

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 ($2 \mu\text{g}$) と pGL3 ベクター ($2 \mu\text{g}$) 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、多くは半致命的(ウイルス増殖が著しく減少)あるいは致命的(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TZM-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、半致命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命的となることが分かった。そこで、S149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、いずれも致命的変異であり、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、TZM-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命的・致命的変異体では、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、S149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、ウイルス複製に致命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・粒子形成に關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間相互作用に關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. *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、酒井遥介、泉泰輔、宮崎恭行、足立昭夫：SA1proxの遺伝子配列はVif/APOBEC3G依存的にウイルス複製能を変動させる。第62回日本ウイルス学会学術集会。2014年11月10-12日(月水)、横浜。

2) 酒井遥介、笹田ひかり、土肥直哉、泉泰輔、宮崎恭行、足立昭夫、野間口雅子：HIV/SIV Vpx蛋白質の発現調節に寄与する領域の解析。第62回日本ウイルス学会学術集会。2014年11月10-12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、酒井遥介、泉泰輔、内山恒夫、足立昭夫、野間口雅子：HIV-1 Gag-CAヘリックス7の変異がウイルス複製後期過程に及ぼす影響の解析。第62回日本ウイルス学会学術集会。2014年11月10-12日(月水)、横浜。

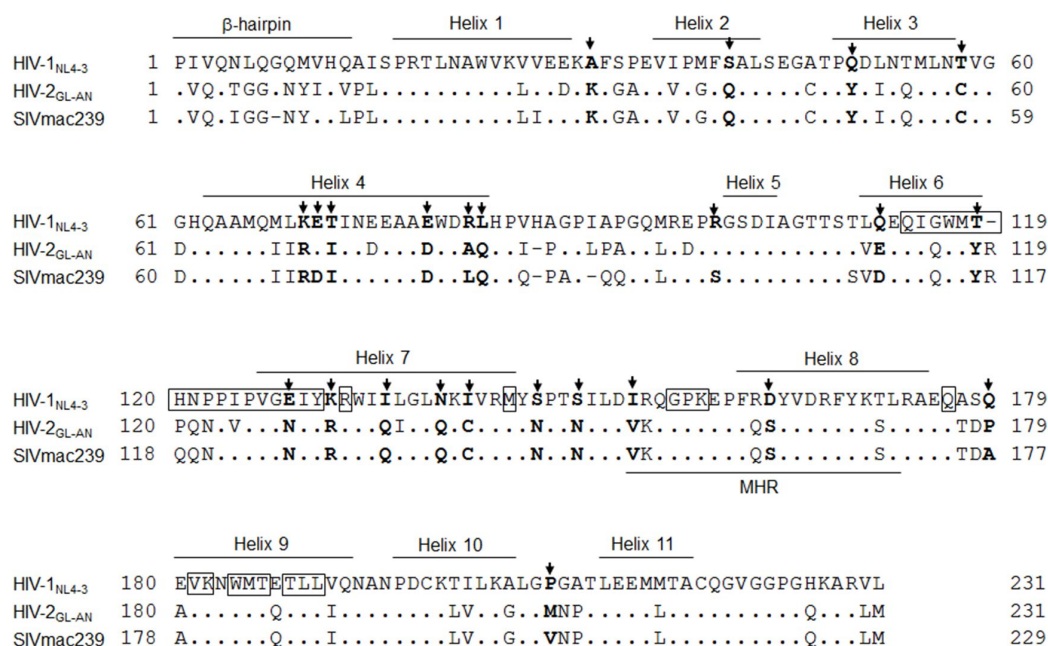


図 HIV-1 (NL4-3)、HIV-2 (GL-AN)、SIVmac239 の Gag-CA アミノ酸配列 本研究で初めて変異を導入した 24 種のアミノ酸部位を黒太字/黒矢印で示す。黒枠は、ヘリックス 6 ~ 9 の間で immature capsid assembly に影響を及ぼすことが報告されているアミノ酸部位・領域を示す。MHR, major homology region

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