の評価. 日本薬学会第135年会. 2015年3月27日（金）、神戸（予定）.
- 12) 古賀涼子、江島智彦、金丸陽亮、柴田佑里、田口祐、井上純一郎、大塚雅巳、藤田美歌子：TRAF6ポリユビキチン化を抑制する低分子化合物のシグナル伝達経路への作用と抑制メカニズムの検討. 日本薬学会第135年会. 2015年3月27日（金）、神戸（予定）.
- 13) 立石大、安楽健作、村尾直樹、門出和精、原田信志、古賀涼子、岡本良成、藤田美歌子、大塚雅巳：新規HIV-1放出抑制剤を目指したイノシトールリン脂質誘導体の創製. 日本薬学会第135年会. 2015年3月28日（土）、神戸（予定）.
- 14) Taha Ali、岩丸佳奈、Halil Ciftci、古賀涼子、黒崎博雅、藤田美歌子、岡本良成、秀拓一郎、牧野敬史、倉津純一、中尾光善、梅澤一夫、Mohamed Abdel-Aziz、Gamal El-Din Abu-rahma、Eman Beshr、大塚雅巳. 日本薬学会第135年会. 2015年3月28日（土）、神戸（予定）.

分担研究課題：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

研究分担者：徳永 研三（国立感染症研究所感染病理部 主任研究官）

研究協力者：多田 卓哉（国立感染症研究所感染病理部 流動研究員）

研究要旨

RING フィンガー型 E3 ユビキチンリガーゼである MARCH8 は、11 種類ある MARCH ファミリー蛋白の 1 つであり、MHC-II、CD86 やトランスフェリンレセプター等の様々な膜蛋白質をダウンレギュレートする宿主膜蛋白である。我々は昨年度までに、MARCH8 がマクロファージや樹状細胞で高発現していること、MARCH8 のウイルス産生細胞における発現がレンチベクター及び HIV-1 ウイルス粒子の感染性を低下させることを報告した。本年度の研究において、MARCH8 は HIV-1 複製前期しかもウイルスエントリーの段階を強力にブロックすること、それは MARCH8 の HIV-1 エンベロープまたは VSV-G との相互作用を介したウイルス粒子への取り込み抑制に依ることが明らかになった。更に MARCH8 を高発現しているマクロファージにおいて shRNA により MARCH8 をノックダウンした結果、そこから産生されたウイルスの感染性の著しい上昇が認められた。このことからマクロファージにおける内因性発現レベルの MARCH8 はウイルスの感染性を低下させるのに十分な量であることが分かった。本研究成果は、MARCH8 が APOBEC3G、TRIM5 α 、BST-2/tetherin、SAMHD1 及び MX2 に続く第 6 番目の主要抗ウイルス宿主因子であることを示すものである。

A. 研究目的

RING フィンガー型 E3 ユビキチンリガーゼである MARCH8 は、11 種類ある MARCH ファミリー蛋白の 1 つであり、種々の膜蛋白質をダウンレギュレートする宿主膜蛋白である。我々は昨年、MARCH8 が単球由来マクロファージ (MDM) や樹状細胞で高発現していること、MARCH8 のウイルス産生細胞における発現がレンチベクター及び HIV-1 ウイルス粒子の感染性を低下させることを報告した。本年度は MARCH8 の HIV-1 複製サイクルにおける阻害ステップを明らかにし、さらにその詳細な分子抑制機構に迫ることを目的とした。

B. 研究方法

1. 逆転写産物の定量実験

MARCH8 の HIV-1 逆転写・核移行への影響を調べるため、水泡性口炎ウイルス G 蛋白 (VSV-G) または HIV-1 エンベロープ発現ベクターと Env 変異型ルシフェラーゼレポーター-HIV-1 プロウイルス DNA を、MARCH8 発現ベクターまたはコントロールベクターと共に 293T 細胞へコトランスフェクションして、48 時間後に上清中の p24 量を ELISA により測定した。等量の HIV-1 Env シュードウイルスまたは VSV-G シュードウイルスを MAGIC5 細胞または 293T 細胞に感染させて、経時的 (4、8、24、48 時間後) にサンプリングした細胞から DNA を抽出し、それをを用いたリア

ルタイム PCR により、初期逆転写産物・後期逆転写産物・2-LTR (核移行 DNA) のコピー数を定量した。

2. エントリーアッセイ

HIV-1 プロウイルス DNA と共に β ラクタマーゼ融合型 Vpr (BlaM-Vpr) 発現ベクターと、MARCH8 発現ベクターまたはコントロールベクターを 293T 細胞にコトランスフェクションし、48 時間後に産生されたウイルスの p24 を定量した。等量のウイルスと MT4 細胞を 4 時間インキュベートした後、 β ラクタマーゼの蛍光基質である CCF2 を MT4 細胞に添加して 14 時間インキュベートした。非切断型 CCF2 (520 nm) および切断型 CCF2 (447 nm) の両シグナルをフローサイトメーターで測定することにより、エントリー効率を定量化した。同様の実験を VSV-G シュードウイルスでも行った。

3. エンベロープインコーポレーションアッセイ

等量の HIV-1 Env シュードウイルス (MARCH8+ または MARCH8-) のエンベロープ量を gp120 ELISA により定量した。次に HIV-1 Env シュードウイルスまたは VSV-G シュードウイルスを 25% スクロースに重層して、90,000 rpm で 10 分間、超遠心を行った。超遠心ペレットおよび細胞溶解液に SDS サンプルバッファーを加えて電気泳動を行い、抗 gp120 抗体、抗 VSV-G 抗体、抗 p24 抗体、または抗 MARCH8 抗体ウェスタンブロット法により解析を行った。

4. 免疫沈降法

N 末 HA タグ付加 MARCH8 発現ベクター、HIV-1 Env 発現ベクター及び Rev 発現ベクターを、または HA-MARCH8 発現ベクターと VSV-G 発現ベクターを 293T 細胞にコトランスフェクションした。40 時間培養した後、細胞溶解液を加えて遠心した上清を用いて、抗 anti-HA 抗体による免疫沈降反応を行った。抗 gp120 ポリクローナル抗体または抗 VSV-G モノクローナル抗体を用いた沈降物のウエスタンブロットにより、HIV-1 Env または VSV-G と MARCH8 との相互作用を検討した。

5. マクロファージにおける MARCH8 サイレンシング実験

MARCH8 shRNA (またはコントロール shRNA) 発現レンチベクター、パッケージングベクター及び VSV-G 発現ベクターを 293T 細胞へコトランスフェクションし、48 時間後に上清中の p24 量を定量した。あらかじめ M-CSF により分化させた二人のドナー由来のマクロファージに shRNA レンチベクターを導入した。導入 48 時間後に HIV-1 ルシフェラーゼレポーターウイルスを感染、産生された HIV-1 を、MAGIC5 細胞に感染させ、ルシフェラーゼアッセイを行うことにより、ウイルスの感染効率を定量した。

[倫理面への配慮] 遺伝子組換え実験は、国立感染症研究所・組換え DNA 実験安全委員会において平成 25 年 9 月 13 日付け承認番号・機 25-53 により、また大臣確認 (大臣確認通知番号: 平成 25 年 4 月 12 日付 24 受文科振第 3049 号および平成 25 年 9 月 20 日付 25 受文科振第 1849 号) により承認を得たプロトコールに従って行われた。

C. 研究結果

1. MARCH8 による HIV-1 複製前期の抑制

まず MARCH8 の抗ウイルス活性が、ウイルス複製のどの過程で認められるのかについて、VSV-G シュードウイルスを使用して、初期及び、後期逆転写物、さらに核移行の指標である 2-LTR のコピー数をリアルタイム PCR によって比較検討した。その結果、VSV-G シュードウイルスでは初期逆転写においてすでに MARCH8 の抑制効果が認められることが分かった。さらに HIV-1 でも VSV-G シュードウイルスと同様に初期逆転写における抑制効果が認められた (図 1)。このことから、MARCH8 は複製前期のもっとも最初のステップ、すなわちエントリーの部分に関与してい

る可能性が考えられた。

2. MARCH8 によるエントリーの阻害

上記の可能性を検証するため β ラクタマーゼ-vpr 融合型タンパク (以下、BlaM-Vpr) の系を利用したエントリーアッセイを行った。ウイルスと標的細胞をインキュベートしてエントリーが成立するとウイルス粒子内の BlaM-Vpr が細胞内に取り込まれ、あらかじめ標的細胞に取り込ませておいた蛍光基質である CCF2 が BlaM-Vpr によりクリーブされることによって、本来、緑色の蛍光色素を発する CCF2 が青色のシグナルを呈する切断型へと変化し、その両シグナルの測定によりエントリー効率を定量した。その結果、VSV-G シュードウイルス、また HIV-1 の両ウイルスにおいてエントリー効率の著しい低下が認められた (図 2)。このことから、産生細胞における MARCH8 の発現がウイルスのエントリーを負に制御することが明らかとなった。

3. MARCH8 によるエンベロップ蛋白のウイルス粒子への取り込み抑制

MARCH8 によるウイルスエントリー効率の低下の原因がウイルス粒子へのエンベロップの取り込みに起因するか否かについて検討した。まず、産生されたウイルス上清のエンベロップ量を市販の gp120 ELISA kit を用いて評価した結果、コトランスフェクションする MARCH8 DNA 量依存的に上清中のエンベロップ量が減少することが明らかとなった。この ELISA の実験系ではウイルス粒子上のエンベロップそのものを測定していないため、ウイルス粒子の超遠心精製を行い、そのペレットを用いたウエスタンブロットを行った。その結果、MARCH8 存在下では HIV-1 ウイルス粒子上の HIV-1 Env 及び VSV-G が共に著しく減少していた。このことから、MARCH8 はウイルス粒子へのエンベロップの取り込みを低下させることが明らかになった。

4. MARCH8 と HIV-1 Env および VSV-G との分子間相互作用

上記の結果を受けて、我々は MARCH8 のエンベロップへの影響がこの膜蛋白の HIV-1 Env および VSV-G に対する特異的な結合に依るものか否かを検討した。T7 エピトープタグを付加した MARCH8 と HIV-1 Env または VSV-G を共発現させて、抗 T7 エピトープ抗体により免疫沈降法を行った結果、予想通り、MARCH8 が HIV-1 Env と VSV-G の両方と相互作用することが分かった。

5. マクロファージにおける内因性発現レベルの MARCH8 の HIV-1 に対する抑制効果

昨年度の研究において、MARCH8 はマクロファージにおいて特に高い発現が認められたため、マクロファージにおける内因性発現レベルの MARCH8 がウイルスの感染性を低下させるのに充分であるか否かを確認すべくノックダウン実験を行った。まず、MARCH8 ノックダウンベクターを作製し、マクロファージでトランスダクションを行い、intact な Env を有する HIV-1 ルシフェラーゼウイルスの VSV-G シュードタイピングにより得られたウイルスを、MARCH8 ノックダウン細胞に感染させた。マクロファージから産生されたウイルスを MAGIC5 細胞に感染させ、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、感染効率の評価を行った。まず、shRNA によるノックダウン効率を検討したところ、2人のドナー由来のマクロファージにおいて MARCH8 の効率よいノックダウンが認められた。これらのマクロファージから得られたウイルスの感染性を評価した結果、どちらのウイルスにおいても著しい回復が認められた。このことから MARCH8 の内因性発現レベルはウイルスの感染性を低下させるのに十分な量であることが明らかになった。

D. 考察

宿主膜蛋白 MARCH8 はエンベロープ蛋白に特異的に結合して、ウイルス粒子中へのエンベロープ蛋白の取り込みを阻害することにより、ウイルスのエントリー効率を著しく低下させることが明らかになった。また内因性発現レベルの MARCH8 は HIV-1 の感染性の低下に十分な量であることが分かった。

本文中には示していないが、今回、MARCH8 は他の HIV-1 株由来の Env 蛋白に加えて、MuLV や XMRV の Env に対しても同様に抑制能を有していた。これらレトロウイルス科のウイルスのみならずラブドウイルス科の水疱性口炎ウイルスの G 蛋白にも抑制効果を示すことから、MARCH8 は幅広い抗ウイルススペクトラムを有することが考えられる。このことは、他の5種類の抗ウイルス宿主因子の中で、細胞内または核内局在性を示す APOBEC3G、TRIM5 α 、SAMHD1、または MX2 がレトロウイルス特異的な活性を示すのに対して、膜蛋白 BST-2/tetherin が広範囲な抗エンベロープウイルス活性を示すことと共通

しており、抗ウイルス宿主膜蛋白の特徴として大変興味深い。

最後に、本研究結果より我々は、MARCH8 が APOBEC3G、TRIM5 α 、BST-2/tetherin、SAMHD1 及び MX2 に続く第6番目の主要抗ウイルス宿主因子であると結論づける。

E. 結論

- 1) MARCH8 は HIV-1 複製前期をブロックする。
- 2) MARCH8 はウイルスエントリーを阻害する。
- 3) MARCH8 は HIV-1 Env および VSV-G のウイルス粒子中への取り込みを抑制する。
- 4) MARCH8 は HIV-1 Env および VSV-G と特異的に結合する。
- 5) マクロファージにおける MARCH8 の内因性発現レベルはウイルスの感染性を低下させるのに十分な量である。
- 6) MARCH8 は APOBEC3G、TRIM5 α 、BST-2/tetherin、SAMHD1 及び MX2 と並ぶ主要抗ウイルス宿主因子である。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Utachee, P., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Tokunaga, K., Ikuta, K., Takeda, N., Kameoka, M.: 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, 2014.
- 2) Zhou, D., Wang, Y., Tokunaga, K., Huang, F., Sun B, Yang, R.: The HIV-1 accessory protein Vpr induces the degradation of the anti-HIV-1 agent APOBEC3G through a VprBP-mediated proteasomal pathway. *Virus Res.* 195:25-34, 2015.
- 3) 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 (co-corresponding author), Miura, T.: Anti-APOBEC3G activity of

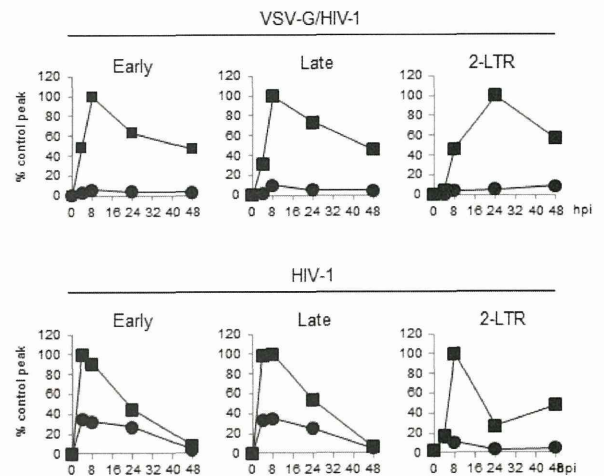
HIV-1 Vif protein is attenuated in elite controllers. *J. Virol. In press.*

- 4) 多田卓哉、徳永研三：抗ウイルス宿主因子 BST-2/tetherin とそれに拮抗するウイルス蛋白の分子間対決 Molecular Confrontation between the Host Restriction Factor BST-2/Tetherin and Its Viral Antagonists. 日本エイズ学会誌 The Journal of AIDS Research. 16: 126-136, 2014.

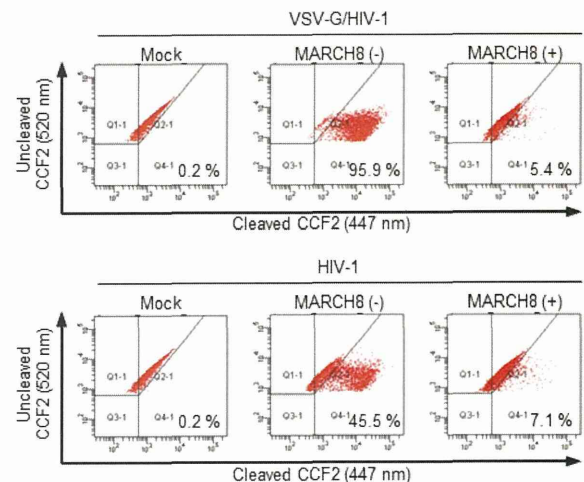
学会発表

- 1) 多田卓哉、張延昭、小山貴芳、山岡昇司、藤田英明、徳永研三：新規抗ウイルス宿主因子 MARCH8 による HIV-1 感染抑制機構の解明. 第 62 回日本ウイルス学会総会（横浜）2014. 11.
- 2) 張延昭、多田卓哉、山岡昇司、徳永研三：HIV-1 複製前期の抑制に関わる IFN 誘導性抗ウイルス宿主因子群の解析. 第 62 回日本ウイルス学会総会（横浜）2014. 11.
- 3) 高畑辰郎、徳永研三、長谷川温彦、神奈木真理、増田貴夫：HIV-1 インテグラーゼの非酵素的機能の解析. 第 62 回日本ウイルス学会総会（横浜）2014. 11.
- 4) 和田倭、小林（石原）美栄、寺原和孝、池野翔太、徳永研三、川名（立川）愛、山岸誠、竹山春子、横田（恒次）恭子：恒常的に培養維持された CD4 陽性 T 細胞への HIV-1 の感染とその転写制御機構の解明. 第 62 回日本ウイルス学会総会（横浜）2014. 11.
- 5) 高畑辰郎、徳永研三、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機能の解析. 第 28 回日本エイズ学会（大阪）2014. 12.
- 6) 多田卓哉、張延昭、小山貴芳、山岡昇司、藤田英明、徳永研三：新規宿主因子 MARCH8 は HIV-1 のエントリーを阻害する. 第 28 回日本エイズ学会（大阪）2014. 12.
- 7) Tada, T., Zhang, Y., Koyama, T., Yamaoka, S., Fujita, H., and Tokunaga, K. (speaker): Novel restriction factor MARCH8 blocks HIV-1 replication. XX International AIDS Conference, Melbourne, Australia, 2014. 7. (Late breaker's oral abstract)

[図 1]



[図 2]



分担研究課題：TRIM5 α による脱殻機序の解明とモジュレータの探索

研究分担者：中山 英美（大阪大学微生物病研究所 ウイルス感染制御分野 准教授）

研究要旨

HIV-1のカプシドと相互作用し、脱殻あるいは核移行に関与すると考えられている TRIM5 と Mx2 の 2 つの宿主細胞側因子について以下の研究を行った。(1) カプシドの 4 番目と 5 番目の α ヘリックス間のループ (L4/5) にランダムな変異を導入したライブラリーを作成し、TRIM5 α 耐性能を持ち増殖効率の良いウイルスの分離を試みた。半年に渡る耐性誘導の結果、2 カ所の変異 V86A と G116 を持つウイルスが得られた。同じ方法で以前に TRIMCyp 耐性ウイルスを得た場合は導入した L4/5 の変異だけが選択されたが、TRIM5 α の場合 L4/5 とは離れたヘリックス 6 に適応変異が誘導されており、TRIMCyp よりも TRIM5 α はカプシドの広範囲に渡る立体構造を認識していると考えられた。(2)Mx2 は主にマクロファージで抗 HIV-1 活性を示す宿主因子だが、報告されている活性は 30 年前に樹立された実験室株 NL43 を使って測定された結果である。現在流行している HIV-1 が Mx2 に対する抵抗性を獲得したのか否かを検討するために、2005、2007、2009、2011 の各年にタイで行われた性産業に従事する 20 歳代女性に対するサーベイランスで新規感染者として同定された方々の血漿中のウイルスのカプシド領域を PCR にて増幅し塩基配列を決定した。カプシドの 207 番目がセリンの場合に MX2 に対する部分的な抵抗性を示すが、抵抗性と考えられるセリン株の割合は 10%以下で 2005 年から 2011 年の間に増加する傾向はなく、In vitro で過剰発現させれば顕著な抗 HIV-1 活性を示す Mx2 に対して抵抗性を持たないウイルスも人から人へと現在も伝播し続けていると考えられた。その理由として、HIV-1 が主に増殖する CD4 陽性 T 細胞においては Mx2 の発現あるいは機能が十分でない可能性が挙げられ、CD4 陽性 T 細胞にける Mx2 の発現あるいは機能増強が抗 HIV-1 戦略となり得ると考えられた。

A. 研究目的

(1) TRIM5 α 耐性ウイルスの誘導

カニクイザル *TRIM5* 遺伝子には、TRIM5 α と TRIMCyp の 2 つの遺伝的多型が存在する。これまでに TRIMCyp 耐性 HIV-1 はサイクロフィリン A (CypA) が結合するカプシド蛋白質の 4 番目と 5 番目の α ヘリックス間のループ (L4/5) を SIVmac のものと置き換えることで得られている。また、L4/5 にランダムな変異を導入した HIV-1 ライブラリーから TRIMCyp 存在下で増殖するウイルスを選択することにより、アミノ酸置換数のより少ない耐性 HIV-1 の作成に成功している。本年度は、同様のウイルスライブラリーから、TRIM5 α 耐性能を持ちかつ増殖効率の良いウイルスの分離を試みた。

(2) 最近感染した感染者体内の HIV-1 株の Mx2 感受性の解析

Mx2 は主にマクロファージにおいて抗 HIV-1 活性を示す宿主因子だが、報告されている活性は 30 年前に樹立された実験室株 NL43 を使って測定された結果である。ヒト-ヒト間で伝播を繰り返して 30 年経過した現在流行している HIV-1 が変異して Mx2 に対する耐性を獲得して来ているのか否かを検討した。

B. 研究方法

(1) TRIM5 α 耐性ウイルスの誘導

L4/5 にランダム変異を導入した 10^4 クローンの

プロウイルスライブラリーを作成した。まず、PRYSPRY ドメインを欠く TRIM5 を発現するセンダイウイルスを感染させた MT4 細胞に感染させ、増殖可能なウイルスのみを選択して増幅させた。得られた HIV-1 ライブラリーをカニクイザルの TRIM5 α をセンダイウイルスベクターで高発現させた MT4 細胞に感染させ、耐性ウイルスを誘導し、更にセンダイウイルス非感染 MT4 細胞を培養に加えることでわずかに増殖したウイルスをレスキューするサイクルを繰り返し、カニクイザル TRIM5 α を発現するセンダイウイルス感染 MT4 細胞でも増殖可能なウイルスを得た。そして感染細胞のプロウイルス DNA から、カプシド蛋白質をコードするウイルス遺伝子部分を PCR で増幅し、その塩基配列を決定した。

観察された変異を NL43 株に導入し、Vif が SIVmac のものに置き換わっている NL-SVR プラスミドの BssH II と Spe I 制限酵素部位を用いて組換えた。常法に従い 293T 細胞にプラスミドを導入し、3 日後の培養上清をウイルスストックとして回収した。株化 T 細胞 MT4 にカニクイザル TRIM5 α あるいは SPRY 領域を欠いた TRIM5 を発現するセンダイウイルスベクターを感染させ、9 時間後に HIV-1 (NL4-3) および改変した HIV-1 を感染させ、感染 1、3、および 6 日後の培養上清中の p24 抗原量を ELISA 法にて測定した。

(2) 最近感染した感染者体内の HIV-1 株の Mx2 感受性の解析

タイ王国国立衛生研究所の Siriphan Saeng-aroon博士、本村和嗣博士の協力の下、2005、2007、2009、及び2011年に行われた性産業従事者の20歳代女性に対するサーベイランスで新規感染者として同定された感染者の血漿中のウイルスのカプシド領域をPCRにて増幅し塩基配列を決定した。系統樹解析はMEGA5を用い近隣結合法にて行った。HIV-1のMx2感受性解析は、ヒトMX2タンパク質を発現するセンダイウイルスベクターをヒトCD4陽性MT4細胞に感染させ、MX2過剰発現細胞におけるHIV-1の増殖を、培養上清中のカプシド抗原量をELISAにて測定して検討した。Mx2耐性を示すと報告のあったカプシドの207番目のアミノ酸のプロリンからセリンへの置換を持つウイルスは人為的変異導入により作成した。

(倫理面への配慮)

本研究はタイ国立衛生研究所の倫理審査を経て行った。遺伝子組換え実験は「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、大臣確認および機関承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) TRIM5 α 耐性ウイルスの誘導

カニクイザル TRIM5 α に耐性のウイルスはセレクションとレスキューを6回繰り返した結果、86番目のバリンがアラニンに置換した変異 (V86A) と116番目のグリシンがグルタミン酸に置換した変異 (G116E) を持つウイルスとして得られた。次に、VifがSIVmacのものに置き換わっているNL-SVRプラスミドにこのV86AG116E変異を導入した分子クローンを作成し、そのウイルスのTRIM5 α 耐性を改めて検証したところ、部分的な耐性が確認された。(図1)。さらにV86Aだけでも部分的な耐性が確認され、この変異がカニクイザルTRIM5 α 耐性獲得に重要であることが明らかとなった。またこの変異を持つウイルスの増殖力は親株と比べ大きく損なわれてはいなかった。

(2) 最近感染した感染者体内のHIV-1株のMx2感受性の解析

2005年、2007年、2009年、並びに2011年に感染したと考えられる感染者201人の血漿から174人についてカプシド領域の塩基配列を得ることが出来た。主要なサブタイプはCRF01_AEであり全体の92.4%を占めていた。年代別では、2005年に38人、2007年に40人、2009年に28人、2011年に52人であった。Mx2を発現する細胞でHIV-1のNL43株を継代すると耐性変異が生じることが本年度にアメリカのグループから報告されたが、それに相当するNL43株の207番目のアミノ酸をプロリンからセリンに置換したNL43-P207Sウイルスを作

成したところ、Mx2高発現下でも増殖が可能で、不完全ではあるが耐性を獲得することが確認された(図2)。今回アミノ酸配列を決定した感染者体内のHIV-1の中で207番目のアミノ酸がMx2耐性のセリンの株はそれぞれ7.9%, 5.0%, 3.6%, 9.6%でMX2耐性の臨床株の割合は、本研究で得られた2005年から2011年の間では大きく増える傾向はなかった。系統樹解析を行ったところ、セリンを持つウイルスがまとまったクラスターを形成することはなかった(図3)。

D. 考察

(1) TRIM5 α 耐性ウイルスの誘導

86番目のアミノ酸はL4/5のヘリックス4に近い箇所であるCypAとの結合には影響が無いと考えられる。一方で、G116E変異は以前、我々がサルTRIM5 α を発現していないヒト細胞CEMにおいて増殖力が改善するサル指向性HIV-1を得ようとした過程で観察された変異であり、想定外に1アミノ酸変異でカニクイザルTRIM5 α に対するわずかな耐性を付与すると報告した変異と一致している。変異ライブラリーとして導入したL4/5とは異なる場所に耐性誘導中に獲得された変異であり、116番目のアミノ酸が位置するヘリックス6がカニクイザルTRIM5 α と相互作用する部位として重要であることが改めて確認されたことになる。これらの変異を持つウイルスの試験管内での増殖力は親株と比べ大きく損なわれているわけではなく、現在、TRIM5 α ホモ接合体のカニクイザルへの感染実験を計画している。

(2) 最近感染した感染者体内のHIV-1株のMx2感受性の解析

In vitroで過剰発現させれば顕著な抗HIV-1活性を示すMx2に対して抵抗性を持たないと考えられるウイルスも人から人へと現在も伝播していると考えられた。その理由として、HIV-1が主に増殖するCD4陽性T細胞でのMx2の発現あるいは活性が十分ではない可能性が挙げられる。

E. 結論

V86AG116E変異により部分的にHIV-1がカニクイザルTRIM5 α 耐性を示すことが明らかになった。また、Mx2の持つ抗HIV活性に抵抗性がないと考えられるウイルスが現在も流行しており、Mx2の発現増強は抗HIV戦略となり得ると考えられた。

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) Takeda E, Kono K, Hulme AE, Hope TJ, Nakayama EE, 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 EE, Shioda T, Miyasaka M. The HIV-1 gp120/CXCR4 axis promotes CCR7 ligand-dependent CD4 T cell migration: CCR7 homo- and CCR7/CXCR4 hetero-oligomer formation as a possible mechanism for up-regulation of functional CCR7. *PLoS One* 10:e0117454, 2015.

3) Nomaguchi M, Nakayama EE, Yokoyama M, Doi N, Igarashi T, Shioda T, Sato H, Adachi A: Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 α . *Microbes and Infection*16:936-44, 2014.

2. 学会発表等

1) Nakayama EE., Tobita, S., Sultana, T., Saito A., Akari H., and Shioda T. Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings & Courses Program(RETROVIRUSES) May 19, 2014, Cold Spring Harbor, America

2) 武田英里、河野健、Amy E. Hulme、Thomas J. Hope、中山英美、塩田達雄. TRIM5 α によるHIV-1 および HIV-2のカプシドコアの脱殻促進:可視化ウイルスによる解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日、横浜.

3) Tahmina Sultana、中山英美、飛田哲志、齊藤暁、明里宏文、塩田達雄. Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会、2014年12月3日、大阪.

4) 田谷かほる、武田英里、中山英美、塩田達雄、明里宏文、金子新. 再生医療技術のエイズ研究応用のためのアカゲザルiPS細胞樹立とCD34陽性細胞への分化. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会、2014年12月3日、大阪.

5) 武田英里、河野健、Amy E. Hulme、Thomas J. Hope、中山英美、塩田達雄. TRIM5 α 存在下における HIV-1 および HIV-2 のカプシドコアの脱殻. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会、2014年12月3日、大阪.

6) 中山英美、Uttayamakul Sumonmal、Tiphaine Oudot-Mellakh、Pimrapat Tengtrakulcharoen、Julien Guernon、Jean-Francois Delfraissy、Srisin Khusmith、Chariya Sangsajja、Sirirat Likanonsakul、Ioannis Theodorou、塩田達雄. Genome-wide association study of HIV-related lipotrophy in Thai patients: Association of a DLGAP1 polymorphism with fat loss. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会、2014年12月3日、大阪.

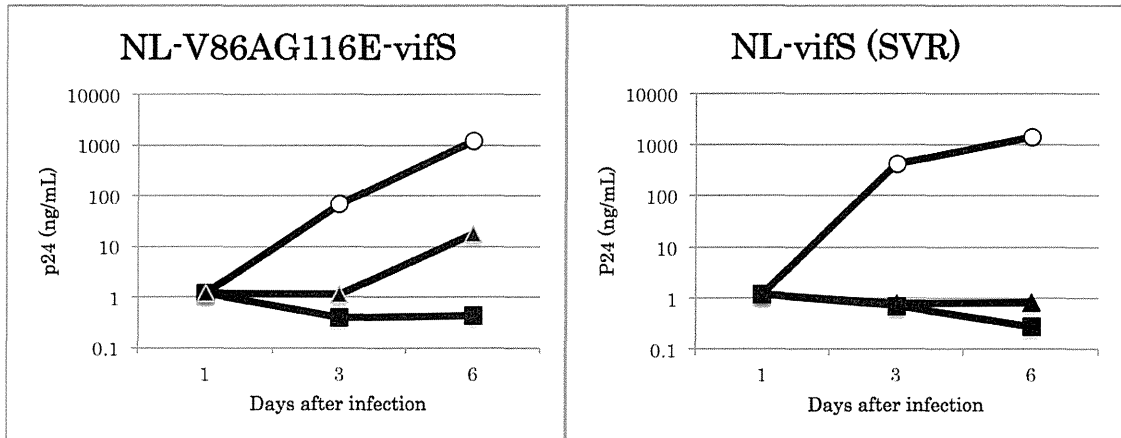


図1 カプシド変異を持つ HIV-1 のカニクイザル TRIM5 α /TRIM5 γ 感受性
 ▲はカニクイザルTRIM5 α 発現細胞、■はカニクイザルTRIM5 γ 発現細胞、○はSPRYドメイン欠損TRIM5発現細胞(抗ウイルス因子陰性コントロール)でのウイルス増殖を示す。縦軸はカプシド抗原量を示す。

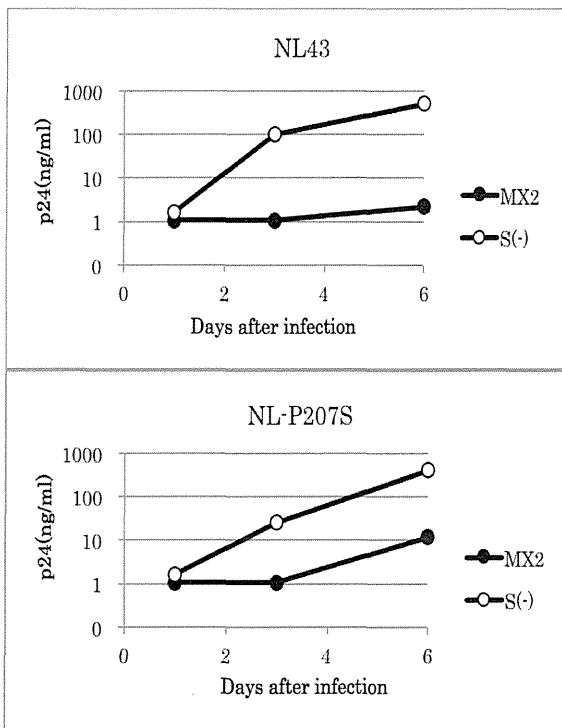


図2 HIV-1 の Mx2 感受性
 ●はヒトMx2発現細胞、○はSPRYドメイン欠損TRIM5発現細胞(抗ウイルス因子陰性コントロール)での増殖を示す。縦軸は増殖したHIV-1のカプシド抗原量を示す。

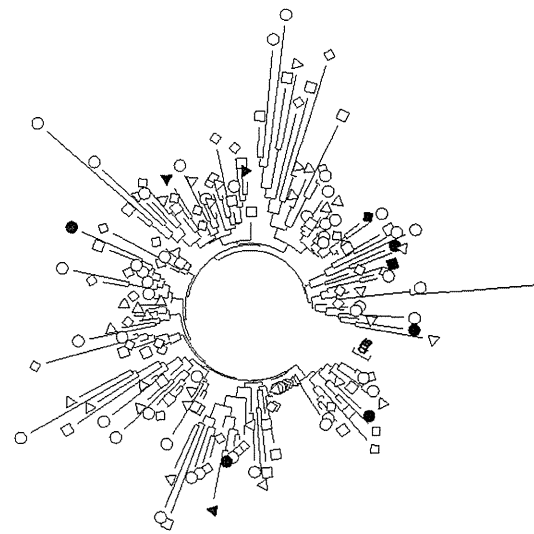


図3 サブタイプ AE カプシドのアミノ酸配列に基づく系統樹解析

▼:2005年分離ウイルスでカプシドの207番目のアミノ酸がセリンのもの。
 ▽:2005年分離ウイルスで207番目のアミノ酸がセリン以外のもの。
 ◆:2007年分離ウイルスで207番目のアミノ酸がセリンのもの。
 ◇:2007年分離ウイルスの207番目のアミノ酸がセリン以外のもの。
 ■:2009年分離ウイルスで207番目のアミノ酸がセリンのもの。
 □:2009年分離ウイルスで207番目のアミノ酸がセリン以外のもの。
 ●:2011年分離ウイルスで207番目のアミノ酸がセリンのもの。
 ○:2011年分離ウイルスで207番目のアミノ酸がセリン以外のもの。
 マーカーなし: NL43

分担研究課題：HIV-2 Vpx の機能解析

研究分担者：藤田 美歌子（熊本大学薬学部附属創薬研究センター 准教授）

研究要旨

2011年、HIV-2 Vpx が抗ウイルス宿主因子 SAMHD1 をプロテアソーム分解することでウイルス増殖性が付与されることが報告された。そこで我々が既に行った変異体解析の結果を見直したところ、T細胞におけるウイルス増殖には Vpx の SAMHD1 分解非依存的機能が関わることが示唆された。一方、マクロファージにおける HIV-2 増殖が、全て Vpx の SAMHD1 分解能で説明されるかどうかは明らかでない。そこで変異体解析を行った。その結果、Vpx の SAMHD1 分解非依存的機能を見出すことはできなかった。意外なことにこの解析において、Vpx の持つ特徴的な領域である亜鉛フィンガーモチーフとポリプロリンモチーフの新しい役割を見出した。

A. 研究目的

HIV-2は、Vprに加えてその類似蛋白質Vpxも持つ。Vpxはマクロファージにおけるウイルス増殖に必須であり、またT細胞においてはウイルス増殖性を増強することが知られる。2011年、HIV-2 Vpxが抗ウイルス宿主因子SAMHD1をプロテアソーム分解することでウイルス増殖性が付与されることが報告された。そこで我々が既に行った変異体解析の結果を見直したところ、T細胞におけるウイルス増殖にはVpxのSAMHD1分解非依存的機能が関わることが示唆された。一方、マクロファージにおけるHIV-2増殖が、全てVpxのSAMHD1分解能で説明されるかどうかは明らかでない。そこで、変異体解析を行った。

B. 研究方法

Vpxの点変異体のシリーズ（全長にわたる点変異体19個）を用いてSAMHD1分解活性を調べ、そのウイルス増殖付与能力と比較した。SAMHD1分解非依存的機能の存在の可能性を示す変異体について、さらに詳細にその機能を調べた。

（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) 昨年度までに、Vpx 存在下における SAMHD1 の分解を観察する系を立ち上げた。この際、野生株 Vpx の量が多過ぎると SAMHD1 の分解が見られないことを見出し、pcDNA hSAMHD1 (SAMHD1 の発現ベクター) 3.24 µg と pEF-Fvpx (N 末端に FLAG タグを持つ Vpx の発現ベクター) 0.06 µg を 293T 細胞に導入することにした。まず、この条件で変異 Vpx 存在下での SAMHD1 の発現量を調べたところ、野生株 Vpx の他、P4L、

N33S、E43G、C87A、H94A、P103A、P109A 存在下で、SAMHD1 の発現量が顕著に低下していた。これらの変異体を野生型と分類した。

(2) (1)で、19 個の変異体のうち SAMHD1 分解を示す 7 つの変異体を明らかにした。その他のものについては変異 Vpx 蛋白質の量が分解に適していない（既に、変異の種類によって発現量が異なることを示している）だけで、用いる Vpx 発現ベクターの量を変えれば分解能を示す可能性もある。そこで、残りの 12 個の変異体について、発現ベクター量を 0.0075 µg から 1.9 µg まで細かく変えて、SAMHD1 の発現量を調べた。その結果、E30G、H39L、W49L、S63A、R70A、H82A については分解が見られた。この分解の程度は野生株よりも低いか、または分解に必要な発現ベクターの量が野生株のものより多いことから、これらの変異体を中間型と分類した。また、この系においても分解が全く見られなかった変異体 P10L、E15G、E20G、W24L、W56L、Q76A は Vpx 欠損型と分類した。

(3) (1)および(2)で見られた結果と、既に報告した、マクロファージにおける Vpx 変異体のウイルス増殖性付与能力を比較した。変異体の発現量が非常に低かった W24L、N33S、H39L、W49L、W56L は、増殖性付与能力を全く持たないかわずかにしか持たなかった。その他の変異体については、これらの 2 つの能力に、おおむね一致が見られた。すなわち野生型の SAMHD1 分解能力を持つものは野生株と同様の増殖性付与能力を持ち、中間型の SAMHD1 分解能力を持つものは中間型の増殖性付与能力を持ち、SAMHD1 分解能力が見られなかったものは増殖性付与能力を全く持たないかわずかにしか持たなかった。しかし、4 つの例外があった。SAMHD1 分解能力が見られなかったが中間型の増殖性付与能力を持つ P10L、中間型の SAMHD1 分解能力を持つが十分な増殖性付

与能力を持つ E30G、野生型の SAMHD1 分解能力を持つのにも関わらず増殖性付与能力が中間型である C87A および P109A である。

(4) (3)で見られた例外的な性質を持つ C87A および P109A 変異体を、SAMHD1 分解非依存的機能が低下したものの候補として位置づけ、さらに詳細な解析を行った。まず、これらの2つの変異体について、発現ベクター量を 0.0075 µg から 1.9 µg まで細かく変えて、293T 細胞における SAMHD1 の発現量を調べた。その結果、野生株が十分な SAMHD1 分解量を示す 0.03 µg および 0.06 µg 以外のいくつかのベクター量でも、これら2つの変異体は SAMHD1 分解活性を示した。意外なことに P109A 変異体は、ベクター量が 1.9 µg と多くても SAMHD1 を分解した。この理由として、Vpx の多量化が E3 ユビキチンライゲース錯体の生成を妨げるが(この錯体内で Vpx は単量体である)、P109A 変異体は多量化能が低下していることが考えられた。既に Vpx-Vpx 相互作用を観察する系を立ち上げ、変異体について調べたが、19 個の変異体のシリーズの中では P109A のみにおいて Vpx-Vpx 相互作用が低下していることが観察されている(このシリーズに含まれないがポリプロリンモチーフのそれぞれのアミノ酸をアラニンに変えた変異体を用いてこの解析を行ったところ、P106A においても Vpx-Vpx 相互作用の低下が見られた)。これにより、P109A 変異体は過剰な蛋白質発現量を持っていても SAMHD1 を分解すると予想される。

(5) C87A および P109A 変異体が全長の HIV から十分に発現されるのか、またウイルス粒子に取り込まれるかについて調べた。まず、Vpx 抗体 (HIV-2 Vpx monoclonal antibody 6D2.6) がこれらの変異蛋白質に対しても反応するかどうか確認したところ、C87A には反応したが、P109A を認識することはできなかった。そこでまず、293T 細胞に HIV-2 感染性クローン pGL-AN を導入し、この抗体を用いて細胞内の発現を調べたところ、意外なことに C87A 変異体の発現量が著しく低下していた。FLAG タグを N 末端に持つ発現ベクターからは十分な量の C87A 変異体の発現が見られていたが、この違いが何に起因するのか検討中である。また、P109A 変異体については、ポリクローナル抗体を用いた実験が既に行われており(未発表)、ビリオンへの取り込みが確認されている。なお、この抗体の感度が低いため、細胞内での発現量は調べられていない。

(6) P109A 変異 Vpx を持つ HIV-2 の感染前期過程における欠損を調べた。pGL-Ns (pGL-AN の *env*

欠損体) またはその変異体と VSV-G の発現ベクターを 293T 細胞に共導入し、放出ウイルスを PMA 分化 THP-1 細胞に感染させ、DNA を抽出してリアルタイム PCR 解析を行った。その結果、Vpx 欠損体では、既に報告されているとおり逆転写過程における欠損が見られた。一方 P109A 変異体では、Vpx 欠損体ほど顕著ではないものの逆転写過程における欠損が観察された。

(7) P109A 変異 Vpx が HIV-2 の感染後期過程において欠損を持つかどうか調べた。PMA 分化 THP-1 細胞(マクロファージ様細胞)に対するトランスフェクション効率の向上を検討したところ、300 nM の PMA を用いて THP-1 細胞を分化させ((6)で用いた分化 THP-1 細胞も同これと同様に調整)、リポフェクタミン 3000 を用いてトランスフェクションすることで、p27 ELISA キットで検出可能な量のウイルスが放出されることがわかった。この方法で pGL-AN またはその変異体を導入し、上清のウイルス量を調べたところ、Vpx 欠損体や P109A 変異体は野生株と同様にウイルスを放出することがわかった。なお、同じ実験系を用いて HIV-2 Vpr の効果を確かめたところ、Vpr のウイルス放出抑制効果が見られており、感染者体内のリザーバーにおいて Vpr が働いている可能性を予想し現在検討を行っている。

(8) (6)での実験と同様に感染させた PMA 分化 THP-1 細胞における内在性 SAMHD1 の量をウエスタンブロット法により調べた。野生株 Vpx を持つウイルス感染においては SAMHD1 量の著しい低下が見られたが、Vpx 欠損体では SAMHD1 量に低下が見られなかった。意外なことに P109A 変異体においては SAMHD1 量の少しの低下が見られ、野生株ほどの十分な低下は見られなかった。同じタイターのウイルスを 293T 細胞に感染させた場合、P109A においても十分な SAMHD1 量の低下が見られており、P109A の SAMHD1 分解能はマクロファージ特異的に低下していることが示唆された。また、(3)で述べたように P10L 変異体は SAMHD1 分解能力が見られなかったが中間型の増殖性付与能力を持つ。この変異体についても同様に感染 PMA 分化 THP-1 細胞における内在性 SAMHD1 の量を調べたところ、この細胞内では少しの分解が見られていた。

(9) C87A 変異体以外の亜鉛フィンガー形成に関わるアミノ酸の変異体、P109A 以外のポリプロリンモチーフのアミノ酸の点変異体を既に構築し、亜鉛フィンガーおよびポリプロリンモチーフの役割を現在詳細に検討している。

D. 考察

P109A変異体では、Vpx-Vpx相互作用が弱く過剰な蛋白質量でもSAMHD1を分解すること、マクロファージ特異的にSAMHD1分解活性が低下していることが示された。すなわちポリプロリンモチーフ上の109番目のプロリンは、2つの経路でSAMHD1分解を制御すると考えらる。既にポリプロリンモチーフはVpxの翻訳を促進していることを示したが、この他にもマクロファージ特異的にSAMHD1分解を促進する役割があると考えられる。しかし、このモチーフにより蛋白質の多量化も促進し過剰に蛋白質があるとSAMHD1分解が逆に妨げられるため、ウイルス粒子内のVpx蛋白質量は適量に調整されていると推定される。

E. 結論

本研究において、マクロファージにおけるSAMHD1分解非依存的機能を見出すことはできなかった。しかしその過程で、Vpxの亜鉛フィンガー部位が蛋白質発現に関わること、ポリプロリンモチーフがSAMHD1分解を制御すること、特にマクロファージ特異的に分解を促進することを示した。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tateishi, H., Anraku, K., Koga, R., Okamoto, Y., Fujita, M., and Otsuka, M. 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, 2014.

2. 学会発表等

1) Fujita, M., Ciftci, H.I., Yamamoto, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Iwatani, Y., Otsuka, M.: SAMHD1-independent functions of HIV-2 Vpx protein. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Retroviruses. 2014年5月20日 (月)、Cold Spring Harbor, USA.

2) 藤野悠那、山本充奈美、Halil Ibrahim Ciftci、島垣和功、古賀涼子、大塚雅巳、藤田美歌子: HIV-2 Vpxにおける亜鉛フィンガーおよびC末端ポリプロリンモチーフの役割. 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) 加茂真宏、立石大、岡本良成、森川裕子、大塚雅巳、藤田美歌子: Gagに作用する抗HIV化合物BMMPの作用機序解明と活性改良の検討. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10日 (月)、横浜.

4) 大杉剛生、若宮誠、森川沙樹、中村直子、川辺正等美、藤田美歌子: HTLV-1感染細胞株およびHTLV-1 TaxトランスジェニックマウスにおけるDok-1,2および3の発現. 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) 古賀涼子、江島智彦、金丸陽亮、田口祐、柴田佑里、井上純一郎、大塚雅巳、藤田美歌子: TRAF6ポリユビキチン化を抑制する低分子化合物のシグナル伝達阻害と抑制メカニズムに関する検討. 第37回日本分子生物学会年会. 2014年11月26日 (水)、横浜.

6) HIV-2 Vpxにおける亜鉛フィンガー、ポリプロリンモチーフの役割と翻訳後修飾の意義. 第37回日本分子生物学会年会. 2014年11月26日 (水)、横浜.

7) Ciftci Halil Ibrahim、藤野悠那、古賀涼子、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. 2014年12月4日 (木)、大阪.

8) 立石大、安楽健作、村尾直樹、古賀涼子、岡本良成、大塚雅巳、藤田美歌子: HIV-1放出阻害を目指したイノシトールリン脂質誘導体の創製. 第28回日本エイズ学会学術集会. 2014年12月5日 (金)、大阪.

9) 加茂真宏、立石大、岡本良成、森川裕子、大塚雅巳、藤田美歌子: Gagに作用する抗HIV剤BMMPの作用機序解明と活性改良の試み. 第28回日本エイズ学会学術集会. 2014年12月5日 (金)、大阪.

10) モハメド オスマン ラドワン、古賀涼子、岡本良成、藤田美歌子、大塚雅巳: A novel zinc chelating inhibitor of NF- κ B activation: Biotin modification and docking study. 第31回日本薬学会九州支部大会. 2014年12月7日 (日)、福岡.

11) 加茂真宏、立石大、山本充奈美、岡本良成、森川裕子、三隅将吾、大塚雅巳、藤田美歌子: 抗HIV剤BMMPの作用機序解明と構造改変の試み. 日本薬学会第135年会. 2015年3月26日 (木)、神戸 (予定).

12) チップチ ハリル イブラヒム、Aysenur Erdogan、Emre Arkan、古賀涼子、大塚雅巳、藤田美歌子、Mahmut Kus、Mustafa Can: カルバゾールとフェノチアジン誘導体の設計・合成および抗ガン活性の評価. 日本薬学会第135年会. 2015年3月27日 (金)、神戸 (予定).

13) 古賀涼子、江島智彦、金丸陽亮、柴田佑里、田口祐、井上純一郎、大塚雅巳、藤田美歌子: TRAF6ポリユビキチン化を抑制する低分子化合物のシグナル伝達経路への作用と抑制メカニズムの検討. 日本薬学会第135年会. 2015年3月27日

(金)、神戸 (予定)

14) 立石大、安楽健作、村尾直樹、門出和精、原田信志、古賀涼子、岡本良成、藤田美歌子、大塚雅巳：新規HIV-1放出抑制剤を目指したイノシトールリン脂質誘導体の創製. 日本薬学会第135年会. 2015年3月28日 (土)、神戸 (予定)

15) Taha Ali、岩丸佳奈、Halil Ciftci、古賀涼子、黒崎博雅、藤田美歌子、岡本良成、秀拓一郎、牧野敬史、倉津純一、中尾光善、梅澤一夫、Mohamed Abdel-Aziz、Gamal El-Din Abuo-rahma、Eman Beshr、大塚雅巳. 日本薬学会第135年会. 2015年3月28日 (土)、神戸 (予定)

