

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を抽出してノザンプ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。Model A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Model B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Model A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最外端でこれ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RNA 5' 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パルジ・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。

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.1

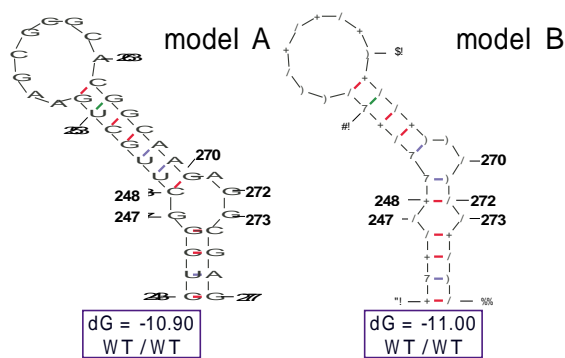


Fig.2

