

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 逆転写過程に關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、逆転写制御機構に關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

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、反応条件の至適化を行った (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)。

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)。

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)。

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、逆転写制御機構に關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關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 NFkB 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關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 IFNa in CD4 Memory T Cells. 第62回日本ウイルス学会, 2014年、横浜。

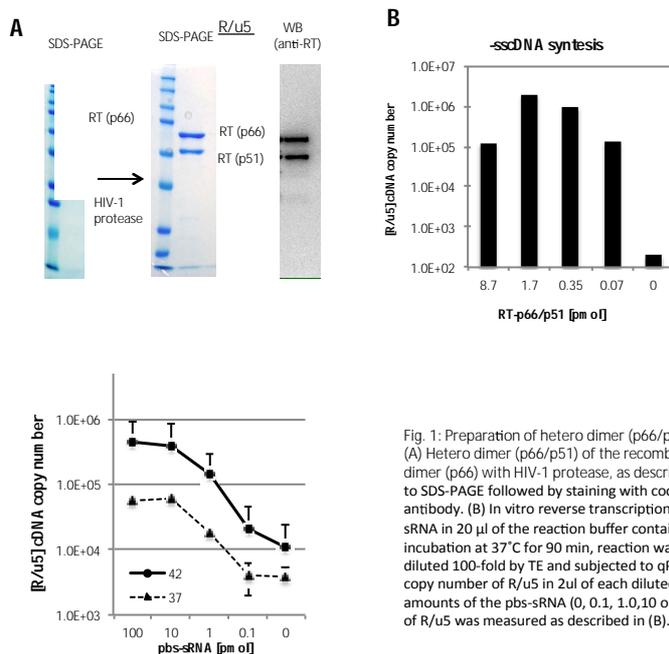


Fig. 1: Preparation of hetero dimer (p66/p51) of the recombinant HIV-1 RT (A) Hetero dimer (p66/p51) of the recombinant HIV-1 RT (rRT) was generated by proteolysis of the rRT in homo dimer (p66) with HIV-1 protease, as described in the "Methods". Final preparation of the p66/p51 was subjected to SDS-PAGE 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 μ l 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 5min. 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).

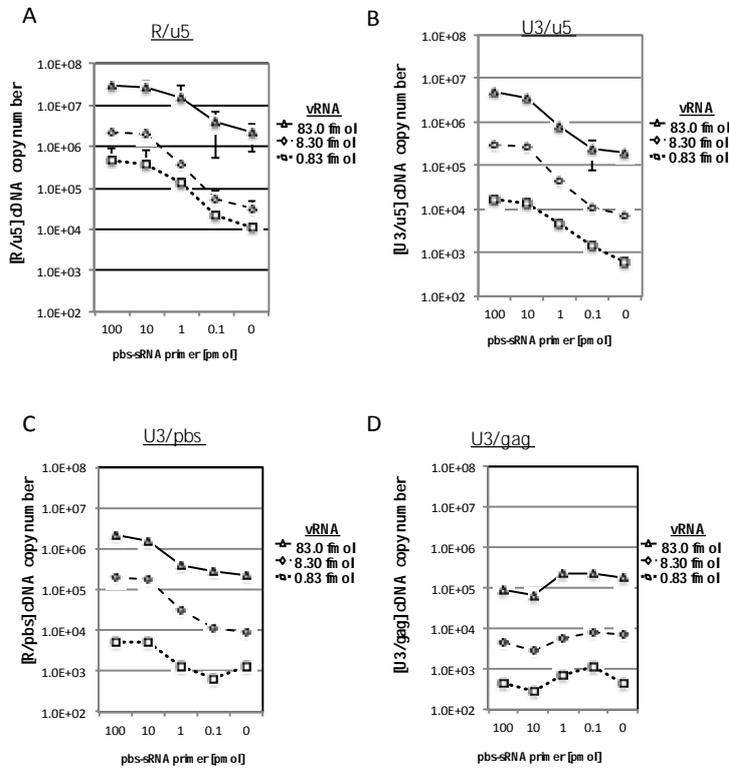


Fig. 2. Primer-dose dependency of cDNA synthesis and its strand transfers. In vitro reverse transcription was performed with several amounts of the pbs-sRNA (0, 0.1, 1.0, 10 or 100 pmol per reaction) at 42°C for 90 min. Primer-dose dependency of the cDNA synthesis was examined with three different amounts 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.

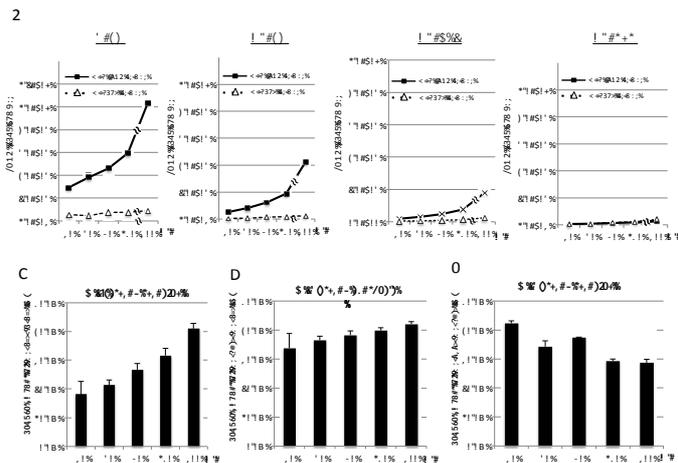


FIG 3. Time course analysis of cDNAs and their strand transfer. (A) In vitro RT assay was performed with 83 fmol of HIV-1 RNA and 100 pmol of pbs-sRNA primer and aliquots of the reaction were periodically harvested at 30, 60, 90 and 300 min after incubation at 42°C. The level of each cDNA intermediate (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).

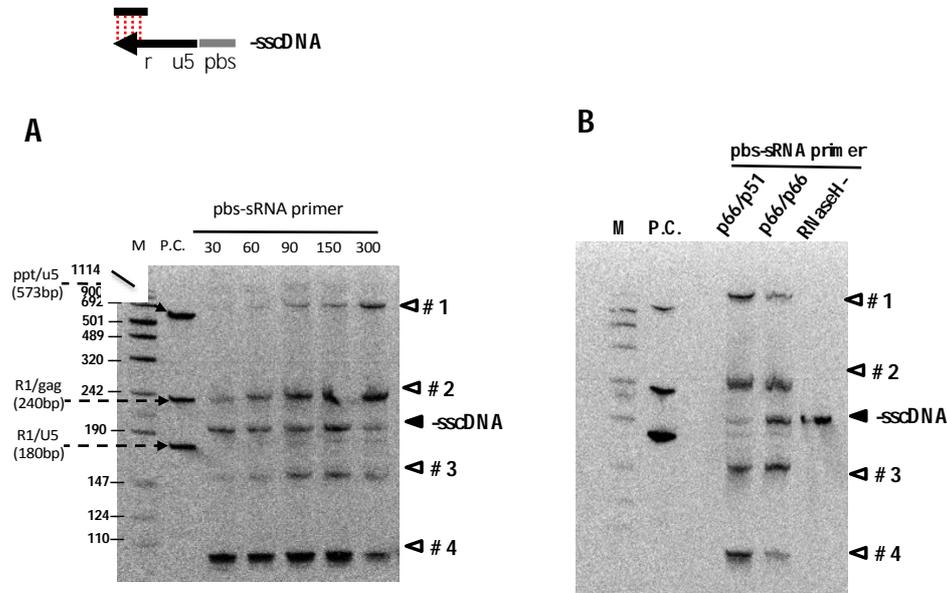


Fig. 4 . Aliquot of each reaction performed for the time-course analysis (Fig. 3) were subjected to southern blot analysis under denatured condition. (A) Dig-labeled HIV-1 primer R1-25 (Dig-R1-25 probe) was used to detect $-sscDNA$. The bands corresponding to $-sscDNA$ (200 nt) and aberrant product generated 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.

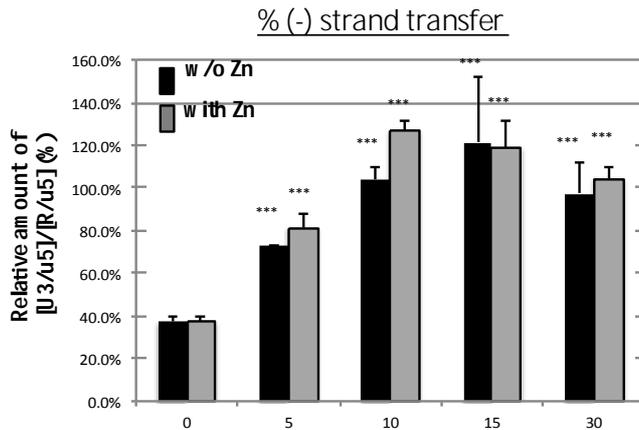


FIG 5. Stimulatory effects of HIV-1 NC. HIV-1 RNA (68 pmol) and pbs-sRNA (100 pmol) were pre-incubated with serial dilutions of sNC (0, 5, 10, 15 or 30 pmol) by ddw for 5 min at 37°C. The same serial dilutions of sNC that were pre-treatment of with $ZnCl_2$ (with Zn) or without $ZnCl_2$ (w/o Zn) were 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 (***) $p < 0.001$.