

201421016A

平成26年度 厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
H25-エイズ-一般-003

HIVGag 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

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 佐藤 裕徳
(国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・室長)

平成26年度 厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
H25-エイズ-一般-003

HIVGag 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

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 佐藤 裕徳
(国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・室長)

研究組織

研究者名	分 担	所 属	役 職
佐藤 裕徳	研究代表者	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター	室 長
野間口雅子	研究分担者	徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部	准教授
塩田 達雄	研究分担者	大阪大学微生物病研究所 感染機構研究部門	教 授
増田 貴夫	研究分担者	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科	准教授
梁 明秀	研究分担者	横浜市立大学 医学部微生物学	教 授
蝦名 博貴	研究分担者	京都大学ウイルス研究所 附属ヒトレトロウイルス研究施設	助 教
間 陽子	研究分担者	理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット	ユニットリーダー
櫻木 淳一	研究分担者	大阪大学微生物病研究所 感染機構研究部門	助 教
玉村 啓和	研究分担者	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所	教 授
村上 努	研究分担者	国立感染症研究所 エイズ研究センター	室 長
足立 昭夫	研究協力者	徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部	教 授
横山 勝	研究協力者	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター	主任研究官

目次

I. 総括研究報告書	1
研究代表者:佐藤 裕徳 (国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター)	
II. 分担研究報告書	
柱 1. Gag 蛋白質の機能構造と変化能の研究	
1. HIV Gag ^{p24} カプシド蛋白質の治療標的候補部位の絞り込み.....	5
佐藤 裕徳 (国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター)	
2. HIV Gag の致死的変異の解析	9
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)	
柱 2. HIV の複製研究	
3. HIV 粒子脱殻における Gag の機能に関する研究.....	13
塩田 達雄 (大阪大学微生物病研究所)	
4. HIV ゲノム逆転写新規制御における Gag 蛋白質と関連因子.....	17
増田貴夫 (東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科)	
5. Gag の細胞内輸送機構に関する研究～翻訳後修飾を中心に.....	21
梁 明秀 (横浜市立大学 医学部)	
6. 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.....	24
蝦名 博貴 (京都大学ウイルス研究所)	
7. HIV-1 アクセサリー蛋白質のパッケージングにおける Gag の機能の研究.....	28
間 陽子 (理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット)	
8. HIV Gag 蛋白質とウイルスゲノム RNA との相互作用に関する解析	32
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)	
柱 3. 抗 HIV 化合物研究	
9. 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.....	34
玉村 啓和 (東京医科歯科大学 生体材料工学研究所)	
10. Gag ペプチドを用いた Gag 機能部位の研究.....	40
村上 努 (国立感染症研究所 エイズ研究センター)	
III. 業績一覧(2014).....	43

I. 総括研究報告書

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

課題番号：H25-エイズ一般-003

研究代表者：佐藤 裕徳（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 室長）

研究分担者：塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所 教授）、増田 貴夫（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 准教授）、梁 明秀（横浜市立大学医学部、教授）、櫻木 淳一（大阪大学微生物病研究所 助教）、間 陽子（理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニット ユニットリーダー）、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）、蝦名 博貴（京都大学ウイルス研究所 助教）、村上 努（国立感染症研究所エイズ研究センター 室長）、玉村 啓和（東京医科歯科大学学生体材料工学研究所 教授）

1. 研究目的

HIV 感染症に苦しむ患者は現在も 3,000 万人を超える。治療法は格段に進歩し、感染者のエイズ発症を阻止できるようになった。しかし、現在の方法では HIV を完全に制御すること（治療：cure）はできず、エイズを発症しなくても様々な問題が生じうる。引き続き、より良い制御法の開発に向けて基盤的研究を継続する必要がある。そこで本研究では、まだ治療標的となっていない HIV 「Gag」蛋白質に着目し、その構造、機能、変化能の理解を深め、新しい HIV 制御法を開発するための基盤を作る。

Gag 蛋白質は、HIV 粒子の主要な構造蛋白質として、ウイルス粒子形成と感染性維持、および細胞におけるウイルス複製の進行、など HIV 生活環全般に重要な役割を果たす。また自然免疫と獲得免疫の標的となる。有力な治療標的候補だが、この分子を標的とする HIV 制御法は確立していない。生細胞内における Gag の多彩な機能を評価する実験系の構築が難しいこともあり、一般には、機能部位を標的とする分子の論理的な設計、あるいは抗 HIV 分子の作用点や特異性の評価は難しい。

そこで本研究では、生命科学、及び異分野の先端技術を取り入れながら新たな Gag 解析プラットフォームを構築し、Gag 蛋白質の構造、機能、変化能に関わる新知見を集積し、得られた成果を基に抗 HIV 分子候補の設計、合成、改変を進め、低分子化合物等を利用した新しい HIV 制御法を開発するための情報・技術基盤を作る。

2. 研究方法

研究代表者の *in silico* 構造解析を軸に異種研究グループが連携して Gag 解析プラットフォームを構築する。これを用いて機能部位を同定し、構造特性と可変性を明らかにする。有力な弱点部位が見つければこれを標的とする分子を設計・合成し、抗 HIV 活性を評価する。

柱1. 構造解析研究（計算科学）：コンピュータを用いる分子シミュレーションと数理解析の解析基盤を構築し、Gag 機能部位の保存される構造特性や相互作用を明

らかにする（佐藤、研究協力者：横山勝）。

柱2. HIV複製研究（ウイルス学）：ライブイメージング等を活用して細胞内Gag前駆体の局在、ゲノムRNAとの会合の場、細胞内動態、あるいは細胞に侵入したHIVコアの動態等を解析する実験系を構築し、変異導入解析や宿主因子の発現制御実験により、細胞におけるGag機能を制御するシス・トランス因子を明らかにする。研究代表者と共同で、Gagの機能を司る構造特性を明らかにする（塩田、蝦名、増田、野間口、間、梁、櫻木、佐藤）。

柱3. 創薬シード探索（ケミカルバイオロジー）：有機合成化学の技術を用いて細胞内に導入可能なGag部分ペプチド誘導体のライブラリーを作製し、抗HIV活性を評価する。柱1、2の研究者と共同で、抗HIV分子候補の設計、合成、改変を進め、抗HIV活性を評価する（玉村、村上、佐藤）。

（倫理面への配慮）

遺伝子組換え生物等を用いる実験については、所属機関の承認を得て、「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」を遵守して行なった。

3. 研究結果

（1）Gag カプシド（CA）蛋白質の治療標的候補部位の選定：有力な治療標的候補部位として CA 蛋白質 α ヘリックス 9（h9）を選別した。①h9 由来ペプチド誘導体が抗 HIV 活性をもつ（玉村、村上）。②h9 内に HIV/SIV で高度に保存されるトリプトファン残基（W184）が存在し、疎水性相互作用のネットワークを形成することで CA 二量体の安定化に寄与する（佐藤）。③h9 近傍の変異は、CA 二量体の不安定化、自然免疫エフェクター TRIM5 α への感受性亢進、感染者ウイルス量の低下につながる（塩田、佐藤、Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7）。（2）HIV コア脱殻・逆転写の分子機序：HIV コア脱殻の動態解析系の構築に成功し、TRIM5 α は侵入してきたコアを細胞質内で認識して破壊することで感染を阻害すること、Gag マトリクス蛋白質（MA）の N 末変異が脱殻を促進し、同時にゲノム逆転写障害をも

たらずこと、等がわかった（塩田、村上）。HIV ゲノム逆転写の素過程の効率を定量解析する無細胞再構築系の樹立に成功し、逆転写反応の律速段階がストランド転移過程であること、Gag スクレオカプシド (NC) は 1st ストランド転移効率を上昇させることがわかった（増田）。（3）感染後期過程の分子機序：細胞内の Gag 前駆体と HIV RNA を観測するライブイメージング系の構築に成功し、CA アミノ酸残基 134 と 149 が Gag 前駆体の細胞質膜での集合、細胞質輸送の制御部位であることがわかった（蝦名、野間口）。HIV ゲノムパッケージングの独自解析系を構築し、HIV ゲノム LTR SL1 領域は未報告のバルジ・ループ・ステム機能構造をとることがわかった（櫻木）。Gag 翻訳後修飾を司る宿主蛋白質を包括的に同定する実験系を構築し、Gag p6 Ser487 が aPKC によりリン酸化されること、aPKC 阻害剤が p6 リン酸化の減弱を介してウイルス粒子感染性の低下に結びつくことがわかった（梁）。（4）創薬シード探索：Tsg101-Gag p6 結合阻害分子を同定した。これらの化合物はマクロファージでのウイルス複製を阻害した（間）。MA および CA 部分ペプチドライブラリーの中から、抗 HIV 活性をもつものを特定した、二次構造を維持するように共有結合で架橋したステーブルペプチドは、細胞膜を透過することができ、細胞で抗 HIV 活性を示した（玉村、村上）。

4. 考察

柱 1-3 の異なるアプローチで得られた結果は、全て、CA 蛋白質の h9 が HIV/SIV の急所の一つであることを強く示唆した。W184 を介する疎水性相互作用ネットワークを破壊させる分子を設計・合成できれば、ウイルス粒子形成や細胞内コア脱殻を阻害する HIV 複製阻害剤のリード化合物が得られると期待される。

HIV の発見後 30 年を経たが、生細胞における Gag の機能については未解決課題が多く残されている。Gag を標的とする制御法開発の蓋然性を高めるには、Gag の弱点となる機能の理解が不可欠となる。本研究の実施により、ライブイメージング等の技術を取り入れた細胞内 Gag 観察系の構築が進み、班員の共同研究で HIV 複製制御機構の新知見が集積した。いずれも、今後の解析結果次第で、治療標的部位の同定に結びつく。本研究の継続により、異種分野が連携する新たな Gag 解析プラットフォームの構築が進み、Gag 機能を制御するシス・トランス制御因子の新たな知見が蓄積し、Gag を標的とする新しい HIV 制御法の開発・情報基盤が形成されると期待される。

5. 自己評価

1) 達成度について

当初計画は順調に達成された。*in silico* 構造解析を軸に異種研究グループが有機的に連携する Gag 解析プラットフォームの構築が順調に進み、HIV 複製における Gag の機能と自然免疫エフェクターの作用機構に関する新知見が集積し、治療標的部位候補の構造特性と変化能の解析が進んだ。特に Gag CA 蛋白質について、HIV の弱点候補が特定された。これらの研究活動により、Gag を標的とする創薬シード探索の情報・技術基盤の構築が進んだ。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究では、異種分野連携により HIV 複製研究に新たな道を開き、成果を HIV 制御戦略の構築に活用する。この試みは、世界的にも極めてユニークである。研究を通じて種々の新しい Gag 解析手法が創成され、Gag の構造・機能・進化の特徴と HIV 複製機構の理解が深まる。これにより Gag を標的とする HIV 制御法を論理的に開発する新しい技術・情報基盤が構築される。すでに種々の新たな Gag 機能アッセイ系の構築に成功し、有力な治療標的候補を同定する、などの成果を得ている。ウイルス学の進展を通じて科学と技術の進展と普及に寄与することから、学術的、国際的な意義が高い。さらに、新たな HIV 制御戦略の構築に貢献する点から社会的意義も高い。

3) 今後の展望について

異種分野連携基盤の構築も順調に進み、HIV の弱点と目される Gag CA 蛋白質の相互作用を明らかにしていることから、新しい HIV 制御法の開発基盤を作るとの当初目標の達成は可能と考えられる。最終年度は、柱 1-3 の Gag CA の成果を基に創薬シード探索を行う。一方、依然として Gag の機能に不明な点が多く、未同定の治療標的部位が存在する可能性も高い。このため引き続き柱 1-3 の研究を継続し、HIV の弱点候補を探索する。

6. 結論

ウイルス学・計算科学・ケミカルバイオロジーが有機的に連携する独自性の高い Gag 解析基盤の構築が順調に進み、Gag 機能を制御するシス・トランス制御因子の構造と可変性の知見が順調に蓄積した。また、Gag CA の有力な弱点部位候補が判明し、その構造特性も明らかになった。これらの研究成果により、Gag を標的とする HIV 制御法を開発する蓋然性が高まった。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

該当無し。

研究発表

研究代表者

佐藤裕徳

- 1) 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 TRIM5 α . *Microbes Infect.* Nov; 16(11) : 936-944, 2014.
- 2) Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yokoyama, M., Sato, H., Masuda, T., and Adachi, A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. *J Virol.* Apr;88(8) : 4145-4160, 2014.
- 3) Burwitz, B., Wu, H., Reed, J., Hammond, K., Newman, L., Bimber, B., Nimiyongskul, F., Leon, E., Maness, N., Friedrich, T., Yokoyama, M., Sato, H., Matano, T., O'Connor, D., and Sacha, J. Tertiary mutations stabilize CD8+ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol.* Mar; 88(6) : 3598-3604, 2014.
- 4) Kudoh, A., Takahama, S., Sawasaki, T., Ode, H., Yokoyama, M., Okayama, A., Ishikawa, A., Miyakawa, K., Matsunaga, S., Kimura, H., Sugiura, W., Sato, H., Hirano, H., Ohno, S., Yamamoto, N., and Ryo, A. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology.* Jan 22; 11(1) : 9, 2014.
- 5) Motozono, C., Yokoyama, M., Sato, H., and Ueno, T. Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths. *Microbes Infect.* Apr; 16(4) : 320-327, 2014.

研究分担者

塩田達雄

- 1) Hayasaka, H., Kobayashi, D., Yoshimura, H., Nakayama, E.E., Shioda, T., and 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* 2014 Accepted.
- 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 TRIM5 α . *Microbes infect.* 16(11) : 936-944, 2014.
- 3) Taya, K., Nakayama, E.E., and Shioda, T. Moderate restriction of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 9(3) : e90969, 2014.

増田貴夫

- 1) Kinpara, S., Itoh, S., Takahata, T., Saitoh, Y., Hasegawa, A., Kijiyama, M., Utsunomiya, A., Masuda, M., Miyazaki, Y., Matsuoka, M., Nakamura, M., Yamaoka, S., Masuda, T., and Kannagi, M. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and anti-sense viral RNA in the constitutive NF κ B activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Leukemia* (in press).
- 2) Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yokoyama, M., Sato, H., Masuda, T., and Adachi, A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. *J Virol.* 88:4145-4160, 2014.

野間口雅子

- 1) 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.
- 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 TRIM5 α . *Microbes and Infection* 16: 936-944, 2014.
- 3) 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.
- 4) Miyake, A., Miyazaki, Y., Fujita, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. Role of poly-proline motif in HIV-2 Vpx expression. *Frontiers in Microbiology* 5: 24. doi: 10.3389/fmicb.2014.00024, 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.
- 6) Miyake, A., Fujita, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Otsuka, M., Ode, H., Iwatani, Y., Sakai, Y., Doi, N., Nomaguchi, M., Adachi, A., and Miyazaki, Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient

translation. *Journal of General Virology* 95: 179-189, 2014.

梁 明秀

- 1) Watashi, K., Sluder, A., Daito, T., Matsunaga, S., Ryo, A., Nagamori, S., Iwamoto, M., Nakajima, S., Tsukuda, S., Borroto-Esoda, K., Sugiyama, M., Tanaka, Y., Kanai, Y., Kusuhara, H., Mizokami, M., and Wakita, T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Hepatology* 59:1726-1737, 2014.
- 2) Kurotaki, D., Yamamoto, M., Nishiyama, A., Uno, K., Ban, T., Ichino, M., Sasaki, H., Matsunaga, S., Yoshinari, M., Ryo, A., Nakazawa, M., Ozato, K., and Tamura, T. IRF8 inhibits C/EBP α activity to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. *Nat Commun.* 5:4978, 2014.
- 3) Nishi, M., Akutsu, H., Kudoh, A., Kimura, H., Yamamoto, N., Umezawa, A., Lee, S.W., and Ryo, A. Induced cancer stem-like cells as a model for biological screening and discovery of agents targeting phenotypic traits of cancer stem cell. *Oncotarget* 5:8665-8680, 2014.
- 4) Okayama, A., Miyagi, Y., Oshita, F., Nishi, M., Nakamura, Y., Nagashima, Y., Akimoto, K., Ryo, A., and Hirano, H. Proteomic Analysis of Proteins Related to Prognosis of Lung Adenocarcinoma. *J Proteome Res.* 13:4686-4694, 2014.
- 5) Kudoh, A., Takahama, S., Sawasaki, T., Ode, H., Yokoyama, M., Okayama, A., Ishikawa, A., Miyakawa, K., Matsunaga, S., Kimura, H., Sugiura, W., Sato, H., Hirano, H., Ohno, S., Yamamoto, N., and Ryo, A. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology.* 11:9, 2014.
- 6) Furukawa, A., Sugase, K., Morishita, R., Nagata, T., Kodaki, T., Takaori, A., Ryo, A., and Katahira, M. Quantitative analysis of the location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 53:2349-2352, 2014.
- 7) Nishi, M., Sakai, Y., Akutsu, H., Nagashima, Y., Quinn, G., Masui, S., Kimura, H., Perrem, K., Umezawa, A., Yamamoto, N., Lee, S.W., and Ryo, A. Induction of cells with cancer stem cell properties from nontumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene.* 33:643-652, 2014.

間陽子

- 1) Hagiwara, K., Ishii, H., Murakami, T., Takeshima, S-n., Chutiwitoonchai, N., Kondo, Y., Honda, K., Osada, H., Tsunetsugu-Yokota, Y., Suzuki, M., and Aida, Y. Synthesis of a Vpr-binding derivative for use as a novel HIV-1 inhibitor. *Antivirus Res.*, in press.
- 2) Murakami, T., and Aida, Y. Visualizing 1 Vpr-induced G2 arrest and apoptosis. *PLoS ONE* 9(1):e86840, 2014.
- 3) Zahoor, M. A., Xue, G., Sato, H., Murakami, T., Takeshima, S-n., and Aida, Y. Visualizing 1 Vpr-induced G2 arrest and apoptosis. *PLoS ONE* 9(8):e106418, 2014.
- 4) Miyatake, H., Sanjoh, A., Unzai, S., Matsuda, G., Tatsumi, Y., Miyamoto, Y., Dohmae, N., and Aida, Y. Crystal structure of human importin- α 1 (Rch1), revealing a potential autoinhibition mode involving homodimerization. *PLoS ONE* 9(8):e106418, 2014.

玉村啓和

- 1) Masyuk, M., Abduelmula, A., Morosan-Puopolo, G., Ödemis, V., Rehimi, R., Khalida, N., Yusuf, F., Engele, J., and Tamamura, H. Carsten Theiss & Beate Brand-Saberi, Retrograde Migration of Pectoral Girdle Muscle Precursors Depends on CXCR4/SDF-1 Signaling. *Histochem. Cell. Biol.* 142(5) : 473-488, 2014.
- 2) Yamamoto, J., Maeda, N., Komiya, C., Tanaka, T., Denda, M., Ebisuno, K., Nomura, W., Tamamura, H., Sato, Y., Yamauchi, A., Shigenaga, A., and Otaka, A. Development of a Fluoride-responsive Amide Bond Cleavage Device that is Potentially Applicable to a Traceable Linker. *Tetrahedron* 70(34) : 5122-5127, 2014.
- 3) Takano, H., Narumi, T., Ohashi, N., Suzuki, A., Furuta, T., Nomura W., and Tamamura, H. Development of the 8-Aza-3-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl Group as a New Entry of Photolabile Protecting Groups. *Tetrahedron* 70(29) : 4400-4404, 2014.
- 4) Yamamoto, J., Denda, M., Maeda, N., Kita, M., Komiya, C., Tanaka, T., Nomura, W., Tamamura, H., Sato, Y., Yamauchi, A., Shigenaga, A., and Otaka, A. Development of a Traceable Linker Containing a Thiol-responsive Amino Acid for the Enrichment and Selective Labelling of Target Proteins. *Org. Biomol. Chem.* 12(23) : 3821-3826, 2014.
- 5) Narumi, T., Tsuzuki S., and Tamamura, H. Imidazolium Salt-Catalyzed Friedel-Crafts-Type Conjugate Addition of Indoles: Analysis of Indole/Imidazolium Complex by High Level ab Initio Calculations. *Asian J. Org. Chem.* 3(4) : 497-503, 2014.
- 6) Narumi, T., Takano, H., Ohashi, N., Suzuki, A., Furuta, T., and Tamamura, H. Isostere-Based Design of 8-Azacycoumarin-type Photolabile Protecting Groups: A Hydrophilicity Increasing Strategy for Coumarin-4-ylmethyls. *Org. Lett.* 16(4) : 1184-1187, 2014.

II. 分担研究報告書

研究課題： HIV Gag^{p24} カプシド蛋白質の治療標的候補部位の絞り込み

研究分担者：佐藤 裕徳（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 室長）
研究協力者：横山 勝（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官）
玉村 啓和（東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授）
村上 努（国立感染症研究所 エイズ研究センター 室長）
塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所 教授）

研究要旨

柱1-3の連携により、HIV Gag^{p24} カプシド蛋白質の有力な治療標的候補部位を絞り込んだ。① α -helix 9 (h9) は、W184 を介する疎水性相互作用により HIV コアの安定化に重要な役割を果たしている。② W184 は、HIV/SIV で極めて高度に保存されている。③ 玉村・村上らが報告した抗 HIV ペプチド誘導体 (19L；玉村らの分担報告書参照) は、h9 に合致する。④ Cotten、塩田、佐藤らが報告した HIV-2 CA CTD 変異 (CA 二量体の不安定化、TRIM5 α 感受性亢進、感染者血中ウイルス量の低下を誘起する変異；Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7) は、h9 に近接している。以上の結果と既報のウイルス学・免疫学情報は、h9 の W184 が介在する疎水性相互作用が HIV/SIV の急所の一つであることを強く示唆する。

A. 研究目的

HIV Gag蛋白質は、HIV粒子の主要な構造蛋白質として、ウイルス粒子形成と感染性維持、および細胞におけるウイルス複製の進行、などHIV生活環全般に重要な役割を果たす。また自然免疫と獲得免疫の標的となる。有力な治療標的候補だが、この分子を標的とするHIV制御法は確立していない。本研究では、Gag蛋白質の一つ「Gag^{p24} カプシド蛋白質」の構造・機能・可変性の理解を基に、治療標的部位の論理的な特定を試みた。

B. 研究方法

(1) 多様性解析：ロス・アラモス研究所 (HIV databases <http://www.hiv.lanl.gov/content/index>) より HIV-1/SIVcpz Gag全長アミノ酸配列 (n=6, 225) と HIV-2/SIVsmmのそれ (n=101) を取得し、既法 (Yokoyama et al., Front Microbiol. 2012, 3:312など) で、個々のアミノ酸残基の Shannon情報エントロピーを計算した。

(2) 構造解析：コア安定化に寄与する相互作用は、HIV-1コア構造情報 (成熟型) (Zhao G et al., Nature 497, 643-646, 2013) を材料として、MOE (Chemical Computing Group Inc., Montreal, Quebec, Canada) を用いて探索した。カプシド二量体の安定性は、二量体の結合エネルギー

($E_{bind} = E_{dimer} - 2E_{monomer}$) を指標として数値化した (Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7)。

(3) CA部分ペプチド誘導体の合成と抗HIV活性評価：合成は玉村らの研究グループ、活性評価は村上らの研究グループが行った。詳細は、分担研究報告書 (玉村) に記載されている。

(4) HIV-2のTrim5 α 感受性の解析：塩田らの研究グループ (柱2) が実施した。MT4にTrim5 α 発現用センダイウイルスとHIV-2を重感染させ、培

養上清に放出されるGag CA量をELISAで測定した (Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7)。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え生物等を用いる実験については、所属機関の承認を得て、「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」を遵守して行なった。

C. 研究結果

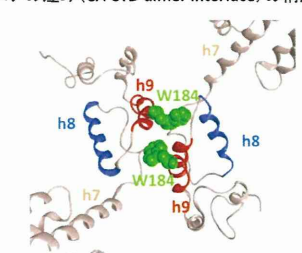
① 構造解析 (図1；成熟コア中のCA CTDドメイン二量体境界面の構造)：現時点で得られる最も精密なHIV-1コア構造情報 (成熟型) を材料とし、MOEを用いてコア安定性に寄与する相互作用を探索した。その結果、当初想定していたCAヘキサマー間には強い相互作用は認められなかった。一方でCAのC末ドメイン (CTD) の α -helix 9 (h9) の W184が介在する強い疎水性相互作用ネットワークが見出された。このネットワークを基盤としてCA二量体と六量体の安定化がおき、その後弱い相互作用でコアが安定化すると考えられる。

図1. 構造解析(柱1)

コアの安定化に重要なアミノ酸残基の探索



コアの窪み (CA CTD dimer interface) の構造

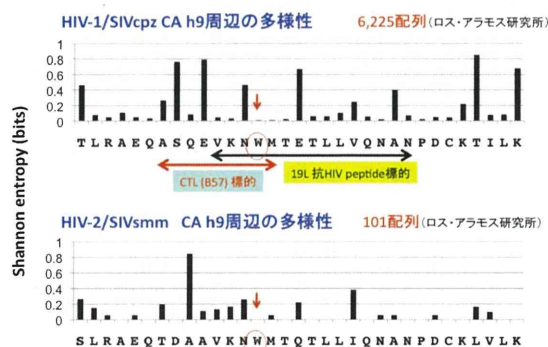


“W184”を介する「疎水性相互作用」で安定化

②多様性解析 (図2) : ロス・アラモス研究所に登録されているHIV-1/SIVcpz (n=6, 225)、およびHIV-2/SIVsmm (n=101) のCA全長配列のアライメント情報を用い、個々のアミノ酸サイトの情報エントロピーを調べた。その結果、W184残基は情報エントロピーがほぼ0で、情報の揺らぎが無いことがわかった。すなわちW184残基はHIV/SIV集団において極めて高度に保存されている。サル、並びにヒトで感染・増殖を繰り返す過程で変化することのできないアミノ酸残基と考えられる。

図2. 多様性解析(柱1)

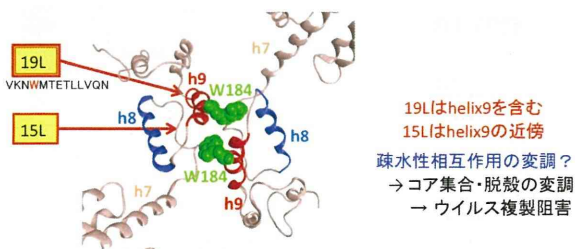
“W184” は、長期に渡るHIV/ SIVの増殖や流行の間に変化しない(できない)



③ケミカルバイオロジー (玉村、村上らの分担研究報告書、及び図3) : 玉村・村上らは、HIV-1 CA全長を網羅する合成ペプチドライブラリーを構築し、培養細胞を用いたHIV感染系で個々のペプチドの抗HIV活性を評価した。抗HIV活性をもつペプチドがCAの立体構造上でどの領域に位置するのかをMOEを用いて調べた。その結果、19Lは、h9にほぼ一致することがわかった。また他のCTD由来抗HIVペプチド誘導体 (15L) も、h9の近傍に位置することがわかった。これらのペプチドは、h9が介在する疎水性相互作用の変調を誘起することで抗HIV活性を発現する可能性が示唆された。なお、15Lは細胞障害性があることから、CA以外の分子を標的にしている可能性もある。

図3. ケミカルバイオロジー(柱3)

CA CTD由来抗HIVペプチド誘導体(15Lと19L)は、h9 近傍に位置する

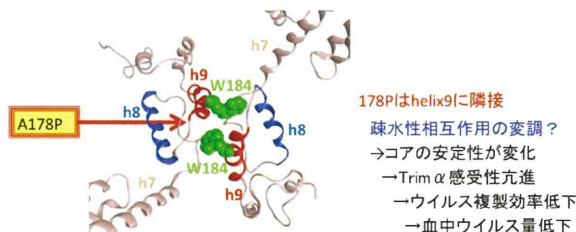


④構造生物学研究 (図4) : Cotton M、塩田、佐藤らは、HIV-2 感染者のCA 蛋白質CTDドメイン生じる3種の変異 (A119P, S159P, A178P) の構造生物学的意義を調べた。その結果、これらの変異がCA二量体の不安定化、自然免疫エフェクターTRIM5 α への感受性亢進、感染者の血中ウイルス量の低下を誘起することを見出した (Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7)。今回、これらの変異の立体構造上での位置を調べた。これらはCTD 7-h9の間に生じ、立体構造上はh9に近接しており、その1つ (A178P) はh9に隣接することがわかった。

また、その周辺は、感染者のウイルス量を制御する活性をもつCTLエピトープB57の標的となっていることもわかった (図2)。これらの変異は感染者におけるウイルスの適応度を低下させる。それにもかかわらず一部の感染者で維持されるのは、CTLが強い選択圧として働き、HIVはまず増殖能を犠牲にしてもCTLを逃避する必要があるからかもしれない。

図4. 構造生物学(柱1&2)

血中ウイルス量、Trim5 α 感受性、CA二量体安定性を制御する HIV-2 Gag CA変異 (Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7)は、h9に隣接



D. 考察

柱1-3の異なるアプローチで得られた結果は、CA蛋白質の h9のW184が介在する疎水性相互作用ネットワークがHIV/SIVの急所の一つであることを強く示唆する。この相互作用は、カプシド二量体の安定化を通じてコアの安定化を保証する (図1)。塩田、佐藤らはCA二量体並びにコア安定性の変調がTRIM5 α 感染阻害感受性を増強することを示している (Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7、および塩田の分担研究報告書)。コア安定性には適切な範囲のCA二量体安定性が必要で、この安定性の変調はウイルスの増殖能の変調や喪失につながると考えられる。W184は、HIV/SIVの感染と増殖の間に維持され、長期にわたって全く変化しない (図2)。W184が介在する「適切な」相互作用ネットワークの維持は、CA二量体とコアの「適切な」安定性の維持に必須なため、絶対に変化できないと考えられる。

最近、海外のグループにより、感染性ウイルス粒子形成の前提となるGag前駆体の順序だった集合のしくみについて興味深い知見が報告された。

(Robinson B A et al. *J. Virol.* 2014;88:5718-5741, Woodward CL et al. *J. Virol.* 2015;15:1267-1277, Schur FK et al. *Nature.* 2015;517:505-508)。これらの研究により、ウイルスコア成熟において、184Wを含むh9の疎水性アミノ酸残基が、適切なGag前駆体集合の進行に重要な働きをしていることが示された。

我々の研究班の解析結果と併せて考えると、CA CTD h9のW184は、HIV複製サイクル前期・後期の全般で一貫して重要な働きをしており、このため非常に強い「構造・機能変化の制約」がはたらくために全く変化できないと考えられる。そこで、W184を標的とし、これを介する疎水性相互作用ネットワークの変調、もしくは破綻を招く分子を設計・合成できれば、感染性ウイルス粒子の形成や細胞内での適切なコア脱殻を阻害する感染・複製阻害剤が得られると期待される。

仮にW184を標的とする阻害剤が得られたとしても、周辺の変異部位(図2)の変異で薬剤耐性ウイルスが発生するかもしれない。しかし、同時に変異による増殖能の低下効果も期待できる。すなわち、逃避変異が生じて、その変異はCA二量体の安定化に影響を与え、HIVの感染力低下を招き、結果的に感染者のウイルス量が低下する可能性がある。例えばW184を標的とするB57をもつ感染者のウイルス量は優位に低い(Nat Med. 2007,13(1):46-53)。また、エリートコントローラの40%前後はB57をもつ。これらの報告は、B57によるウイルス制御は強力であると同時に、仮にCTL逃避変異が出現しても変異ウイルスの増殖能は低下していることを示唆する。上述のCotten、塩田、佐藤らの報告した3種のCA CTD変異(A119P, S159P, A178P)は、ウイルスのTRIM5 α 感受性亢進を招くにも関わらず、一部の感染者体内で維持される。この一見矛盾した観察結果も、CTLの関与を考えると説明できる。CTLが強い選択圧として働くため、HIVは増殖能を犠牲にしても変異する必要があると考えられる。同様に、W184を標的とする強力な選択圧となる薬剤を創成できれば、これを用いてHIVの増殖能が低下する方向に進化を誘導することで、エリートコントローラのようにHIVのより良い制御が可能となるかもしれない。

E. 結論

柱1-3研究が連携し、HIV Gag^{p24} カプシド蛋白質の有力な治療標的候補部位を絞り込んだ。最終年度は、CA CTD h9 W184を標的とする創薬シード探索を行う。

F. 知的所有権の取得状況

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

○ : Gag 論文., 無印 : 計算科学

1) Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of a large outbreak of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir in the 2103-14 influenza season in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (in press)

2) Kuroda M, Niwa S, Sekizuka T, Tsukagoshi H, Yokoyama M, Ryo A, Sato H, Kiyota N, Noda M, Kozawa K, Shirabe K, Kusaka T, Shimojo N, Hasegawa S, Sugai K, Obuchi M, Tashiro M, Oishi K, Ishii H, Kimura H. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C. *Sci Rep.* 5:8185, 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 Infect. *Microbes Infect.* 16:936-44, 2014.

4) 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.* 88:4145-60, 2014.

5) ○Burwitz B, Wu H, Reed J, Hammond K, Newman L, Bimber B, Nimiyongskul F, Leon E, Maness N, Friedrich T, Yokoyama M, Sato H, Matano T, O'Connor D, and Sacha J. Tertiary mutations stabilize CD8+ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 88:3598-604, 2014.

6) Motozono C, Yokoyama M, Sato H, and Ueno T. Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths. *Microbes and Infection* 16:320-7, 2014.

7) ○Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno S,

Yamamoto N, Ryo A. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology*. 11:9, 2014.

2. 学会発表等

○ : Gag., 無印 : 計算科学

1. ○佐藤裕徳. 病原性ウイルス研究と計算科学. MOEフォーラム2014, 7月8日(火)、2014年、東京.
2. 佐藤裕徳. シンポジウム「抗HIV薬の移り変わりから未来を考える」指定発言者(基礎) 第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 2014年12月3-5日(水-金)、大阪(大阪国際会議場).
3. ○佐藤裕徳. 「コンピュータ予測がHIVを追いつめる」市民公開講座・エイズ予防財団成果発表会「HIV感染症のCureは可能か? -基礎研究者の挑戦」第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 2014年12月3-5日(水-金)、大阪(大阪国際会議場).
4. Sato H, Yokoyama M, Nakamura H, Motomura K. Strong constraints on changes in capsid protein of norovirus pandemic lineage GII.4_2006b after the onset of outbreaks. XVI International Congress of Virology (The IUMS 2014). July 27 -August 1, 2014, Montreal, Canada.
5. Yokoyama M and Sato H. Structural dynamics and correlated motions of HIV-1 gp120 revealed by molecular dynamics simulation. XVI International Congress of Virology (The IUMS 2014). July 27 -August 1, 2014, Montreal, Canada.
6. 佐藤裕徳、横山勝、本村和嗣、中村浩美、田村務、吉澄志磨、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛、田中智之、Norovirus Surveillance Group of Japan. ヒト集団におけるノロウイルス流行株の多様性と進化. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水)、横浜.
7. 横山勝、中村浩美、佐藤裕徳. ノロウイルス GII.4カプシドにおける共変異部位の推定. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水)、横浜.
8. 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、横山勝、中村一哉、白倉雅之、菅原裕美、佐藤彩、佐藤裕徳、小田切孝人、全国地方衛生研究所. 2013/14シーズンにおけるNA阻害剤耐性A(H1N1)pdm09ウイルスの地域流行. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水)、横浜.
9. 引地優太、横山勝、竹村太地郎、藤野真之、熊倉成、山本直樹、佐藤裕徳、俣野哲朗、村上努. 新規CXCR4阻害剤KRH-3955耐性HIV-1の誘導とその解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水)、横浜.
10. ○関紗由里、野村拓志、西澤雅子、横山勝、佐藤裕徳、團塚愛、三浦智行、小柳義夫、俣野哲朗. SIVの持続感染・伝播における変異蓄積に関する研究. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水)、横浜.
11. 原田恵嘉、横山勝、Boonchawalit Samatchaya、佐藤裕徳、松下修三、吉村和久. CD4類似低分子化合物誘導体(CD4 MCs)の耐性プロファイルと分子動力的機構解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水)、横浜.
12. 佐藤裕徳、本村和嗣、横山勝. 環境ウイルスとヒト集団の関わり. 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25-27日(火-木)、横浜.
13. 横山勝、佐藤裕徳. ランダム行列理論によるHIV gp120の動的性質の解析. 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25-27日(火-木)、横浜.
14. 横山勝、佐藤裕徳. HIV-1 gp120における中和逃避ためのアロステリックパス. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 2014年12月3-5日(水-金)、大阪(大阪国際会議場).

研究課題：HIV Gag の致死的変異の解析

研究分担者：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）

研究要旨

HIV-1 は、ヒトで効率良く増殖するための配列・機能・構造を有する。Gag-capsid (CA) には、HIV/SIV 間で良く保存されたアミノ酸部位・領域と HIV-1 が固有に有するアミノ酸部位・領域とが存在する。HIV-1 のヒトでの増殖に必須の Gag-CA のアミノ酸部位・領域を明らかにするため、HIV-1 に固有の Gag-CA アミノ酸部位に SIVmac 型のアミノ酸変異を導入し半致死的・致死的変異を同定した。これらの変異の中には、ウイルス複製前期過程にのみ影響を及ぼすもの (A31K、S41Q、Q50Y) とウイルス複製後期過程にのみ影響を及ぼすもの (S149N) とが存在した。Gag プロセシングの欠損が示唆される特徴的な変異 (I134Q) も認められた。I134Q や S149N を含むヘリックス7とそれに続くリンカードメインの変異体 (11 種) では、ウイルス産生量が著しく低下しており、HIV-1 粒子形成に重要な領域であると考えられる。これまでも immature capsid assembly に関与するアミノ酸部位・領域が報告されているが、ヘリックス7とリンカードメインに関する解析は少ない。今後、本領域の変異が HIV-1 粒子形成に及ぼす影響を詳細に解析し、ウイルス複製における役割を解明することにより、HIV-1 の脆弱部位を明らかにする。

A. 研究目的

HIV-1はヒトでの増殖に非常に良く適応している。このため、HIV-1がコードする蛋白質はヒトで特異的かつ効率良く増殖するための配列を持ち、ウイルス複製に必須の機能・構造を維持している。HIV-1 Gag-capsid (CA) は、ウイルス複製能や宿主指向性の決定に寄与し、宿主細胞におけるウイルスの複製前期過程および後期過程に機能する。HIV/SIVのGag-CAが形成するウイルスコア構造は類似しているが、Gag-CAのアミノ酸配列は異なる。Gag-CAには、HIV/SIV間で良く保存されたアミノ酸部位・領域と、HIV-1が特異的 (HIV/SIV間で保存されていない) に持つアミノ酸部位・領域とが存在する。前者はGag-CAの機能・構造を保つために必須の配列であり、後者はHIV-1がヒトで効率良く増殖するために有する配列であると考えられる。従来、HIV/SIV間で良く保存されたアミノ酸部位の変異体解析により、ウイルス複製におけるGag-CAの機能・役割が研究されてきた。本研究では、HIV-1がヒトで増殖するために必須のGag-CAの機能・構造を明らかにするため、HIV-1 Gag-CA特異的なアミノ酸部位をSIVmac型に変え、HIV-1の致死的変異を探索・同定する。HIV-1 Gag-CAの致死的変異がウイルス複製素過程に及ぼす影響を調べ、Gag-CAの脆弱部位および変異箇所のウイルス複製における役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 変異体構築：HIVおよびSIVのGag-CAアミノ酸配列を比較し、HIV-1の配列が他のウイルスと異なるアミノ酸部位を抽出した。HIV-1 (NL4-3クローン) を親株として、これらの抽出した部位にSIVmac239型のアミノ酸を導入した変異体を site-directed mutagenesisにより構築した。

2. ウイルス調製：ウイルスは、293T細胞へのトランスフェクション (Lipofectamine2000もしくはリン酸カルシウム法) により調製した。ウイルス産生量は、逆転写酵素 (RT) アッセイもしくは HIV-1 p24 ELISA kitにより測定した。
3. ウイルス増殖能 (Multi-cycle replication)：ヒトリンパ球系H9細胞 (10^5) に等量のウイルス (10^4 RT units) を接種後、継時的に培地を回収した。培養上清中のウイルス産生量をRTアッセイにより測定した。
4. ウイルス感染価 (Single-cycle infectivity)：ルシフェラーゼレポーターTZM-bl細胞 (4×10^3) に等量のウイルス ($1 \sim 4 \times 10^4$ RT units) を接種後、細胞を回収しルシフェラーゼ活性を測定した。
5. Gag発現：293T細胞にプロウイルスクローンを Lipofectamine2000でトランスフェクションした。細胞粗抽出液をウェスタンブロッティングに供し、抗Gag-p24抗体を用いてGag蛋白質を検出した。
6. ウイルス産生量：AMD3100存在下で、H9細胞 (10^6) にプロウイルスクローン (2 μ g) とpGL3ベクター (2 μ g) をNucleofector IIでコトランスフェクション (Nucleofector kit V、プログラムX-005) 後、培養上清中のGag-p24量をELISA kitで測定した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来臨床材料を使用する研究や動物実験は行わない。組換えDNA実験は徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会 (委員長 足立昭夫教授) の承認を得て行う。「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

HIV-1 Gag-CAアミノ酸配列がHIV-2/SIVの配列とは異なるアミノ酸部位を抽出した。これらの部位にSIVmac239型のアミノ酸変異を導入し、24種のGag-CA変異体を構築した(図)。H9細胞でのウイルス増殖特性を調べた結果(表)、構築した変異体のうち、4種(E79D、R100S、I153V、Q179A)は親株と同程度の増殖特性を示したが、多くは半致死性的(ウイルス増殖が著しく減少)あるいは致死性的(感染実験期間15日中のウイルス増殖検出不能)変異であった。これらの変異がウイルス複製前期過程に及ぼす影響を調べるため、ルシフェラーゼレポーターT2M-bl細胞でのウイルス感染価を比較した(表)。大部分の変異体でウイルス感染価は低下し、A31K、K70R、R82L、T119Y、E128Nでは親株の5%以下となった。一方、S149N変異のみは、半致死性的変異であるにも関わらず、親株と同程度のウイルス感染価を示した。

ウイルス複製後期過程に及ぼす影響について、プロウイルスクローンをH9細胞にトランスフェクション後、ウイルス産生量を比較した結果(表)、A31K、S41Q、Q50Yは親株と同程度のウイルス産生能を示すことが分かった。他の変異体は全てウイルス産生能が減弱しており、S149Nは複製後期過程への影響により半致死性的となることが分かった。そこで、S149Nにおいて変異させるアミノ酸によってウイルス複製に及ぼす影響が変わり得るか否かを検討した(表)。S149A/S149D/S149Kは、いずれも致死性的変異であり、複製前期過程・後期過程とも親株よりも著しく低下していた。また、I135Qでは、T2M-bl細胞での感染価が10%程度にまで低下したので、直近の高度に保存されているI134に同じ変異Qを導入しウイルス複製への影響を調べた(表)。I134Qでは、ウイルス産生量をRTアッセイで測定できたが、p24 ELISAでは検出できなかった。そこで、I134QのGag発現を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べた。その結果、細胞内およびウイルス粒子でGag-p24が検出されず、Gagのプロセッシングに異常があることが示唆された。I134Qは、細胞内でのGag蛋白質の安定性にも影響している可能性があるため、今後、検討していく必要がある。

以上の結果(表)から、本研究で構築した半致死性的・致死性的変異体では、ウイルス複製前期過程にも後期過程にも悪影響を及ぼすものが多かったが、前期過程にのみ欠損(A31K、S41Q、Q50Y)および後期過程にのみ欠損(S149N)がある特徴的な変異を同定できた。特に、S149Nは変異させるアミノ酸をA/D/Kに変更すると、S149Nよりも複製前期・後期過程とも著しく低下することが分かり、アミノ酸の物理化学的性状によりGagの機能・構造が変わり得ることが分かった。

I134QやS149Nを含むGag-CAヘリックス7とそれに続くリンカードメインでは、構築した他の変異体(E128N、K131R、I135Q、N139Q、I141C、S146N、S149A、S149D、S149K)も全てウイルス産生量を減じ、ウイルス複製に致死性的であったことから、本領域のHIV-1粒子形成における重要性が示唆された。本領域内で変異させたアミノ酸部位はHIV-1内では高度に保存されており(E128、I135を除く)、HIV-1がヒトで増殖するために必須の部位・領域であると考えられた。

D. 考察

Gag-CAヘリックス8近傍には、immature capsid assemblyに関わるmajor homology region (MHR)が存在するが、ヘリックス7近傍での解析は少ない(図)。本研究で見出したヘリックス7近傍の変異体(11種)は、ウイルス粒子産生を著しく減弱させることから、HIV-1アセンブリー・粒子形成に関与する新たな領域を同定できたと考えている(表)。また、S41とQ50(表)はGag-CA N-terminal domain間相互作用に関与することが示唆されており、今後、変異が複製素過程(逆転写、核移行)に及ぼす影響を調べ、これらのアミノ酸部位の複製前期過程における役割を解析していく必要がある。

E. 結論

これまでに報告のないHIV-1複製後期過程に重要な役割を持つ領域(Gag-CAヘリックス7とリンカードメイン)を新たに見出した(図および表)。本領域において変異導入したアミノ酸部位のHIV-1内での保存性の高さ、および、変異させるアミノ酸によるウイルス複製に及ぼす影響の違いから、これらのアミノ酸部位の機能・構造上の重要性が示唆される。今後、さらに詳細にウイルス学的解析を行うことにより、ウイルス複製抑制のための標的となり得る脆弱部位を明らかにできると考えている。

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) [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 \$\alpha\$. *Microbes Infect.* 16: 936-944, 2014.](#)

2) [Doi N, Adachi A, Nomaguchi M. Growth properties of macaque-tropic HIV-1 clones carrying vpx/vpr genes from simian immunodeficiency viruses in place of their vpr regions. *J Med. Invest.* 61: 374-379, 2014.](#)

- 3) Nomaguchi M, Doi N, Adachi A. Virological characterization of HIV-2 *vpx* gene mutants in various cell systems. *Microbes Infect.* 16: 695-701, 2014.
- 4) Nomaguchi M, Miyake A, Doi N, Fujiwara S, Miyazaki Y, Yokoyama M, Tsunetsugu-Yokota Y, 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.* 88: 4145-4160, 2014.

2. 学会発表等

- 1) 野間口雅子、土肥直哉、酒井遙介、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 - 12日(月 - 水)、横浜.

- 2) 酒井遙介、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 - 12日(月 - 水)、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10 - 12日(月 - 水)、横浜.
- 4) 土肥直哉、宮崎恭行、酒井遙介、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10 - 12日(月 - 水)、横浜.

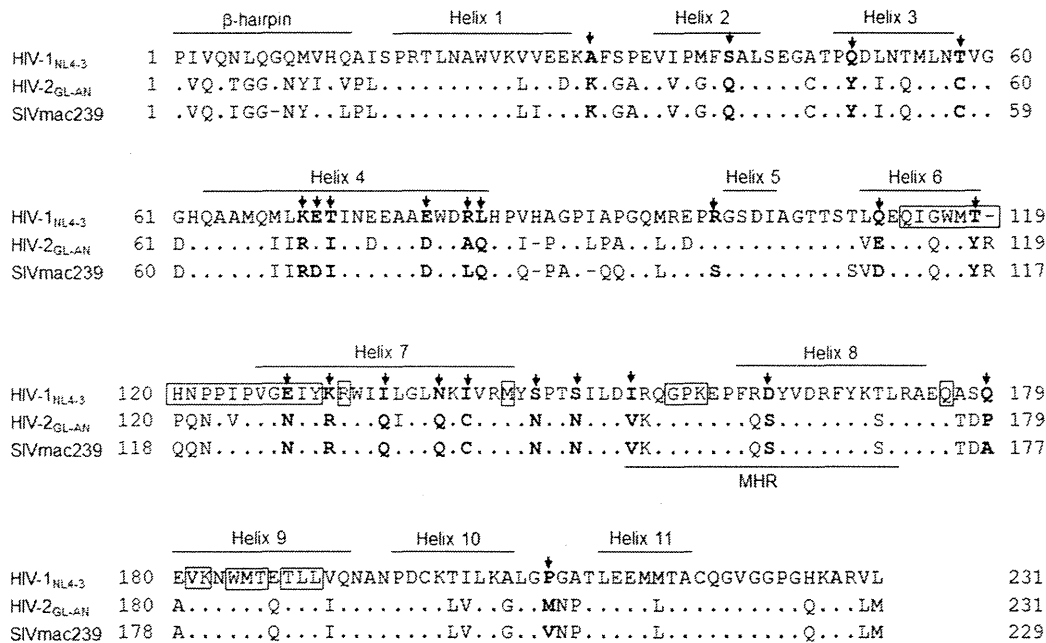


図 HIV-1 (NL4-3)、HIV-2 (GL-AN)、SIVmac239 の Gag-CA アミノ酸配列 本研究で初めて変異を導入した 24 種のアミノ酸部位を黒太字/黒矢印で示す。黒枠は、ヘリックス 6～9 の間で immature capsid assembly に影響を及ぼすことが報告されているアミノ酸部位・領域を示す。MHR, major homology region

表 本研究において構築した Gag-CA 変異体のウイルス学的特性

変異	ドメイン	ウイルス増殖 ¹	ウイルス感染価 ²	Gag 発現 ³	ウイルス産生量 ⁴
NL4-3		+++	1.00	++	1.00±0.00
A31K	Helices 1/2	-	0.01	++	0.86±0.33
S41Q	Helix 2	-	0.17	++	1.04±0.36
Q50Y	Helix 3	-	0.06	+	0.93±0.24
T58C	Helices 3/4	+	0.16	++	ND

K70R	Helix 4	—	0.04	++	NA
E71D	Helix 4	++	ND	ND	ND
T72I	Helix 4	+	0.35	++	ND
E79D	Helix 4	+++	ND	ND	ND
R82L	Helix 4	—	0.01	+	0.35±0.09
L83Q	Helix 4	+	0.37	+ / ++	ND
R100S	Helices 4/5	+++	ND	ND	ND
Q112D	Helix 6	+	0.61	ND	ND
T119Y	Helix 6	—	0.03	+	0.31±0.05
E128N	Helix 7	—	0.02	++	0.39±0.09
K131R	Helix 7	—	ND	ND	0.46±0.08
I134Q	Helix 7	—	0.00	—	—
I135Q	Helix 7	—	0.10	ND	0.09±0.07
N139Q	Helix 7	—	ND	ND	0.46±0.16
I141C	Helix 7	—	0.12	++	0.37±0.08
S146N	Linker	—	0.10	++	0.45±0.08
S149N	Linker	+	0.99	++	0.37±0.17
S149A	Linker	—	0.06	ND	0.11±0.02
S149D	Linker	—	0.00	ND	0.06±0.01
S149K	Linker	—	0.01	ND	0.19±0.06
I153V	Linker	+++	ND	ND	ND
D163S	Helix 8	—	0.28	ND	ND
Q179A	Helices 8/9	+++	ND	ND	ND
P207V	Helices 10/11	++	0.69	+	ND

¹ ウイルス増殖 (Multi-cycle replication) は、H9 細胞での増殖特性 (ウイルス感染から 15 日間) を半定量的に表記した。

² ウイルス感染価 (Single-cycle infectivity) は、NL4-3 を接種した TZM-bl 細胞でのルシフェラーゼ活性を 1 として各変異体の感染価を相対値で表した。

³ Gag 発現は、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後の細胞内発現量を半定量的に表記した。

⁴ ウイルス産生量は、NL4-3 の H9 細胞へのプロウイルスクローンへのトランスフェクション後の培養上清中の Gag-p24 量を 1 として各変異体のウイルス産生量を相対値で表した。

ND, not determined; NA, not applicable

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

旧世界サル（旧世界サル）の TRIM5 α の HIV 感染阻害の分子機構の詳細は未だ明らかにされていない。今のところ、細胞全体の融解液中のコアの崩壊状況を蔗糖密度勾配遠心により検討する生化学的実験結果から、TRIM5 α は細胞質内に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。本研究では、蛍光色素で HIV 粒子とコアとを標識して培養細胞に感染させ、経時的に蛍光色素の解離を蛍光顕微鏡で観察することにより HIV の脱殻過程を観察する *in situ* uncoating assay を用いて、カニクイザル、アカゲザル等の旧世界サルの TRIM5 α 存在下での HIV-1 ならびに HIV-2 の脱殻状況を観察した。その結果、旧世界サルの TRIM5 α 存在下では、HIV-1 の脱殻が促進されること、カニクイザル TRIM5 α に感受性を示す HIV-2 株の場合にはカニクイザル TRIM5 α 存在下で脱殻が促進されるが、カニクイザル TRIM5 α に耐性を示す HIV-2 変異株の場合には脱殻は促進されないこと、が明らかになった。これらの結果から、従来、生化学的手法で示唆されたコアの速やかな破壊が、TRIM5 α の感染阻害の本態であることが明確になった。

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) 因子として報告された。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 HIV 感染阻害の分子機構の詳細は明らかにされていない。アカゲザル、カニクイザルの TRIM5 α は強い抗 HIV-1 作用を示す一方、ヒトの TRIM5 α はごく弱い抗 HIV-1 作用を持ち、その結果ヒトでの HIV-1 感染は拡大を続けていると考えられる。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の障害となっている。

今のところ、感染細胞全体の融解液中のコアの崩壊状況を蔗糖密度勾配遠心により検討する生化学的実験結果から、TRIM5 α は細胞質内に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。しかしこの方法では、細胞に非特異的に取り込まれ、その後の感染成立には至らない HIV コアの崩壊状況も併せて観察することになり、感染成立に至る経路に入った HIV 粒子のカプシドの崩壊状況を正しく観察していると言うことは出来なかった。そこで我々は、異なる蛍光色素で HIV 粒子のエンベロップ、コア内の Vpr、コアの構成成分である P24 を染め分けることにより、感染成立に至る経路に正しく入った HIV 粒子のカプシドのみの崩壊状況を蛍光顕微鏡により解析する *in situ* uncoating assay を用いて、旧世界サルの TRIM5 α が HIV カプシドの崩壊を引き起こしているか否かを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. カニクイザル TRIM5 α 発現ヒト細胞の作成

ハイグロマイシン耐性遺伝子を持つ発現ベクター-pCEP4 に HA タグを付したカニクイザル TRIM5 α 遺伝子を挿入してヒト HeLa 細胞に導入し、hygromycin B 存在下で培養してカニクイザル TRIM5 α 発現細胞を選別した。カニクイザル TRIM5 α の発現は HA タグに対する抗体で導入細胞を染色して確認した。カニクイザル TRIM5 α の抗 HIV 活性は、緑色蛍光蛋白質 (GFP) を発現する HIV-1 あるいは HIV-2 を感染させ、GFP 発現細胞数がベクターのみを導入した細胞と比べて低下することにより確認した。

2. *In situ* uncoating assay

Campbell らの方法によった (Campbell et al. (2007) *Virology* 360: 286-293)。まず、Env 遺伝子にフレームシフト変異を導入した HIV-1 あるいは HIV-2 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 あるいは Vpx、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 p24 (CA) 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。正しくエンベ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. カニクイザルTRIM5 α 発現ヒト細胞の作成
TRIM5 α 発現ベクター導入後、3つの独立したHeLa細胞株を樹立した。図1にこれらの細胞株でのカニクイザルTRIM5 α の発現を示す。ウエスタンブロット (図1A)、蛍光染色(図1B)とも3つの細胞株で同様にカニクイザルTRIM5 α が発現していることが確認できた。また、GFPを発現するHIV-1あるいはHIV-2をこれらの細胞株に感染させると、GFP発現細胞の数がベクターのみを導入した細胞株と比べて低下することから、発現したカニクイザルTRIM5 α が抗HIV活性を保持していることが確認された (図1C)。

2. In situ uncoating assay

1. で作製したカニクイザル TRIM5 α を発現するHeLa細胞に、dTomato でエンベロープを標識しコア内に GFP で標識した Vpr あるいは Vpx を持ち、水疱性口内炎ウイルスの G タンパク質でシュードタイプした HIV-1 あるいは HIV-2 を感染させ、経時的に細胞を固定してコアの構成成分である P24 (CA) を Cy5 で染色して蛍光顕微鏡で観察した。dTomato の蛍光を失って感染成立の経路に正しく入った HIV 粒子について、脱殻前と考えられる GFP と Cy5 の蛍光が共局在するものと脱殻が完了したと考えられる Cy5 の蛍光と共局在しない GFP の数を数えて脱殻した粒子の割合を計算した。その結果、カニクイザル TRIM5 α により感染が抑制される HIV-1 (NL-Nh:NL43 株の env 欠損株) と HIV-2 (GH123-Nh:GH123 の env 欠損株) は、カニクイザル TRIM5 α 発現細胞株においては CA と共局在しない GFP 粒子の割合がベクターのみを導入した細胞株においてより有意に減少し、脱殻がカニクイザル TRIM5 α の存在により亢進していることが明らかになった (図 2 の左側と中のグラフ)。一方、カニクイザル TRIM5 α によってその感染がほとんど抑制されない HIV-1 の変異株 (ASA-Nh : GH123ASA 株の env 欠損株) については、カニクイザル TRIM5 α の存在により CA と共局在しない GFP 粒子の割合は変化せず、脱殻の速度に影響がないことが明らかになった (図 2 の右側のグラフ)。

D. 考察

本研究によりエンベロープを失って感染成立に至る経路に正しく入ったHIV粒子のカプシドのみの崩壊状況を検討しても、カニクイザルTRIM5 α により感染が抑制されるHIV-1とHIV-2は、カニクイザルTRIM5 α の存在によりその脱殻が促進されること、カニクイザルTRIM5 α により感染が抑制されないHIV-2変異株においては脱殻の促進は観察されないことが明らかになった。ASA-Nhは

GH123-NhとカニクイザルTRIM5 α の認識に関わるCAの3アミノ酸のみが異なっており、ウイルスのTRIM5 α 感受性の違いが確かに脱殻速度に反映されていることが確認された。本研究により脱殻の制御が新規の抗HIV戦略策定に繋がることが示唆された。

E. 結論

感染成立に至る経路に正しく入ったHIV粒子のカプシドのみの崩壊状況を検討しても、カニクイザルTRIM5 α により感染が抑制されるHIV-1とHIV-2はカニクイザルTRIM5 α の存在によりその脱殻が促進されること、カニクイザルTRIM5 α により感染が抑制されないHIV-2変異株においては脱殻の促進は観察されないことが明らかになった。従って、従来、生化学的手法で示唆されたコアの速やかな破壊が、TRIM5 α の感染阻害の本態であることが明確になった。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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* 2015 Accepted

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* 2015 Accepted

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 / Institut Pasteur* 16:936-944, 2014.

2. 学会発表等

1) Tatsuo Shioda: Host Factors in the Pathogenesis of HIV Infection. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) AIDS Panel Meeting 2015年1月26日-29日 Taipei, Taiwan

2) 櫻木小百合, 塩田達雄, 櫻木淳一: HIV パッケージングシグナル内最重要領域 SL1 の機能的構造に関する多角的解析. 第 28 回日本エイズ学会学