

術集会・総会 2014年12月3日-5日 大阪,日本

3) 中山英美, Uttayamakul Sumonmal, Tiphaine Oudot-Mellakh, Pimrapat Tengtrakulcharoen, Julien Guergnon, 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-5日 大阪, 日本

4) 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 -5日大阪,日本

5) 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-5日 大阪,日本

6) 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-5日 大阪,日本

7) 櫻木淳一, 櫻木小百合, 塩田達雄: HIV-1 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62回日本ウイルス学会学術集会 2014年11月10日-12日 横浜,日本

8) 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-12日 横浜,日本

9) Tatsuo Shioda: Host factors in the pathogenesis of HIV infection. International Congress on Medical Virology 2014 2014年11月5日-7日 Bangkok, Thailand

10) Emi E Nakayama, Tetsushi Tobita, Tahmina Sultana, Akatsuki Saito, Hirofumi Akari, Tatsuo Shioda: Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara 2014年9月23日-26日 奈良,日本

11) 武田英里、河野健、Amy E. Hulme、Thomas J. Hope、中山英美、塩田達雄: In situ uncoating assay を用いた TRIM5 α 存在下における HIV カプシドコアの脱殻速度の解析. 第28回近畿エイズ研究会・学術集会 2014年6月7日 大阪,日本

12) Sayuri Sakuragi, Tatsuo Shioda, Jun-ichi Sakuragi: SL1 revisited—Functional analysis of the structure and conformation of HIV-1 psi RNA. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings & Courses Program (RETROVIRUSES) 2014年5月19日-24日 Cold Spring Harbor, USA.

13) Emi E. Nakayama, Satoshi Tobita, Tahmina Sultana, Akatsuki Saito, Hirofumi Akari, Tatsuo Shioda: 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) 2014年5月19日-24日 Cold Spring Harbor, USA.

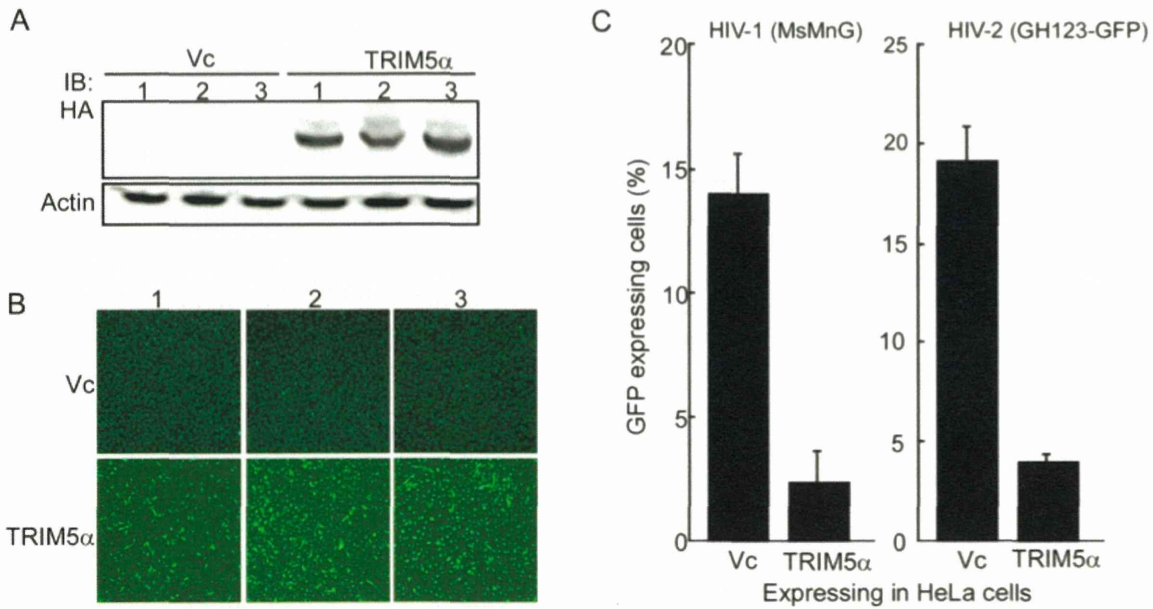


図 1 : ヒト HeLA 細胞におけるカニクイザル TRIM5 α の発現。ウエスタンブロット (A) と蛍光抗体法 (B) によりカニクイザル TRIM5 α の発現を確認した (B は DAPI との共染色)。緑色蛍光蛋白質 (GFP) を発現する HIV-1 あるいは HIV-2 を感染させ、発現させたカニクイザル TRIM5 α が抗 HIV 活性を保持していることを確認した。

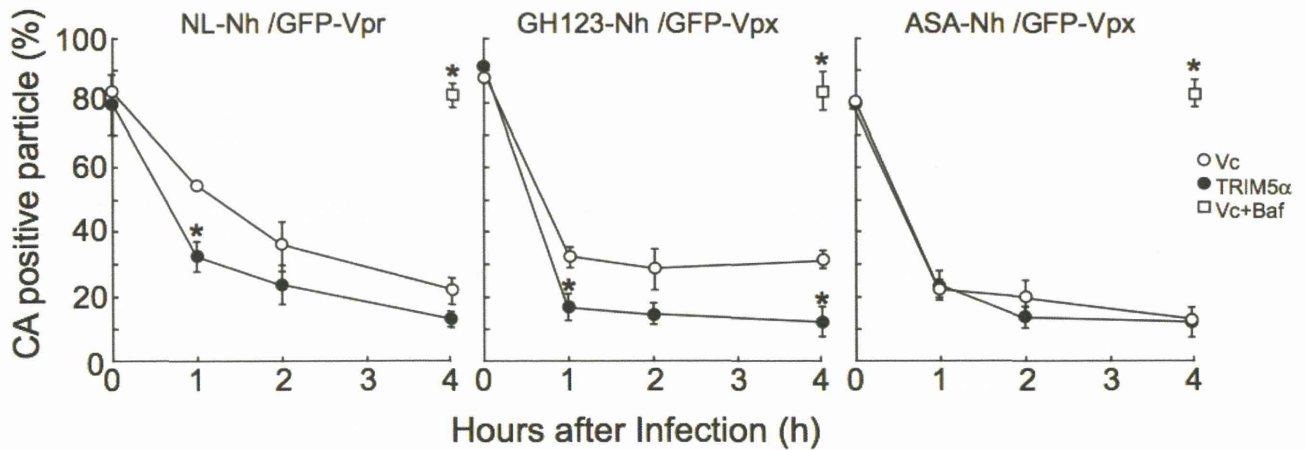


図 2 : In situ uncoating assay。カニクイザル TRIM5 α により感染が抑制される NL-Nh や GH123-Nh はカニクイザル TRIM5 α 存在下 (黒丸) ではベクターのみの細胞 (白丸) と比べて有意 (*) に脱殻速度の亢進が認められた。一方、カニクイザル TRIM5 α により感染が抑制されない ASA-Nh では脱殻速度の亢進は認められなかった。なお、バフィロマイシン存在下では膜融合が生じないためにコアが細胞内へ侵入しないため脱殻は全く進行しない (Baf : 白四角)。

研究課題：HIV ゲノム逆転写新規制御における Gag 蛋白質と関連因子

研究分担者：増田貴夫（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 准教授）

研究要旨

HIV-1 逆転写過程に関与する核酸および酵素蛋白を合成および精製し、これら合成材料を用いた無細胞環境下でのウイルス cDNA 産物の定量/定性解析を行った。その結果、(-)鎖 strong-stop cDNA の合成およびその後の RNaseH 依存性の 1st ストランド転移と (+)鎖 cDNA 合成までを一連の反応として再構築することに成功し、逆転写過程に存在する律速段階を明確にした。また、Gag 蛋白に属するヌクレオキャプシド (NC) は、律速段階の一つである 1st ストランド転移効率を 2-3.5 倍上昇させる結果を得た。この無細胞再構築系は、逆転写制御機構に関与する新規分子標的を探るための重要なツールとなることが期待される。

A. 研究目的

HIV複製の脆弱性は感染初期過程にあり、阻害剤開発の新たな標的となりうる。しかしながら、HIV脱核過程から逆転写過程の各素過程の分子機構の詳細は不明な点が多く残されている。本研究では、HIV感染初期過程の分子機構の解明から新規薬剤標的の分子基盤を提示することを目的とした。本分担研究では、HIV-1逆転写過程の無細胞再構築系を確立し、逆転写反応の律速段階の明確化とGag蛋白による律速過程制御の検討を行った。

B. 研究方法

T7 *in vitro* 転写系にて逆転写過程に必須なシス配列を持つ擬似ウイルスゲノム RNA を調整した。HIV-1RT は大腸菌にて発現/精製したレコンビナント RT (p66) 蛋白をプロテアーゼ処理により、RT ヘテロダイマー (p66/p51) を調整した (Fig. 1)。ウイルスゲノム RNA と pbs-RNA プライマーもしくは、精製 tRNA (Lys3) をアニーリング後、レコンビナント RT と dNTPs を添加し、42°C で 30-300 分行い、得られた cDNA 産物をリアルタイム PCR 法および変性ゲルを用いたサザンブロット法により、定量及び定性解析した。HIV-1 ヌクレオキャプシド (NC) の合成およびレコンビナント蛋白を調整し、その影響を検討した。

(倫理面への配慮)

該当無し

C. 研究結果

① HIV-1 逆転写過程の無細胞再構築系の確立：合成 HIV-1 RNA およびレコンビナント逆転写酵素 (p66/p51) を調整後、反応条件の最適化を行った (Fig. 1)。その結果、鋳型 HIV RNA 0.83- 83 fmole およびプライマー RNA (1-100pmole) において cDNA 産物の定量性が確保できる事を確認した (Fig. 2)。

② cDNA 産物の時系列変化の定量解析：qPCR 解析により、(-)鎖 strong-stop cDNA (-sscDNA) の合成は反応開始 30min から 300min まで linear な増殖曲線を得た。また、-sscDNA の 1st-jump 産物 (U3/u5) および (+)鎖 strong-stop cDNA (+sscDNA) の合成の時系列増殖を確認した (Fig. 3)。

③ cDNA 産物の時系列変化の定性解析：*in vitro* 逆転写反応産物を変性 PAGE 泳動後、サザンブロット解析を行った。その結果、-sscDNA の合成とその後の RNaseH 依存性の転移産物を確認した (Fig. 4)。

④ HIV-1 NC の効果：Gag蛋白に属するヌクレオキャプシド (NC) は、律速段階の一つである 1st ストランド転移効率を 2-3.5 倍上昇させた (Fig. 5)。また、NC の作用は Zn イオン非依存性であることを確認した。

以上より、-sscDNA の合成およびその後の RNaseH 依存性の 1st ストランド転移と (+)鎖 cDNA 合成までを一連の反応として再構築することに成功した。逆転写過程に存在する律速段階がストランド転移過程に存在することが明確となった。また、Gag 蛋白に属するヌクレオキャプシド (NC) は、律速段階の一つである 1st ストランド転移効率を 2-3.5 倍上昇させることがわかった。

D. 考察

複数のステップより構成される HIV 逆転写反応の無細胞環境下での連続的再構築は、世界的にも報告例が無い。本研究により明確となった律速過程は、HIV 感染初期過程における脆弱性の一つと考えられる。本無細胞再構築系は、逆転写制御機構に関与する新規分子標的を探るための重要なツールとなることが期待される。

E. 結論

HIV-1 感染初期過程の主要反応である逆転写過

程の律速段階は2つのストランド転移反応であり、本反応はHIVの脆弱性の一つと考えられる。Gag蛋白に属するヌクレオキャプシド (NC) は、律速段階の一つである1stストランド転移制御に関与する逆転写必須因子である。

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

- 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 NFκB 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.

2. 学会発表等

- 1) 増田貴夫. HIV インテグラーゼの非酵素的機能 -次世代 IN 阻害剤の分子標的- ランチョンセミナー “Science of HIV Integrase and its Inhibitors.” 第28回日本エイズ学会, 2014年、大阪.

- 2) 増田貴夫, 佐藤洋子, 高畑辰郎, 加藤義一, 厚井聡志, 長谷川温彦, 河合剛太, 神奈木真理. HIV-1 逆転写過程のストランド転移におけるウイルスストランド転移におけるウイルスゲノム RNA 5' 末端配列の重要性. 第28回日本エイズ学会, 2014年、大阪.
- 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, 2014年、大阪.
- 4) 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, 2014年、横浜.
- 5) 増田貴夫, 佐藤洋子, 高畑辰郎, 加藤義一, 厚井聡志, 長谷川温彦, 河合剛太, 神奈木真理. HIV-1 逆転写過程におけるストランド転移制御に関与するシスおよびトランス因子. 第62回日本ウイルス学会, 2014年、横浜.
- 6) 三浦和樹, 長谷川温彦, 増田貴夫, 山岡昇司, 神奈木真理. Latent HIV Infection and Potential Role of IFNα in CD4 Memory T Cells. 第62回日本ウイルス学会, 2014年、横浜.

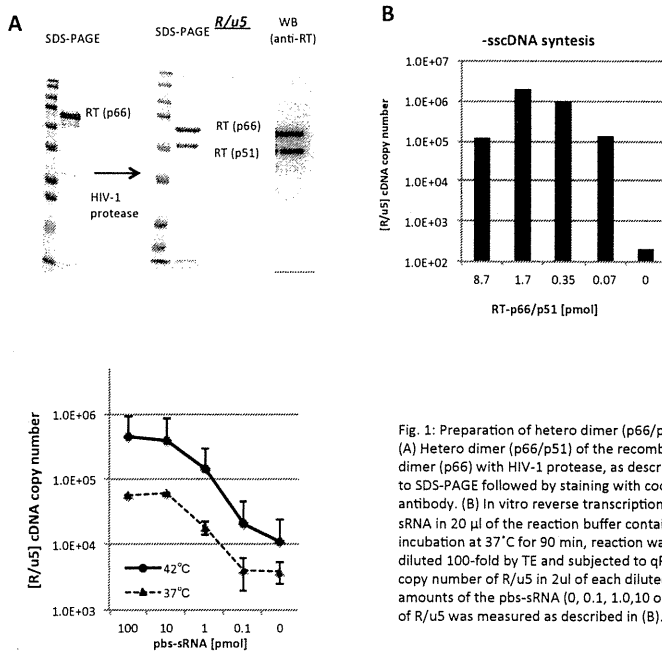


Fig. 1: Preparation of hetero dimer (p66/p51) of the recombinant HIV-1 RT (A) Hetero dimer (p66/p51) of the recombinant HIV-1 RT (rRT) was generated by proteolysis of the rRT in homo dimer (p66) with HIV-1 protease, as described in the "Methods". Final preparation of the p66/p51 was subjected to SDS-PAGE followed by staining with coomassie brilliant blue and western blot analysis with anti-HIV-1 RT antibody. (B) In vitro reverse transcription was performed with 0.83 fmol of HIV-1 RNA and 10 fmol of the pbs-sRNA in 20 μl of the reaction buffer containing 0, 0.07, 0.35, 1.7 or 8.7 pmol of the rRT (p66/p51). After incubation at 37°C for 90 min, reaction was stopped by heating at 95°C for 5 min. Then, the reaction mixture was diluted 100-fold by TE and subjected to qPCR analysis using a primer pair of R1-55/AA55. Values were shown as copy number of R/u5 in 2ul of each diluted sample. © In vitro reverse transcription was performed with several amounts of the pbs-sRNA (0, 0.1, 1.0, 10 or 100 pmol per reaction) at 37°C or 42°C for 90 min. The copy number of R/u5 was measured as described in (B).

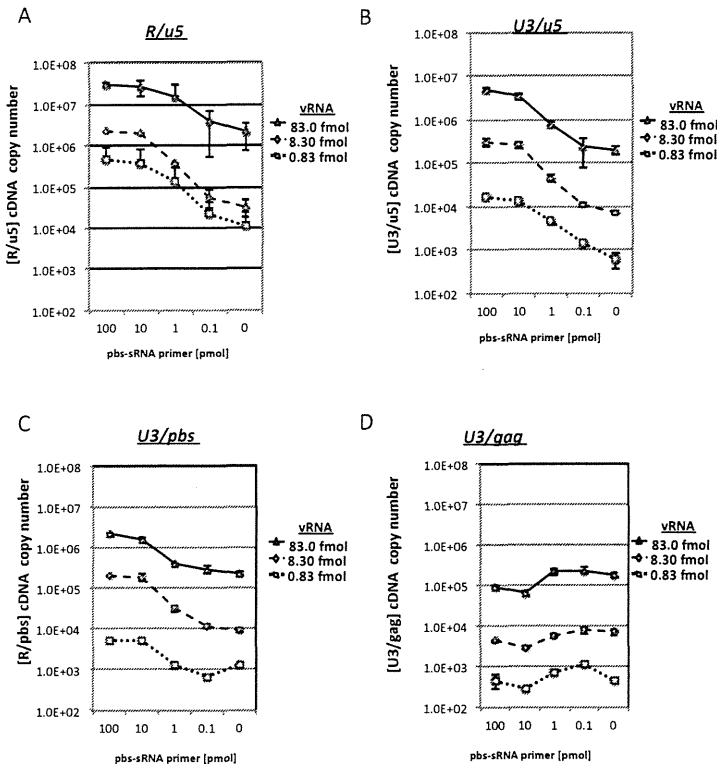


Fig. 2. Primer-dose dependency of cDNA synthesis and its strand transfers. In vitro reverse transcription was performed with several amounts of the pbs-sRNA (0, 0.1, 1.0, 10 or 100 pmol per reaction) at 42°C for 90 min. Primer-dose dependency of the cDNA synthesis was examined with three different amounts of HIV-1 RNA (0.83, 8.3 or 83 fmol). The copy number of R/u5 (A), U3/u5 (B), U3/pbs (C) or U3/gag (D) in each sample was determined. The experiment was performed in duplicate for each reaction and the mean value with error bar of ± 1 standard deviation (S.D.) of each reaction was plotted.

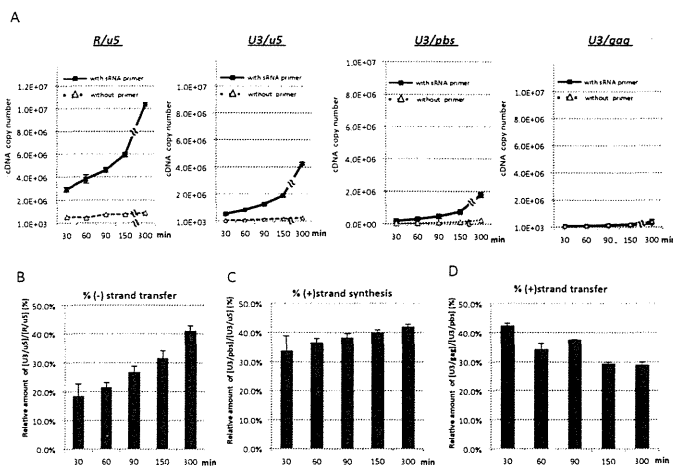


FIG 3. Time course analysis of cDNAs and their strand transfer. (A) In vitro RT assay was performed with 83 fmol of HIV-1 RNA and 100 pmol of pbs-sRNA primer and aliquots of the reaction were periodically harvested at 30, 60, 90 and 300 min after incubation at 42°C. The level of each cDNA intermediate (R/u5, U3/u5, U3/pbs or U3/gag) was determined by qPCR, as described in Figure 2. The % of the first strand-transfer of -sscDNA (B), the synthesis of +sscDNA (C) and the second strand-transfer of +sscDNA (D) were estimated by calculating the ratio of the copy number of R/u5, U3/u5, U3/pbs and U3/gag in each time point. The experiment was performed in duplicate for each reaction and the mean value with error bar of ± 1 S.D. of each sample was shown (A-D).

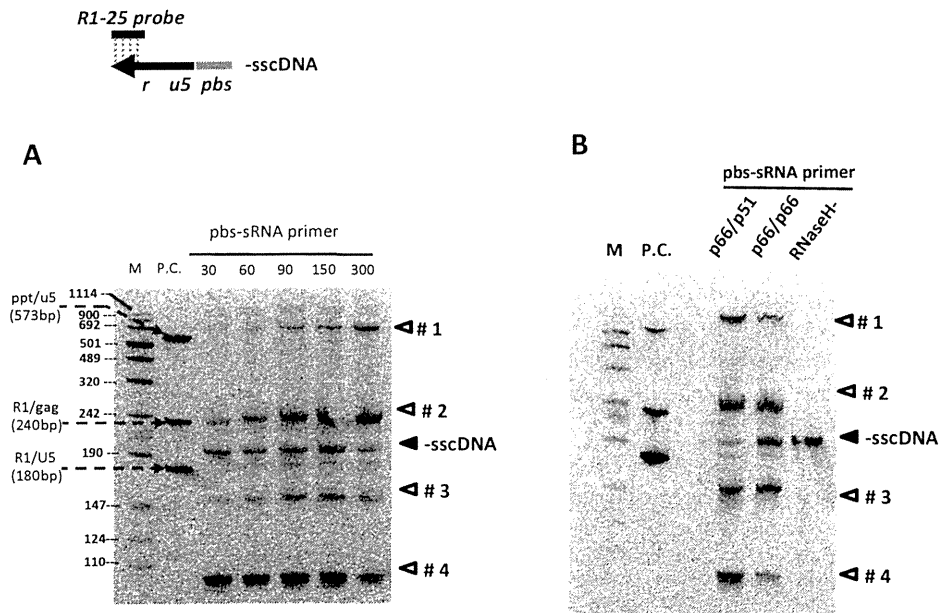


Fig. 4 . Aliquot of each reaction performed for the time-course analysis (Fig. 3) were subjected to southern blot analysis under denatured condition. (A) Dig-labeled HIV-1 primer R1-25 (Dig-R1-25 probe) was used to detect $-sscDNA$. The bands corresponding to $-sscDNA$ (200 nt) and aberrant product generated by self-priming of $-sscDNA$ (SP) were denoted (#1~#4). (B) In vitro reverse transcription was performed by using HIV-1 rRT (p61/p51), homodimer (p66/p66), or M-MLV RT lacking RNaseH activity. After 300min incubation, the level of $-sscDNA$ and its aberrant products generated by each rRT was examined by southern blot analysis using Dig-R1-25 probe. Dig-labeled HIV-1 primer R1-25 (Dig-R1-25 probe) was used to detect $-sscDNA$. The bands corresponding to $-sscDNA$ (200 nt) and aberrant product generated by self-priming of $-sscDNA$ (SP) were denoted by (#1~#4), respectively.

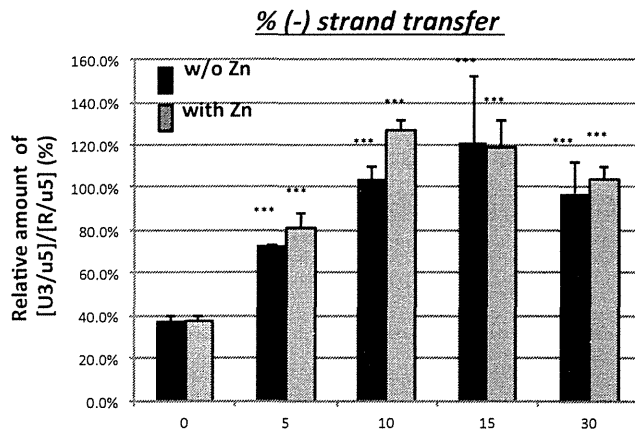


FIG 5. Stimulatory effects of HIV-1 NC. HIV-1 RNA (68 pmol) and pbs-sRNA (100 pmol) were pre-incubated with serial dilutions of sNC (0, 5, 10, 15 or 30 pmol) by ddw for 5 min at 37°C. The same serial dilutions of sNC that were pre-treatment of with $ZnCl_2$ (with Zn) or without $ZnCl_2$ (w/o Zn) were examined in parallel. Reaction was initiated by adding the reaction mixture containing 1.7 pmol of rRT (p66/51). After incubation for 300 min at 42°C, each reaction was subjected to qPCR analysis. The % of the first strand-transfer of $-sscDNA$ was estimated as described in Fig. 2. This experiment performed at least three times and representative result was shown. Significant of stimulatory effect of each dose of sNC was examined by student t analysis (***) $p < 0.001$.

研究課題：Gagの細胞内輸送機構に関する研究～翻訳後修飾を中心に

研究分担者：梁 明秀（横浜市立大学医学部 微生物学 教授）

研究協力者：宮川 敬、工藤 あゆみ、松永 智子

研究要旨

ウイルス複製後期過程における粒子産生 (Virion genesis) に至るまでの Gag の細胞内輸送メカニズムの詳細は未解明であり、このことが Gag を標的とする抗ウイルス薬の開発を阻む要因となっている。そこで本研究では、Virion genesis に関与すると推測される宿主因子 (c-CBL, APC) について解析し、これらの因子群を介した Gag の細胞内輸送・集合メカニズムについて検討を行った。その結果、これらの因子群は、Gag のアセンブリー、プロセッシングあるいはリサイクリングなど様々な過程に関与すると考えられた。

A. 研究目的

感染細胞におけるGagの輸送、アセンブリー(集合と多量体化)そしてHIV粒子産生 (Virion genesis) に至る詳細な分子機構は未解明であり、このことがGagを標的とする薬剤の開発を阻む要因となっている。そこで本研究ではこれら一連のvirion genesisに関与する宿主因子ネットワークを解明し、これらの因子群がHIV-1複製に与える影響について、ウイルス増殖や病態との関連について考察を行う。ウイルスは宿主のメンブレントラフィックや細胞骨格を利用して細胞内に侵入したり細胞から出芽したりするものが複数あることが知られている。また、このことは細胞の極性や運動方向によって、ウイルス分泌の方向性や細胞内の局在が変化することを示唆するものである。また、細胞内ウイルスタンパク質が宿主細胞の輸送系や細胞骨格系の機能を阻害することにより、ウイルス病原性を発揮する可能性が示唆される。HIV感染遊走マクロファージにおいても、ウイルス出芽方向は、細胞が動く方向に同期していることが知られている。したがって動的な細胞変化にともなうHIV Gagタンパク質の細胞内動態を理解することは、新たなウイルス-宿主相互作用の解明につながる可能性がある。Gagタンパク質の細胞内輸送方式や輸送場所を決定する制御機構が解明されれば、それらに関わる細胞側因子の同定につながり、新規の治療法の開発へと道を開くことができる。本研究課題ではHIV感染細胞のダイナミクスと連動したGagタンパク質の細胞内制御について解析する。HIV Gagタンパク質の機能的ユビキチン化に焦点を当て、Gagタンパク質の細胞内輸送方式や出芽方向、さらには細胞-細胞間感染に関与する因子群の同定を行う。本年度は特にGagとの機能的相互作用が推測されるユビキチンリガーゼc-CBLおよびAPCのHIV粒子産生への影響について解析した。

B. 研究方法

c-CBL, APCのHIV産生に対する影響を調べるため、HEK293細胞もしくはJurkat細胞にHIV分子クローン (pNL4-3) とHaloタグが付加したc-CBL発現ベクター (pHT-CBL) もしくはGFPタグが付加されたAPC (pEGEP-APC)を共発現させ、48時間後の細胞内Gagおよび培養上清中のGag量をウェスタンブロット法、ELISA法を用いて解析した。HIV感染実験は、これらの因子を発現したJurkat細胞もしくはH9細胞にHIVを感染させ、上清中のHIV量についてELISA法にて数日毎に測定した。Cell-to-cell感染への影響を調べるため、これらの因子とGag-GFPを発現させたJurkat細胞とDsRedを発現させたH9細胞とを96well plate内で共培養し、24時間後にDsRedおよびGag-GFP陽性細胞をフローサイトメーターにてカウントした。

Gagの多量体化はBiFC (二分子蛍光補完法 Bimolecular Fluorescence Complementation) 系を使用した。これは細胞内でGag同士が結合した場合にのみ緑色蛍光タンパク質Kusabira-Green (KG) の立体構造が再構築され蛍光が観察されるという原理に基づいたものであり、蛍光を獲得した細胞をフローサイトメーターにて測定し、結合の割合を数値化した。

C. 研究結果

1. HIV粒子産生におけるc-CBLの機能解析

我々と他の研究グループは、宿主防御因子Tetherinの機能制御に重要な役割を果たす因子としてBCA2 (PLoS Pathog. e1000700, 2009)、HRS (PLoS Pathog. e1001265, 2011) を同定した。興味深いことにBCA2やHRSはともにEGF受容体(EGFR)の輸送、特にエンドサイトーシスに関わる因子であるが、一方でこれらの因子がGagのものにも機能することが近年報告された。BCA2はGagをユビキチン化することで (PLoS Pathog. e1004151, 2014)、またHRSはGagのエキソサイトーシスを阻害することで (Protein & Cell 6, 2011)、

HIV産生を制御する。これらの報告はGagのアセンブリーおよびHIV産生機構の一部にEGFRの輸送因子群が関与する可能性を示唆する。そこで、同じくEGFRの膜輸送に関与し、且つ多くの生物種で保存されているアダプタータンパク質c-CBLについてHIV産生への影響を調べた。その結果、c-CBL濃度依存的なHIV産生の増加が見られた。また、Gag-Polのみの発現で上清中に放出されるViral-like particle (VLP) に対しても、c-CBLはその産生を増加させた。しかしc-CBLの過剰発現ではVLP産生をむしろ減少させた。これは、c-CBL過剰発現によりE3複合体の形成に影響が出た可能性が考えられる。c-CBLはリン酸化されたEGFRに結合してその輸送を制御することが報告されており、現在Gagのリン酸化と絡めてその詳細な機構について検討中である。また、c-CBLはユビキチンリガーゼとしても知られており、Gagのユビキチン化に関与する可能性についても検討している。

2. HIV粒子産生におけるAPCの機能解析

我々は、過去の研究により、癌抑制遺伝子産物であるAPC蛋白質がHIV Gagの新規結合因子であることを質量分析によって見出した。昨年度までの成果として、APCは、①HIV Gagと結合し、②HIV複製後期過程においてGagの細胞膜までの輸送および多量体化を促進し、③T細胞におけるCell-free感染およびCell-to-cell感染を促進する因子であることが判明している。今年度も引き続きその生理学的機能について検討を行った。APCがHIV Gag特異的に機能する宿主因子であるかを検討するため、HIV-1、HTLV-1、XMRVのGag発現ベクターを作製し、コントロール細胞とAPC発現細胞におけるVLP産生を比較した。その結果、APCはHIV-1 VLP産生のみを促進し、HTLV-1およびXMRV VLP産生には影響を与えなかった (図1)。次に、APCとHIV-1 Gagの複合体構造をシミュレーションすることで両者の結合に関与するアミノ酸残基や、Gag多量体化に対する影響についての構造学的推測を試みた。その結果、APCの複数の領域がGagと相互作用しうることが推定された。しかしながら現在判明しているAPCのGag結合領域が800アミノ酸程度と大きいため、APCのGag結合領域をさらに狭めるための実験を行っている。

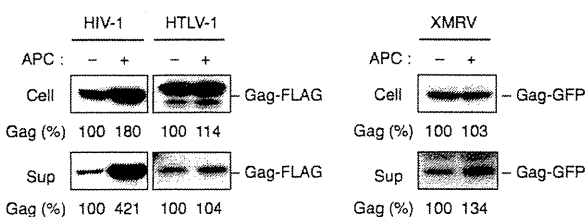


図1 APCのHIV Gag特異的なVLP産生促進。HEK293細胞にHIV-1、HTLV-1またはXMRV由来のGag発現ベクターとAPC発現ベクターを共発現し、48時間後の細胞内および細胞上清中のGag量をウェスタンブロット法で解析した。

D. 考察

今回解析したc-CBL、APCはいずれの因子もGagに直接結合し、VLP産生を変化させることから、Gagそのもの、あるいはVirion genesisに関与する細胞内マシナリーへの関与が疑われる。

T細胞においてNefはc-CBLを失活させることでシグナル伝達系を抑制することが報告されている (Immunity 23, 2005)。このことは、Nefがc-CBLを介してウイルス粒子の産生を制御する可能性があることを示唆する。今後はT細胞におけるGag-CBL系の解析をsiRNAやCRISPR/Cas9法を用いたノックダウン実験において検証予定である。またc-CBLは、リン酸化された基質タンパク質に結合し、ユビキチン化修飾を付加する機構が一般的に知られているため、Gagのリン酸化とユビキチン化という観点から本因子が関与する可能性やそのウイルス学的機能について検討中である。

APCは300kDを超える比較的大きなタンパク質であり、さらにいくつかの補助因子と複合体を形成する。GagがHIV産生する上でこのような巨大なAPC複合体を利用するメリットについては今後検討する必要がある。我々の実験では、APC結合因子の一つであるKAP3が、APCによるHIV産生促進に重要であることが明らかになっている。KAP3はAPC複合体が微小管上を滑るのに必要なアダプター因子であり、Gagが効率よく細胞膜へ輸送されるためのカーゴタンパク質として利用している可能性がある。またAPCは微小管を利用してRNAを細胞の先端部へ輸送することが知られており (Nature 453, 2008)、APC-Gag複合体がウイルスRNAの効率的な輸送に関与する可能性についても現在検討中である。

E. 結論

HIV産生に影響を与える因子群の解析により、HIV virion genesisに至る各過程の分子機構が一部解明されつつある。今後の詳細な検討により、Gagのユビキチン化、リン酸化の観点から薬剤標的となるweak pointを見いだせる可能性がある。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1)Furukawa A, Sugase K, Morishita R, Nagata T, Kodaki T, Takaori-Kondo A, Ryo A, Katahira M. Quantitative analysis of location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014;53(9):2349-52.

2. 学会発表等

(1)梁 明秀;無細胞蛋白質発現系を活用したウイルス-宿主相互作用研究, ウイルス研究の潮流シリーズ・ウイルス研究所セミナー, 京都, 2014年10月.

(2)Ayumi Kudoh, Kei Miyakawa, Satoko Matsunaga, Isao Kosugi, and Ryo Akihida ; H11/HSPB8 confers HIV resistance to Human placental trophoblasts, The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara, 奈良, 2014年9月.

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

研究分担者：蝦名 博貴（京都大学ウイルス研究所 助教）

研究協力者：小柳 義夫（京都大学ウイルス研究所 教授）、野間口 雅子（徳島大学 准教授）

研究要旨

Gag 蛋白質は HIV 複製全般に重要な蛋白質である。複製後期過程における Gag 蛋白質の機能はウイルス粒子形成、ウイルス RNA の粒子への取り込みなど多岐にわたることが知られているが、細胞内でそれらが機能する時と場所は明らかになっていない。そこで本研究では HIV 複製後期過程において Gag 蛋白質が機能する時空的知見を収集することを目的として、Gag 蛋白質の細胞内ライブイメージング解析実験系の構築を行なった。そして、その実験系を用いて Gag の CA 変異体 I134Q, S149N 変異体の解析を行なった。その結果、I134Q 変異体ではウイルス粒子形成過程で Gag 蛋白質が細胞質膜で凝集すること、S149N 株では多くの Gag 蛋白質は細胞質内器官に留まっていることを明らかにした。また、ゲノム編集技術を用いることで、ウイルス複製に重要な領域、すなわち、ウイルスの脆弱部位を DNA レベルで検索するシステムを構築し、その評価を行なった。

A. 研究目的

本研究の目的は、HIV-1 複製に必須な Gag の機能、並びに、その機能発現の責任領域を明らかにして創薬探索の基盤を築くことである。目的遂行のため、1)ウイルス複製後期過程の Gag の輸送、そして、その mRNA との会合の時と場所を解析するためのライブイメージング解析実験系の確立、2)ゲノム編集法を使ったウイルス脆弱部位の検索実験系の構築を目的とした。

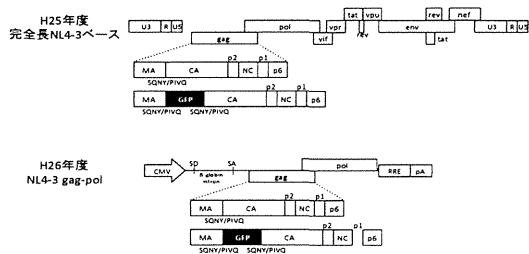
B. 研究方法

H25 年度に作製した完全長 HIV-1_{NL4-3} の MA-CA 切断部位に蛍光蛋白質遺伝子を挿入したウイルスは、その複製が不完全であり、さらに Vpr など細胞毒性を示すウイルス蛋白質も発現することから、ライブイメージングの解析効率に問題があった。そこで、H26 年度は新規に HIV-1_{NL4-3} をベースとするレンチウイルスベクターシステムを構築した上で、その MA-CA 切断部位に蛍光蛋白質遺伝子を挿入して、Gag のライブイメージングシステムを新たに構築した (図 1)。このレンチウイルスベクターをベースとしたシステムでは、ウイルスの複製過程を観察できないものの、複製後期過程の Gag 輸送、Gag とウイルス RNA との会合の時と場所を解析することに特化したものとなっている。蛍光標識 Gag 蛋白質の局在解析には共焦点顕微鏡、ならびに、GE Cytell システムを用いた。

その他、ゲノム編集法を使ったウイルス脆弱部位の検索実験系の検証実験を行なった。ゲノム編集法は生細胞内で任意の DNA 標的配列を切断し、NHEJ 修復経路を介してランダムな Insertion/deletion (indel) 変異を導入する事が出来る革新的技術である。我々は、ゲノム編集法の CRISPR/Cas9 システムが HIV プロウイルスに対しても有効であることを見出していることから、

このシステムを用いて DNA レベルで標的部位に mutation をランダムに導入し、その中から増殖してくる(選択された)ウイルスゲノムのシーケンスを解析することによって、ウイルスが変異できない部位、すなわち、ウイルスの脆弱部位を検索する方法の検証をおこなった。まず、CRISPR システムのレンチウイルスベクター導入系を独自に構築し、そのレンチウイルスベクター導入系を用いて HIV 標的 gRNA と Cas9 蛋白質を恒常的に発現する Jurkat 細胞を樹立した。そして、その樹立した CRISPR 発現 Jurkat に HIV-1_{NL4-3} を感染させ HIV の複製、並びに、その細胞で増殖した (CRISPR 耐性) ウイルス RNA のシーケンスの解析を行なった。

図 1: 蛍光標識 Gag 蛋白質発現コンストラクト



(倫理面への配慮)

本申請研究では HIV 遺伝子を含む遺伝子組み換え実験を行うため原則として P3 レベルの封じ込めが必要な機関承認実験と一部大臣確認実験である。当研究所には P3 レベルの物理的封じ込めが完備しており、既に、組換え HIV 使用に関

する機関承認実験、ならびに大臣確認実験の手続きも完了している。

実験動物である NOG マウスの使用はカルタヘナ条約を守り、動物愛護法、および 3R(Replacement(代替)、Reduction(削除)、Refinement(改善))の理念に基づき実験を行なう。また、当大学動物委員会の承認は既に得ている。

C. 研究結果

再構築した蛍光標識 Gag 解析システムを用いて、徳島大学・野間口雅子 准教授との共同研究として、1)Gag processing 不全 CA I134Q 変異体、2)後期過程が親株よりも悪くなる CA S149N 変異体の Gag 蛋白質の細胞内局在解析を行なった。その結果、I134Q 変異体ではウイルス粒子形成過程で Gag 蛋白質が細胞質膜で凝集すること、S149N 株では多くの Gag 蛋白質は細胞質内器官に留まっていることを明らかにした (図 2)。

また、GE Cytell システムを用いて、これら GFP 標識 Gag 変異蛋白質の細胞質における分布を、細胞質領域における GFP 蛍光輝度の最大値と最低値のばらつき (SD) として算出した。その結果、野生型 Gag に比して、I134Q、S149N 変異体では、優位に SD 値が高く、Gag 蛋白質の局在に偏りがある事が見出された。また、それぞれの細胞における単位蛍光強度あたりの蛋白質局在のばらつき (SD) を CV として算出した場合 (細胞質の蛍光輝度のばらつき SD/細胞質の蛍光輝度の総和) も同様に、Gag 変異体は野生型に比べて有意に高く、その局在にばらつきがあることが示された (図 3 右)。

ゲノム編集法を使った DNA レベルでのウイルスの脆弱部位の検索実験系の検証には、LTR の non functional region (T295), NF-kB 結合領域 (T6), TAR (T5) を標的とする gRNA を用いた (図 4)。それぞれの gRNA と Cas9 を恒常的に発現する Jurkat 細胞を作製し、HIV-1_{NI,4,3} を感染させ、上清中の p24 を測定することで CRISPR 導入細胞におけるウイルス増殖を検証した (図 5)。その結果、HIV 標的 CRISPR 導入細胞においてウイルス増殖の遅延が確認された (図 6)。また、それぞれの CRISPR 導入細胞から増殖したウイルスゲノムの配列をシーケンス解析した結果、CRISPR 標的部位に変異が誘導されていた。興味深い事に、non functional region (T295) を標的とする CRISPR 導入細胞で増殖したウイルスには、ゲノム編集法で導入される典型的なランダム indel 変異が誘導されていたが、ウイルス増殖に必須な NF-kB binding region (T6) と TAR (T5) を標的とする CRISPR 導入細胞で増殖したウイルスには、ランダムな indel 変異ではなく、その変異導入に傾向

図 2: Gag 変異体の局在の共焦点顕微鏡解析

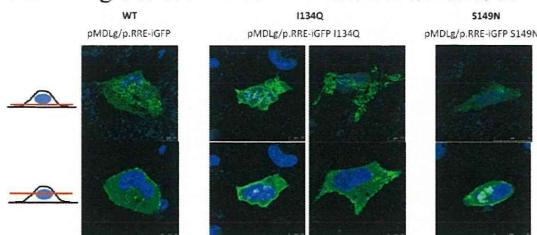


図 3: 細胞質における蛍光標識 Gag 蛋白質のばらつき

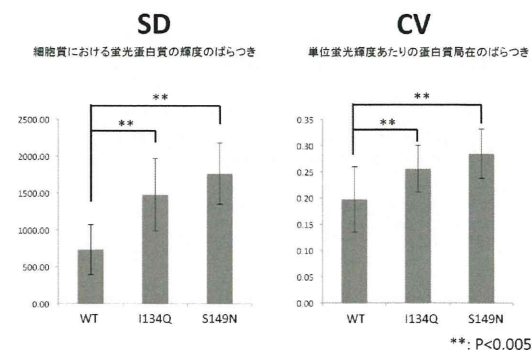


図 4: gRNA の設計

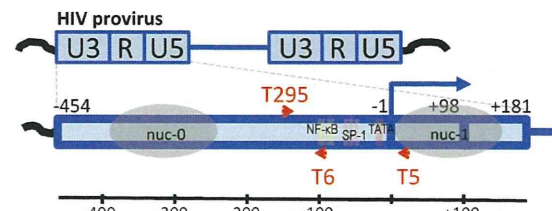
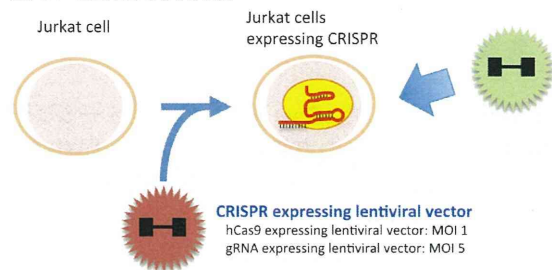


図 5: 感染実験概要



がみられた (図 7)。具体的には、T6 標的 CRISPR 耐性ウイルスでは二つの NF-kB binding region のうち一つは保持されたままであり、T5 領域には TAR ステムループの構造を保持するように点変異が導入されていたものが多く検出された。また、T6 と T5 導入細胞では T295 導入細胞より強力な

図 6: CRISPR 導入 Jurkat 細胞における HIV-1_{NL4-3} 増殖

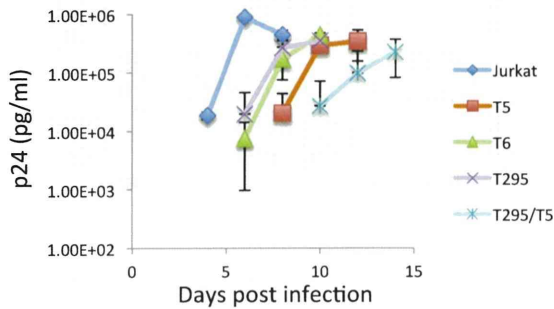


図 7: CRISPR 導入 Jurkat 細胞で増殖したウイルス RNA 配列

T5: TAR sequence is essential for transcription of vRNA

```
WT  GCCTCTCTGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTG
    GCCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTG
    GCCTCTCTGGTTAGATCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTG
    GCCTCTCTGGTTAACCCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTG
    GCCTCTCTGGTT-----CCTGGAGCTCTCTG
```

T6: NF-kB binding sequence is important for viral transcription

```
WT  CTTGCTACAAGGGACTTTCCGCTGGGACTTTCCAGGGAGGC
    CTTGCTACAAGGGACTTTCC-----AGGGAGGC
    CTTGCTACAAGGGACTTTCCGCTGG-----AGGC
```

T295: non functional region

```
WT  TCACGTFGGCCGAG-----AGCTGCATCCGGAGTACTTCAAG
    TCACGTFGGCCG-----AGCTGCATCCGGAGTACTTCAAG
    TCACGTFGGCCGAGTAGTAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAG
    TCAC-----GCTGCATCCGGAGTACTTCAAG
```

ウイルス増殖の遅延効果が確認されたことから、ゲノム編集法を利用する事で、ウイルスの増殖に必須な部位 (=脆弱部位) を DNA レベルで検索可能であることが示唆された。

D. 考察

本研究で確立した Gag のライブイメージング実験系により、Gag の点変異体の細胞内局在の異常を明らかに出来たことから、今後も HIV の致死変異や複製制御因子を見つけた班員との連携により、Gag 発現と局在の制御要因の解析が期待できる。また、この Gag 蛋白質のライブイメージング解析システムと H25 年度に構築した MS2 を利用したウイルス RNA のライブイメージング法を組み合わせることで、Gag 蛋白質とウイルスゲノム RNA の相互作用の空間的解析が期待できる。

また、GE Cytell システムを導入する事によって、細胞質の蛋白質の定量解析が可能となった。今回の結果では、野生型 Gag は細胞膜に集積して、ウ

イルス様粒子 (VLP) を形成するものの、過度に aggregation を起こすことがなく、Gag 蛋白質の細胞質における偏りはある程度均一なものとなるが、変異体 I134Q では図 2 に示すように細胞膜で過度に aggregation し、蛍光輝度が極端に高い部分が生じた結果 SD は野生型に比べて有意に高く算出されたと考えられる。S149N では、Gag が細胞内小器官に蓄積されるため、蓄積された部位の蛍光輝度が強くなり、野生型より有意に SD 値が高くなったと考えられる(図 3 左)。

また、ゲノム編集法を使ったウイルス脆弱部位の検索実験系の構築過程において、細胞にあらかじめ HIV 標的 CRISPR システムを恒常発現させることで、HIV の複製を抑制できることが確認された。このことは、HIV 標的 CRISPR は潜伏状態プロウイルスの除去効果に加え、複製可能な HIV に対しても抗ウイルス効果があること、すなわち、HIV 標的 CRISPR を駆使した HIV 治療戦略が有用であることを示唆する。しかしながら、予想通り CRISPR 耐性変異を獲得したウイルスが増殖したことから、現行薬剤併用療法のように gRNA を組み合わせる使用、HIV の脆弱部位を見つけるといった耐性変異株の出現を抑える工夫が不可欠であると考えられる。

また、ウイルス RNA のシーケンス解析により、以下に示す CRISPR 耐性変異の出現機序が予想される。まず、CRISPR システムによって標的配列の二本鎖 DNA 切断とランダムな indel 変異が誘導された後、その変異が導入されたプロウイルス集団の中から、ウイルス複製能を保持しつつ、CRISPR 耐性変異を獲得したウイルスが選択的に増殖したと考えられる。non functional region を標的とする T295 gRNA 導入細胞ではランダムな indel 変異が導入されても、ウイルス増殖に影響を及ぼさない領域であり、ウイルスが CRISPR 耐性変異を獲得する際に制限を受けなかったため、典型的な indel 変異をもつウイルスが数多く検出されたと考えられる。一方、NF-kB 結合領域を標的とする T6 gRNA 導入細胞では、二つある NF-kB のうち一つを保持したものだけがウイルス増殖過程で選択され、TAR 標的 T5 gRNA 導入細胞では TAR の RNA 立体構造を保持しつつ、CRISPR 耐性変異を獲得したウイルスが選択されたと考えられる。このことから、本研究で確立した手法をウイルスの複製に必須な部位 (=脆弱部位) を検索するのに有効であることが示された。ウイルス複製に必須な Gag の脆弱部位の検索、すなわち、新たな創薬標的検索方法として期待できる。

E. 結論

Gag を標的とする HIV 治療法開発の基盤とな

る実験系、1)Gag 蛋白質のライブイメージング解析系、2)ゲノム編集法を使ったウイルス脆弱部位の検索実験系を構築した。

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) Ebina H, Kanemura Y, Misawa N, Sakuma T, Kobayashi T, Yamamoto T, Koyanagi Y. A high excision potential of TALENs for integrated DNA of HIV-based lentiviral vector. *PLoS One*. In press.

2) 蝦名博貴、小柳義夫. ゲノム編集とエイズ治療. 医学の歩み. 医歯薬出版株式会社, 2015.

3) 蝦名博貴、小柳義夫. ゲノム編集技術を用いたエイズ根治療法の可能性. 今すぐ始めるゲノム編集, 羊土社, 2014.

2. 学会発表等

1) 蝦名博貴: 感染者からのウイルスの除去. 市民公開講座 HIV 感染症の Cure は可能か?-基礎研究者の挑戦. 2014年12月5日(金)、大阪

2) 蝦名博貴: ゲノム編集法を用いたエイズ治療戦略の展望. 第28回日本エイズ学会学術集会. 2014年12月3-5日(水-金), 大阪.

3) 蝦名博貴、金村優香、小柳義夫: ゲノム編集法を用いた HIV プロウイルスのライブイメージングシステムの構築. 第37回日本分子生物学会年会. 2014年11月25-27日(火-木), 横浜

4) Ebina H: Perspective of genome editing technologies for viral diseases. The 27th Annual Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology. 2014年11月12-14日(水-金), 小倉.

5) 蝦名博貴、金村優香、三沢尚子、佐久間哲史、小林朋子、山本卓、小柳義夫: TALEN 法による HIV プロウイルスの高編集効果. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月11-12日(月-水), 横浜.

4) 蝦名博貴: ゲノム編集の HIV への応用、第4回ゲノム編集研究会. 2014年10月6-7日(月-火), 広島.

6) 蝦名博貴: ゲノム編集法を用いたウイルスゲノムの改変~HIV 治療への応用、第8回日本ゲノム微生物学会若手の会. 2014年9月28-29日(日-月), 静岡.

7) 蝦名博貴、三沢尚子、金村優香、小柳義夫: ゲノム編集法のエイズ治療への展望. 第16回白馬シンポジウム. 2014年6月13-14日(金-土), 熊本.

研究課題： 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
研究分担者：間 陽子（理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット ユニトリリーダー）
研究協力者：Chutiwitoonchai Nopporn（理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット
訪問研究員・エイズ予防財団 リサーチレジデント）

研究要旨

HIV-1アクセサリー蛋白質VprはGag蛋白質p6ドメインとの結合を介してウイルス粒子にパッケージングされること、p6のVprとの結合サイトは、HIV-1粒子の放出に必須なEndosomal sorting complex required for transport (ESCRT)であるTsg101 およびAlixとp6との結合サイトの近接に位置していることが知られているが、VprがGagとESCRT分子群との相互作用にどのような影響を及ぼすのか不明なままである。これまでに我々は、GST pull down法により、VprがGag とTSG101およびAlixとの結合を濃度依存的に競合阻害する事を初めて示した。さらに、Gag は細胞質に、Tsg101は細胞質および核膜に局在するが、両蛋白質を同時に強発現させると、Gagは核膜上でTsg101と共局在して凝集し、その共局在はVprにより減少することを見出した。今年度は、fluorescence resonance energy transfer (FRET)法により、生細胞内においてGagとTsg101は核膜上で共局して凝集すること、この凝集はVprの発現により阻害されることが立証した。さらに、細胞内でTSG101を過剰発現させるとGagの発現量とウイルス様粒子(VLP)の産生量が減少することを見出した。これらの低下はTSG101によるGagのリソソーム経路を介した分解の可能性が示された。この低下はVprの存在によって回復した。最後に、VprとGag p6の相互作用を標的とする新規阻害剤候補を探索するためのELISA binding法を構築し、構造多様性を考慮した9600個の化合物から、Tsg101とGag p6の結合を阻害する低分子化合物を取得した。これらの幾つかはマクロファージにおけるウイルス複製をも阻害した。

A. 研究目的

HIV-1粒子の放出課程は、Gag 蛋白質のp6領域内に存在する”Late (L) domain”モチーフと後期エンドソーム分子群 Endosomal sorting complex required for transport (ESCRT)との結合を通じて制御される。L domain モチーフの一つがPTAP モチーフと呼ばれ、ESCRT 蛋白質の一つであるTsg101 との結合することでウイルス構成タンパク質の細胞膜移行に重要な作用を示す。事実、PTAP モチーフに変異を導入する、あるいはTsg101 発現をノックダウンするとウイルス粒子の放出は阻害される。L domain の他の結合モチーフがYPXnLモチーフと呼ばれESCRTタンパク質のAlix (AIP1)との結合活性を有する。Alix はTsg101 およびESCRT III complex と結合することが知られている。

HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr は p6 と結合することでウイルス粒子にパッケージングされることが知られているが、Vpr が Gag 蛋白質の輸送や粒子出芽に及ぼす影響は未だ不明なままである。また、Vpr の p6 との結合サイトは P6 と Tsg101 および Alix 結合サイトに近接しているが、その詳細な相互作用様式および Vpr が p6-ESCRT 相互作用にどのような効果を有するのかは明らかになっていない。従って、p6 と ESCRT 分子群との相互作用、Gag 蛋白質の輸送および粒子出芽に果たす Vpr の役割を解析することは、Gag 出芽機構の解明と Gag の新規治療標的部位の探索に重要となる。

本研究の目的は、Gag p6 と TSG101 などの ESCRT 分子群との相互作用および Gag 蛋白質の輸送および粒子出芽に及ぼす Vpr の効果を解析する事、Vpr のウイルス粒子パッケージング機構を解明する事である。更に、p6 と ESCRT 分子群との相互作用を阻害する低分子化合物をスクリーニングすることを目的とする。本研究により Gag の新規治療標的部位および構造の提供および Gag 出芽の分子メカニズムの解明が期待できる。

B. 研究方法

- 1) Fluorescence resonance energy transfer (FRET) 法：eCFP-TSG101/pCAGGS, Gag-Venus/pCAGGS および mRFP-Vpr/pCAGGS 発現ベクターを作製し、HeLa 細胞へ導入後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて FRET 法を行った。
- 2) ウイルス様粒子(VLP)の産生：Gag/pCAGGS ベクターを 293T 細胞に導入して Gag を発現させ、48 時間後に培養上清を回収して 20% ショ糖密度勾配超遠心法により VLP を精製し、Western blot 法を行った。この時、Flag-TSG101/pCAGGS あるいは Vpr/pCAGGS 発現ベクターを共導入した。
- 3) Gag と Tsg101 の結合阻害を標的とした低分子化合物のスクリーニング：GST-Vpr と His-Tsg101 を大腸菌で大量合成し、ELISA binding assay を構築した。合成した PTAP ペプチドを添加することで Gag と Tsg101 蛋白質の結合阻害を確認した。9600 個の小分子化合物を含む Core Library 用いて

スクリーニングを実施した。小分子化合物のウイルス阻害効果と細胞毒性評価はマクロファージを用いた感染実験とWST法により調べた。マクロファージの準備は健康人由来の血液から末梢血単核球 (PBMCs) を分画し、抗-CD14抗体ビーズを用いてCD14陽性細胞である単球を分離し、Macrophage colony stimulation factor (M-CSF)を加えて1週間培養し最終分化マクロファージとした。

(倫理面への配慮) 特になし

C. 研究結果

CFP-TSG101/pCAGGS, Gag-Venus/pCAGGS およびmRFP-Vpr/pCAGGS発現ベクターを作製し、FRET法を構築した。CFP-TSG101/pCAGGSおよびGag-Venus/pCAGGSをHeLa細胞に共導入すると、Tsg101発現ベクターを過剰に発現させた時 (0.75 µg以上) に始めて凝集が確認された (図1)。この凝集は発現ベクターの導入量依存的であった。FRET法によりこの凝集においてTsg101とGagが共局在していることが明らかとなった (図2A)。次に、CFP-TSG101/pCAGGS およびGag-Venus/pCAGGS に加えて、mRFP-Vpr/pCAGGSも同時に導入すると、凝集はVprの存在により低下した (図2B)。

哺乳類細胞に Gag 蛋白質を発現させると VLP が形成・放出されることが報告されている。そこで、Tsg101 が核膜上で Gag と凝集することが、VLP の産生に及ぼす影響を調べた。Gag/pCAGGS、Flag-TSG101/pCAGGS あるいは Vpr/pCAGGS を 293T 細胞に共導入して、48 時間後に培養上清を回収して 20%ショ糖密度勾配超遠心法により VLP を精製し、Western blot 法を行った (図3)。TSG101を強発現させるとGagの発現量とVLPの産生量が減少することが示された。このVLPの産生量の減少はTsg101の量依存的であった。興味深い事に、この減少はVprの存在によって回復した。(data not shown)。

続いて、VLPの産生量の低下がGag蛋白質の分解によるものか否かを調べるために、Gag/pCAGGSおよびGag/pCAGGS発現ベクターを293T細胞に共同導入して24時間培養後にプロテアーゼインヒビターであるLactacystin (LC)およびリソソームインヒビターであるBafilomycin A1(BFA1)で6時間処理した後に、cell lysateを用いてWestern blot法を行った。その結果、TSG101によるGagの分解は、LC処理ではなく、BFA1処理で阻害されたことから、リソソーム経路を介した分解の可能性が示された (図4)。

Tsg101とGag p6の結合を標的とする新規阻害剤候補を探索するためのELISA binding法を構

築し、構造多様性を考慮した9600個の化合物を含むCore Libraryを用いて、Tsg101とGag p6の結合を阻害する低分子化合物を取得した。さらにこれらの化合物の幾つかはマクロファージにおけるウイルス複製をも阻害した。

D. 考察

本研究において初めて、細胞内で過剰発現したTsg101がGagの凝集と分解を誘導することが示された。さらに、Tsg101の過剰発現が、Gagの細胞内での発現とVLPの産生を低下させることも明らかとなった。これらの成果は、TSG101の強発現はGag traffickingとviral buddingを阻害するというこれまでの報告(J Virol 2003. 77(17);9173; J Virol 2003. 77(11);6507; PNAS 2011. 108(37);E689)を裏付けている。この現象が実際のHIV-1感染細胞において認められる否かを解析することが必要である。

これまでに、GAG-TSG101の阻害薬については、2報の論文が発表されている。一つ目はTSG101に結合するインヒビター (Oxime based peptide)、二つ目はGAG-TSG101の結合阻害を標的にしたインヒビター (Selected Cyclin Peptide (IC50:7は7マイクロM, peptidに環状になるように化合物を付加))である。しかし、両者ともペプチドインヒビターであるため、細胞に取り込まれやすくする改変が必要であった。そこで、本研究において我々は、細胞に取り込まれるような改変を必要としない小分子化合物を選択し、標的としてGAG-TSG101の結合阻害を選択した。その結果、Gag p6とTsg101との相互作用が新規抗ウイルス阻害薬の標的となる可能性を突き止めた意義は大きい。今後は、Gag p6とTsg101との相互作用を阻害する小分子化合物の作用機構を詳細に解明することが重要である。

E. 結論

- 1) Tsg101とGag p6が新しい抗ウイルス阻害剤の標的になることが立証された。
- 2) FRET法により、生細胞内においてGagとTsg101は核膜上で共局在して凝集すること、この凝集はVprの発現により阻害されることが確認された。
- 3) 細胞内でTSG101を過剰発現させるとGagの発現量とVLPの産生量が減少した。これらの低下はTSG101によるGagのリソソーム経路を介して分解される可能性が示された。この低下はVprの存在によって回復した。

F. 知的所有権の取得状況 無し

G. 研究発表

1. 論文発表

○1)Murakami T, Aida Y. Visualizing 1 Vpr-induced G2 arrest and apoptosis. *PloS One*, 9(1):e86840, 2014

○2)Zahoor M. A, Xue G, Sato H, Murakami T, Takeshima S-n, Aida Y. HIV-1 Vpr induces interferon-stimulated genes in human monocyte-derived macrophages. *PloS One*, 9(8):e106418, 2014.

3)Miyatake H, Sanjoh A, Unzai S, Matsuda G, Tatsumi Y, Miyamoto Y, Dohmae N, Aida Y. Crystal structure of human importin- α 1 (Rch1), revealing a novel autoinhibition mechanism involving homodimerization. *PloS One*, 10(2): e0115995, 2015

○4)Hagiwara K, Ishii H, Murakami T, Takeshima S-n, Chutiwitoonchai N, Kondoh 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.*, revised.

2. 学会発表等

(1)Kamori D, Murakami T, Hasan Z, Carlson J, Siarot L, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Gatanaga H, Oka S, Aida Y., Ueno T. : Effects of naturally arising mutations in HLA-A*02-restricted immunodominant region on the functions of HIV-1 Vpr, 第16回白馬シンポジウム、2014.6.14、熊本
(2)Zahoor A. M, 薛光愛、佐藤洋隆、村上知行、竹嶋伸之輔、間陽子 : HIV Vpr 発現マクロファージにおけるマイクロアレイによる遺伝子発現解析、第157回日本獣医学会学術集会、2014.9.9-12、札幌

(3)Siarot L、佐藤洋隆、Chutiwitoonchai N、間陽子 : Screening of small molecules Interfering the specific interaction between human immunodeficiency virus-type I(HIV-1) Gag and ESCRT Tsg 101、第157回日本獣医学会学術集会、2014.9.9-12、札幌
(4)村上知行、間陽子 : Vpr は新規 Vpr 結合因子 HIP1 のリン酸化の制御を介して G2 期停止を調節する、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.10-12、横浜

(5)Chutiwitoonchai N、間陽子 : TSG101 overexpression induces Gag aggregation at perinuclear region and this aberrance is rescued by Vpr : 第62回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.10-12、横浜

(6)Siarot L、佐藤洋隆、Chutiwitoonchai N、間陽子 : Gag-Tsg 101 targeting anti-human immunodeficiency virus-type I (HIV-1) therapy、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.10-12、横浜

(7)佐藤洋隆、阿部昌子、大貫哲男、黒田和道、長澤洋介、武井正美、山本樹生、吉田稔、間陽子 : HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr を標的とした新規

抗 HIV 治療薬スクリーニング系の構築、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.10-12、横浜
(8)萩原恭二、村上知行、石井英樹、竹嶋伸之輔、近藤恭光、本田香織、長田裕之、横田(恒次)恭子、鈴木正昭、間陽子 : アクセサリータンパク質 Vpr の核移行を標的にしたマクロファージに対する新規 HIV-1 阻害剤の最適化研究、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.10-12、横浜
(9)Kamori D., 村上知行、Hasan Z, Meribe S, Carlson J., Siarot L、三浦聡之、立川(川名)愛、岩本愛吉、鴻永博之、岡慎一、間陽子、上野貴将 : Effect of natural variability of an immunodominant Vpr region on immunological footprints, clinical outcome and protein functions、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.10-12、横浜
(10)L.L. Siarot, H. Sato, N Chutiwitoonchai, T. Aono, Y. Aida : Screening of small molecule inhibitors for human immunodeficiency virus-type I(HIV-1) by targeting Gag-Tsg101 interaction. 2015. 3.5-7, 2015 Palm Spring Symposium, CA, USA

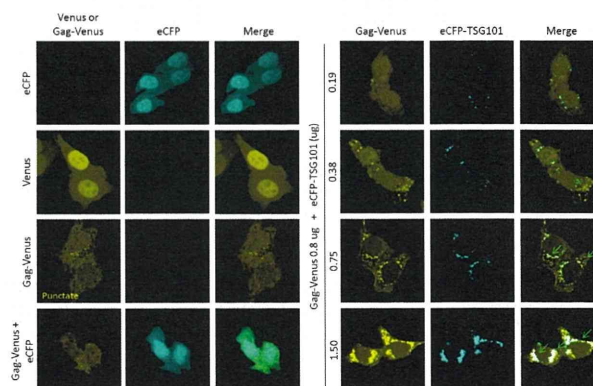


Figure 1 TSG101 induced Gag aggregation. HeLa cells were transfected with Gag-Venus plasmid alone or co-transfected with the indicated amount of eCFP-TSG101 plasmid for 48 hr. The green arrows indicate co-localization of Gag/TSG101.



Figure 4 TSG101 down-regulated Gag through lysosomal pathway. 293T cells were co-transfected with Gag + FLAG-TSG101 plasmids for 24 h. The inhibitors, BFA1 (Bafilomycin A1) or LC (Lactacystin) at indicated concentrations were added and the cells were cultured for 6 h before collecting total cells for Western blot analysis.

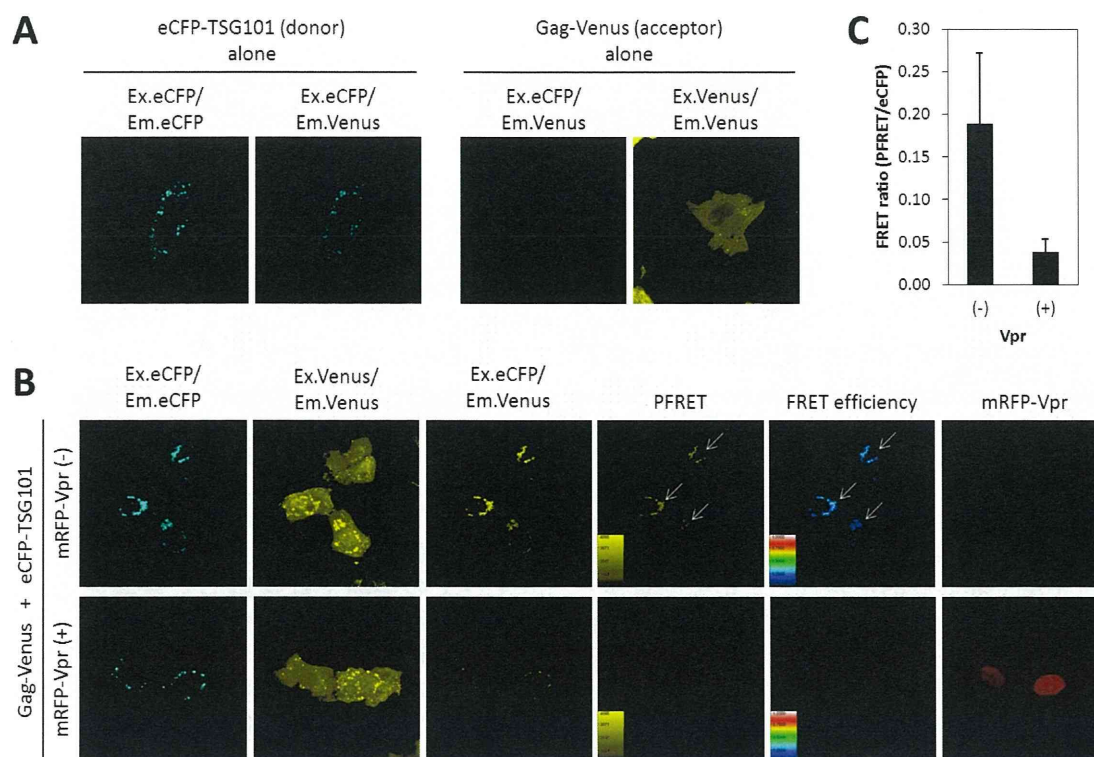


Figure 2 FRET analysis of Vpr rescued TSG101 induced Gag aggregation. HeLa cells were transfected with eCFP-TSG101 or Gag-Venus plasmid alone (A), or co-transfected with eCFP-TSG101 + Gag-Venus plasmids (B, upper row), or eCFP-TSG101 + Gag-Venus + mRFP-Vpr plasmids (B, lower row) for 48 hr. The precision FRET (PFRET) and FRET efficiency were analyzed by sensitized emission method. (C) FRET ratio (PFRET/eCFP-TSG101) calculated from B. The white arrow heads indicated co-localization of Gag/TSG101.

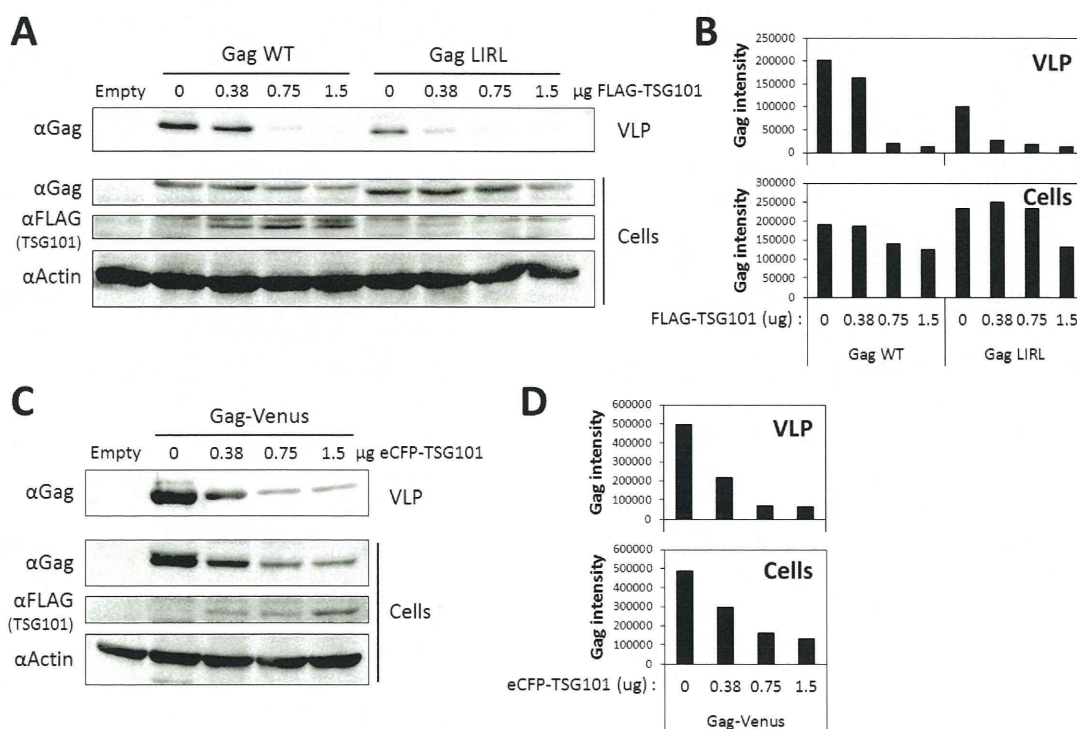


Figure 3 TSG101 induced Gag down-regulation and decreased VLP production. 293T cells were co-transfected with Gag (WT or LIRL, Δ P78) + FLAG-TSG101 plasmids (A) or Gag-Venus + eCFP-TSG101 plasmids (C). After 48 hr, the VLP was collected by 20% sucrose cushion/ultracentrifugation method and the total cell lysates were prepared for Western blot analysis. The Gag intensity of VLP and cell lysate in A and C were compared in B and D, respectively.

研究課題：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

研究分担者：櫻木 淳一（阪大微研 ウイルス感染 助教）

研究要旨

HIV ゲノム二量体化における最重要領域であるゲノム RNA5' 端非翻訳領域のパッケージングシグナル内に存在するステム-ループ 1 (SL1) に着目し、点置換変異導入によりその機能的構造に関する詳細な解析を行った。その結果 SL1 は計算機による構造予測と異なるバルジ・ループ・ステム構造をとることで様々な機能を発揮している可能性が示唆された。

A. 研究目的

HIV-1を含むレトロウイルスのRNA ゲノムは+側一本鎖約9000塩基の長さを持つ。ゲノムはウイルス粒子中で非共有的に結合したホモ二量体として存在していることが知られており、二量体化はゲノムパッケージングや逆転写時のゲノム組換え、あるいは逆転写そのものにも重要な役割を果たすことがこれまでの我々の研究成果により示唆されてきた一方で、どのように二量体化が起きるのかについては未だ多くの点が不明である。HIV-1のゲノム二量体化の機序解明に迫るために、本研究では二量体化反応におけるゲノム上の最重要部位と目されているRNA5' 非翻訳領域(UTR)に存在するSL1領域について、我々が構築した様々な独自の解析系を駆使して機能的構造の解析を行った。

B. 研究方法

HIV-1 NL43感染性DNAクローンを野生型株とし、遺伝子工学的手法を用いてSL1領域に様々な点置換変異を導入した。また、Env領域にフレームシフト変異を導入してEnv遺伝子を破壊し、感染性を失わせた変異体群、二量体化能の定量を行うためにEnv領域にSL1を含むUTR領域を複製挿入した変異体群も作成した。ゲノムパッケージング能の定量のためにGag遺伝子中の二十数塩基に渡る領域に同義置換変異を導入した変異体を作成した。ヒト胚腎臓由来細胞系293Tに種々の変異DNAをトランスフェクトし、産生ウイルスと細胞を回収した。ヒトT細胞系MT-4に感染させることによってウイルスの感染価を測定した。ウイルスRNAを抽出してノザンブロットを行うことでゲノム二量体化能の定量を行った。ウイルス粒子RNA、細胞RNA中のゲノムRNA量をリアルタイム逆転写PCR法によって定量することでパッケージング能の比較を行った。

(倫理面への配慮)

倫理的配慮を必要とする研究は実施していな

い。

C. 研究結果

すべての実験では構築した変異体ウイルスのゲノムパッケージング/ゲノム二量体化/ウイルス増殖能を定量して、導入変異のウイルス活性に及ぼす影響を解析した。一部の変異体に関してはゲノム組換え効率も測定し、解析の結果に加えた。

1. RNA二次構造予測プログラムによってSL1の構造予測を行うと二種類の代表的な構造が算出される。ModelAは多くの論文において標準的なモデルである一方、構造の安定性はわずかにModelBの方が高い(Fig. 1)。実際にウイルス中で機能しているのはどちらの構造であるかを知るために、塩基置換変異によってそれぞれのモデルに特異的な塩基対形成を破壊・再構築した一連の変異体を作成して解析した。その結果ModelAが機能的構造として居る可能性が強く示唆された。
2. SL1のステム領域は上部と下部とに分かれるが、それぞれに3カ所ずつ存在するG-C塩基対についての機能解析を行った。その結果上部については2カ所のG-C塩基対は機能発揮に重要であったが最上部のヘアピンループに隣接した1カ所(G254-C264)については塩基対形成が不要である可能性が示唆された。
3. 同様に下部ステムの3カ所のG-C塩基対について解析を行った結果2カ所のG-C塩基対は機能発揮に重要であったが、最基部の1カ所(C243-G277)については分子内塩基対形成よりも分子間塩基対形成の方が機能的に重要である可能性が示唆された。この可能性はゲノム組換えアッセイの結果からも裏付けされた。
4. ヘアピンループ部の回文配列(GCGCGC)を変異導入によりG6個あるいはC6個のストレッチに変化させて二量体化頭を観察し

た結果、通説通りヘアピンループは二量体形成に非常に重要な領域であることが確認された。

D. 考察

SL1の機能的全体構造がRNA単体の二次構造の安定性に必ずしも則していないことは、蛋白質を含めたウイルスゲノムRNAの周辺環境を反映していると考えられた。

ステム上部の解析からヘアピンループは従来考えられていた9塩基よりも大きい11塩基によって形成されるタイミングがある可能性が考えられた。ヘアピンループの拡大はループ形状に柔軟性をもたらし、二量体化開始点である回文配列の相補鎖形成を容易にするのかも知れない。

ヘアピンループ同士がKissing Dimerを形成しているポイントで同時にステム基部で相互作用が起きることは考えがたい。基部が二量体化の分子間反応に関わっているとすると、Kissing Dimer形成の前段階に中間体として存在するか、二量体化後半にExtended Duplex形成へ遷移した時点でDuplex最外端でこの安定性に寄与する形で働く可能性が考えられた(Fig. 2)。

E. 結論

HIVゲノム二量体化における最重要領域であるゲノムRNA5' 端非翻訳領域のパッケージングシグナル内に存在するステムループ1 (SL1)は、計算機による構造予測と異なるバルジ・ループ・ステム構造をとることで様々な機能を発揮している可能性が示唆された。

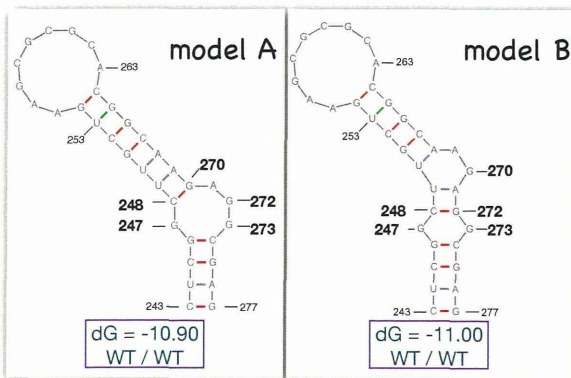


Fig. 1

F. 知的所有権の取得状況
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表等

1) Sayuri Sakuragi, Tatsuo Shioda and Jun-ichi Sakuragi. SL1 REVISITED: FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE STRUCTURE AND CONFORMATION OF HIV-1 GENOME RNA. Retrovirus meeting at Cold Spring Harbor Laboratory. May 19-24, 2014, NY, USA.

2) 櫻木淳一、櫻木小百合、塩田達雄 HIV-1 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 日本ウイルス学会 2014、横浜

3) 櫻木淳一 HIVゲノム RNA とその周辺 シンポジウム 13「HIVのウイルス学」 日本エイズ学会 2014、大阪

4) 櫻木淳一、櫻木小百合、塩田達雄 HIV-1 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 日本エイズ学会 2014、大阪

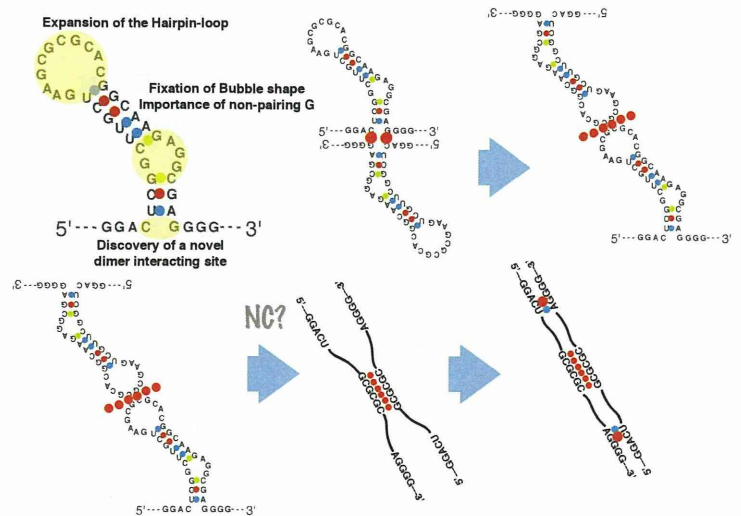


Fig. 2

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

研究分担者: 玉村 啓和 (東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授)

研究要旨

Gag を標的とする治療標的部位の探索、候補因子の特定に関する研究を、有機合成化学を基盤として行った。目的は抗 HIV 活性化化合物の創出、候補化合物の構造活性相関の情報提供、Gag の機能制圧である。今年度の研究成果は、1) 以前抗 HIV 活性が見られたマトリックスタンパク質(MA)の部分ペプチドの最適化を行った。2) カプシドタンパク質(CA)を網羅する合成ペプチドライブラリーの抗 HIV 活性を、村上努博士(国立感染症研究所、エイズ研究センター)に評価していただいた。3) 細胞膜透過性ユニットを付与したいいくつかの CA 部分ペプチドに顕著な抗 HIV 活性が見られ、構造活性相関の基盤情報が得られた。

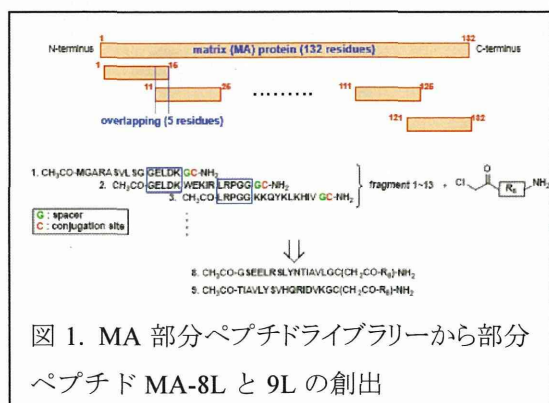
A. 研究目的

Gag を標的とする治療標的部位の探索、候補因子の特定に関する研究を、有機合成化学を基盤として行う。目的は抗 HIV 活性化化合物の創出、候補化合物の構造活性相関の情報提供、Gag の機能制圧である。ウイルスタンパク質 Gag からプロセッシングにより生じるマトリックスタンパク質(MA)、カプシド (CA) に着目し、部分ペプチドライブラリーから抗 HIV-1 活性を有する配列を探索し、それぞれの部分ペプチドの抗 HIV-1 活性および細胞毒性について検討を行う。

B. 研究方法

1) MA 部分ペプチドの最適化

以前、全長 132 残基の MA タンパク質を N 末端側から 15 残基ずつに分割し、MA 部分ペプチドライブラリーを設計、合成した。なお、合成した部分ペプチドを細胞内へ導入するため、細胞膜透過性を有する octa-Arg 配列を付



加している。その中で、高活性を示した MA-8L と 9L について、最適化を行った(図 1)。

- GSEELRSLYN[TIAVL]YSVHQRIDVK (MA-8, MA-9 をカバーする全配列: 25 残基)
- ① SEELRSLYN[TIAVL]Y
 - ② EELRSLYN[TIAVL]YS
 - ③ ELRSLYN[TIAVL]YSV
 - ④ LRSLYN[TIAVL]YSVH
 - ⑤ RSLYN[TIAVL]YSVHQ
 - ⑥ SLYN[TIAVL]YSVHQR
 - ⑦ LYN[TIAVL]YSVHQRI
 - ⑧ YN[TIAVL]YSVHQRID
 - ⑨ N[TIAVL]YSVHQRIDV

図 2. 新たな MA 部分ペプチドライブラリー (MA-8L と 9L の間の配列)の設計

具体的に MA-8L と 9L の間の配列①~⑨の部分

