

平成25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

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

平成25年度

総括・分担研究報告書

平成26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)

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. Gag の機能維持に必要な構造に関する研究	10
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 の致死の変異の解析	14
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	18
塩田 達雄 (大阪大学微生物病研究所)	
4. HIV ゲノムの逆転写制御に関するインテグラーゼの構造と感染性ウイルス粒子コア形成への 関与に関する研究	22
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	25
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	28
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	32
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 粒子パッケージングにおける Gag の機能に関する研究	36
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	39
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	44
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(2013)	48

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

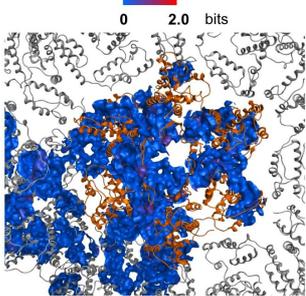
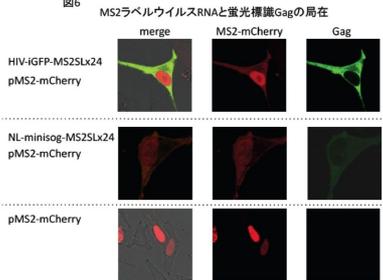
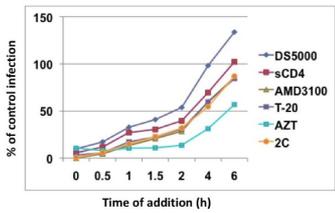
研究代表者：佐藤 裕徳（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 室長）

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）

研究要旨

本研究は、HIV Gag 蛋白質を標的とする創薬に必要な基礎情報を収集することを目的とする。創薬標的を論理的に絞り込むために、HIV の複製研究と Structure-Based Drug Design (SBDD)を一つの研究組織で行う。初年度は、HIV-1 コアの表面構造と多様性を解析し、Gag CA 多量体界面の保存される結合ポケットを見出した。細胞内 Gag の機能複合体（コア、Gag 前駆体 / ウイルスゲノム RNA 複合体）の動態を調べる *in situ* uncoating assay と Gag ライブイメージング系の構築を進め、Gag の細胞における本質的な機能と制御を解析する土台を作った。さらに創薬標的の無作為的の同定も進めた。細胞膜透過性 Gag ペプチドのライブラリーを作製し、Gag MA と CA の特定の部分ペプチドが抗 HIV 活性をもつことを見出した。次年度は、各自の成果を発展させながら連携し、Gag の細胞における役割と機能構造の理解を深める。その延長で HIV 感染の予防・治療標的となりうる弱点を絞り込む。

初年度研究の主な成果

<p>【目的】 HIV Gag蛋白質と結合因子を標的とする創薬に必要な基礎情報の収集</p> <p>【方法】 1. 創薬標的の論理的な絞り込み → 柱1. 機能構造と変化能の研究、柱2. HIVの複製研究 2. 創薬標的の無作為的の同定 → 柱3. 抗HIV化合物研究</p>		
<p>柱1</p> <ul style="list-style-type: none"> * HIV-1コアの保存性結合ポケットの同定 * Gag CAの致死変異の同定  <p>Gag CA多量体界面に高度に保存されるリガンド結合ポケットが存在する</p>	<p>柱2</p> <ul style="list-style-type: none"> * 生細胞のGagの動態を解析する新システムの構築 * HIV複製機構の新知見の蓄積 <p>図6 MS2ラベルウイルスRNAと蛍光標識Gagの局在</p>  <p>ウイルスゲノムRNAとGag前駆体は、細胞質～細胞膜に共局在する</p>	<p>柱3</p> <ul style="list-style-type: none"> * 細胞膜透過性Gagペプチドライブラリーの作製 * 抗HIV活性をもつGag CA, MA部分ペプチドの同定  <p>MAペプチド2CはHIV-1のCD4結合後膜融合に至る過程を阻害する</p>
<p>論文発表</p> <p>➢ Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A. <i>J Virol.</i> 87:11447-612013, 2013.</p> <p>➢ 他、HIV/SIVの複製、ウイルス蛋白質の構造・機能・進化、抗HIV分子の研究成果の論文計37報</p>		

1. 研究目的

HIV 感染症の制御は、国際社会の主要課題と位置づけられる。HIV は高度に変異性である。薬剤治療の有効性を確保し感染拡大を防ぐには、新たな HIV 制御法の開発が重要な課題となる。HIV-1 Gag 蛋白質は、感染性ウイルス粒子の形成やウイルスの複製において広く重要な機能を担う。もしウイルスの生活環を維持するために必然的に変化しにくい Gag 部位があれば、耐性が発現しにくい感染予防・治療標的の候補となる。しかし、実験のみではこのような標的部位の解明に時間がかかる。

近年、生体分子の振る舞いをコンピュータにより近似する技術が急速に進歩している。2013 年度のノーベル化学賞はこの分子シミュレーションの先駆者が受賞したことからも、科学の進展における計算科学の重要性が強調された。我々は約 10 年前にこの技術に着目し、解析基盤を整備して蛋白質の構造解析に応用して来た。蛋白質の構造特性の情報を入手することで、機能発現と制御の理解が進み、ひいてはウイルスの性質の理解が分子レベルで進む。我々は、ウイルス学研究と連携して、計算科学がウイルスの複製、薬剤耐性、免疫逃避、宿主指向性などのしくみ、および変異に伴うウイルスの性質変化の解析に極めて有用であることを立証してきた。さらに、創薬を念頭に置いた分子解析ツールも急速に拡充しており、計算科学の活用は創薬標的を論理的に絞り込む 'Structure-Based Drug Design (SBDD)' に不可欠の技術となっている。

一方、SBDD の出発点として用いる立体構造の不確かさ（機能構造を反映するか否かの不確かさ）を勘案すれば、計算科学のみで創薬標的を絞り込むことには大きな危険がある。X 線結晶構造解析等で得られる構造は、あくまで細胞外の特殊な環境でとりうる歪んだ構造であり、蛋白質が生理的環境下で働くときの機能構造である保証は無い。また、Gag の本質的な機能は、生きた細胞が作り出す細胞内環境で発揮される。しかし、生細胞内で Gag が機能する時と場、機能的相互作用

に伴う Gag の構造動態、あるいは機能発現を制御する要因について詳細に解析することは現在でも難しい。したがって、現在でも感染細胞における Gag の本質的な機能と機能構造は不明な点が多い。

そこで本研究では、創薬標的をより論理的に絞り込むために、HIV-1 の複製研究と SBDD を一つの研究組織で行う。さらに、創薬標的を無作為に同定し、HIV 複製研究と創薬に還元する戦略を進める。この双方向性の研究により、HIV Gag の機能複合体を標的とする創薬に必要な基礎情報の収集をめざす。本研究は、実験に計算科学や情報科学の手法を取り入れた学際的アプローチを用いて新しいウイルス学研究と HIV 制御法開発の土台を構築する基礎研究と位置づけられる。先進性・独創性が高く、学術的、社会的、国際的な意義は大きい。

2. 研究方法

異なる解析アプローチをとる三つの研究の柱を設定し、3 年計画で Gag の弱点を探索・選別し、創薬シード同定やワクチン抗原設計の土台をつくる。H25 年度は、解析系の構築と弱点の予備的探索を行う。H26 年度は、初年度の研究を継続して Gag の機能構造と変化能の新知見を収集し、弱点探索を続ける。また、班員の共同研究を推進して新たな発見の確率を高める。H27 年度は、Gag の有力な弱点候補を選別し、創薬シード同定の土台をつくる。研究協力者として、蛋白質の *in silico* 構造解析を専門とする横山勝博士（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター）に協力を仰ぐ。

【役割分担】

柱 1 . Gag 蛋白質の機能構造と変化能の研究
分子シミュレーション、情報エントロピー解析、数学理論、変異導入解析などを併用することで、機能構造維持のために必然的に変わらない分子表面構造を探索する（佐藤、野間口）。

柱 2 . HIV の複製研究

細胞内の Gag の局在、動態、構造、相互作用を解析する新しい実験系を立ち上げ、Gag の本質

的な機能と機能発現に必要な要因を調べ、HIVの感染力と複製能維持のために必然的に変わらない部位を探索する(塩田、蝦名、増田、間、梁、櫻木)

柱3 . 抗HIV化合物研究

細胞内に浸潤可能なGagペプチド誘導体等を設計・合成し、生物活性と作用機序を解析することにより、Gagの弱点部位を探る(玉村、村上)。

(倫理面への配慮)

本研究は、遺伝子組換え生物等を用いる実験を行う。該当する研究については、所属実験機関の承認を得て、「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」を遵守して行なっている。

3 . 研究結果

柱1 . Gag 蛋白質の機能構造と変化能の研究 :

- 1) MOEのSBDD用ツールとShannon情報エントロピーを用いて蛋白質表面の構造特性と多様性を解析し、Gag CA蛋白質の多量体界面に保存度の高い結合ポケットを見出した(佐藤)。
- 2) 変異導入解析により、 β -hairpin, helix3, helix 4, helix 7のそれぞれに、HIV-1の増殖能を維持するために保存されるアミノ酸残基(Q13, Q50Y, K70, R82, I135)が存在することを見出した(野間口)。

柱2 . HIVの複製研究 :

- 1) HIVコアの細胞内での脱殻過程を追跡する *in situ* uncoating assayをつくり、カニクイザル細胞での増殖能を獲得した改変HIV-1のヒト細胞での増殖能低下は、脱殻速度に低下に起因する可能性を示唆した(塩田)。
- 2) HIV-1インテグラーゼの dimmer-dimer インターフェースにおけるNTD-CCDドメイン間相互作用に必須のアミノ酸残基を同定し、当該相互作用が感染性ウイルス粒子コアの形成/維持に関わる可能性を示唆した(増田)。
- 3) 細胞のキナーゼaPKCがHIV-1 Gag の487番目のセリンをリン酸化することを見出し、このリン酸化はVprのウイルス粒子内への取り込みを促

進させることで、マクロファージにおけるウイルスの感染性の増強に寄与することを示した(梁)。

- 4) miniSOG標識Gagを用いてGagの局在を解析するライブイメージング系の構築を進め、シグナルが微弱で改善の余地はあるものの、ウイルスゲノムRNAとGag前駆体の共局在の場合(細胞質~細胞膜付近)を検出した(蝦名)。
- 5) Gag依存的なゲノムパッケージングを解析し、ゲノム二量体化開始点に未報告の機能構造が存在する可能性を見いだした(櫻木)。

柱3 . 抗 HIV 化合物研究 :

- 1) HIV-1 Gag CA 全域をカバーするペプチドライブラリーと Cyp A binding loop 環状ペプチド誘導体を化学合成し、新たな細胞内導入法を見出した(玉村)。
- 2) HIV-1 Gag MA 部分ペプチドの抗 HIV 作用の作用点はウイルスの CD4 結合後膜融合に至る過程であることを示唆した(村上)。
- 3) Vpr と Gag p6 の相互作用を標的とする阻害剤候補を探索する ELISA binding 法を構築し、構造多様性を考慮した 9600 個の化合物を入手した(間)。

班員の共同研究 :

- 1) HIV-1 宿主域の変化における Gag の役割を structure-guided mutagenesis などにより解析し、HIV-1 CA 蛋白質の特定のアミノ酸変異(M94L/R98S/ Q110D/G114Q)がマカクザル細胞におけるウイルス増殖を顕著に促進することを見出した(野間口、塩田、梁、佐藤)。
- 2) 実験と分子シミュレーションにより、HIV-1 CA の Ser487 のリン酸化が Vpr との相互作用を制御することを示した(梁、佐藤)。
- 3) 抗 HIV-1 活性をもつ HIV-1 CA 部分ペプチドを複数見出し、それらの作用点異なることを示唆した(玉村、村上)。

4 . 考察

柱1 . Gag 蛋白質の機能構造と変化能の研究 :

Gag の創薬標的を論理的に絞り込むためには、

Gag 蛋白質の機能構造と変化能の情報が不可欠である。しかし、「1. 研究目的」で述べたように、蛋白質の機能構造の特定は、一般には難しい。Gag については種々の立体構造が報告されているが、どの構造が機能をよく反映して SBDD に使えるのかを慎重に検討する必要がある。感染性粒子の形成には Gag 間の適切な相互作用が必須である。この機能的相互作用を体現する構造の一つがウイルス粒子のコア構造である。最近、クライオ電子顕微鏡法により HIV-1 subtype B のコア構造が解明された (PDB:3J3Q, Nature 497:643-646, 2013)。現在までに報告されている CA 構造の中で、機能構造を最もよく反映する構造と言える。そこで本研究では、このコア構造を基に結合ポケットを探索した。その結果、低分子化合物が結合しうるポケットが多数同定された。このうち CA 多量体界面の結合ポケットに着目して研究を進めることとした。このポケットは、正常なコア形成を反映して形成される可能性が高い。また、ポケットを形成するアミノ酸残基は、株間で比較的保存されている。そこで H26 年度は、計算科学と実験により CA 多量体界面のポケットが創薬の標的となるかを検証する予定でいる。

HIV CA の弱点を探索する際、CA の致死変異の情報が重要な手がかりを提供する可能性がある。本研究で、ヒト細胞における HIV-1 増殖能を著しく低下させる変異が CA 領域に新たに 4 種見つけた (野間口)。これらの部位は、HIV-1 group M でよく保存されていることもわかった。興味深いことに、SIV CA の対応するアミノ酸は HIV-1 の相対するものとは異なることもわかった。以上の点から、今回見出された部位は、HIV-1 の生活環を維持して行く上で、まだ知られていない重要な役割を担う部位かもしれない。今後は、実験と構造解析により、この部位の役割を検証して行く予定でいる。

柱 2 . HIV の複製研究 :

Gag の創薬標的を論理的に絞り込むためには、HIV の複製機構の理解が不可欠である。複製研究により Gag の重要な機能の情報が得られ、標的と

すべき機能を論理的に絞り込むことができる。しかし、「1. 研究目的」で述べたように、生細胞における Gag の本質的な機能の特定は、一般には難しい。最大の原因は、生細胞における Gag の挙動 (局在や構造の動態、機能的相互作用) を精密に追跡する系の欠如にある。そこで本研究では、Gag の細胞内での挙動を解析する新しい系の構築を進めた (塩田、蝦名)。現在、感染初期におけるコア脱殻過程、あるいは感染後期における Gag 前駆体とウイルスゲノム RNA の動態を詳細に解析する系ができつつある。解析系が完成すれば、HIV 複製中の機能複合体 (コアや Gag/ウイルスゲノム RNA 複合体) の細胞内局在と動態、および影響因子を解析する。HIV 複製機構の black box の解明に非常に重要な役割を果たすことが期待される。

本研究では、8 名の研究者が手分けして HIV 複製の前期と後期過程を解析している。いずれの研究も解析系、あるいは着眼点に独創的な点を持ち、複製研究に独自の道を切り開いている。今後も個々の班員の独自研究を進展させることで、HIV の複製機構の black box の解明に寄与することが期待される。その際、進展の内容によっては、コア脱殻の制御、あるいは Gag 前駆体とウイルスゲノム RNA の相互作用の制御との関わりが生じる可能性が十分にある。そこで、H26 年度は、個々の班員の研究を進展させるとともに、適宜、塩田博士、蝦名博士との共同研究を計画し、必要に応じて *in situ* uncoating assay 系、および Gag ライプライミング系による解析を取り入れる。これにより、新しい系の検証・改良と応用を効率的に進めたい。

柱 3 . 抗 HIV 化合物研究 :

「1. 研究目的」で述べたように、SBDD に用いる構造の不確かさ (機能構造を反映するかどうかの不確かさ) を勘案すれば、従来からあるリード化合物の同定手法、すなわち構造情報に依存せず無作為に抗 HIV 阻害因子を探索する手法は、依然として非常に有力な手法である。その際、Gag 蛋白質の細胞膜透過性部分ペプチドのライブラ

リーを探索すれば、拮抗阻害が期待される。そこで本研究では、HIV-1 Gag CA と MA の全域をカバーする部分ペプチドライブラリーを化学合成し、octa-Arg 配列を付加して膜透過性を付与した後、抗 HIV 活性を調べた。その結果、抗 HIV-1 活性をもつ複数の Gag 部分ペプチドを見出した。今後の研究で作用点の特異性と低細胞毒性が確認されれば、ウイルスの複製研究や創薬への応用が期待される。

5. 自己評価

1) 達成度について

本研究の開始にあたっては、事前評価のコメント（改善すべき点：ウイルス学研究としてレベルの高いものを申請してほしい、具体的なゴールを設定すべき）を考慮して目的と計画を練り直した。結果の項に示す通り、研究は、計画に沿って順調に進んでいる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

本研究では、HIV Gag蛋白質と結合因子について創薬に必要な基礎情報を収集する。その過程で得られるGag蛋白質の構造、機能、変化能の知見は、ウイルスの複製と進化の理解を深める。ウイルス学の進展における学術的意義がある。さらに、HIVの弱点探索の基盤情報となり、創薬シードやワクチン抗原の論理的設計や同定につながる。本研究の成果が新たな抗HIV薬やワクチン抗原の開発に結びつけば、HIV感染者の治療やHIV感染拡大阻止に貢献する。厚生労働行政的、社会的、国際的意義も大きいと考えられる。

3) 今後の展望について

H26年度は、個々の班員の独創的な研究を進展させるとともに、班員間や柱間の共同研究を推進して新たな発見の確率を高める。

柱1、2、3の共同研究：

1) HIV-1 コアの CA 多量体界面に見出された保存

性結合ポケットが創薬の標的となるかを検証する。変異導入解析等を通じてポケットの破壊がもたらす効果を調べる。コンピュータを用いて結合分子を設計し、化学合成し、抗 HIV 活性を調べる。

2) HIV 複製研究に携わり、Gag 変異ウイルスを所有する班員や宿主因子を研究する班員について、適宜、HIV コアの *in situ* uncoating assay と Gag ライブイメージング系を用いた共同研究を進め、細胞内 Gag の機能複合体の動態と制御について新知見を蓄積する。

6. 結論

HIV の弱点同定のために HIV の複製研究と Structure-Based Drug Design (SBDD) を進め、(i) Gag CA 多量体界面の保存された結合ポケットを見出した、(ii) Gag CA の致死変異を同定した、(iii) HIV 複製中の機能複合体(コアや Gag/ウイルスゲノム RNA 複合体)の細胞内局在と動態を解析する新システムの構築が進んだ、(iv) HIV 複製機構の新知見を蓄積した、(v) 細胞膜透過性 Gag ペプチドのライブラリーを作製し、Gag MA と CA の部分ペプチドが抗 HIV 活性をもつことを見出した。次年度は、個々の成果を発展させながら連携し、細胞における Gag の役割と機能構造の理解を深める。その延長で HIV 感染の予防・治療標的となる弱点を絞り込む。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

HIV立体構造認識抗体誘導ペプチド（特願2011-082813）、CXCR4多量体を認識する多価型CXCR4リガンド、及びその合成方法（特願2009-159771）、HIV立体構造認識抗体誘導ペプチド抗原、及びその合成方法（特願2009-120352）、HIV立体構造認識抗体誘導ペプチド抗原、及びその合成方法（特願2009-120352）、標的物質の検出方法、並びに、これに用いるタグ、DNA、ベクター、プローブ及び検出キット（特願2009-509091）

論文発表

: Gag 蛋白質とその結合因子の解析、* : 班員の共同研究

HIV/SIV の複製研究、ウイルス蛋白質の構造・機能・進化研究、抗 HIV 分子の研究の論文を抜粋

研究代表者

佐藤裕徳

- 1) 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, Sacha J. Tertiary mutations stabilize CD8+ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol*. [Epub ahead of print] PMID: 24371068
- 2) * 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*. [Epub ahead of print] PMID:24478432
- 3) * 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. PMID:24447338
- 4) Motozono C, Yokoyama M, Sato H, Ueno T. Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths. *Microbes Infect*. S1286-4579(13)00266-9, 2013. PMID:24380790
- 5) Koyama T, Arias JF, Iwabu Y, Yokoyama M, Fujita H, Sato H, Tokunaga K. APOBEC3G Oligomerization is associated with the inhibition of both Alu and LINE-1 retrotransposition. *PLoS One*. 2013 Dec 19;8(12):e84228. PMID:24367644
- 6) * Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *J Virol*. 87(21):11447-61, 2013. PMID:23966385
- 7) Sato H, Yokoyama M, Toh H. Genomics and computational science for virus research. *Front Microbiol*. 4:42,2013. PMID:23472060
- 8) Tsuchiya K, Ode H, Hayashida T, Kakizawa J, Sato H, Oka S, Gatanaga H. Arginine insertion and loss of N-linked glycosylation site in HIV-1 envelope V3 region confer CXCR4-tropism. *Sci Rep*. 2013 Aug 8;3:2389. doi: 10.1038/srep02389. PMID:23925152
- 9) Yuan Y, Yokoyama M, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato H, and Yusa K. Structure and dynamics of the gp120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1JR-FL to maraviroc. *PLoS One*. Jun 28;8(6):e65115, 2013. PMID:23840315
- 10) * Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama E, Akari H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol*. 94(Pt 6):1318-24, 2013. PMID:23486671
- 11) Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov I, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Conformational epitope consisting of the V3 and V4 loops as a target for potent and broad neutralization of simian immunodeficiency viruses. *J Virol*. 87(10):5424-36, 2013. PMID:23468483
- 12) * Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, Adachi A. Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes Infect*. 15(4):319-28, 2013. PMID:23384722
- 13) * Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. (NM and YM equally contributed to this work). *Microbes Infect* 15:56-65, 2013. PMID:23123544
- 14) Kamiyama H, Kakoki K, Shigematsu S, Izumida M, Yashima Y, Tanaka Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N, Sano T, Shidoji Y, Kubo Y. CXCR4-tropic, but not CCR5-tropic, human immunodeficiency virus infection is inhibited by the lipid raft-associated factors, acyclic retinoid analogs, and cholera toxin B subunit. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 29:279-88, 2013. PMID:22845664

研究分担者

塩田達雄

- 1) Taya K, Nakayama EE, Shioda T. Moderate restriction of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. 2014 Accepted.
- 2) *Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Miyakawa, K., Ryo, A., Ode, H., Iwatani, Y., Miura, T., Igarashi, T., Sato, H., and Adachi, A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HI-1 restriction factors. *J Virol. Nov* ; 87(21):11447-11461, 2013.
- 3) Kono, K., Takeda, E., Tsutsui, H., Kuroishi, A., Hulme, A.E., Hope, T.J., Nakayama, E.E., and Shioda, T. Slower Uncoating Is Associated with Impaired Replicative Capability of Simian-Tropic HIV-1. *PLoS One. Aug* 13;8(8): e72531, 2013.
- 4) *Saito, A., Nomaguchi, M., Kono, K., Iwatani, Y., Yokoyama, M., Yasutomi, Y., Sato, H., Shioda, T., Sugiura, W., Matano, T., Adachi, A., Nakayama, E., and Akari, H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol.* ;94(Pt 6):1318-24, 2013.
- 5) *Nomaguchi, M., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Nakayama, E.E., Shioda, T., Yokoyama, M., Sato, H., and Adachi, A. Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes Infect.* ;15(4):319-28, 2013.
- 6) Nakayama, E.E., Nakajima, T., Kaur, G., Mimaya, J.I., Terunuma, H., Mehra, N., Kimura, A., Shioda, T. A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5 α linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses. Jun*; 29(6):919-24, 2013.
- 7) *Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes Infect.* ;15(1):56-65, 2013.

野間口雅子

- 1) *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.*, in press.
- 2) Miyake A, Miyazaki Y, Fujita M, Nomaguchi M, Adachi A. Role of poly-proline motif in HIV-2 Vpx expression. *Front Microbiol.* 25:24, 2014.
- 3) Miyake A, Fujita M, Fujino H, Koga R, Kawamura S, Otsuka M, Ode H, Iwatani Y, Sakai Y, Doi N, Nomaguchi M, Adachi A, Miyazaki Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. *J Gen Virol.* 95:179-189, 2014.
- 4) *Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Miyakawa, K., Ryo, A., Ode, H., Iwatani, Y., Miura, T., Igarashi, T., Sato, H., and Adachi, A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *Journal of Virology* 87: 11447-11461, 2013.
- 5) Doi N, Okubo A, Yamane M, Sakai Y, Adachi A, Nomaguchi M. Growth potentials of CCR5-tropic/CXCR4-tropic HIV-1mt clones in macaque cells. *Front Microbiol.* 4:218, 2013.
- 6) *Saito, A., Nomaguchi, M., Kono, K., Iwatani, Y., Yokoyama, M., Yasutomi, Y., Sato, H., Shioda, T., Sugiura, W., Matano, T., Adachi, A., Nakayama, E.E., and Akari, H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* 94: 1318-1324, 2013.
- 7) *Nomaguchi, M., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Nakayama, E.E., Shioda, T., Yokoyama, M., Sato, H., and Adachi, A. Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15: 319-328, 2013.
- 8) *Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15: 56-65, 2013.

増田貴夫

- 1) *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.* (in press)
- 2) Kinpara, S., Kijiyama, M., Takamori, A., Hasegawa, A., Sasada, A., Masuda, T., Tanaka, Y., Utsunomiya, A., and Kannagi, M. Interferon-alpha (IFN-alpha) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN-alpha combined with zidovudine induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells. *Retrovirology* 10: 52, 2013.

梁明秀

- 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.* In press, 2014
- 2) *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(1):In press, 2014

- 3) * Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A.; Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *J Virol*. 87(21):11447-61, 2013.

蝦名博貴

- 1) Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., Koyanagi, Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Scientific Reports*. 3: 2510, 2013.

櫻木淳一

- 1) Sho Sudo, Hiyori Haraguchi, Yoko Hirai, Hiroyuki Gatanaga, Jun-ichi Sakuragi, Fumitaka Momose, and Yuko Morikawa. Efavirenz enhances HIV-1 Gag processing at the plasma membrane through Gag-Pol dimerization. *J. Virol. March*; 87:6 3348-3360. doi:10.1128/JVI.02306-12, 2013.

岡陽子

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

玉村啓和

- 1) Narumi T, Takano H, Ohashi N, Suzuki A, Furuta T, Tamamura H. Isostere-Based Design of 8-Azacoumarin-type Photolabile Protecting Groups: A Hydrophilicity Increasing Strategy for Coumarin-4-ylmethyls. *Org. Lett.* in press.
- 2) Hashimoto C, Narumi T, Otsuki H, Hirota Y, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, Tamamura H. A CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitor: Pharmacokinetics. *Bioorg. Med. Chem.* 21(24): 7884–7889, 2013.
- 3) * Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Nakahara T, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. CXCR4-derived Synthetic Peptides Inducing Anti-HIV-1 Antibodies. *Bioorg. Med. Chem.* 21(22): 6878–6885, 2013.
- 4) Otsuki H, Hishiki T, Miura T, Hashimoto C, Narumi T, Tamamura H. Yoshimura K, Matsushita S, Igarashi T. Generation of a Replication-competent Simian–human Immunodeficiency Virus, the Neutralisation Sensitivity of Which can be Enhanced in the Presence of a Small Molecule CD4 Mimic. *J. Gen. Virol.* 94(12): 2710–2716, 2013.
- 5) * Nomura W, Aikawa H, Ohashi N, Urano E, Metifiot M, Fujino M, Maddali K, Ozaki T, Nozue A, Narumi T, Hashimoto C, Tanaka T, Pommier Y, Yamamoto N, Komano J, Murakami T, Tamamura H. Cell-Permeable Stapled Peptides Based on HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Product. *ACS Chem. Biol.* 8(10): 2235–2244, 2013.
- 6) * Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Tsutsumi H, Haseyama M, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. Anti-HIV-1 Peptide Derivatives Based on the HIV-1 Co-receptor CXCR4. *ChemMedChem* 8(10): 1668-1672, 2013.
- 7) * Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Ohashi N, Fujino M, Murakami T, Yamamoto N. Tamamura H. Multimerized CHR-derived Peptides as HIV-1 Fusion Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 21(15): 4452–4458, 2013.
- 8) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors: Lead Optimization Studies of the Aromatic Substituents. *Bioorg. Med. Chem.* 21(9): 2518–2526, 2013.
- 9) * Narumi T, Aikawa H, Tanaka T, Hashimoto C, Ohashi N, Nomura W, Kobayakawa T, Takano H, Hirota Y, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Low Molecular Weight CXCR4 Ligands with Variable Spacers. *ChemMedChem* 8(1): 118-124, 2013.
- 10) Ohashi N, Nomura W, Narumi T, Tamamura H. Peptide-based Ligand Screening and Functional Analysis of Protein Kinase C. *Biopolymers: Peptide Science* 100(6): 613-620, 2013.

村上努

- 1) * Hashimoto, C., Nomura, W., Narumi, T., Fujino, M., Nakahara, T., Yamamoto, N., Murakami, T., and Tamamura, H. CXCR4-derived synthetic peptides inducing anti-HIV-1 antibodies. *Bioorg Med Chem* 21(22): 6878-6885, 2013.
- 2) * Nomura, W., Aikawa, H., Ohashi, N., Urano, E., Métifiot, M., Fujino, M., Maddali, K., Ozaki, T., Nozue, A., Narumi, T., Hashimoto, C., Tanaka, T., Pommier, Y., Yamamoto, N., Komano, J., Murakami, T., and Tamamura, H. Cell-Permeable stapled peptides based on HIV-1 Integrase Inhibitors derived from HIV-1 gene products. *ACS Chemical Biology* 8(10): 2235-2244, 2013.
- 3) * Hashimoto, C., Nomura, W., Narumi, T., Fujino, M., Tsutsumi, H., Haseyama, M., Yamamoto, N., Murakami, T., and Tamamura, H. Anti-HIV-1 Peptide derivatives based on the HIV-1 co-receptor

- CXCR4. Chem Med Chem 8: 1668-1672, 2013.
- 4) *Nomura, W., Hashimoto, C., Suzuki, T., Ohashi, N., Fujino, M., Murakami, T., Yamamoto, N., and Tamamura H. Multimerized CHR-derived peptides as HIV-1 fusion inhibitors. Bioorg Med Chem 21(15): 4452-4458, 2013.
 - 5) Takemura, T., Kawamata, M., Urabe, M., and Murakami, T. Cyclophilin A-dependent restriction to capsid N121K mutant human immunodeficiency virus type 1 in a broad range of cell lines. J Virol 87(7): 4086-4090, 2013.
 - 6) Checkley, M.A., Luttge, B.G., Mercredi, Kyere, S.K., Donlan, J., Murakami, T., Summers, M.F., Cocklin, S., and Freed, E.O. Reevaluation of the requirement for TIP47 in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein incorporation. J Virol 87(6): 3561-3570, 2013.
 - 7) *Narumi, T., Aikawa, H., Tanaka, T., Hashimoto, C., Ohashi, N., Nomura, W., Kobayakawa, T., Takano, H., Hirota, Y., Murakami, T., Yamamoto, N., and Tamamura, H. Low-molecular-weight CXCR4 ligands with variable spacers. Chem Med Chem 8(1): 118-124, 2013.

研究課題：Gag の機能維持に必要な構造に関する研究

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）

研究協力者：横山 勝（同上）

研究要旨

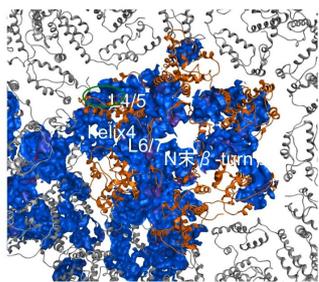
本研究では、HIV Gag 蛋白質を標的とする創薬やワクチン開発に必要な Gag の機能構造と変化能の情報を収集することを目的とする。主に計算科学と情報科学の手法を用いて解析し、適宜、実験を取り入れる。初年度は、(i) HIV-1 subtype B のコアの表面構造を解析し、CA 多量体界面に保存度の高い結合ポケットを見出した。(ii) また、班員と共同で CA 変異が HIV-1 の宿主域と CA の構造安定性に与える影響を調べ、サル指向性の獲得に直接関わる変異と CA 構造の安定化に寄与する 2 種類の変異が存在することを示唆した (Nomaguchi M et al., *J Virol.* PMID:23966385) (iii) さらに海外研究者と共同で、SIVmac239 の感染伝播動物モデルにおいて生じる CTL 逃避変異と補償変異を解析し、補償変異は CA 六量体内で近接して分子間相互作用に影響を与え、構造安定性の回復に寄与することで CTL 逃避ウイルスの適応度を向上させている可能性を示唆した (Burwitz B et al., *J Virol.* PMID:23966385)。以上の研究により、Gag CA 蛋白質を標的として Structure-Based Drug Design (SBDD) を実施するために必要な CA の構造情報を取得し、解析技術基盤を整備した。

初年度研究の主な成果

【目的】 Gagを標的とする創薬やワクチン開発に必要なGagの機能構造と変化能の情報を収集する

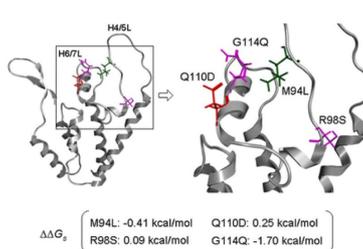
【方法】 計算科学と情報科学の手法を用いる 適宜、実験を取り入れる

図1. HIV-1 コアの表面構造の解析



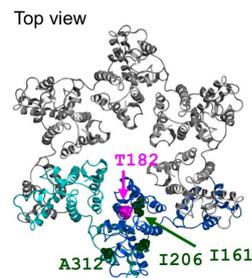
Gag CA 多量体界面に保存されるリガンド結合ポケットが存在する

図2. HIV-1 CA の構造安定性の解析



HIV-1 の宿主指向性の変化に寄与するCA変異には、サル指向性の獲得に直接関わる変異とCA構造の安定化に寄与する2種類の変異が存在する (*J Virol.* PMID:23966385)

図3. SIVmac239 CA六量体の分子内相互作用の解析



感染伝播動物モデルにおいて生じたCTL逃避変異T182Aと補償変異I161V, I206V, A312PはCA六量体内で近接する補償変異は、CA安定化に影響する可能性が高い(*J Virol.* PMID:23966385)

論文発表

➢HIV/SIVの複製、ウイルス蛋白質の構造・機能・進化の研究成果の共同研究論文計14報

A. 研究目的

HIV感染症の制御は、国際社会の主要課題と位置づけられる。HIVは高度に変異性である。薬剤治療の有効性を確保し感染拡大を防ぐには、新たなHIV制御法の開発が重要な課題となる。HIV-1 Gag蛋白質は、感染性ウイルス粒子の形成やウイルスの複製において広く重要な機能を担う。もしウイルスの生活環を維持するために必然的に変化しにくいGag部位があれば、耐性が発現しにくい感染予防・治療標的の候補となる。しかし、実験のみではこのような標的部位の解明に時間がかかる。

近年、生体分子の振る舞いをコンピュータにより近似する技術が急速に進歩している。2013年度のノーベル化学賞はこの分子シミュレーションの先駆者が受賞したことから、科学の進展における計算科学の重要性が強調された。我々は約10年前にこの技術に着目し、解析基盤を整備して蛋白質の構造解析に応用して来た。蛋白質の構造特性の情報を入手することで、機能発現と制御の理解が進み、ひいてはウイルスの性質の理解が分子レベルで進む。さらに、近年は創薬を念頭に置いた分子解析ツールも急速に拡充しており、計算科学の活用は創薬標的を論理的に絞り込む‘Structure-Based Drug Design (SBDD)’に不可欠の技術となっている。

一方、SBDDの出発点として用いる立体構造の不確かさ(機能構造を反映するか否かの不確かさ)を勘案すれば、計算科学のみで創薬標的を絞り込むことには大きな危険がある。X線結晶構造解析等で得られる構造は、あくまで細胞外の特殊な環境でとりうる歪んだ構造であり、蛋白質が生理的環境下で働くときの機能構造である保証は無い。Gagについても種々の構造が報告されているが、どの構造を基にSBDDを進めるのかを慎重に検討する必要がある。そこで本研究では、まず、PDBに登録されている立体構造情報が機能構造を反映しているかを吟味し、次いで計算科学の手法を用いてGag蛋白質を標的としたSBDDの実施に必要な基礎情報を収集することとした。また並行して、班員と連携によりGag蛋白質の構造特性とウイルスの性質を解析し、SBDDを実施する基礎情報を整備することとした。

B. 研究方法

1) HIV-1 コアのリガンド結合ポケットの探索: クライオ電子顕微鏡法により得られたHIV-1 subtype Bのコアの3次元情報(PDB:3J3Q. *Nature* 497:643-646, 2013)をポケット探索に用いた。

Molecular Operating Environment (MOE : <http://www.chemcomp.com/>)に搭載されているSBDD用ツールを用いて蛋白質表面のもつ特性を解析し、リガンド結合ポケットを同定した。

2) 多様性解析: HIV-1 subtype BのCA蛋白質アミノ酸配列は、Los Alamos HIV Sequence Database (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>)より入手した。配列アライメントは multiple alignment program MAFFT(<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>)を用いた。個々のアミノ酸残基の多様性の定量的な比較は、Shannonの情報エントロピーを指標とした (Motomura K. et al., *J Virol.* 82:11247-62, 2008)。

3) 分子モデリング: HIV-1 CA 蛋白質のNTD領域の立体構造モデル、およびSIVmac239 CA 六量体モデルは、ホモロジーモデリング法を用いて構築した。モデリングは、MOEに搭載されている蛋白質立体構造解析用ツール‘MOE-Align’と‘MOE-Homology’を用いた。HIV-1 CA NTD モデリングの鋳型には、解像度2.00 ÅのNTD構造(PDB accession 番号: 1M9C) (*Nat.Struct.Biol.* 10: 475-481, 2003)を用いた。SIVmac239 CA 六量体モデルは、我々が報告した方法(*Retrovirology.* 7:90, 2010)に従って構築した。

4) 構造安定性の解析: 蛋白質の変異による構造安定性の変化は、MOEに搭載されている蛋白質工学用ツール‘Protein Design Application’を用いて解析した。蛋白質の特定のアミノ酸を置換し、とりうる構造をMOEのLowMode MD moduleを用いて網羅的に構築し、ボルツマン分布を用いて自由エネルギーの平均値を求め、変異前のアミノ酸残基の自由エネルギーとの差($\Delta\Delta G$: kcal/mol)を計算した。 $\Delta\Delta G$ を構造安定性の変化の指標とした。

(倫理面への配慮)

該当する事項は無い。

C. 研究結果

1) HIV-1 コアの表面構造の解析(図1)

クライオ電子顕微鏡法により得られたHIV-1 subtype Bのコアの3次元情報を基に、MOEを用いてリガンド結合ポケットを包括的に探索した。その結果、コア表面には多数の結合ポケットが存在することがわかった。特にCA蛋白質多量体界面に位置する複数の結合ポケットに着目して解析を進めた。個々のアミノ酸残基の多様性を情報エントロピーにより定量化したところ、保存度の高いポケットが存在することがわかった。

2) HIV-1 Gag CAの構造安定性の解析 (図2)

野間口研究分担者らは、横山博士らと協力しながらサル指向性増強するHIV-1 CA変異 (M94L/R98S/Q110D/G114Q) を同定した。これらの変異がCAの構造安定性に与える影響について自由エネルギー変化 $\Delta\Delta G$ を指標として調べた。その結果、R98SとQ110Dの $\Delta\Delta G$ 値はプラスとなり、構造安定性低下の不利益をもたらすことがわかった。これらの変異はサル細胞で増殖する際にこの不利益を凌ぐ優位性を付与する、すなわちサル指向性の獲得に直接関わると推察された。一方、M94LとG114Qの $\Delta\Delta G$ 値はマイナスとなり、サル指向性への変化により不安定化したCAを安定化する補償変異と推察された。この推察は、実験結果を良く説明した (Nomaguchi M et al., *J Virol.* 87:11447-612013, 2013., Nomaguchi M et al., *Microbes Infect* 15:56-65, 2013)。

3) SIVmac239 CA六量体の分子内相互作用の解析 (図3)

海外研究者と共同で、SIVmac239の感染伝播動物モデルにおいて生じるCTL逃避変異と補償変異の種類と立体配置を解析した。CTL逃避変異が生じるT182部位と補償変異が生じるI161, I206, A312部位は、六量体形成時に近接することがわかった。これらの補償変異はCA六量体の分子間相互作用に影響を与え、構造安定性の回復に寄与することでCTL逃避ウイルスの適応度を向上させていると推察された。この推察は、実験結果を良く説明した (Burwitz B et al., *J Virol.* in press PMID:23966385)。

D. 考察

1) HIV-1 コアの結合ポケットの同定

Gagについては種々の構造が報告されているが、どの構造を基にSBDDを進めるのかを慎重に検討する必要がある。感染性粒子の形成にはGag間の適切な相互作用が必須である。この機能的相互作用を体現する構造の一つがウイルス粒子のコア構造である。最近、クライオ電子顕微鏡法によりHIV-1 subtype Bのコア構造が解明された (Nature. 2012 487:385-9)。このコアの部品となっているCAの構造は、現在までに報告されているCA構造の中で、最も機能構造を反映する構造と言える。そこで本研究では、このコア構造を基に結合ポケットを探索した。その結果、低分子化合物が結合しうるポケットが多数同定された。このうちCA多量体界面の結合ポケットに着目して研究を進めることとした。ポケットを形成するアミノ酸残基は、株間で比較的保存されていることがわかった。このポケットは、正常なコア形成を反映して形成される可能性が高い。そこで今後は、計算科学と実

験により、このポケットが創薬の標的となるかを検証する予定でいる。

2), 3) HIV-1 CAの構造安定性・分子内相互作用の解析

HIV CAの弱点を探索する際、構造の不安定化をもたらす部位の探索が役立つ可能性がある。本年度の研究で用いた手法は、蛋白質改変を目的として開発された技術で、確認可能なサンプルでは実験値をよく反映することが報告されている。本研究においても実験結果と矛盾しない結果が得られた。今後、この技術をHIV CAの弱点を探索に取り入れていきたい。

E. 結論

(i) HIV-1 subtype Bのコアの表面構造を解析し、CA多量体界面に保存度の高い結合ポケットを見出した。(ii) 班員と共同でCA変異がHIV-1の宿主域とCAの構造安定性に与える影響を調べ、サル指向性の獲得に直接関わる変異とCA構造の安定化に寄与する2種類の変異が存在することを示唆した。(iii) 海外研究者と共同で、SIVmac239の感染伝播動物モデルにおいて生じるCTL逃避変異と補償変異を解析し、補償変異はCA六量体内で近接して分子間相互作用に影響を与え、構造安定性の回復に寄与することでCTL逃避ウイルスの適応度を向上させている可能性を示唆した。以上の研究により、Gag CA蛋白質を標的としてStructure-Based Drug Design (SBDD)を実施するために必要なCAの構造情報を取得し、解析技術基盤を整備した。

F. 知的所有権の取得状況

該当事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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, Sacha J. Tertiary mutations stabilize CD8+ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol.* [Epub ahead of print] PMID: 24371068

2) 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.* [Epub ahead of print] PMID:24478432

3) 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. PMID:24447338

4) Motozono C, Yokoyama M, Sato H, Ueno T. Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths. *Microbes Infect*. S1286-4579(13)00266-9, 2013. PMID:24380790

5) Koyama T, Arias JF, Iwabu Y, Yokoyama M, Fujita H, Sato H, Tokunaga K. APOBEC3G Oligomerization Is Associated with the Inhibition of Both Alu and LINE-1 Retrotransposition. *PLoS One*. 2013 Dec 19;8(12):e84228. PMID:24367644

6) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *J Virol*. 87(21):11447-612013, 2013. PMID:23966385

7) Sato H, Yokoyama M, Toh H. Genomics and computational science for virus research. *Front Microbiol*. 4:42,2013. PMID:23472060

8) Tsuchiya K, Ode H, Hayashida T, Kakizawa J, Sato H, Oka S, Gatanaga H. Arginine insertion and loss of N-linked glycosylation site in HIV-1 envelope V3 region confer CXCR4-tropism. *Sci Rep*. 2013 Aug 8;3:2389. doi: 10.1038/srep02389. PMID:23925152

9) Yuan Y, Yokoyama M, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato H, and Yusa K. Structure and dynamics of the gp120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1JR-FL to maraviroc. *PLoS One*. Jun 28;8(6):e65115, 2013. PMID:23840315

10) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama E, Akari H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol*. 94(Pt 6):1318-24, 2013. PMID:23486671

11) Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov I, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Conformational epitope consisting of the V3 and V4 loops as a target for potent and broad neutralization of simian immunodeficiency viruses. *J Virol*. 87(10):5424-36, 2013. PMID:23468483

12) Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, Adachi A. Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred

during replication in macaque cells. *Microbes Infect*. 15(4):319-28, 2013. PMID:23384722

13) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. (NM and YM equally contributed to this work). *Microbes Infect* 15:56-65, 2013. PMID:23123544

14) Kamiyama H, Kakoki K, Shigematsu S, Izumida M, Yashima Y, Tanaka Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N, Sano T, Shidoji Y, Kubo Y. CXCR4-tropic, but not CCR5-tropic, human immunodeficiency virus infection is inhibited by the lipid raft-associated factors, acyclic retinoid analogs, and cholera toxin B subunit. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 29:279-88, 2013. PMID:22845664

2. 学会発表等

1) Koyama T, Arias JF, Iwabu Y, Yokoyama M, Fujita H, Sato H, and Tokunaga K. APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of Alu and LINE-1 retrotransposition. Keystone Symposia: Mobile Genetic Elements and Genome Evolution, March 9-14, 2014, Santa Fe, New Mexico, USA.

2) Kubo Y, Shigematsu S, Kamiyama H, Izumida M, Yashima Y, Hayashi H, Sato H, Yamamoto N, Matsuyama T. Identification of a novel interferon-stimulated gene whose product significantly restricts HIV-1 replication. **Cold Spring Harbor Meeting**, May 20-25, 2013, NY USA.

3) 久保嘉直、神山陽香、泉田真衣、田中勇悦、安井潔、佐藤裕徳、山本直樹、松山俊文、林日出喜。インターフェロン γ 誘導因子GILTによるHIV粒子産生抑制機構の解明。第61回日本ウイルス学会学術集会。2013年11月10-12日(火-木) 神戸。

4) 野間口雅子、三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、宮崎恭行、横田恭子、横山勝、佐藤裕徳、増田貴夫、足立昭夫。HIV-1 pol (4895-4933) の1塩基置換によるウイルス複製制御機構の解析。第61回日本ウイルス学会学術集会。2013年11月10-12日(火-木) 神戸。

5) Juan F Arias、小山貴芳、横山勝、佐藤裕徳、徳永研三。APOBEC3Gの二量体化はLINE-1転移抑制に重要である。第61回日本ウイルス学会学術集会。2013年11月10-12日(火-木) 神戸。

6) 横山勝、佐藤裕徳。V1/V2によるHIV-1 gp120のゆらぎに与える影響。第36回日本分子生物学会年会、2014年12月3日~6日(火-金) 神戸。

研究課題：HIV Gag の致死の変異の解析

研究分担者：野間口 雅子（徳島大学大学院ヘルスパイオサイエンス研究部 准教授）

研究要旨

HIV-1 Gag-capsid (CA) の機能・構造の維持は、ウイルス複製にとって決定的に重要である。Gag-CA の機能・構造維持に関わるアミノ酸部位の同定は、ウイルス複製を制御するための標的の選定に役立つ。一方、HIV-1 はヒト細胞・個体での増殖に適応・進化しており、極めて高い宿主指向性を示す。従って、HIV-1 と SIV の CA アミノ酸配列において、SIV CA とは異なる HIV-1 固有のアミノ酸部位・領域は、HIV-1 がヒト細胞での増殖に適応してきた結果であり進化的脆弱部位となり得る。本研究では、HIV/SIV CA アミノ酸配列比較を基に、HIV-1 固有のアミノ酸部位への変異導入（1 アミノ酸置換）を行いウイルス複製に及ぼす影響を解析した。その結果、ウイルス複製後期過程のみに悪影響を及ぼす変異（S149N）および、ウイルス複製前期過程を著しく阻害する致死変異（Q50Y、K70R、R82L、I135Q）を同定した。今後、これらの変異がウイルス複製素過程に及ぼす影響を詳細に解析することにより、これらの CA アミノ酸部位のウイルス複製における役割を明らかにし、HIV-1 の弱点および制御法の確立に寄与する知見を得る。

A. 研究目的

ウイルスの蛋白質は、宿主における複製に必須の機能・構造を有している。機能・構造維持に重要な部位や、これらの変異によるウイルス複製減弱化に関する知見は、HIV-1複製制御のための基盤情報となる。

HIV-1 Gag-capsid(CA)は、ウイルス複製や宿主指向性の決定に重要な役割を持つ。レンチウイルス間（HIVやSIV）において、CAによって形成されるウイルスコアの形態は円錐型/コーン型でよく似ているが、HIVやSIVの宿主指向性は大きく異なる。この要因の1つはCAのアミノ酸配列の違いにある。CAには、HIV/SIVでよく保存された領域と各ウイルス固有の配列を持つ領域とが存在する。HIV-1 CA固有の配列・領域は、HIV-1がヒト細胞で効率良く増殖するために適応してきた結果、必然的に獲得したものであり、進化的脆弱部位となり得る。本研究では、HIV/SIV CAのアミノ酸配列比較に基づき、HIV-1の致死変異を探索し、ウイルスの弱点部位に関する情報を収集することを目的とした。

B. 研究方法

1. HIV-1 CA変異体の構築：HIV/SIV CAの配列は、HIV sequence compendium 2013 (Los Alamos National Laboratory, <http://www.hiv.lanl.gov>)の情報を基に比較し、HIV-1 CA固有のアミノ酸をSIV型のアミノ酸に置換した。親株はHIV-1標準株であるNL4-3を用い、変異導入は、QuickChange site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies Inc.) により行った。導入された変異は、

BigDye terminator v1.1 cycle sequencing kit (Life Technologies Corporation) を用いて確認した。

2. ウイルス複製能 (Multi-cycle replication) の測定：ウイルスストックの調製は、ヒト293T細胞へのプロウイルスクロンのトランスフェクション(リン酸カルシウム法)により行った。ウイルス量は培養上清中の逆転写酵素 (RT) 活性あるいはp24 ELISAにより測定した。等量のウイルスをヒトリンパ球由来H9細胞に接種し、培養上清中のウイルス量の変化を経時的に調べた。
3. ウイルス感染価 (Single-cycle infectivity) の測定：等量のウイルスをTZM-bl細胞 (Tat発現によりルシフェラーゼを発現するレポーター細胞) に接種した。感染1日後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

(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

以前、我々はサル細胞・個体で効率良く増殖するサル指向性HIV-1を構築するための一環として、サルTRIM5 α (CAを標的とする内在性HIV-1複製抑制因子) に対して抵抗性を示すHIV-1 CAの作製に

取組んだ。HIV/SIV CAアミノ酸配列比較と *in silico*構造解析とを組み合わせ、CAへの変異導入解析を行った結果、サルTRIM5 α による複製抑制の回避に寄与するアミノ酸部位を同定することができた。このサルTRIM5 α 抵抗性HIV-1 CAの構築過程で、サル細胞でのウイルス増殖にとって致命的なCA変異(8ヶ所)を見出した。致命的変異は、CAの β -hairpin (L6P、Q13L)、ヘリックス3(Q50Y)、ヘリックス4 (K70R、R82L、L83Q)、ヘリックス7(I135Q)、およびインタードメインリンカー領域(S149N)に存在した。これらの変異がヒト細胞での増殖に及ぼす影響を調べるため、HIV-1標準株(NL4-3)にCA変異を導入し、H9細胞でのウイルス増殖特性を調べた(図1)。その結果、複製能が減弱するもの(L6P、L83Q、S149N)と複製が検出できないもの(Q13L、Q50Y、K70R、R82L、I135Q)があることが分かった。

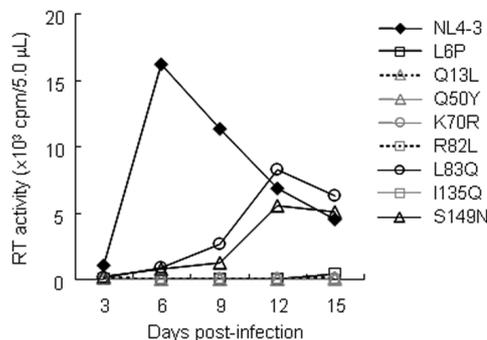


図1. HIV-1 (NL4-3) CA変異体のH9細胞での増殖特性。ウイルスストックは、293T細胞へのプロウイルスクローンのトランスフェクションにより調製した。等量のウイルス(10^4 RT units)を、H9細胞(10^5)に接種し、培養上清中のウイルス産生量をRTアッセイで測定した。

表1. CA変異体のウイルス産生量

変異	ウイルス	
	産生量 ¹	p24/RT ²
NL4-3(親株)	1.000±0.000	1.000±0.000
Q50Y	0.633±0.040	1.070±0.060
K70R	0.500±0.042	0.011±0.003
R82L	0.241±0.105	0.810±0.084
L83Q	0.329±0.232	0.953±0.230
I135Q	0.127±0.087	0.006±0.000
S149N	0.485±0.080	0.952±0.292

¹NL4-3のRT活性を1としてCA変異体のウイルス産生量を相対値で表した。

²NL4-3のRTに対するp24の比を1としてCA変異体のp24/RT値を相対値で表した。

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産生されるウイルス量をNL4-3およびCA変異体で比較した(表1)。CA変異体のウイルス産生量は、親株に比べていずれも低下していた。さらに、K70RおよびI135Qはウイルス粒子中のRT活性に対するp24量が親株に比べて著しく低く、コア形成に何らかの異常があることが示唆された。

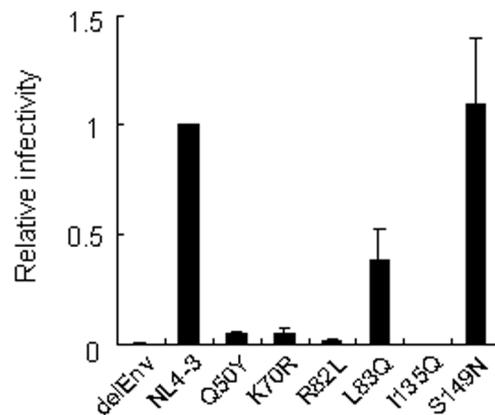


図2. HIV-1 (NL4-3) CA変異体のウイルス感染価。ウイルスは、293T細胞へのプロウイルスクローンのトランスフェクションにより調製した。等量のウイルス(2×10^4 RT units)をT2M-b1細胞(4×10^3)に接種後、細胞を回収しルシフェラーゼ活性を測定した。感染価は、NL4-3のルシフェラーゼ活性を1として、変異体の活性を相対値で表した。

次に、CA変異体の感染価をT2M-b1細胞で調べた(図2)。H9細胞において、ウイルス複製が検出不能な変異体(図1、Q50Y、K70R、R82L、I135Q)は、T2M-b1細胞での感染価も親株に比べて著しく低く、これらの変異は、複製前期過程に強く影響を及ぼすことが示唆された。K70RおよびI135Qは、親株に比べてウイルス粒子のp24/RT値が著しく低いことから(表1)、コア形成に何らかの異常があり、その結果、複製前期過程が阻害されているのではないかと推測された。これらの変異体(Q50Y、K70R、R82L、I135Q)については、電子顕微鏡による粒子の形態観察を試行中である。一方、H9細胞において、複製能が減弱する変異体(図1、L83Q、S149N)では、L83QはT2M-b1細胞において、親株の50%程度の感染価を持っていた。S149Nの感染価は親株と同程度であり、この変異が複製前期過程には何ら影響しないことを示した。H9細胞におけるS149Nの複製能低下は、複製後期過程への影響によるものと考えられた。

D. 考察

サル指向性HIV-1構築の過程で見出したCAの致死変異は、HIV-1のヒト細胞でのウイルス増殖においても抑制的に働いた。各CA変異のHIV-1 group Mにおける頻度を調べた(HIV-1 compendium 2013, 178 strains)。その結果、Q50(94%)、K70(100%)、R82(100%)、L83(64%)、I135(97%)、S149(98%)であり、これらのアミノ酸は保存性が高く、かつ、SIV CAの対応するアミノ酸とは異なることから、これらがHIV-1複製において重要な役割を担うかもしれないと考えられた。さらに、HIV/SIV CAアミノ酸配列比較により、HIV-1とSIVで異なるアミノ酸部位について、新たな変異体(16種)を構築しており、今後、複製能に及ぼす影響を検討していく。

HIV-1 CAのQ63A/67A二重変異体では、核移行過程が阻害されることが報告されている。今後、致死変異(Q50Y、K70R、R82L、L83Q、I135Q、S149N)について、ウイルス複製のどの素過程が阻害されているのかを詳細に解析していく必要がある。これにより、HIV-1 CAの機能・構造維持に關与するアミノ酸部位のウイルス複製における役割を明らかにする。

E. 結論

HIV/SIV CAのアミノ酸配列比較からHIV-1固有のアミノ酸部位を選択、SIV型のアミノ酸に置換することにより、HIV-1 CAの致死変異を同定することができた。HIV-1がヒト細胞・個体での増殖に適応してきたことを考えると、HIV-1固有のアミノ酸部位は進化的脆弱部位となり得ることが推測される。これらのアミノ酸部位の情報を集積し、ウイルス複製における役割を明らかにすることにより、今後、新しいHIV-1制御法の確立に発展することが期待される。

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., 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.*, in press.

2) Miyake A, Miyazaki Y, Fujita M, Nomaguchi M., Adachi A. Role of poly-proline motif in HIV-2 Vpx

expression. *Front Microbiol.* 25:24, 2014.

3) Miyake A, Fujita M, Fujino H, Koga R, Kawamura S, Otsuka M, Ode H, Iwatani Y, Sakai Y, Doi N, Nomaguchi M., Adachi A, Miyazaki Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. *J Gen Virol.* 95:179-189, 2014.

4) Nomaguchi M., Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *J Virol.* 87:11447-11461, 2013.

5) Doi N, Okubo A, Yamane M, Sakai Y, Adachi A, Nomaguchi M. Growth potentials of CCR5-tropic/CXCR4-tropic HIV-1mt clones in macaque cells. *Front Microbiol.* 4:218, 2013.

6) Saito A, Nomaguchi M., Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol.* 94:1318-1324, 2013.

7) Nomaguchi M., Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, Adachi A. Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes Infect.* 15:319-328, 2013.

2. 学会発表等

1)野間口雅子、三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、宮崎恭行、横田恭子、横山勝、佐藤裕徳、増田貴夫、足立昭夫：HIV-1 *pol*(4895-4933)の1塩基置換によるウイルス複製制御機構の解析．第61回日本ウイルス学会学術集会．2013年11月10-12日(日-火)、神戸．

2)宮崎恭行、三宅在子、野間口雅子、内山恒夫、足立昭夫：In vitro再構築系を用いたHIV-1/HIV-2 CAアセンブリーの安定性に関する解析．第61回日本ウイルス学会学術集会．2013年11月10-12日(日-火)、神戸．

3)足立昭夫、土肥直哉、藤原佐知、野間口雅子：アカゲザルPBMCで効率良く増殖するHIV-1mtの構築．第61回日本ウイルス学会学術集会．2013年11月10-12日(日-火)、神戸．

4)齋藤暁、大附寛幸、東濃篤徳、鈴木沙織、松田健太、高橋尚史、松岡佐織、岩谷靖雅、杉浦互、野間口雅子、足立昭夫、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：CCR5指向性を示す新規サル指向性HIV-1はサル個体に持続感染する．第61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月10-12日(日-火)、神戸．

5)三宅在子、宮崎恭行、野間口雅子、足立昭夫：
Vpx 発現における C 末端ポリプロリンモチーフの
機能の解析 . 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 .
2013 年 11 月 10-12 日 (日-火) 神戸 .

6)山本充奈美、野間口雅子、古賀涼子、岩谷靖雅、
高宗暘暁、三隅将吾、大塚雅巳、足立昭夫、藤田
美歌子：マクロファージにおける SAMHD1 非依存
的な HIV-2 Vpx の機能 . 第 61 回日本ウイルス学
会学術集会 . 2013 年 11 月 10-12 日 (日-火) 神
戸 .

7)土肥直哉、藤原佐知、酒井遥介、大久保綾香、
山根瑞萌、足立昭夫、野間口雅子：R5-tropic
HIV-1mt Env 適応変異の宿主細胞依存性増殖促進
機構の解析 . 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 .

2013 年 11 月 10-12 日 (日-火) 神戸 .

8)齊藤暁、大附寛幸、東濃篤徳、鈴木沙織、松田
健太、高橋尚史、松岡佐織、岩谷靖雅、杉浦互、
野間口雅子、足立昭夫、保富康宏、俣野哲朗、三
浦智行、明里宏文：CCR5 指向性を示す新規サル
指向性 HIV-1 はサル個体に持続感染する . 第 27
回日本エイズ学会学術集会 . 2013 年 11 月 20-22
日 (水-金) 熊本 .

9)モッフチ ハリルイブラハム、古賀涼子、岩谷
靖雅、野間口雅子、足立昭夫、大塚雅巳、藤田美
歌子：SAMHD1-independent function of HIV-2 Vpx
protein . 第 27 回日本エイズ学会学術集会 . 2013
年 11 月 20-22 日 (水-金) 熊本 .

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

ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）は非常に狭い宿主域を持ち、ヒトとチンパンジー以外の動物には感染できない。HIV-1の動物実験モデルを作製することを目的として、我々は先にHIV-1のVifおよびGagに種々の改変を行い、カニクイザルの細胞でも増殖できる改変HIV-1株の作出に成功した（Kuroishi et al. (2009) *Retrovirology* 6: 70）。しかし、この改変HIV-1株はカニクイザル細胞で増殖できる代わりに、ヒト細胞での増殖能が著しく低下していた。また、その増殖能低下は、主に感染初期過程が効率良く進行しないことによるものであった。この改変HIV-1株のヒト細胞における増殖能低下の原因を明らかにする目的で、我々はこの改変HIV-1の感染後の脱殻の速度を、ウイルスコアとコア内のGFP融合Vprとの解離を蛍光顕微鏡で観察するin situ uncoating assayを用いて測定した。その結果、この改変HIV-1の脱殻の速度は、野生型HIV-1と比較して明らかに遅くなっていた。また、この改変HIV-1をヒトT細胞株で長期経代してヒト細胞での増殖能がある程度回復した復帰変異株はGagのカプシド領域内にアミノ酸の変異が認められた（Kuroishi et al. (2010) *Retrovirology* 7: 58）が、この復帰変異株では、脱殻の速度がほぼ野生型HIV-1程度まで回復していた。これらの結果から、カニクイザル細胞での増殖能を獲得した改変HIV-1のヒト細胞での増殖能低下は、脱殻速度に低下に起因する可能性が考えられた。

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2004年に同定された。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、そのウイルス感染阻害の分子機構は明らかにされていない。今のところ、TRIM5 α は細胞質内に存在し、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。アカゲザル、カニクイザルのTRIM5 α は強い抗HIV-1作用を示すが、ヒトのTRIM5 α の抗HIV-1作用は弱く、その結果としてヒトでのHIV-1感染は拡大を続けている。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に遅れが生じている。

我々は先にTRIM5 α の標的であるHIV-1のGag中のカプシドおよびもう一つの抗HIV-1因子であるAPOBEC3Gをプロテアソーム分解に導くVifに改変を行い、カニクイザルの細胞でも増殖できる改変HIV-1株（NL-4/5S6/7SvifS）の作出に成功した（Kuroishi et al. (2009) *Retrovirology* 6: 70）。しかし、NL-4/5S6/7SvifSはカニクイザル細胞で増殖できる代わりに、ヒト細胞での増殖能が著しく低下していた。また、その増殖能低下は、主に感染初期過程が効率良く進行しないことによるものであった。本研究は、NL-4/5S6/7SvifSがヒト細胞においてその感染初期過程が効率良く進行しない分子機構の詳細を解明する事を目的とした。

B. 研究方法

1. ウイルスの増殖能の測定

2X10⁵個のヒト株化T細胞CEM-SSにカプシドタンパク質20ngのHIV-1あるいはその変異体を感染させ、経時的に培養液を回収して、その上清中に含まれるカプシドタンパク質量をELISA法で測定した。また、感染初期過程のみの進行を定量するために、GFPを発現する組換えHIV-1ウイルスを水疱性口内炎ウイルスのGタンパク質を用いてCEM-SS細胞に感染させ、1日後にフローサイトメーターでGFP発現細胞数を測定した。

2. In situ uncoating assay

Campbellらの方法によった（Campbell et al. (2007) *Virology* 360: 286-293）。具体的には、まず、Env遺伝子にフレームシフト変異を導入したHIV-1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、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。正しくエンヴェ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. ウイルスの増殖能

NL-4/5S6/7SvifS (図1A)は、HIV-1 NL43株のカプシドのコア外側に位置する85番目から93番目(4/5)と120番目から125番目のアミノ酸(6/7)並びにVif遺伝子全長をサル細胞で効率よく増殖できるSIVmac239(S)のものと交換して作製した組み換えウイルスである。しかしヒト細胞CEM-SSにおいては、図1Bに示すように、野生株のカプシドを持つHIV-1(NL-VifS)と比較して、その増殖能は顕著に低下していた。NL-4/5SG116E6/7SvifSは、NL-4/5S6/7SvifSをCEM-SS細胞で長期経代して増殖能がある程度復帰した株で(図1B)、カプシドの変異を導入した二カ所の間にあたる116番目のアミノ酸がグリシン(G)からグルタミン酸(E)に置換していた。

NL-4/5S6/7SvifSのヒト細胞での増殖能の低下が、感染初期過程に主要な欠陥があることを確認するために、GFPを発現する組換えHIV-1ウイルスを水疱性口内炎ウイルスのGタンパク質を用いてCEM-SS細胞に感染させ、1日後にフローサイトメーターでGFP発現細胞数を測定した(図2)。その結果、NL-4/5S6/7SvifS感染CEM-SS細胞では、野生型のカプシドを持つHIV-1と比較して感染初期過程の進行が約3分の1以下に低下していた。一方、NL-4/5SG116E6/7SvifSでは、感染初期過程の進行は野生型のカプシドを持つHIV-1の半分程度まで回復していた。

2. In situ uncoating assay

NL-4/5S6/7SvifSがヒト細胞においてその感染初期過程が効率良く進行しない分子機構の詳細を解明するために、in situ uncoating assayを行い、NL-4/5S6/7SvifSとNL-4/5SG116E6/7SvifSのヒトHeLa細胞での脱殻速度を測定して、野生型カプシドを持つHIV-1の脱殻速度と比較した。図3にその結果を示す。感染後0時間(16C、2時間の吸着直後)において、野生型カプシドを持つHIV-1、NL-4/5S6/7SvifS、NL-4/5SG116E6/7SvifSはいずれも、約75%のGFPシグナル(コア内のVpr)がCy5のシグナル(カプシド)と一致していた。感染後1時間において、野生型カプシドを持つHIV-1とNL-4/5SG116E6/7SvifSでは40%未満のGFPシグナルがCy5シグナルと一致していたが、NL-4/5S6/7SvifSでは50%以上のGFPシグナルがCy5シグナルと一致していた。同様の傾向は感染後2時間においても観察されたが、4時間後には、いずれのウイルスも約30%のGFPシグナルがCy5シグナルと一致していた。一方、エンドソームの融合阻害剤であるBafiromycin Aを添加した場合は、感染後4時間経過した時点でも0時間とほぼ同様の約75%のGFPシグナルがCy5シグナルと一致し

ており、水疱性口内炎ウイルスのGタンパク質によって正しく細胞質内に侵入したコアについて解析できることが確認された。

D. 考察

カプシドとVifに変異を持ち、サルのTRIM5 α やAPOBEC3G等の抗HIV-1因子の攻撃を回避してカニクイザル細胞で増殖できるようになったNL-4/5S6/7SvifSが、ヒト細胞においてはその感染初期過程が効率良く進行しない分子機構を解明するために、in situ uncoating assayを用いて脱殻速度を測定した。その結果、NL-4/5S6/7SvifSでは脱殻速度の明らかな低下が観察された。一方、NL-4/5S6/7SvifSをCEM-SS細胞で長期経代して増殖能がある程度復帰したNL-4/5SG116E6/7SvifSでは、脱殻速度はほぼ野生型のカプシドを持つHIV-1と同程度まで回復していた。従ってNL-4/5S6/7SvifSのヒト細胞における増殖能の低下は、NL-4/5S6/7SvifSの脱殻速度の低下に起因する可能性が考えられた。

NL-4/5S6/7SvifSの脱殻速度の低下がどのように増殖能の低下をもたらすかは、現状では明らかではない。Hulmeらは、逆転写酵素阻害剤に用いてHIV-1の逆転写を阻害すると、脱殻の速度が低下すると報告している(Hulme et al., PNAS, (2011), 108:9975-9980)。しかし我々が野生型のカプシドを持つHIV-1やNL-4/5S6/7SvifSのヒト細胞における逆転写の進行を経時的に解析すると、感染後8時間まではNL-4/5S6/7SvifSの逆転写は野生型カプシドを持つHIV-1よりもむしろ効率良く進行していたが、逆転写産物の核移行は、明らかに障害されていた。一方、NL-4/5SG116E6/7SvifSでは、感染後8時間までの逆転写産物の蓄積はむしろ野生型のカプシドを持つHIV-1より低下していた。以上の結果からHIV-1の脱殻速度の低下が必ずしも逆転写の進行を妨げるわけではないことが考えられる。最近、HIV-1のカプシドは、核孔タンパク質であるRanBP2と相互作用して逆転写産物の核移行の直前まで逆転写産物を結合している可能性が提示された。今後、HIV-1の脱殻が実際に核の近傍で生じているか否か、in situ uncoating assayをさらに改良して検討していく予定である。

E. 結論

カニクイザル細胞で増殖できるようになったNL-4/5S6/7SvifSが、ヒト細胞においてはその感染初期過程が効率良く進行しない分子機構を解明するために、in situ uncoating assayを用いて脱殻速度を測定した。その結果、NL-4/5S6/7SvifSでは脱殻速度の明らかな低下が観察された。一方、NL-4/5S6/7SvifSをCEM-SS細胞で長期経代して増殖能がある程度復帰した

NL-4/5SG116E6/7SvifSでは、脱殻速度はほぼ野生型のカプシドを持つHIV-1と同程度まで回復していた。従ってNL-4/5S6/7SvifSのヒト細胞に置ける増殖能の低下は、NL-4/5S6/7SvifSの脱殻速度の低下に起因する可能性が考えられた。これらの結果から、HIV-1の脱殻過程も抗HIV-1戦略の新しい標的となり得ることが示唆された。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A. Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *J Virol*. 2013 Nov;87(21):11447-11461.

2) Kono K, Takeda E, Tsutsui H, Kuroishi A, Hulme AE, Hope TJ, Nakayama EE, Shioda T. Slower Uncoating Is Associated with Impaired Replicative Capability of Simian-Tropic HIV-1. *PLoS One*. 2013 Aug 13;8(8):e72531.

3) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiyama W, Matano T, Adachi A, Nakayama E, Akari H. TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol*. 2013;94(Pt 6):1318-24.

4) Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, Adachi A. Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes Infect*. 2013;15(4):319-28.

5) Nakayama EE, Nakajima T, Kaur G, Mimaya JI, Terunuma H, Mehra N, Kimura A, Shioda T. A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5 α linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013 Jun;29(6):919-24.

6) Taya K, Nakayama EE, Shioda T. Moderate restriction of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. 2014 Accepted.

1) Eri Takeda, Ken Kono, Hiromi Tsutsui, Ayumu Kuroishi, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, Emi E Nakayama, Tatsuo Shioda: Slower uncoating is associated with impaired replicative capability of simian-tropic HIV-1. 第12回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 2013年9月10-13日、淡路島

2) Kahoru Taya, Emi E Nakayama, Shioda Tatsuo: Moderate restriction of macrophage tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages. 第12回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 2013年9月10-13日、淡路島

3) 櫻木淳一、夏井洋和、櫻木小百合、塩田達雄：レンチウイルスのGag開始コドンおよび翻訳とゲノムパッケージングに関する解析 第61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月10-12日、神戸

4) 武田英里、河野健、Hulme Amy E., Hope Thomas J., 中山英美、塩田達雄：可視化ウイルスをつかったHIV-2カプシドコアの脱核速度測定法の確立 第61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月10-12日、神戸

5) 櫻木淳一、櫻木小百合、塩田達雄：HIVサブタイプ比較によるゲノムパッケージングに関する解析 第27回日本エイズ学会学術集会・総会 2013年11月20-22日、熊本

6) 田谷かほる、中山英美、塩田達雄：マクロファージ指向性 HIV-1も、マクロファージおよび単球において SAMHD1 による増殖抑制を受けている。第27回日本エイズ学会学術集会・総会 2013年11月20-22日、熊本

2. 学会発表等

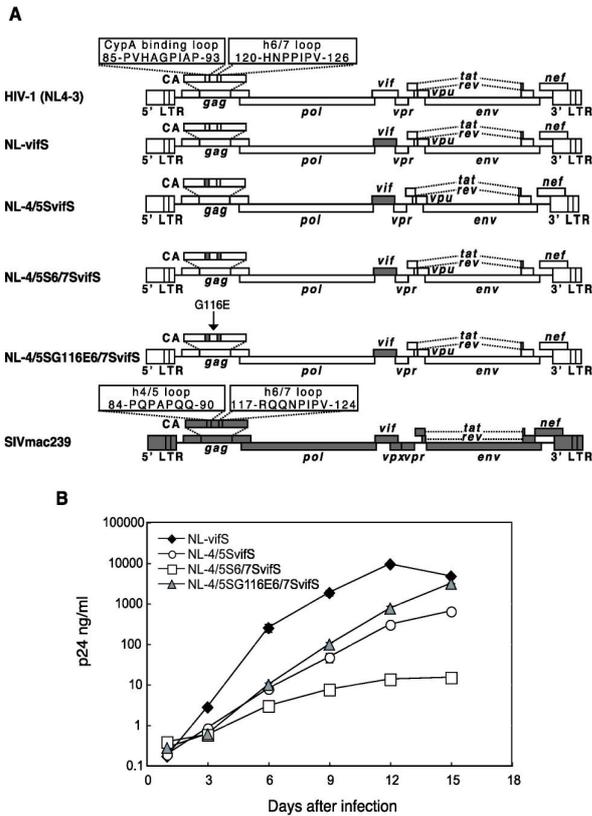


図1. HIV-1およびその改変ウイルス (A) ゲノム構造。白四角はHIV-1、灰色四角はSIVmacのゲノムを示す。(B) ヒト株化T細胞CEM-SSでの各ウイルスの増殖。野生株と同じカプシドを持つNL-vifS(黒菱形)、NL-4/5S6/7SvifS(白四角)、NL-4/5SG116E6/7SvifS(灰色三角)の増殖をカプシドタンパク質 (P24) 量で示す。

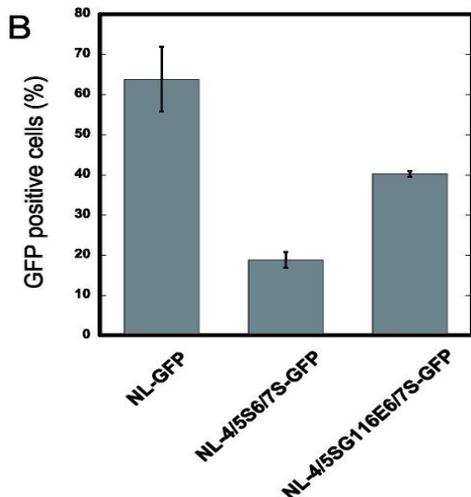


図2. HIV-1およびその改変ウイルスの感染初期

過程の解析。GFPを発現する各組換え HIV-1 ウィルスを水疱性口内炎ウイルスの G タンパク質を用いて CEM-SS 細胞に感染させ、1 日後にフローサイトメーターで GFP 発現細胞数を測定した。GFP 陽性細胞の割合を示す。

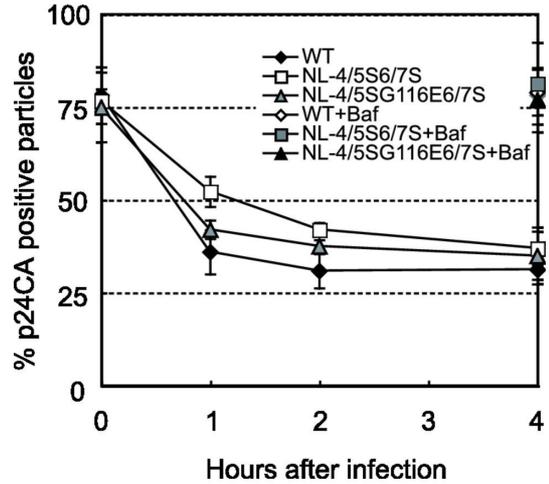


図3. In situ uncoating assay. HIV-1 プロウイルス DNA と蛍光色素 dTomato で標識した Src の N 末端 15 アミノ酸、GFP で標識した Vpr、水疱性口内炎ウイルスの G タンパク質をそれぞれ発現するプラスミドを 293 細胞に導入して組み換えウイルスを回収した。得られた組み換えウイルスを HeLa 細胞に感染させ、経時的に固定してカプシドタンパク質を Cy5 標識抗体で染色し、GFP、dTomato、Cy5 それぞれの色素を励起して蛍光顕微鏡にて検出した。正しくエンヴェロップが外れて細胞質内に侵入したと考えられる dTOMATO の蛍光を含まない 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。Baf: Bafilomycin A.

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：HIV ゲノムの逆転写制御に関するインテグラーゼの構造と感染性ウイルス粒子コア形成への関与に関する研究

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・免疫治療学分野）

研究要旨

HIV-1 インテグラーゼ（IN）は、本来の酵素機能である組み込み過程に加え、脱殻／逆転写過程にも大きく関与している。我々は、この酵素活性非依存的機能には、N-末端ドメイン（NTD）のコンフォメーション形成を介した多量体形成が重要であることを示唆する結果を得ている。本研究では、NTD 変異体のウイルス粒子レベルでの性状解析を行い、ウイルス粒子形成への影響を検討した。さらに、IN の四量体形成時に、NTD と相互作用が推定される中央酵素活性ドメイン（CCD）のアミノ酸残基に点変異を導入した HIV IN-CCD 変異体を作成し、ウイルス複製レベルでの解析を行った。その結果、NTD 変異はウイルス粒子放出およびプロテアーゼによる Gag-pol 前駆体蛋白切断には影響せず、endogenous RT 活性は WT と同程度保持していることが明らかとなった。また、IN の NTD-CCD 間の相互作用は、HIV 感染後の cDNA 合成開始に必須であることを明らかにした。以上、IN の四量体形成における dimer-dimer インターフェースにおける NTD-CCD ドメイン間相互作用に必須な新規アミノ酸残基を同定し、本相互作用が感染性ウイルス粒子コアの形成／維持に重要である可能性が示唆された。

A. 研究目的

HIV-1 インテグラーゼ（IN）はウイルスゲノムの組み込み過程（酵素活性機能）以外にも、脱殻、逆転写過程にも関与している（酵素活性非依存的機能と呼ぶ）。これまでに我々は、HIV-1 IN の N 末端ドメイン（NTD、1-55）の構造を規定する分子間相互作用として Tyr15 残基のベンゼン環基を介した π / π -CH 相互作用などの非共有結合が逆転写およびそれ以前の感染素過程における IN 機能発現に必須であることを明らかにしている。本研究では、NTD と相互作用が推定される Tyr15 周辺の NTD 残基および中央酵素活性ドメイン（CCD）のアミノ酸残基に点変異を導入した HIV IN-CCD 変異体を作成し、ウイルス複製レベルでの解析を行い、IN のドメイン間相互作用の重要性を検討した。

B. 研究方法

HIV-1 IN の構造情報に基づく変異体の作成と解析：HIV-1 IN NTD を種々の NMR および部分結晶構造解析結果を鋳型にして構造シミュレーションを、佐藤研究代表者および横山分担研究者との共同で行った。

構造情報に基づく変異体の作成と解析：で見いだされた IN NTD の構造を規定する分子間相互作用に重要なアミノ酸を種々のアミノ酸に置換した変異 HIV-1 クローンを作成し、single-round 感染系により変異の影響をウイルス複製レベルで評価した。

各 IN 変異体のウイルス粒子の Gag-pol 前駆体蛋白の切断パターンを gag 蛋白の各コンポーネントを認識するモノクローナル抗体（抗 p24 および抗 p17 抗体）を用いたウェスタンブロット（WB）法により解析した。

endogenous RT アッセイ：各 IN 変異体のウイルス粒子を超遠心により回収し、180pg の p24 相当のウイルス粒子を 0.05% TritonX100 で溶解後、100nM dNTPs、50mM MgCl₂ 存在下で 37 で 90 分反応させた。PK 処理後 cDNA 産物を HIV-1 特異的プライマーを用いた real-time PCR により定量した。

IN の部分結晶構造情報に基づき、IN 四量体形成における NTD との分子間相互作用に重要となるアミノ酸残基にの点変異を導入した HIV-1 クローンを作成し、single-round 感染系により変異の影響をウイルス複製レベルで評価した。

（倫理面への配慮）

該当事項無し。

C. 研究結果

Tyr15 のアミノ酸特性：Y15 を他のアミノ酸に置換した変異体（Ala, Cys, Tyr, Phe, Trp, His, もしくは Glu 計 7 種）解析結果から、殆どのアミノ酸置換変異は Ala 置換変異と同様に著しい感染低下をもたらした（Fig.1A）、いずれも感染後の逆転写初期産物合成の低下によるものであった。（Fig.1B）。一方で、Tyr15 の Phe

への置換 (Y15F) は WT と同様の感染価を維持していた。Trp に置換した変異体 (Y15W) は WT 比で 4.9% 近くの感染価を保持していた (Fig. 1A)。

変異体ウイルス粒子の解析: Y15 変異 HIV のウイルス粒子の放出 (Fig. 2A) および gag 蛋白前駆体のプロセッシング (Fig. 2B) は、野性株 (WT) と比較して顕著な差を認めなかった。さらに、ウイルス粒子を用いた endogenous RT 活性はいずれも WT と差を認めなかった (Fig. 2C)。

IN-NTD Y15 近傍の点変異体の解析:

Y15 近傍のアミノ酸残基の変異体の解析から、Y15A に加え、WT 比で 0.5% 以下の感染能の低下を引き起こす K14A および D25A 変異体を新たに同定した (Fig. 3A)。また、いずれも Y15A 同様逆転写反応の逆転写初期の産物である r/U5 および最終産物である r/gag 領域の cDNA 量が顕著に減少しており (Fig. 3B、C)、ルシフェラーゼアッセイで観察された感染性との相関が見られた。さらに、gag 蛋白前駆体のプロセッシング (Fig. 3D) endogenous RT 活性はいずれも WT と差を認めなかった (Fig. 3E)。HIV-1 IN NTD の構造 (PDB ID: 1WJD) に基づくと、K14A および D25A は Y15 近傍に位置することが明らかとなった (Fig. 3F)。

IN-CCD 変異体の解析: 部分の断片の結晶構造解析の結果を基にした四量体モデルが報告されている (PDB ID: 1K6Y および PDB ID: 1EX4)。Y15 付近には CCD の W132, F181, I182, F185 といった残基が存 E11 は K186 と D25 は K188 との水素結合が示唆されている (Fig. 4B)。これら NTD 残基との相互作用が推測される CCD 残基の変異体構築し、ウイルス複製レベルでの解析をおこなったところ、Y15A と同様な表現系を示す CCD 変異体 (W131A, W132A, F181A, I182A, F185A, K186E, K187A, K188A) を同定した。

D. 考察

本研究において報告した、アラニン置換によって逆転写異常が生ずるアミノ酸残基 E11, K14, Y15, D25 は NTD-CCD 断片の結晶構造解析のモデルにおいて四量体形成時に dimer-dimer インターフェイスに存在すると考えられる残基であり (Fig. 4B)、対応する CCD 残基の変異は NTD 変異と同様な影響をもたらすことが明らかとなった。以上より機能的逆転写複合体と IN の多量体化との相関が強く示唆される。本研究結果は、HIV-1 複製前期素過程における IN の機能を規定する構造解明において重要な知見と考えられる。また、HIV 複

製阻害剤開発におけるあらたな標的となりうる分子基盤情報を提供した。

E. 結論

HIV-1 IN の四量体形成に必須と考えられるアミノ酸残基を NTD および CCD 領域内に新たに同定した。これらの残基間の水素結合および疎水性結合は、IN の感染前期課程における機能と構造維持および発現に必須な分子間相互作用と考えられる。

F. 知的所有権の取得状況

特記すべきこと無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.* (in press)

2) Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, Masuda T, Tanaka Y, Utsunomiya A, Kannagi M. Interferon-alpha (IFN-alpha) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN-alpha combined with zidovudine induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells. *Retrovirology* 10:52.2013.

2. 学会発表等

1) 高畑 辰郎、佐藤 洋子、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非酵素的機能と構造の解析 第27回 日本エイズ学会 (神戸) 11月, 2013年

2) 佐藤 洋子、高畑 辰郎、鈴木 萌華、河合 剛太、長谷川 温彦、神奈木 真理、増田 貴夫 HIV-1 逆転写反応の試験管内再構築に向けた各種因子の検討評価 第27回 日本エイズ学会 (神戸) 11月, 2013

3) 野間口 雅子、三宅 在子、土肥 直哉、藤原 佐知、宮崎 恭行、横田 恭子、横山 勝、佐藤 裕徳、増田 貴夫、足立 昭夫 HIV-1 pol (4895-4933) の1塩基置換によるウイルス複製制御機構の解析 第61回 日本ウイルス学会 (神戸) 11月, 2013

4) 柿沼 桃瑠、金原 秀一、笹田 亜麻子、長谷川 温彦、増田 貴夫、神奈木 真理 HTLV-1

感染によるI型インターフェロン応答の誘導機序 第61回 日本ウイルス学会(神戸) 11月,2013年

- 5) 木地山 真実、長谷川 温彦、金原 秀一、秋葉 彩乃、増田 貴夫、神奈木 真理 HTLV-1感染細胞のウイルス発現抑制へのPKRの関与 第61回 日本ウイルス学会(神戸) 11月,2013年
- 6) 秋葉 彩乃、高森 絢子、長谷川 温彦、金原 秀一、木地山 真実、増田 貴夫、神奈木 真理 HTLV-1感染者由来HTLV-1感染T細胞株のサイトカイン産生プロファイル 第61回 日本ウイルス学会(神戸) 11月,2013年

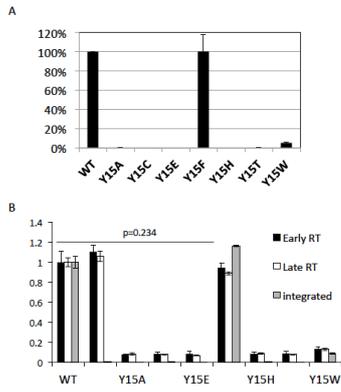


Fig. 1 Tyrl5 IN (Y15) 変異体の感受性. (A) IN-NTDのTyr15(Y15)残基にアミノ酸変異を伴う点変異を導入し、Luciferase/VSV-G シンドライウイルスを作成し、293T細胞に感染させ、24時間後にウイルス遺伝子発現をLuciferase活性により評価した。WTを100%とし、各々のp24相対値を示す。(B) ウイルスを293T細胞に感染させ、4時間後に細胞を洗浄後培養液を交換し、24時間後に細胞からフルクトシドシクロホリンムによって全DNAを回収した。Early (R/US), Late (R/pag) 及びIntegrated (Alu) 領域特異的なプライマーを用いたリアルタイムPCR法でcDNAを定量化した。WTを100%とし、各々のcDNA量を示す。

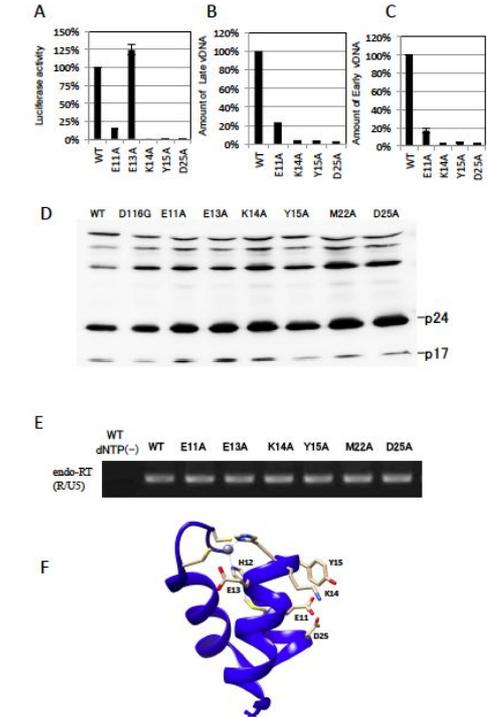


Fig. 3 IN NTD変異体の感受性. IN-NTDのTyr15(Y15)残基近傍のアミノ酸変異を伴う点変異を導入し、Luciferase/VSV-G シンドライウイルスを作成し、293T細胞に感染させ、24時間後にウイルス遺伝子発現をLuciferase活性により評価した。WTを100%とし、各々のp24相対値を示す(A)。感染48時間後に293T細胞を洗浄後培養液を交換し、24時間後に細胞からフルクトシドシクロホリンムによって全DNAを回収した。Early (R/US)およびLate (R/pag) 領域特異的なプライマーを用いたリアルタイムPCR法でcDNAを定量化した。WTを100%とし、各々のcDNA量を示す(B,C)。ウイルス粒子を經過心によりウイルス粒子を回収後、p24/p17抗体を用いたWestern blot法によるp24/p17抗体を検出した(D)。回収されたウイルス粒子を用い、endogenous RT 酵素をこきない、R/US領域のPCR産物のグルコシドパターンを解析した(E)。NTDによるR/US IN NTDの構造を解析した(F)。R/US領域の構造を解析した(F)。R/US領域の構造を解析した(F)。

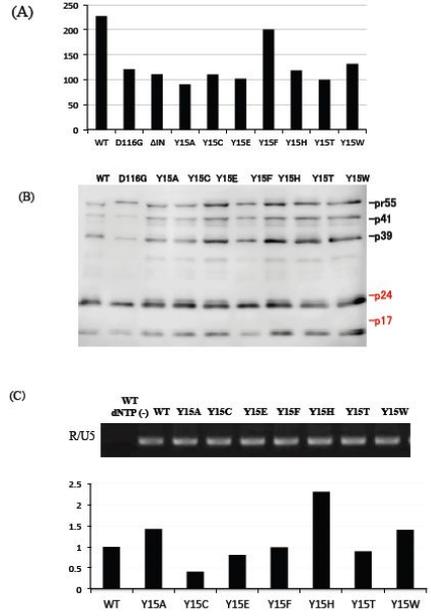


Fig. 2 Tyrl5 IN (Y15) 変異体の感受性. IN-NTDのTyr15(Y15)残基にアミノ酸変異を伴う点変異を導入し、Luciferase/VSV-G シンドライウイルスを293T細胞に感染させ、72時間後に培養上清中のp24量をELISA法により定量化(A)。WTを100%とし、各々のp24相対値を示す。得られたウイルス粒子を經過心によりウイルス粒子を回収後、p24/p17抗体を用いたWestern blot法によるp24/p17抗体を解析した(B)。回収されたウイルス粒子を用い、endogenous RT 酵素をこきない、R/US領域のPCR産物のグルコシドパターン(上部)およびp24比でcDNA量(R/US)の定量化解析し、WTを1とした相対値で結果を示す(下部)(C)。

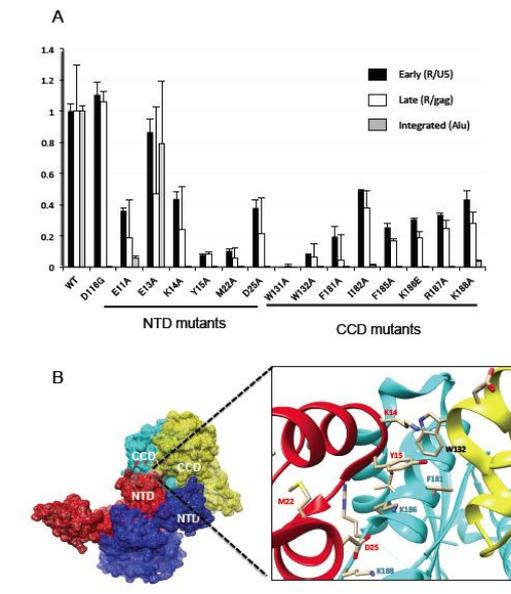


Fig. 4 IN CCD変異体の感受性. IN-NTDのTyr15(Y15)残基近傍のアミノ酸変異を伴う点変異を導入し、Luciferase/VSV-G シンドライウイルスを293T細胞に感染させ、24時間後に培養上清中のp24量をELISA法により定量化(A)。WTを100%とし、各々のp24相対値を示す。得られたウイルス粒子を經過心によりウイルス粒子を回収後、p24/p17抗体を用いたWestern blot法によるp24/p17抗体を解析した(B)。回収されたウイルス粒子を用い、endogenous RT 酵素をこきない、R/US領域のPCR産物のグルコシドパターンを解析した(C)。NTD 残基(E11, Y15, D25)の構造を解析した(D)。

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

HIV-1 感染細胞内における Gag タンパク質のリン酸化制御は広く論じられてきたが、それらのウイルス複製へ与える影響について十分な解析がなされていなかった。我々は Gag タンパク質と直接結合するヒトプロテインキナーゼを網羅的探索から、Gag を直接リン酸化するキナーゼとして aPKC (Atypical protein キナーゼ C) を同定した。本年度は、aPKC による感染後期過程における Gag のリン酸化とその機能的役割について分子構造モデルに基づいた機能解析を行った。本研究課題では aPKC によりリン酸化される Gag の 487 番目のセリンと、Vpr の 44 番目のグルタミンが、Gag-Vpr 相互作用に重要な役割を果たすことが示された。また、このリン酸化は Vpr のウイルス粒子内への取り込みを促進させることで、マクロファージにおけるウイルスの感染性の増強に寄与することが明らかとなった。

A. 研究目的

Gag を標的とする薬剤の開発には、創薬対象となる Gag タンパク質の感染細胞内における特性や機能制御を詳細に理解する必要がある。また、感染細胞における Gag タンパク質の翻訳後修飾が、Gag の細胞内輸送に関わる宿主因子群との相互作用やウイルス様粒子形成にどのように影響しているかについて、未解決の事項が多く残されている。そこで、本研究では Gag を直接リン酸化することが明らかとなった宿主タンパク質リン酸化酵素 aPKC に着目し、aPKC による Gag のリン酸化が HIV-1 感染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。

B. 研究方法

リン酸化アッセイのリコンビナントタンパク質はコムギ無細胞タンパク質合成系により Gag、aPKC を合成しコムギ胚芽を含む合成液中から GST ビーズによる目的タンパク質の精製を行った後、キナーゼ反応の解析に用いた。キナーゼ反応液は一部を SDS-PAGE 後のゲルから切り出し、トリプシンで処理し Titanspere Phos-Tio Kit を用いてリン酸化ペプチドの濃縮後、MALDI-TOF/TOF-MS にて質量分析を行った。リン酸化部位の同定には Mascot プログラムによる配列解析を行った。Gag のリン酸化部位特異抗体は PLT (pS)LRSLFGND (Ser487 のリン酸化を含む Gag の 484 - 495 領域) のペプチドに対する抗体をスクラム社に依頼して作製し分離精製したものを用いた。抗体の特異性評価にはアルファスクリーンを用い、作製した抗体が非リン酸化ペプチド配列とは反応しないことを確認し研究に用いた。

細胞における aPKC の活性の影響を観察するため aPKC 特異的阻害剤を用いた抑制実験を行った。これらの解析に使用した阻害剤は、aPKC の基質

をミミックするペプチド鎖であり、細胞に添加すると aPKC のキナーゼ活性のみを特異的に阻害する。

Gag と Vpr の細胞内結合解析は BiFC (二分子蛍光補完法 Bimolecular Fluorescence Complementation) 系を使用した。Vpr と緑色蛍光タンパク質 Kusabira-Green (KG) の N 末側約半分の融合タンパク質 (Vpr-KGN, VprQ44E-KGN) 及び Gag と KG の C 末側約半分の融合タンパク質 (Gag-KGC, GagS487A-KGC) の発現コンストラクトを作成した。これは、細胞内で Gag と Vpr 両者が結合した場合にのみ 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。

aPKC 活性が HIV 複製に与える影響を検証するため細胞培養株である単球から PMA 処理によりマクロファージを分化誘導し NL4-3Δenv 株、NL4-3ΔVprΔenv 株を VSVG にパッケージングしたウイルスのシングルラウンド感染実験を行った。また、健康人から単離した単球をマクロファージに分化した細胞に、aPKC 阻害剤存在下で 89.6 株、AD-8 株を感染させ解析した。

C. 研究結果

1. Gag をリン酸化する宿主キナーゼの同定

Gag と細胞内において直接結合した宿主因子のうち、in vitro 解析において精製した Gag タンパク質と aPKC を反応させ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の取り込みをオートラジオグラフィにより確認し、aPKC により Gag が直接リン酸化を受けることが明らかとなった。この反応産物を LC-MS/MS 解析にかけ、aPKC による Gag のリン酸化部位は Gag-p6 領域内のセリン 487 番であることが示された。そこで、Gag-Ser487 のリン酸化特異的抗体を作製し細胞内における当該部位のリン酸化と aPKC 活性につ

いて検討した。細胞にGagを発現させるとSer487のリン酸化が観察されたが、このリン酸化はaPKCの特異的阻害剤を処理することにより失われた。これらのことから、aPKCは細胞内においてGagのSer487を直接リン酸化する因子であることが明らかとなった。

2. Gagのリン酸化とVpr粒子内取り込み

GagのSer487は、Alix結合モチーフとVpr結合モチーフに近接する位置に存在する。そこでGagのSer487のリン酸化がAlixやVprとの結合に与える影響について検討した。その結果GagのSer487番のリン酸化はGagとVprの細胞内相互作用やVLPへの取り込みを促進することが明らかとなった。また、GagとVprとの免疫沈降ではGagのSer487のリン酸化は非リン酸化Gagと比較し細胞内におけるGagとVprの結合が安定であった。

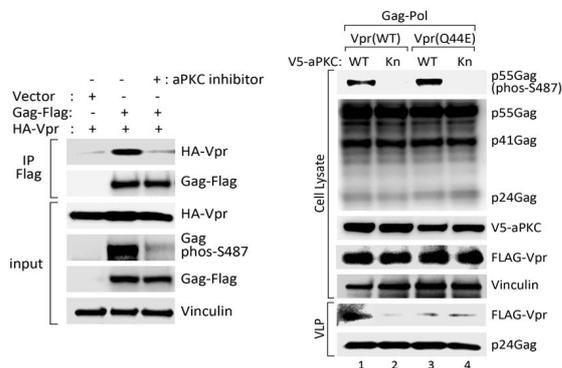


図1. Gag-Ser487のリン酸化とVprの結合
左) 免疫沈降法 右) 粒子内 (VLP) 取り込み

GagのSer487のリン酸化とVprとの結合を分子結合シミュレーション結果より再構成すると、当該部位のリン酸化によりVprのグルタミン44との間に新たな水素結合が生まれ結合が強化されることが示された。このことを検証するため、VprのQ44をグルタミン酸 (E) に置換した変異体を作製し、Gagとの結合能について解析を行った。BiFCを用いた結合解析の結果、生細胞内においてVprは野生株と比較しQ44E変異体でGagとの結合が著しく損なわれた。

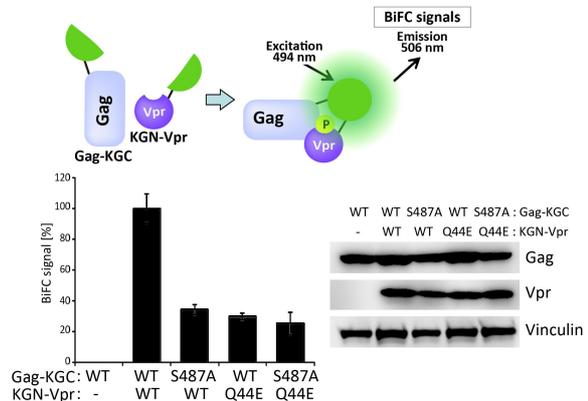


図2. Gag-Vprの二分子蛍光補完法を用いた解析

3. Gagのリン酸化がHIV-1感染に与える影響

aPKCによるGagのSer487のリン酸化がHIV-1感染に与える影響について検討を行った。HIV-1_{NL4-3}株をマクロファージに感染させると、Gagのセリン487番がリン酸化されていたがこのリン酸化はaPKC特異的阻害剤を細胞に処理することにより失われた。また、aPKC特異的阻害剤を処理したウイルス粒子は感染力を著しく欠損していたが、もともと感染力の弱いVprを欠損したウイルス株ではaPKC阻害剤の影響が見られなかった。

aPKC活性がHIV-1感染に与える影響を検証するために、HIV-1_{89.6}株とHIV-1_{AD-8}株を用いてHIV-1感染実験を行った。健常人から単離した単球よりマクロファージを分離誘導し、aPKC特異的阻害剤存在下、非存在下における細胞外ウイルス粒子放出を12日間測定したところ、aPKC阻害剤処理した細胞ではコントロールと比較して細胞外ウイルス濃度が低く抑えられていた。

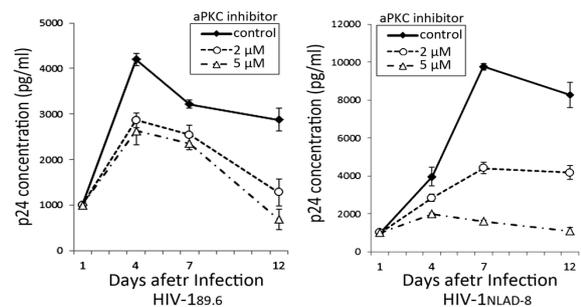


図3. aPKC 阻害剤存在下でのヒトマクロファージを使用した HIV-1 感染実験

D. 考察

これまで、Gagのp6領域のリン酸化が感染細胞中に起きることは報告されてきたが、そのリン酸化を行う責任キナーゼの同定や、リン酸化の機能や意義について詳細な解析は十分にはなされてこなかった。本研究課題では、Gagは感染細胞内

においてaPKCによりSer487のリン酸化を受け、このリン酸化は細胞内でのGag-Vprの結合をより安定化し、VprのHIV粒子内取り込みを促進することが明らかとなった。Vprの粒子内取り込みは、マクロファージ細胞における感染時の細胞内環境構築に必要と考えられている。本研究においてもaPKC阻害剤の添加により、マクロファージ細胞におけるHIVの感染性が著明に減弱したことから、HIV感染においてaPKCのリン酸化活性がGagのリン酸化に伴うVprの粒子内取り込みの促進に関与することが示唆されたが、aPKCがHIV感染においてGagのSer487のリン酸化以外にも関与している可能性も否定できない。当然のことながら、感染細胞内においてはaPKCだけでなく感染時に活性化してくるキナーゼが多数存在しており、Gagの機能発現に関わる翻訳後修飾の全貌を理解するには、これからも多くの挑戦的な解析を行う必要がある。

E. 結論

HIV-1Gagを感染細胞内において直接リン酸化する宿主タンパク質リン酸化酵素としてaPKCを同定した。解析の結果aPKCはGagのSer487を特異的にリン酸化し、このリン酸化によりGagとVprの結合が促進され、HIV-1粒子の感染性を向上させていることが明らかとなった。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1)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*. In press, 2014

(2)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(1):In press, 2014

(3)Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A.; Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *J Virol*. 87(21):11447-61, 2013

2. 学会発表等

(1) 工藤あゆみ、宮川 敬、松永智子、小杉伊三夫、梁 明秀；Vpx の機能抑制的に作用する宿主因子の同定とその作用機序．第 61 回日本ウイルス学会学術集会，兵庫，2013 年 11 月．

(2) 宮川 敬、松永智子、工藤あゆみ、梁 明秀；Vpx のリン酸化は HIV 感染を制御する．第 27 回日本エイズ学会学術集会，熊本，2013 年 11 月．

(3) 梁 明秀；プロテオミクスを活用した HIV-1 感染制御宿主因子の探索．*Infection and Immunity Research Symposium*，福岡，2013 年 11 月．

(4)Ryo A; A proteomic approach to decipher the molecular link between HIV-1 Gag and host proteins, *HUPO 2013*, Yokohama, 2013.9.

【報告書作成要領】

- 添付のファイル（添付の「分担報告書 鋳型」）を鋳型とする（余白は上下左右とも 25mm）。
- 「A. 研究目的」から「G. 研究発表」までを、4 ページ程度にまとめる。
- 文字の大きさは 10 ポイント（和文；MS 明朝、英数字；Times New Roman）
- 可能な範囲で図表を使ってください（結果か末尾に挿入してください）
- 論文 平成 25 年 4 月 1 日以降のものであることをご確認下さい。 ご自身の名前に下線を引いて下さい。
* 健康危険情報（下記参照）がある場合は分担報告書には含めずに、別途ご報告下さい。

<健康危険情報について>

- ・ 研究の結果、得られた成果の中で健康危険情報（国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものがある場合や、研究過程において健康危険情報を把握した場合には、国民の生命、健康に重大な影響を及ぼすと考えられる内容と理由を簡潔に記入するとともに、その情報源（研究成果、研究者名、学会発表名、雑誌等の詳細）について記述すること。
- ・ 既に厚生労働省に通報した健康危険情報であっても、本研究報告書の提出の時点において健康危険情報に該当すると判断されるものについては記述すること。

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）

研究要旨

Gag 蛋白質は HIV 複製全般に重要な蛋白質である。複製後期課程における 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と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 複製後期課程において Gag 蛋白質が機能する時と場の新規知見を収集することを目的として、Gag 蛋白質の生細胞におけるライブイメージング解析実験系を構築した。まず、蛍光顕微鏡よりも高い解像度での細胞内局在を解析するため、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡での解析を可能とするシロイナズナの Phototropin2 由来、miniSOG タグを融合した Gag 蛋白質を作製した。また、細胞内におけるウイルス RNA と Gag 蛋白質の会合の時と場を明らかにするために MS2 蛋白質を利用したウイルス RNA のライブイメージング実験系を構築した。そして、これらイメージング解析実験系を用いて、Gag 蛋白質の細胞内局在、Gag 粒子形成過程、さらに、ウイルス RNA と Gag 蛋白質の共局在の場についての知見を得た。

A. 研究目的

本研究はHIV複製の後期課程におけるGag蛋白質の構造的に変化できない重要な機能領域の解明を目的とする。

Gag蛋白質はHIV複製全般に重要な働きを担うが、複製後期過程ではウイルスRNAのパッケージングを含むウイルス粒子形成に中心的な役割を有する。しかし、Gag蛋白質が翻訳されてから粒子形成までの過程において、その機能する時と場についての時空間的な挙動に関する知見は乏しい。そこで本研究では、複製後期課程におけるGag蛋白質の時空間的な機能解析を可能にする系を立ち上げ、Gag蛋白質が機能する時と場の新規知見を収集する。

B. 研究方法

Gag蛋白質の生細胞における可視化のために、完全長HIV NL4-3 gag遺伝子のMA-CA切断部位に蛍光蛋白質遺伝子を挿入した。電子顕微鏡と蛍光顕微鏡の両方を用いたGag蛋白質の細胞内局在と動

態観察を可能にするため、蛍光蛋白質としてシロイナズナ由来の緑色蛍光miniSOG遺伝子を用いた(図1-1)。miniSOG遺伝子は人工遺伝子合成により合成し、完全長NL4-3のMA-CA切断部位にウイルスプロテアーゼ認識配列を挟む形で挿入した(図1)。

ウイルスRNAのライブイメージングには、生細胞内にて特殊なRNAステムループ(MS2SL)構造を特異的に蛍光標識可能なMS2システムを利用した。緑色蛍光標識Gag蛋白質との共局在解析のため、赤色蛍光蛋白質(mCherry)と核内局在シグナル(NLS)を付加したMS2蛋白質の発現プラスミドを構築した。同時に、miniSOG遺伝子を挿入したNL4-3のnef遺伝子領域にMS2SL配列を挿入した(図2)。

図1-1

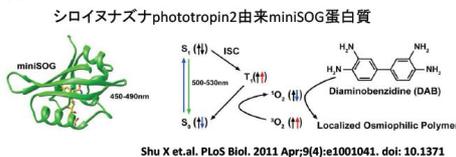


図1-2

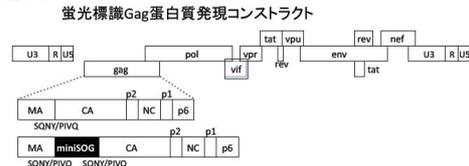


図2-1

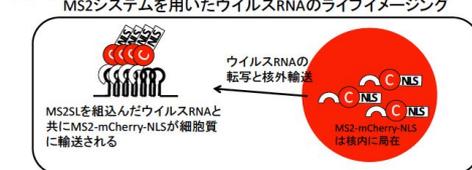
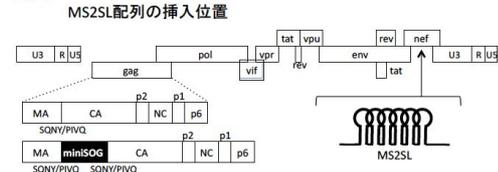


図2-2



蛍光標識Gag蛋白質、ならびに、ウイルスRNAの局在解析のため、蛍光蛋白質遺伝子、MS2SL配列を組込んだウイルス発現プラスミド、ならびに、NLS-MS2-mCherry融合蛋白質発現プラスミドを

HeLa細胞に導入し、発現した蛍光標識蛋白質の細胞内挙動を蛍光顕微鏡で解析した。

(倫理面への配慮)

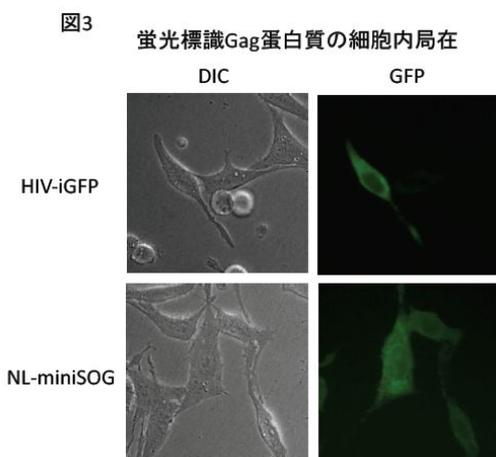
本研究はHIV 遺伝子を含む遺伝子組み換え実験を行うため原則としてP3 レベルの封じ込めが必要な機関承認実験と一部大臣確認実験である。組換えHIV 使用に関する機関承認実験、ならびに大臣確認実験の手続きも完了している。当研究所のP3 レベルの物理的封じ込め施設にて研究を行っている。また今後予定している実験動物であるNOGマウスの使用はカルタヘナ条約を守り、動物愛護法、および 3R(Replacement(代替)、Reduction (削除)、Refinement(改善))の理念に基づき実験を行なう。また、当大学動物委員会の承認は既に得ている。

C. 研究結果

1. miniSOG標識Gag蛋白質発現系の構築

完全長NL4-3のMA-CA切断部位にminiSOGを挿入したminiSOG標識Gag蛋白質の発現プラスミド、比較対称として既に報告されている完全長NL4-3のMA-CA切断部位にGFPを挿入したHIV Gag-iGFP発現プラスミド(2007. J Virol. Hübner W et al.)をHeLa細胞に導入し、蛍光標識Gag蛋白質の局在を蛍光顕微鏡で観察した。

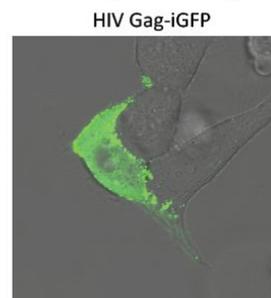
その結果、miniSOG標識Gag蛋白質の蛍光強度はHIV Gag-iGFPと比して低いものの、その局在はHIV Gag-iGFP発現プラスミド導入細胞と同様に、細胞質でその発現が確認された。また、Gag蛋白質は細胞膜付近により多く集積すること、さらには、細胞質膜に均一に局在するのではなく、特に強く局在する領域があることが観察された(図



3)。

続いて、これら蛍光標識Gag蛋白質発現細胞におけるGag粒子形成過程の観察が可能であるかどうかを検証した。Gag粒子は全てのGag蛋白質発現細胞で観察されず、Gag蛋白質の発現量が多い細胞において、その表面に蛍光強度の強いスポットとして観察された(図4)。

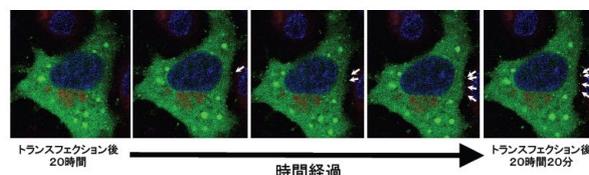
図4 蛍光標識Gag蛋白質のGag粒子形成



2. 蛍光標識Gag蛋白質を用いた粒子形成のタイムラプス実験系の構築

将来的には生細胞においてGag蛋白質の細胞内局在を経時的に観察する計画である。そのため、タイムラプス実験のアッセイ系を立ち上げた。今回は、Gag粒子形成過程の観察が可能であるかどうかを検証した。その結果、蛍光標識Gag発現プラスミドを導入したHeLa細胞において、HIV Gag-iGFPプラスミドのトランスフェクション後20時間よりGag粒子形成過程が観察された。1分間隔で20分のタイムラプス観察を行なったところ、約20分間の間にGag粒子の集合が確認された(図5、矢印がGag粒子)。

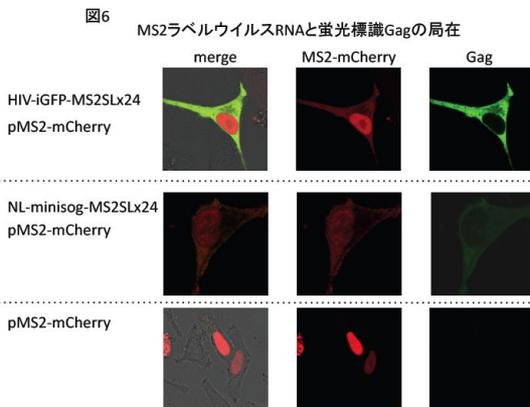
図5 Gag粒子形成過程のタイムラプス解析



3. ウイルスRNAのライブイメージング実験系の構築

ウイルス粒子産生過程における緑色蛍光標識Gag蛋白質とウイルスRNAが相互作用する時と場所を明らかにするアッセイ系を構築するため、MS2システムを用いたウイルスRNAのライブイメージング実験系を構築した。nef遺伝子領域に

MS2SL配列を組込んだ蛍光標識Gag発現ベクター (HIV-iGFP-MS2SLx24, HIV-minisog-MS2SLx24) と mCherry-NLS 融合 MS2 蛋白質発現ベクター (pMS2-mCherry) を HeLa 細胞にコトランスフェクションし、24 時間後に蛍光顕微鏡観察を行なった。その結果、MS2SL 非導入細胞において mCherry-NLS 融合 MS2 蛋白質は核内にのみ局在するのに対し、MS2SL 配列を含むウイルス RNA の発現条件下では細胞質、特に、細胞膜付近でそのシグナルが観察された。さらには、そのシグナルは緑色蛍光標識 Gag 蛋白質と共局在しており、ウイルス RNA の細胞膜付近において、特に強いシグナルが観察された (図 6)。ただし、mCherry-NLS 融合 MS2 蛋白質発現細胞における蛍光標識 Gag 蛋白質発現細胞の割合は非常に低く、さらにはその発現量も非常に低かった。



D. 考察

本研究に用いた蛍光標識Gag蛋白質発現ベクターであるHIV-iGFP, HIV-minisogは、完全長NL4-3配列をベースとして作製したため、感染性ウイルスの放出の可能性がある。結果には示していないが、HIV-iGFP, HIV-minisog導入細胞の上清には、その感染価は著しく低いものの、感染性を有する蛍光ウイルスが存在することを確認している。すなわち、本研究で構築したウイルスは、その感染力価からウイルス侵入時の解析には向かないが、複製後期課程の解析には有用であると考えられる。

また、miniSOG標識Gagは蛍光強度が低く、そして蛍光顕微鏡観察時の退色の速度が比較的速いという弱点はあるものの、既に報告されている HIV Gag-iGFP プラスミドより発現される蛍光標識Gagと同様の局在を示した。すなわち、miniSOG標識Gagを用いたGag蛋白質局在解析実験は、蛍光顕微鏡解析と並列して電子顕微鏡レベルでの解析も可能な実験系であり、今後の詳細解析実験に

有用である。

さらには、Gag蛋白質とウイルスRNAの会合の場を明らかにする目的で、MS2を利用したウイルスRNAのライプライメージング実験系を構築し、ウイルスRNAと蛍光標識Gagの共局在を確認した。今後、この実験系を用いてタイムラプス解析実験を行う予定であるが、現在において、その発現効率に問題がある。mCherry-NLS融合MS2蛋白質発現細胞における蛍光標識Gag蛋白質発現細胞の割合は非常に低い。そのため、タイムラプス実験を行なうためには、実験系を改良する必要がある。ウイルスRNAにMS2SL構造を組込むことにより、Gag蛋白質の発現量が低下したと考えられるため、今後は、可視化するウイルスRNA発現プラスミドと蛍光標識Gagの発現プラスミドを分割する等の改善が必要であると考えられる。

E. 結論

本研究により、miniSOG標識Gagの構築が完成した。また、改善の余地はあるものの、ウイルスRNAと蛍光標識Gagの局在解析実験系が構築された。蛍光標識Gag蛋白質のタイムラプス解析系の立ち上げが完了した。以後はこれら実験系を用いて、変異導入蛍光標識Gagとの比較実験を行なうことにより、Gagの細胞内局在に重要な領域を明らかにする。

F. 知的所有権の取得状況

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) [Ebina H](#), Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci. Rep.* 3:2510. 2013

2. 学会発表等

1) 金村優香、Peter Gee、[蝦名博貴](#)、Yoo Ji Seung、藤田尚志、小柳義夫： Novel function of SAMHD1 to involve in regulation of type I interferon induction. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年, 12 月 3-6 日(火-金)、神戸。

2) [Ebina H](#), Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. : Development of the CRISPR/Cas9 system editing for latent HIV-1 provirus. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 3-6 日(火-金)、神戸。

3) [蝦名博貴](#)、三沢尚子、金村優香、小柳義夫： ゲノム編集技術による潜伏 HIV プロウイルスの制御と除去. 第 27 回日本エイズ学会学術集会. 2013 年 11 月 20-22 日(水-金)、熊本。

4) 金村優香、Gee Peter、蝦名博貴、Yoo Ji Seung、藤田尚志、小柳義夫：I型 IFN 発現制御における SAMHD1 の新規機能の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 10-12 日(日-火)、神戸.

5) 蝦名博貴：ゲノム編集技術による潜伏 HIV プロウイルスの制御と除去. 第 3 回ゲノム編集研究会. 2013 年 10 月 26-27 日(土-日)、広島.

【報告書作成要領】

- 添付のファイル（添付の「分担報告書 鋳型」）を鋳型とする（余白は上下左右とも 25mm）。
- 「A. 研究目的」から「G. 研究発表」までを、4 ページ程度にまとめる。
- 文字の大きさは 10 ポイント（和文；MS 明朝、英数字；Times New Roman）
- 可能な範囲で図表を使ってください（結果か末尾に挿入してください）
- 論文 平成 25 年 4 月 1 日以降のものであることをご確認下さい。ご自身の名前に下線を引いて下さい。
* 健康危険情報（下記参照）がある場合は分担報告書には含めずに、別途ご報告下さい。

< 健康危険情報について >

- ・ 研究の結果、得られた成果の中で健康危険情報（国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものがある場合や、研究過程において健康危険情報を把握した場合には、国民の生命、健康に重大な影響を及ぼすと考えられる内容と理由を簡潔に記入するとともに、その情報源（研究成果、研究者名、学会発表名、雑誌等の詳細）について記述すること。
 - ・ 既に厚生労働省に通報した健康危険情報であっても、本研究報告書の提出の時点において健康危険情報に該当すると判断されるものについては記述すること。

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 ユニットリーダー）

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）

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宿主因子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わからないままである。そこで、VprがGagとESCRT分子群との相互作用に及ぼす影響を解明するためにGST pull down法を行った結果、Gag がTSG101およびAlixと結合することが証明された。さらにVprがGag とTSG101およびAlixとの結合をVprの濃度依存的に阻害する事を初めて明らかにした。細胞内での局在解析を行ったところ、Gag は細胞質に、Tsg101は細胞質および核膜に局在していた。両蛋白質を同時に強発現させると、Gagは核膜上でTsg101と共局在した。この共局在はVprを細胞に発現させると減少した。

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個の化合物を入手した。

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わからない。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、Vpr の、p6 と TSG101・Alix などの ESCRT 分子群との相互作用、Gag 蛋白質の輸送および粒子出芽、に及ぼす効果を解析する事、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、および Vpr と p6 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。Gag の新規治療標的部位および構造の提供が期待できる。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) Glutathione S Transferase (GST) pull down法と結合阻害実験:

大腸菌で精製したGST融合Gag (GST-Gag)およびHis融合Gag (His-Gag)とFlag融合Tsg101 (Flag-Tsg101)/pCAGGSベクターあるいはFlag融合Alix (Flag-Alix)/pCAGGSベクターをHeLa細胞へ導入後にFlagペプチドを用いて精製したFlag-Tsg101あるいはFlag-Alixを用いてGST pull-down法を行った。

この系に合成PTAPペプチドおよびFlag融合Vpr(Flag-Vpr)/pCAGGSベクターをHeLa細胞へ導入後にFlagペプチドを用いて精製したFlag-Vprで結合阻害実験を行った。

2) Gag, Tsg101およびVprの局在解析:

HA-Gag/pCAGGSベクター

Flag-Tsg101/pCAGGSベクター、

HA-Vpr/pCAGGSベクターをHeLa細胞へ導入して、抗-Gagおよび抗-Tsg101抗体で染色して、その局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

3) ELISA binding 法の構築: 低分子化合物をスクリーニングするために、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。

(倫理面への配慮) 無し

C. 研究結果

(1) Gag と TSG101・Alix などの ESCRT 分子群との相互作用および Vpr の効果の解析:

Flag-Alix および HA-Gag あるいは Flag-Tsg101 および GST-Gag の相互作用を GST pull-down 法で解析した。その結果、Gag は Alix および Tsg101 と各々結合することを確認した(図 1 A,B)。次に、その相互作用に及ぼす Vpr の効果を解析するために、細胞内で発現・精製した Vpr を添加して結合に及ぼす効果を解析した。その結果、Vpr が Gag と TSG101 および Gag と Alix の結合を各々、Vpr の添加量に依存的に競合阻害する事を初めて明らかにした(図 1 A-C)。続いて、同様の実験を Vpr 発現細胞抽出液で行うと、Vpr は Gag と TSG101 の結合を Vpr 発現細胞抽出液の量依存的に競合阻害した(図 1 D)。

(2) Gag, Tsg101 および Vpr の細胞内局在:

HA-Gag/pCAGGSベクターおよび Flag-Tsg101/pCAGGSベクター を HeLa 細胞へ導入して共焦点レーザー顕微鏡で解析したところ、Gag は細胞質に、Tsg101 は細胞質および核膜に局在していた(図 2)。次に、両蛋白質を同時に発現させると、Gag は Tsg101 と核膜上で共局在した。さらに、Gag と Tsg101 に加えて Vpr を細胞に同時に発現させると Gag の核膜への局在が減少した。一方、Alix を単独で細胞質に局在した。

(3) Vpr と Gag p6 の相互作用を標的とする新規阻害剤候補の探索:

新規抗 HIV-1 薬を開発するために、Gag と Tsg101 の結合を阻害する低分子化合物をスクリーニングする。まず、スクリーニングに用いるための ELISA binding 法を構築した。96 穴プレートに、抗 GST 抗体を固相化させ、精製した GST-Gag、さらに His-Tsg101 を結合させ、HRP 標識抗-Tsg101 抗体を反応後に基質で発色させ、450nm の吸光度を測定した。最初に、最適な GST-Gag と His-Tsg101 の蛋白質量を決定した。

次に、構築された系が、阻害効果を正確に測定出来るか否かを、Tsg101 の PTAP モチーフに結合して Gag と Tsg101 結合を競合的に阻害することが報告されている PTAP ペプチドを添加することによって調べた。PTAP ペプチドの添加により量依存的に、GST-Gag と His-Tsg101 の結合が阻害されたことから、構築された系が Gag と Tsg101

蛋白質の結合阻害を正確に測定できることが確認された。そこで、既に入手した構造多様性を考慮した 9600 個の化合物を含む Core Library 用いて、年度内にスクリーニングを開始する予定である。

D. 考察

多くの論文 (J Virol 2003. 77(17);9173; J Virol 2003. 77(11);6507; PNAS 2011. 108(37);E689)において、TSG101 の強発現は Gag trafficking と viral budding を阻害する事が報告されている。本研究では、細胞内で TSG101 を強発現させると Gag の核膜での凝集を誘導する事が示された。さらに、本研究において、Vpr が Gag と Tsg101 の相互作用を競合阻害することを初めて立証された。以上の結果から、HIV-1 感染細胞において、Vpr が Gag の核膜での凝集を阻害し、複製効率を上昇させている可能性が考えられた。

今後は Gag と Tsg101 および Gag と Alix との相互作用における生細胞内での Vpr の効果を時間的・空間的に明らかにする事、および Vpr の Gag と ESCRT 分子群との結合における競合阻害のメカニズムを解明する事を進めて行きたい。

E. 結論

(1) Gag は Tsg101 および Alix と結合した。Vpr は 2 つの相互作用を Vpr の量依存的に競合阻害した。その競合阻害効果は Vpr 発現細胞の抽出液でも起こった。

(2) 細胞内で強発現させると、Gag は細胞質に、Tsg101 は細胞質および核膜に局在した。両蛋白質を同時に強発現させると、Gag は核膜上で Tsg101 と共局在した。この共局在は Vpr を細胞に発現させると減少した。Alix の局在は細胞質であった。

(3) 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 個の化合物を入手した。

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. 学会発表等

1) Aida Y: Nuclear Import process as potential antiviral target for AIDS. 25th Workshop on Retroviral Pathogenesis. 2013 年 8 月 7-10 日(水-土)、Reykjavik Iceland

2) 村上裕信、萩原恭二、鈴木健博、堂前直、閻

陽子: 新規 Vpr 結合因子のプロテオミクス法による同定およびウイルス産生への影響. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 10-12 日(日-火)、神戸.

3) 村上知行、間陽子: HIV-1 Vpr による細胞周期 G2 期停止を制御する新規宿主因子 HIP1 の同定. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 10-12 日(日-火)、神戸.

4) 村上裕信、萩原恭二、鈴木健裕、堂前直、間陽子: プロテオミクス法により同定した新規 Vpr 結合因子 PRMT5/7 によるウイルス複製制御機構. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月 20-22 日(水-金)、熊本.

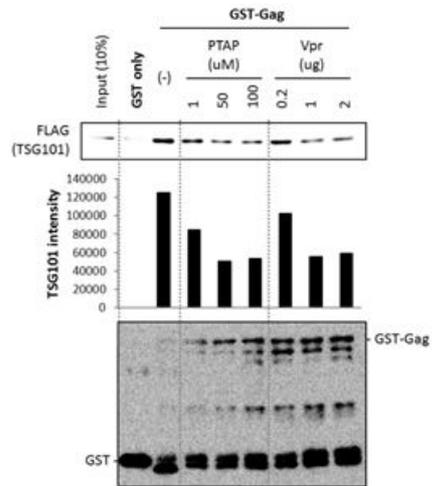
5) 村上知行、間陽子: Vpr による細胞周期 G2 期停止誘導能を制御する新規宿主因子 HIP1 の同定と解析. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013 年 11 月 20-22 日(水-金)、熊本.

6) 間陽子: 感染症へのあくなき挑戦 新しいエイズとインフルエンザ薬創製にむけて. 北海道医療大学・講演. 2013 年 12 月 16 日(日)、札幌.

7) Murakami T, Aida Y: Time-Lapse Imaging of Vpr-Induced Apoptosis at the G1 and M Phases after G2 Arrest. 2014 Palm Springs Symposium on HIV/AIDS. 2014 年 3 月 6-8 日(木-土)、Palm Springs, U.S.A.

Figure 1. Vpr inhibited Gag-TSG101 binding. (A) Purified GST-Gag beads, Flag-TSG101 and Flag-Vpr were co-incubated, pulled-down and washed before Western blotting. PTAP peptide was used as positive control. (B) Purified HA-Gag beads, Flag-AIP1 and Flag-Vpr were co-incubated, pulled-down and Western blotted. (C) Purified GST-Gag was co-incubated with Flag-TSG101/Flag-Vpr or pre-incubated with Flag-Vpr before adding Flag-TSG101. GST-Gag was pulled-down and Western blotted. (D) Purified GST-Gag and Flag-TSG101 were co-incubated with total cell lysate from Vpr-transfected cells before pulled-down and Western blotted.

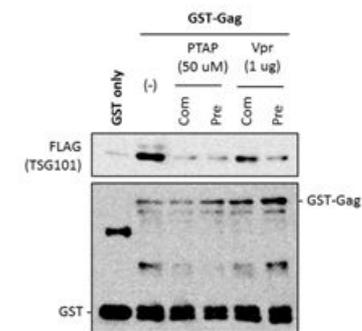
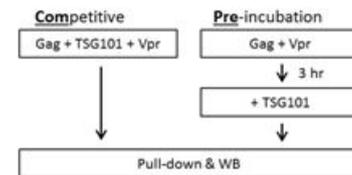
A



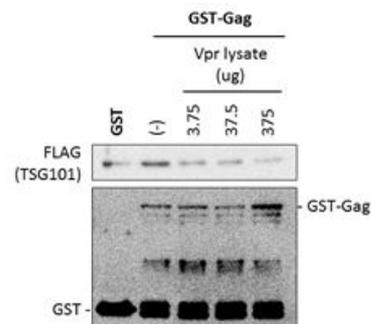
B



C



D



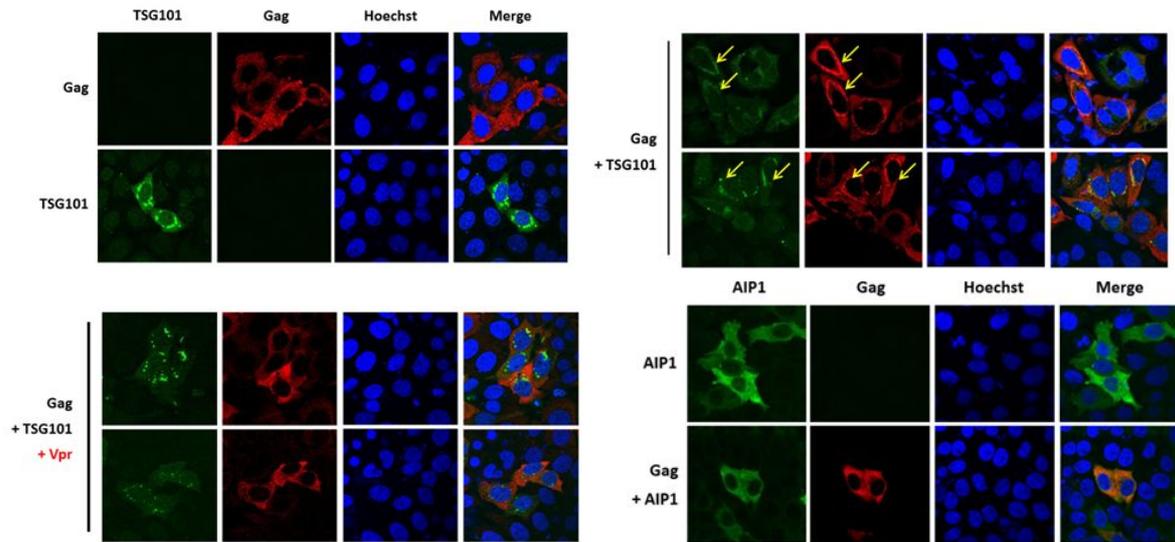


Figure 2. Vpr rescued TSG101 induces Gag aggregation at nuclear envelop. (A) HeLa cells were transfected with Gag or TSG101, stained with α Gag/Alexa594 or α TSG101/Alexa488. (B) HeLa cells were co-transfected with Gag and TSG101. (C) HeLa cells were co-transfected with Gag, TSG101 and Vpr. (D) HeLa cell were co-transfected with Gag and AIP1.

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（H25-エイズ-一般-003）（HIV 粒子パッケージングにおける Gag の機能に関する研究）

研究分担者：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 助教）

研究要旨

HIV の粒子形成蛋白である Gag の多様な機能の中で、ゲノムパッケージング反応に注目してヌクレオカプシド (NC) 蛋白及びそのカウンターパートであるゲノム RNA に着目して解析を試みた。ゲノムパッケージングはウイルスが感染伝播する上で最も重要なステップの一つであり、ウイルスゲノムを細胞内の多様な RNA 群から選別するその特異性・高効率性から抗ウイルス戦略における標的となる可能性がある。今年度は HIV-1 と HIV-2 で異なる可能性が示唆されてきたパッケージングのメカニズムについて、他のレンチウイルスも含めて検討した。また、多様性に富む HIV-1 の様々なサブタイプに着目し、二つのサブタイプを比較検討することで効率の良いパッケージングに働く責任領域の同定を試みた。

A. 研究目的

ウイルス粒子に自己のゲノムを取り込むゲノムパッケージングはウイルスのアイデンティティを確立するイベントであり、その生活環で最も重要なステップの一つである。HIVを含むレトロウイルスにおいてはポジティブ本鎖RNAゲノムの5'末端数百塩基がパッケージングシグナル (psi) として機能し、ウイルス粒子形成蛋白Gag中のヌクレオカプシド (NC) 領域と特異的に結合することによって起きると考えられる。レトロウイルスのRNAゲノムはウイルス粒子内で非共有結合を介して二量体化しており、psi内に二量体結合領域 (DLS) が存在する。パッケージングにあたってはDLS二量体の形成する特異的構造がpsiとしてNCに識別される可能性が指摘されている。

パッケージングは多種多様な細胞質内のRNA群からウイルスゲノムRNAのみを効率的かつ特異的に選別する精緻な反応であり、抗ウイルス戦略の標的となりうる。したがってHIVゲノム二量体化及びゲノムパッケージの機序及び機能的構造の解明はHIVの制圧の端緒となり、抗ウイルス剤及びワクチン開発を実施する科学的基盤を提供する。

本研究で分担者は、psiの必要十分領域に着目し、その内部の機能的構造に関して詳細な解析を行い、考察を加える。今回はpsi内に存在するGag翻訳開始コドンAUGの役割の探索、およびHIV-1のサブタイプの多様性を利用したpsiおよびNCの機能領域の検索を試みた。

B. 研究方法

HIV-1 プロウイルス型プラスミド pNL432、HIV-2 プロウイルス型プラスミド pGH123、SIVmac プロウイルス型プラスミド pMA239、SIVagm プロウイ

ルス型プラスミド pSA212 および HIV-1ELI 株感染細胞 DNA より PCR 増幅・クローニングした ELI 断片を母体として変異体を作成した。各プロウイルス型プラスミドの Gag もしくは Pol 領域に 7-10 アミノ酸の同義置換変異を導入し、コントロール用プラスミドとした。野生型塩基配列と同義置換変異配列をそれぞれリアルタイム PCR のプローブ標的部位として、FAM, HEX, ROX 同等色素、Cy5 等で 5' 末を、ダーククエンチャーで 3' 末を標識したものを合成してプローブとして用いた。パッケージングシグナルや Gag フレーム内に機能失活を意図した変異導入した変異体を多数作成した。

293T 細胞へのコトランスフェクションにより変異体とコントロールプラスミドを導入し、上清のウイルスと細胞内の RNA をそれぞれ精製してウイルスゲノム RNA 量をリアルタイム PCR によって測定してコントロールに対する変異体のウイルス粒子内取り込み効率をパッケージング効率として算出した。

ゲノム二量体化効率を算出するためには特殊な構造の変異体群を作成し、ウイルス粒子精製・RNA 抽出及びノザンプロットを行って解析した。

（倫理面への配慮）

倫理面への配慮を必要とする実験は行っていない。

C. 研究結果

1) レンチウイルスのGag-AUGのパッケージングに果たす役割と、翻訳とパッケージングの連鎖についての検討

レトロウイルスの非スプライス型RNAには構造蛋白Gag, Gag-Pol発現の鋳型としての役割と、パッケージされるゲノムとしての役割がある。従ってゲノムパッケージングのメカニズムとして翻訳鋳型となったRNAがパッケージされる（シス型）

翻訳鋳型はパッケージされず、パッケージ専用のRNAが存在する(トランス型)、パッケージされるRNAは翻訳の有無に因らない(ランダム型)の3通りの様式が考えられる(図1)。翻訳とパッケージングの関係を知るために非翻訳型RNAのパッケージング効率をも調べることが可能な実験系を構築し、解析を行った。

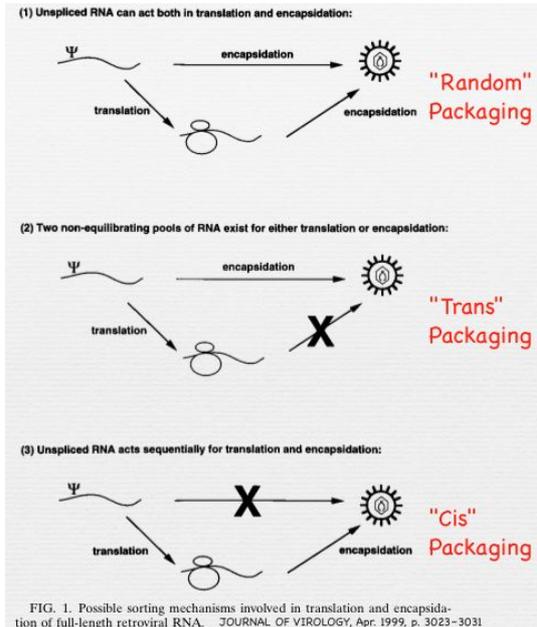


図1・レトロウイルスパッケージングの様式

霊長類レトロウイルスのGag-AUGはpsi内に存在し、psiのRNA二次構造モデルでは上流のCGUと相補鎖形成している。HIV-1においてこの相補鎖形成を妨げる置換変異をGag-AUGに導入した(UGC/CAG/CAU)結果、ゲノムパッケージング効率が60%程度に低下した。一方CGUとの相補鎖形成を妨げない変異をGag-AUGに導入して(ACG/GUG)このpsiの二量体形成能を測定すると効率低下は見られず、パッケージング能も野生株と同等であった(図2)。

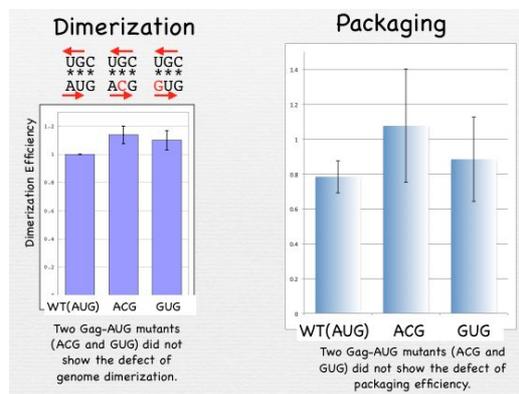


図2・HIV-1Gag-AUG変異体の二量体化及びパッケ

ーシング効率の計測

HIV-2, SIVmac, SIVagmに関しても同様にGag-AUGにACG/GUG変異体を作成してパッケージング能を測定した結果、程度の差はあるがどの変異体も効率の低下が観察された。しかしながらGag発現を途中で止めたいくつかの変異体においてはパッケージング効率の低下は観察されず、完全Gagの翻訳鋳型であることとパッケージングの対象となることは独立であると考えられた。

2) HIV-1サブタイプ間クロスパッケージングの解析によるpsi機能領域の探索

以前の解析において遺伝的距離の近さにもかかわらず、サブタイプBとDのクロスパッケージング効率(Bの粒子にDのpsiを持ったゲノムが取り込まれる効率)が悪いこと報告していた。今回はこの効率低下の責任領域がどこにあるのかを組換え体を作成して調べた。

サブタイプBとDのpsiでは14カ所の塩基が異なっていた。組換え実験の結果中央部のPBS下流の4塩基がD型だとパッケージング効率の減少が起きることが判明した(図3)。

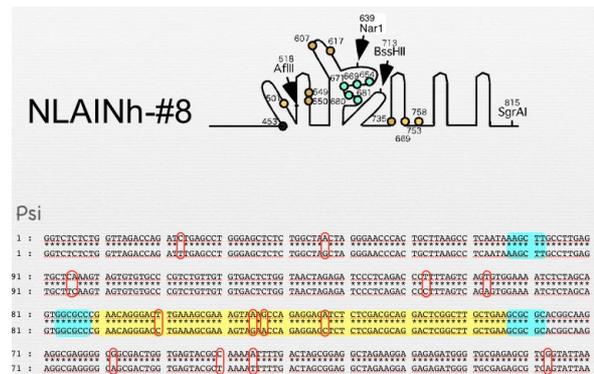


図3・パッケージングに影響を及ぼすサブタイプD由来の領域

パッケージングのトランス因子であるNC蛋白の配列に関して、B型とD型の間には8アミノ酸の違いがあるため、NCをD型に組み換えたウイルスを作成して同様の解析を行った。その結果D型NCを持つウイルスでもB型と同様にD型psiのパッケージング効率低下が見られた。

D. 考察

HIV-1ではこれまでの定説を裏付け、Gag翻訳とパッケージングは独立した事象として存在していると考えられた。HIV-2に関しては議論があったが、1型と同様にランダムパッケージング様式を支持する結果であった。SIVに関してはこれまで報告がなかったがHIVと同様の様式と考えられた。

なお、霊長類レンチウイルスではGag-AUGが翻訳ではなくpsiの機能構造に重要な役割を果たしていること、また、Gag-AUGがCGUと相補鎖を形成していることと仮定して、その相補鎖を維持した変異導入によってもパッケージング能が低下したことから、HIV-2とSIVに関してはGag-AUG周辺の構造が従来予測されてきた二次構造モデルとは異なる可能性が考えられた。

サブタイプ間クロスパッケージの結果から示唆されたパッケージング能低下に関わる領域はPBS下流の狭い領域であった。PBS付近は従来パッケージングには関係しないと考えられており、この結果は非常に興味深い。PsiとNCのサブタイプ型を一致させてもD型のパッケージング不全は回復しなかったが、過去の文献でD型の複製能が特に低いといった指摘は無く、D型の他のウイルス因子が補償に働いている可能性も考えられ興味深い。

E. 結論

霊長類レンチウイルスのパッケージング解析の結果から、すべてのウイルスにおいてGag翻訳とゲノムパッケージングは独立した事象であることが示唆された。またGag-AUGはすべてのウイルスのpsiの中で機能的構造を維持するために重要な役割を果たしていると考えられた。

サブタイプ間クロスパッケージングの結果からこれまで指摘の無かったPBS下流域にパッケージング効率を規定する領域が存在することが明らかとなった。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 櫻木 淳一 HIVの複製プロセス～ウイルスゲノムを中心として～

ウイルス 63, 175-186, 2013

2) Sudo S, Haraguchi H, Hirai Y, Gatanaga H, Sakuragi J, Momose F, Morikawa Y. Efavirenz enhances HIV-1 gag processing at the plasma membrane through Gag-Pol dimerization.

J Virol. 87, 3348-60, 2013

2. 学会発表等

1) Sakuragi J. Relationship between genome packaging and Gag translation of various mammal retroviruses.

25th Workshop on Retroviral Pathogenesis. August 7-10, 2013, Reykjavik, Iceland.

2) Sakuragi J. Virology. Training Course, The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity

Sep 10-13, 2013, Awaji, Japan.

3) 櫻木淳一・夏井洋和・櫻木小百合・塩田達雄 レンチウイルスの Gag 開始コドンおよび翻訳とゲノムパッケージングに関する解析

第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 10 日～12 日 神戸。

4) 櫻木淳一・櫻木小百合・塩田達雄 HIV サブタイプ比較によるゲノムパッケージングに関する解析

第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会 2013 年 11 月 20 日～22 日 熊本。

5) 櫻木淳一・夏井洋和・櫻木小百合・塩田達雄 レトロウイルスの GagAUG および翻訳とゲノムパッケージングに関する解析

第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日～6 日 神戸。

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

我々は有機合成化学・ケミカルバイオロジーを巧みに用いて、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行っている。本研究の目的は Gag に関連する抗 HIV 活性リード化合物の創出、候補分子の構造活性相関の情報基盤の提供、Gag 機能制圧、等である。今年度の研究成果は、1) カプシドタンパク質(CA)を網羅するペプチドライブラリーをすべて合成した。2) Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loop の環状ペプチド誘導体を合成した。3) 候補化合物の細胞内導入法を検討し、oligo-Arg 技術に加えて、stapling 技術の有用性を見出した。

A . 研究目的

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 CA 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。これにより、候補分子の構造活性相関の情報を得、Gag 機能制圧研究をおこなう。

B . 研究方法

1) CA 部分ペプチドライブラリーの設計、合成

全長 231 残基の CA タンパク質を N 末端側から 15 残基ずつに分割し、Sample 1~Sample 23 の CA 部分ペプチドライブラリーを設計した (表 1)。また、この分割の際に活性モチーフの分断を回避するため、5 残基ずつのオーバーラップ部分を設けた。さらに、スペーサーとして Gly、octa-Arg や 2-iodoacetamide との reaction point として Cys を導入した (図 1)。

表 1. CA 部分ペプチドの配列

	Sequence
S1	H ₂ N-PIVQNLQGQMVHQAIGC-CONH ₂
S2	Ac-HN-VHQAISPRTLNAWVKGC-CONH ₂
S3	Ac-HN-NAWVKVVEEKAFSPEGC-CONH ₂
S4	Ac-HN-AFSPEVIPMFSALSEGC-CONH ₂
S5	Ac-HN-SALSEGATPQDLNTMGC-CONH ₂

S6	Ac-HN-DLNTMLNTVGGHQAAGC-CONH ₂
S7	Ac-HN-GHQAAMQMLKETINEGC-CONH ₂
S8	Ac-HN-ETINEEAAEWDRLHPGC-CONH ₂
S9	Ac-HN-DRLHPVHAGPIAPGQGC-CONH ₂
S10	Ac-HN-IAPGQMREPRGSDIAGC-CONH ₂
S11	Ac-HN-GSDIAGTTSTLQEIQIGC-CONH ₂
S12	Ac-HN-LQEIQIGWMTHNPPIPGC-CONH ₂
S13	Ac-HN-NPPIPVGEIYKRWIIGC-CONH ₂
S14	Ac-HN-KRWIILGLNKIVRMYGC-CONH ₂
S15	Ac-HN-IVRMYSPTSILDIRQGC-CONH ₂
S16	Ac-HN-LDIRQGPKEPFRDYVGC-CONH ₂
S17	Ac-HN-FRDYVDRFYKTLRAEGC-CONH ₂
S18	Ac-HN-TLRAEQASQEVKNWMGC-CONH ₂
S19	Ac-HN-VKNWMTETLLVQNANGC-CONH ₂
S20	Ac-HN-VQANANPDSKILKALGC-CONH ₂
S21	Ac-HN-ILKALGPGATLEEMMGC-CONH ₂
S22	Ac-HN-LEEMMTASQVGGPGGC-CONH ₂
S23	Ac-HN-VGGPGHKARVLGC-CONH ₂

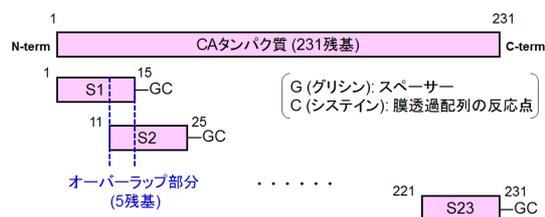


図 1. CA 部分ペプチドライブラリーの設計

CA 部分ペプチドは、Fmoc 固相合成法により合成した。合成の際に NovaSyn[®] TGR resin (novabiochem 社製) を用いて部分ペプチドの C 末端をアミド化し、最後に N 末端をアセチル化した。固相合成後、TFA によるアミノ酸側鎖の脱保護および脱樹脂を行った。その後、HPLC で精製を行い、ESI-TOF MS により目的物を同定した。合成スキームを図 2 に示す。

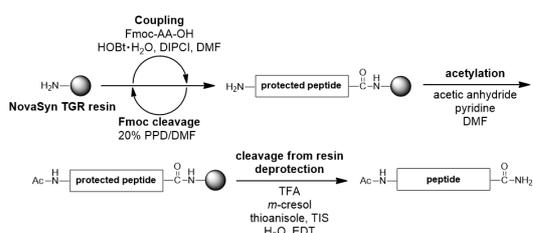


図 2. CA 部分ペプチドの合成スキーム

合成した CA 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 配列を付加した (Sample 1L~23L)。octa-Arg の N 末端にあるクロロアセチル基と CA 部分ペプチドの C 末端に導入した Cys のチオール基との化学選択的反応により合成した (ligation)。また、細胞膜透過性 CA 部分ペプチドに対するコントロールとして、C 末端の Cys のチオール基を 2-iodoacetamide でキャッピングしたコントロール

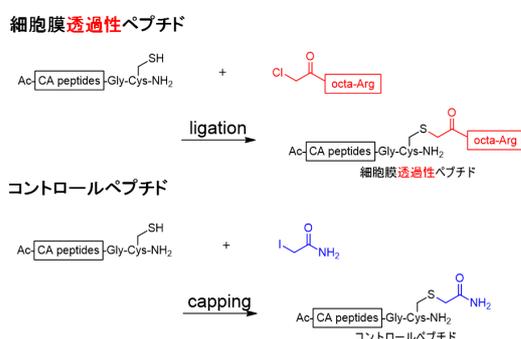


図 3. 細胞膜透過性 CA 部分ペプチドおよびコントロールペプチドの分子設計

ペプチド (Sample 1C~23C) も合成した (capping) (図 3)。

2) Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loop の環状ペプチド誘導体の合成

S9, S10 は CypA binding loop であることから、阻害活性をもつことが考えられる。しかし、S9, S10 がループの途中で分断しているため活性が出ない可能性がある。そこで、新たな部分ペプチドを設計し、同様に合成を行った(図 4)。

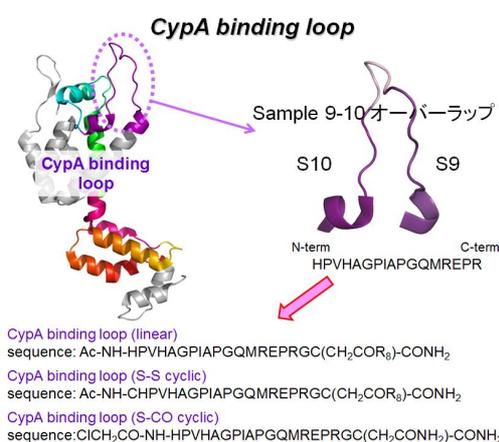


図 4. Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loop の環状ペプチド誘導体

3) 候補化合物の細胞内導入法としての stapling 技術の検討

近年、二次構造を維持した状態のペプチドを共有結合で架橋することにより、細胞膜を透過することができる stapling 技術が報告されている。さらに、このステイプルペプチド (staple peptide) は生体内の酵素にも安定であり、新しいペプチド医薬として期待されている。そこで、これから見いだされる CA 部分ペプチド由来の候補化合物の細胞内導入に応用できるかどうかを評価するため、ペプチド性インテグラーゼ阻害剤をリード化合物として、生体内安定性や細胞膜透過性の向上を目的と

したステイプルペプチドの検討を行った。側鎖にアリル基を有する非天然アミノ酸としてアルキルタイプとエーテルタイプの側鎖を有する2種類のアミノ酸を合成した。それらアミノ酸をペプチド性インテグラーゼ阻害剤のペプチド鎖2カ所にそれぞれ導入し、オレフィンメタセシス反応により架橋し、二次構造を安定化したステイプルペプチドを合成した(図5)。これらのペプチドの構造評価のためのCDスペクトルの測定、抗HIV活性試験、細胞膜透過性実験を行った。

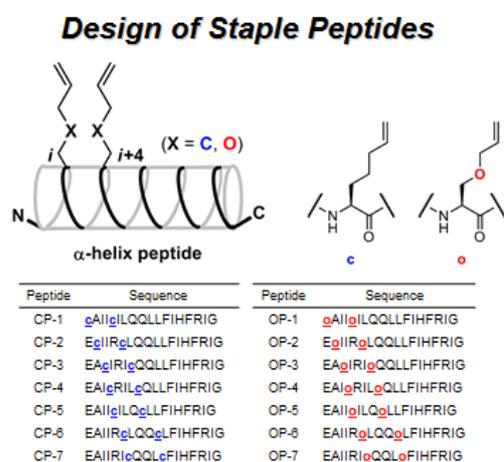


図 5. ペプチド性インテグラーゼ阻害剤を基にしたステイプルペプチドのデザイン

(倫理面への配慮)

今年度の研究に関して、倫理面に該当する事項はない。

C. 研究結果

1) CA 部分ペプチドライブラリーの設計、合成

今年度、CA 部分ペプチドライブラリーの合成をすべて終了した。合成した細胞膜透過性 CA 部分ペプチド 1L-23L の ESI-TOF MS のデータと収率を表 2 に示した。ほぼすべてのペプチドで収率よく、合成することができた。

表 2. 細胞膜透過性 CA 部分ペプチド 1L-23L の ESI-TOF MS データと収率

	calcd. for [M+H ⁺]	found	yield (%)
1L	3140.77	3141.84	57
2L	3226.86	3226.87	13
3L	3239.78	3239.99	34
4L	3131.68	3132.78	51
5L	3041.60	3041.65	64
6L	3048.63	3048.59	20
7L	3207.70	3207.65	82
8L	3316.73	3316.81	51
9L	3071.72	3071.69	85
10L	3104.70	3104.74	81
11L	3027.63	3027.64	62
12L	3267.77	3269.01	74
13L	3301.92	3301.87	49
14L	3410.04	3411.28	42
15L	3298.87	3298.82	34
16L	3339.86	3341.06	83
17L	3485.90	3485.91	32
18L	3297.78	3297.74	56
19L	3267.79	3267.83	35
20L	3118.80	3119.05	57
21L	3080.72	3080.79	43
22L	2970.54	2970.54	86
23L	2597.54	2597.47	69

2) Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loop の環状ペプチド誘導体の合成

本環状ペプチド誘導体に関しても同様に収率よく、合成することができた。また、同定は ESI-TOF MS 測定により行った。

3) 候補化合物の細胞内導入法としての stapling 技術の検討

octa-Arg ペプチドを付与したインテグラーゼ(IN)阻害活性ペプチド中の Phe6, Ile7, Phe9,

Ile11 が阻害活性の発現に重要であると考えられる。このペプチドに、アルキルタイプとエーテルタイプの側鎖を有する 2 種類の非天然アミノ酸を導入し、ステイブルペプチドを合成した。側鎖に酸素原子を含んでいる非天然アミノ酸の方はオレフィンメタセシス反応の効率が大幅に低下した。このことから、アルキルタイプの非天然アミノ酸の方がステイブルペプチド合成に適していると考えられた。また、CD スペクトルより、側鎖を架橋していないリニアペプチドよりも側鎖を架橋したステイブルペプチドの方がより高い α -ヘリックス性を有していた。抗 HIV 活性試験の結果では、いくつかのステイブルペプチドが活性を示した。また、蛍光基を導入したステイブルペプチドは、イメージングにより細胞膜透過性を有することが明らかになった。

D. 考察

有機合成化学・ケミカルバイオロジーの巧みな技術を用い、Gag を標的とする治療標的部位の探索のための目的化合物等を順調に設計、合成できた。

1) CA 部分ペプチドライブラリーの設計、合成

カプシドタンパク質(CA)を網羅するペプチドライブラリーのすべてを、抗 HIV 活性試験に供与できる十分量合成した。現在、分担研究者である村上博士に活性評価を依頼中である。

2) Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loop の環状ペプチド誘導体の合成

本環状ペプチド誘導体についても同様に抗 HIV 活性試験に供与できる十分量合成した。現在、分担研究者である村上博士に活性評価を依頼中である。

3) 候補化合物の細胞内導入法としての細胞内導入法の検討

ステイブル化により、細胞内で高い IN 阻害活性を有する Vpr 断片ペプチドを見出

した。これにより、細胞内導入法として細胞内導入法の有用性を示した。

E. 結論

Gag を標的とする治療標的部位の探索、抗 HIV 活性リード化合物の創出、候補分子の構造活性関連の情報基盤の提供を目指して、今年度は十分な研究成果を得た。具体的には、有機合成化学・ケミカルバイオロジーを巧みに用いて、1) カプシドタンパク質(CA)を網羅するペプチドライブラリーの合成、2) Cyp A binding loop/alternative Cyp A binding loop の環状ペプチド誘導体の合成、3) stapling 技術による候補化合物の細胞内導入法の確立等を行った。

抗ウイルス活性の測定実験に関して、国立感染症研究所エイズ研究センター、村上努室長、藤野真之博士にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

F. 知的所有権の取得状況

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 玉村啓和. ペプチドミメティックスを活用した抗HIV剤の創製. MEDCHEM NEWS(日本薬学会 医薬化学部会) 24(1)巻 頁14~19、2014年
- 2) Narumi T, Takano H, Ohashi N, Suzuki A, Furuta T, Tamamura H. Isostere-Based Design of 8-Azacoumarin-type Photolabile Protecting Groups: A Hydrophilicity Increasing Strategy for Coumarin-4-ylmethyls. *Org. Lett.* in press.
- 3) Hashimoto C, Narumi T, Otsuki H, Hirota Y, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, Tamamura H. A CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitor: Pharmacokinetics. *Bioorg. Med. Chem.* 21(24): 7884–7889, 2013.
- 4) Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Nakahara T, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. CXCR4-derived Synthetic Peptides Inducing Anti-HIV-1 Antibodies. *Bioorg. Med. Chem.* 21(22): 6878–6885, 2013.
- 5) Otsuki H, Hishiki T, Miura T, Hashimoto C, Narumi T, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S, Igarashi T. Generation of a Replication-competent Simian-human Immunodeficiency Virus, the Neutralisation Sensitivity of Which can be Enhanced in the

Presence of a Small Molecule CD4 Mimic. *J. Gen. Virol.* 94(12): 2710–2716, 2013.

6) Nomura W, Aikawa H, Ohashi N, Urano E, Metifiot M, Fujino M, Maddali K, Ozaki T, Nozue A, Narumi T, Hashimoto C, Tanaka T, Pommier Y, Yamamoto N, Komano J, Murakami T, Tamamura H. Cell-Permeable Stapled Peptides Based on HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Product. *ACS Chem. Biol.* 8(10): 2235–2244, 2013.

7) Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Tsutsumi H, Haseyama M, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. Anti-HIV-1 Peptide Derivatives Based on the HIV-1 Co-receptor CXCR4. *ChemMedChem* 8(10): 1668-1672, 2013.

8) Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Ohashi N, Fujino M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Multimerized CHR-derived Peptides as HIV-1 Fusion Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 21(15): 4452–4458, 2013.

9) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors: Lead Optimization Studies of the Aromatic Substituents. *Bioorg. Med. Chem.* 21(9): 2518–2526, 2013.

10) Narumi T, Aikawa H, Tanaka T, Hashimoto C, Ohashi N, Nomura W, Kobayakawa T, Takano H, Hirota Y, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Low Molecular Weight CXCR4 Ligands with Variable Spacers. *ChemMedChem* 8(1): 118-124, 2013.

11) Ohashi N, Nomura W, Narumi T, Tamamura H. Peptide-based Ligand Screening and Functional Analysis of Protein Kinase C. *Biopolymers: Peptide Science* 100(6): 613-620, 2013.

2. 学会発表等

(1) Tamamura H. Peptide-based Chemical Biology & Medicinal Chemistry. Joint Symposium between Chulalongkorn University and IBB/TMDU on Biomedical Materials and Engineering. Oct 25, 2013, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

(2) Tamamura H. Peptide-based Chemical Biology for the Elucidation of a Dimerization State of a GPCR CXCR4 and the Development of Recognition Probes for Cancerous Cells. The 17th Korean Peptide Protein Society Symposium. Nov 29, 2013, Seoul National University, Seoul, Korea.

(3) 玉村啓和:ケミカルバイオロジーとペプチド科学. 第17回ペプチドフォーラム - ケミカルバイオロジーを先導する明日のペプチド科学:新しい接点と可能性を探る -. 2013年6月18日、東京.

(4) 玉村啓和:HIV 感染防止 AIDS 発症防止についての基礎研究. 東京コンソーシアム教員研究セミナー - 大学院紹介講演会「疾患予防」 -. 2013年7月11日、東京.

(5) 玉村啓和:ターゲットタンパク質を特異的に認識するプローブの創製. 生命分子機能研究会2013 学術集会「生命分子・ペプチド創薬の医療へのインパクト」. 2013年9月19-20日、長浜.

(6) 玉村啓和:種々の作用点をターゲットとした抗HIV 剤の創製. 平成25年度厚生労働科学研究

費補助金 創薬基盤推進研究事業 第42回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「新しい作用機構の抗ウイルス薬開発への取り組み—ウイルス感染症に挑む—. 2013年12月9日、東京.

(7) Nomura W, Ohashi N, Métifiot M, Fujino M, Pommier Y, Murakami T, Tamamura H. Stapled Peptides as HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Products. The 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium/the 50th Japanese Peptide Symposium. Nov 6 -8, 2013, Osaka, Japan.

(8) Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Honda Y, Ohashi N, Fujino M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Multimerized C34-Related Peptides as HIV-1 Fusion Inhibitors. The 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium/the 50th Japanese Peptide Symposium. Nov 6 -8, 2013, Osaka, Japan.

(9) 橋本知恵、野村 渉、鈴木貴晴、鳴海哲夫、駒野 淳、村上 努、山本直樹、玉村啓和:HIV-1 外被タンパク質 gp41-CHR 三量体構造を模倣した膜融合阻害剤の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第8回年会. 2013年6月19-21日、東京.

(10) 松本大地、橋本知恵、高野 皓、藤野真之、相川春夫、野村 渉、村上 努、山本直樹、玉村啓和:ウイルスカプシド配列を基にした抗 HIV-1 ペプチドの創製. 日本ケミカルバイオロジー学会 第8回年会. 2013年6月19-21日、東京.

(11) 松本大地、橋本知恵、藤野真之、野村 渉、村上 努、山本直樹、玉村啓和:フォワードケミカルジェネティクスをウイルスカプシドに応用した抗 HIV-1 ペプチドの創製. 第57回日本薬学会関東支部大会. 2013年10月26日、東京.

(12) 野村 渉、橋本知恵、鳴海哲夫、藤野真之、村上 努、玉村啓和: HIV-1 外被タンパク質 gp41-CHR の二量体構造を基盤とした膜融合阻害剤の有用性. 第27回日本エイズ学会学術集会・総会. 2013年11月20-22日、熊本.

研究課題：Gag ペプチドを用いた Gag 機能部位の研究

分担研究者：村上 努（国立感染症研究所 エイズ研究センター 室長）

共同研究者：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：我々は、Gag 機能部位を明らかにするための基盤的研究として、ペプチド化学的手法によって合成した HIV-1 Gag 部分ペプチドの細胞内導入による HIV 複製制御の可能性を検討している。今年度はまず、HIV-1 MA 部分ペプチドライブラリーのスクリーニングから得られた MA 部分ペプチド 2C の抗ウイルス活性スペクトルと作用機序の検討を行った。その結果 2C は、1) MLV Env や VSV-G を介した HIV-1 コアの侵入を阻害しない、2) HIV-1 はサブタイプに関わらず一部の例外はあるがその感染を阻害する、3) HIV-2 や SIV の感染は阻害しない、4) time-of-addition 実験の結果から、その作用点は HIV-1 の CD4 結合後膜融合に至る過程である、と推定された。加えて、HIV-1 CA 部分ペプチドライブラリーの抗 HIV-1 活性を指標としたスクリーニングも実施した。その結果、X4、R5 HIV-1 のいずれのウイルスに対しても阻害活性を示す部分ペプチドが、1) 細胞膜透過性を付与しないペプチドのみ、2) 細胞膜透過性を付与したペプチドのみ、3) その両方のペプチドで阻害活性を示すという3通りの阻害パターンがあることが明らかになった。

A. 研究目的

Gag に関連する治療標的構造の解明 / 抗 HIV 活性リード化合物の開発につながる Gag 機能部位の同定と Gag 蛋白質による HIV 複製制御機構の解明を目的とする。期待される成果は、Gag 部分ペプチドの抗 HIV 活性評価およびその作用機序の解明による Gag 機能部位および治療標的候補因子の特定である。

B. 研究方法

(1) 各種 Env によるシュードタイプ HIV-1 の作製および感染実験：

293T 細胞に Env(-) の HIV-1 と HIV-1 (NL4-3) Env、A-MLV Env または VSV-G を共導入し、これらの Env によるシュードタイプ HIV-1 を作製した。得られたシュードタイプ HIV-1 を試験ペプチドまたはコントロール薬剤の存在下で TZM-bl 細胞に感染させ、感染 2 日後の luciferase 活性を測定することによって試験ペプチドの各種 Env によるシュードタイプ HIV-1 の侵入阻害活性を検討した。

(2) MA 部分ペプチド (2C) に関しては、その作用点を推定するためいわゆる "Time-of-addition" 実験を HIV-1 (NL4-3) Env を TZM-bl 細胞に感染させる系で行った。なお、コントロール薬剤として、吸着阻害剤 DS5000、

sCD4、CXCR4 阻害剤 AMD3100、HIV-1 膜融合阻害剤 T-20 (Enfuvirtide) と AZT を使用した。

(3) CA 部分ペプチド (CA の N 末より 15 残基ずつ 5 残基ずつオーバーラップさせて合成した。Octa-Arg を C 末に付与した細胞膜透過性ペプチドと付与しないコントロールペプチドのセット) を調製し、標的細胞 MT-4 と X4 HIV-1 である NL4-3 の感染系もしくは、標的細胞 PM1/CCR5 と R5HIV-1 である NL(AD8) の感染系で抗 HIV-1 活性および細胞毒性を MTT 試験によって測定した。なお NL(AD8) の感染系では、一部の部分ペプチドの抗 HIV-1 活性の評価を感染細胞培養上清中の p24 (CA) ELISA によっても評価した。

(倫理面での配慮)

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

C. 研究結果

(1) MA 部分ペプチド 2C による各種 Env によるシュードタイプ HIV-1 の感染阻害を検討実験：2C は HIV-1 (NL4-3) Env でシュードタイプした HIV-1 の TZM-bl 細胞への感染を用量依存的に阻害したが、A-MLV Env または VSV-G でシュードタイプした HIV-1 の感染を 12.5 μM においてもほ

ほとんど阻害しなかった(図1)。

(2) MA部分ペプチド2Cの抗ウイルススペクトルの検討: 2CはサブタイプA, B, Cの primary isolates に対して抗ウイルス活性を示したが、一部活性を示さない例外も認められた。興味深いことに、2CはHIV-2, Maraviroc 耐性 HIV-1 (感染研エイズ研究センター・吉村先生 data) や SIVmac239 に対して抗ウイルス活性を示さなかった。

(3) MA部分ペプチド2Cの作用点: Time-of-addition 実験の結果、2Cが抗HIV-1活性を示す作用点は、その作用点はHIV-1のCD4結合後膜融合に至る過程である、と推定された(図2)。

(4) CA部分ペプチドの抗HIV-1活性: X4, R5 HIV-1のいずれのウイルスに対しても阻害活性を示す部分ペプチドが、1)細胞膜透過性を付与しないペプチドのみ(19C)、2)細胞膜透過性を付与したペプチドのみ(1L, 6L)、3)その両方のペプチドで阻害活性を示す(15C, 15L)という3通りの阻害パターンを示す部分ペプチドがあることが明らかになった(表1、表2)。

D. 考察

(1) 予備的実験の結果も総合すると、MA部分ペプチド2Cは、標的細胞側に作用し、おそらくウイルスのCD4結合直後の過程を阻害することが推定される。

(2) CA部分ペプチドの fragment 15はCAのNTDとCTDの連結領域であり、HIV-1コアのアセンブリーなどに重要という報告もあり、このペプチドの作用機序に興味もたれる。

E. 結論

(1) MA部分ペプチド2CはHIV-1の侵入過程の解析に有用なプローブと考えられる。

(2) 抗HIV-1活性を有するCA部分ペプチドが複数得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Nakahara T, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H: CXCR4-derived synthetic peptides inducing anti-HIV-1 antibodies. *Bioorg Med Chem* 21(22):

6878-6885, 2013.

2) Nomura W, Aikawa H, Ohashi N, Urano E, Métifiot M, Fujino M, Maddali K, Ozaki T, Nozue A, Narumi T, Hashimoto C, Tanaka T, Pommier Y, Yamamoto N, Komano J, Murakami T, Tamamura H: Cell-Permeable stapled peptides based on HIV-1 Integrase Inhibitors derived from HIV-1 gene products. *ACS Chemical Biology* 8(10): 2235-2244, 2013.

3) Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Tsutsumi H, Haseyama M, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H: Anti-HIV-1 Peptide derivatives based on the HIV-1 co-receptor CXCR4. *Chem Med Chem* 8(10): 1668-1672, 2013.

4) Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Ohashi N, Fujino M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H: Multimerized CHR-derived peptides as HIV-1 fusion inhibitors. *Bioorg Med Chem* 21(15): 4452-4458, 2013.

5) Takemura T, Kawamata M, Urabe M, Murakami T: Cyclophilin A-dependent restriction to capsid N121K mutant human immunodeficiency virus type 1 in a broad range of cell lines. *J Virol* 87(7): 4086-4090, 2013.

2. 学会発表

1) 林 浩司、竹村太地郎、藤野真之、百瀬文隆、森川裕子、村上 努 . HIV-1 複製過程における Rab7 の機能解析 . 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10 日-12 日

2) 野村 涉、鳴海哲夫、橋本知恵、藤野真之、村上 努、玉村啓和 . HIV-1 外被タンパク質 gp41-CHR の二量体構造を基盤とした膜融合阻害剤の有用性 . 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2012 年 11 月 20 日-22 日

3) 村上 努、橋本知恵、藤野真之、鳴海哲夫、野村 涉、山本直樹、玉村啓和 . HIV-1 特異的侵入阻害剤として機能する MA 部分ペプチドの抗ウイルス活性作用機序の検討 . 第 27 回日本エイ

ズ学会学術集会・総会，熊本，2012年11月20日-22日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
該当事項なし。

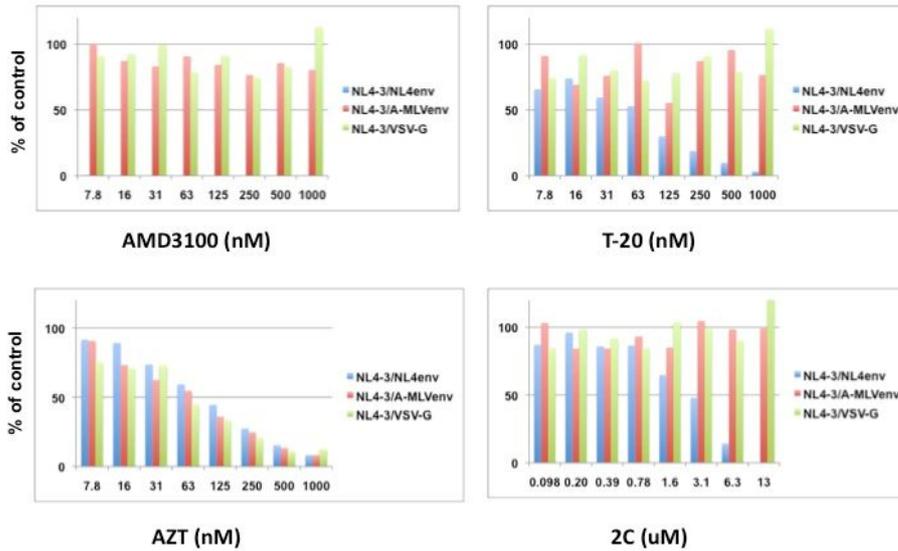
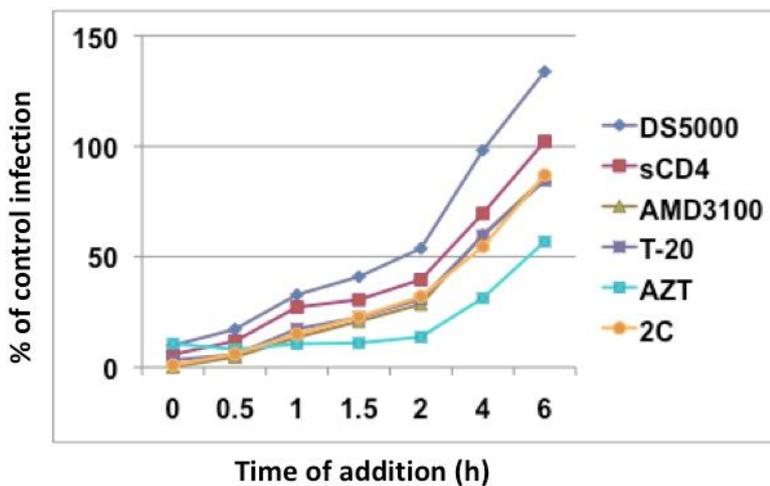


図1. MA部分ペプチド2CはHIV Env特異的にウイルスの標的細胞への侵入を阻害する



標的細胞: TZM-bl

ウイルス: NL4-3/NL4env (pseudovirion)

図2. MA部分ペプチド2CはHIV-1 侵入におけるCD4結合後膜融合に至る過程を阻害する

表1. CA部分ペプチド(コントロールペプチド)の抗HIV-1および細胞毒性

CA ペプチド	MT-4細胞		PM1/CCR5細胞	
	NL4-3 (X4 HIV-1)		NL(AD8) (R5 HIV-1)	
	EC50 (μM)	CC50 (μM)	EC50 (μM) (p24 ELISA)	CC50 (μM)
1C	>50	>50	ND	ND
2C	39% inh. at 50 μM	>50	ND	ND
3C	32	>50	ND	ND
4C	>50	>50	ND	ND
5C	>50	>50	ND	ND
6C	35	>50	ND	ND
7C	>50	>50	ND	ND
8C	23	>50	ND	ND
9C	>50	>50	ND	ND
10C	>50	>50	ND	ND
11C	>50	>50	ND	ND
12C	>50	>50	ND	ND
13C	>50	>50	ND	ND
14C	>22	22	ND	ND
15C	47	>50	27 (6.3)	>50
16C	36	>50	ND	ND
17C	>50	>50	ND	ND
18C	>50	>50	ND	ND
19C	18	>50	22 (5.0)	>50
20C	>50	>50	ND	ND
21C	>50	>50	ND	ND
22C	>50	>50	ND	ND
23C	>50	>50	ND	ND
15REC	20	>50	21(>50)	>50
CypAC	>50	>50	ND	ND
AZT	0.066	>50	0.3 (0.20)	>100
AMD3100	0.033	>50	>50 (>50)	>50
SCH-D (Viviviroc)	>5	>5	0.014 (0.0067)	>5

表2. CA部分ペプチド(細胞膜透過性付与ペプチド)の抗HIV-1および細胞毒性

CA ペプチド	MT-4細胞		PM1/CCR5細胞	
	NL4-3 (X4 HIV-1)		NL(AD8) (R5 HIV-1)	
	EC50 (μM)	CC50 (μM)	EC50 (μM) (p24 ELISA)	CC50 (μM)
1L	6.5	>50	6.2 (15)	>50
2L	8.8	>50	>50	>50
3L	50	>50	>50	>50
4L	41	>50	>50	>50
5L	35	>50	>50	>50
6L	12	>50	13 (4.3)	>50
7L	>50	>50	>50	>50
8L	15	>50	>50 (>50)	>50
9L	>50	>50	ND	ND
10L	35	>50	>50	>50
11L	>50	>50	ND	ND
12L	>50	>50	ND	ND
13L	>35	35	ND	ND
14L	>9	9	ND	ND
15L	4.6	9.3	1.2 (1.0)	18
16L	33	>50	>50	>50
17L	>25	25	ND	ND
18L	>50	>50	ND	ND
19L	>50	>50	>50	>50
20L	33	>50	>50	>50
21L	>50	50	ND	ND
22L	>50	>50	>50	>50
23L	>50	>50	ND	ND
15REL	>41	41	0.46 (0.68)	20
CypAL ¹	36	>50	>50	>50
CypAL ²	7.1	>50	>50	>50
CypAL ³	32	>50	>50	>50
AZT	0.066	>50	0.3 (0.20)	>100
AMD3100	0.033	>50	>50 (>50)	>50
SCH-D (Viviviroc)	>5	>5	0.014 (0.0067)	>5

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
佐藤 裕徳					
Burwitz B, Wu H, Reed J, Hammond K, Newman L, Bimber B, Nimiyoungskul F, Leon E, Maness N, Friedrich T, Yokoyama M, <u>Sato H</u> , Matano T, O'Connor D, Sacha J.	Tertiary mutations stabilize CD8+ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus.	J Virol			in press
Nomaguchi M, Miyake A, Doi N, Fujiwara S, Miyazaki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Yokoyama M, <u>Sato H</u> , Masuda T, Adachi A.	Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability.	J Virol			in press
Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, <u>Sato H</u> , 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			
Motozono C, Yokoyama M, <u>Sato H</u> , Ueno T.	Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths.	Microbes and Infection	S128 6-457 9	00266-9	2013
Koyama T, Arias JF, Iwabu Y, Yokoyama M, Fujita H, <u>Sato H</u> , Tokunaga K.	APOBEC3G Oligomerization is associated with the inhibition of both Alu and LINE-1 retrotransposition.	PLoS One	8	e84228	2013
Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H,	Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors.	J Virol	87	11447-61	2013

Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, <u>Sato H</u> , Adachi A.					
<u>Sato H</u> , Yokoyama M, Toh H.	Genomics and computational science for virus research.	Front Microbiol	4	42	2013
Tsuchiya K, Ode H, Hayashida T, Kakizawa J, <u>Sato H</u> , Oka S, Gatanaga H.	Arginine insertion and loss of N-linked glycosylation site in HIV-1 envelope V3 region confer CXCR4-tropism.	Sci Rep	3	2389	2013
Yuan Y, Yokoyama M, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, <u>Sato H</u> , Yusa K.	Structure and dynamics of the gp120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1JR-FL to maraviroc.	PLoS One	8	e65115	2013
Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, <u>Sato H</u> , Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H.	TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1.	J Gen Virol	94	1318-24	2013
Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov I, Hirsch VM, Yokoyama M, <u>Sato H</u> , Matsushita S.	Conformational epitope consisting of the V3 and V4 loops as a target for potent and broad neutralization of simian immunodeficiency viruses.	J Virol	87	5424-36	2013
Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, <u>Sato H</u> , Adachi A.	Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells.	Microbes Infect	15	319-28	2013
Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, <u>Sato H</u> , Adachi A.	Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. (NM and YM equally contributed to this work).	Microbes Infect	15	56-65	2013.
Kamiyama H, Kakoki K, Shigematsu S, Izumida M, Yashima Y, Tanaka Y, Hayashi H,	CXCR4-tropic, but not CCR5-tropic, human immunodeficiency virus infection is inhibited by the	AIDS Res Hum Retroviruses	29	279-88	2013

Matsuyama T, <u>Sato H</u> , Yamamoto N, Sano T, Shidoji Y, Kubo Y.	lipid raft-associated factors, acyclic retinoid analogs, and cholera toxin B subunit.				
野間口 雅子					
<u>Nomaguchi M</u> , 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 <i>pol</i> gene modulate viral replication ability.	J Virol			in press
Miyake A, Miyazaki Y, Fujita M, <u>Nomaguchi M</u> , Adachi A.	Role of poly-proline motif in HIV-2 Vpx expression.	Front Microbiol	25	24	2014
Miyake A, Fujita M, Fujino H, Koga R, Kawamura S, Otsuka M, Ode H, Iwatani Y, Sakai Y, Doi N, <u>Nomaguchi M</u> , Adachi A, Miyazaki Y.	Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation.	J Gen Virol	95	179-89	2014
<u>Nomaguchi M</u> , Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A.	Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors.	J Virol	87	11447-61	2013
Doi N, Okubo A, Yamane M, Sakai Y, Adachi A, <u>Nomaguchi M</u> .	Growth potentials of CCR5-tropic/CXCR4-tropic HIV-1mt clones in macaque cells.	Front Microbiol	4	218	2013
Saito A, <u>Nomaguchi M</u> , Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H.	TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1.	J Gen Virol	94	1318-24	2013
<u>Nomaguchi M</u> , Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari	Systemic biological analysis of the mutations in two distinct	Microbes Infect	15	319-28	2013

H, Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, Adachi A.	HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells.				
<u>Nomaguchi M</u> , Yokoyama M, Kono K, Nakayama, E.E, Shioda, T, Saito, A, Akari, H, Yasutomi, Y, Matano, T, Sato, H, Adachi, A.	Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells.	Microbes and Infection	15	56-65	2013
塩田 達雄					
Taya K, Nakayam EE, <u>Shioda T</u> .	Moderate restriction of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages.	PLoS One			Accepted.
Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, <u>Shioda T</u> , Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A.	Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors.	J Virol	87	11447-61	2013
Kono K, Takeda E, Tsutsui H, Kuroishi A, Hulme AE, Hope TJ, Nakayama EE, <u>Shioda T</u> .	Slower Uncoating Is Associated with Impaired Replicative Capability of Simian-Tropic HIV-1.	PLoS One	8	e72531	2013
Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, <u>Shioda T</u> , Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H.	TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1.	J Gen Virol	94	1318-24	2013
Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Nakayama EE, <u>Shioda T</u> , Yokoyama M, Sato H, Adachi A.	Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells.	Microbes Infect	15	319-28	2013
Nakayama EE,	A naturally occurring single	AIDS Res	29	919-24	2013

Nakajima T, Kaur G, Mimaya JI, Terunuma H, Mehra N, Kimura A, <u>Shioda T.</u>	amino acid substitution in human TRIM5 α linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection.	Hum Retroviruses			
Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, <u>Shioda T.</u> , Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A.	Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells.	Microbes Infect	15	56-65	2013
増田 貴夫					
Nomaguchi M, Miyake A, Doi N, Fujiwara S, Miyazaki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Yokoyama M, Sato H, <u>Masuda T.</u> , Adachi A.	Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability.	J Virol			in press
Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, <u>Masuda T.</u> , Tanaka Y, Utsunomiya A, Kannagi M.	Interferon-alpha (IFN-alpha) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN-alpha combined with zidovudine induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells.	Retrovirology	10	52	2013
梁 明秀					
Furukawa A, Sugase K, Morishita R, Nagata T, Kodaki T, Takaori-Kondo A, <u>Ryo A.</u> , Katahira M.	Quantitative Analysis of Location- and Sequence-Dependent Deamination by APOBEC3G Using Real-Time NMR Spectroscopy.	Angew Chem Int Ed Engl			in press
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, <u>Ryo A.</u>	The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions.	Retrovirology			in press
Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama	Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones	J Virol	87	11447-61	2013

EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, <u>Ryo A</u> , Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A.	that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors.				
蝦名 博貴					
<u>Ebina H</u> , Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y.	Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus	Sci Rep	3	2510	2013
岡 陽子					
Murakami T, <u>Aida Y</u>	Visualizing 1 Vpr-induced G2 arrest and apoptosis	PloS One	9	e86840	2014
櫻木 淳一					
<u>櫻木 淳一</u>	HIVの複製プロセス～ウイル スゲノムを中心として～	ウイルス	63	175-86	2013
Sudo S, Haraguchi H, Hirai Y, Gatanaga H, <u>Sakuragi J</u> , Momose F, Morikawa Y.	Efavirenz enhances HIV-1 gag processing at the plasma membrane through Gag-Pol dimerization.	J Virol	87	3348-60	2013
玉村 啓和					
Narumi T, Takano H, Ohashi N, Suzuki A, Furuta T, <u>Tamamura H</u> .	Isostere-Based Design of 8-Azacoumarin-Type Photolabile Protecting Groups: A Hydrophilicity Increasing Strategy for Coumarin-4-ylmethyls.	Org Lett			in press
Hashimoto C, Narumi T, Otsuki H, Hirota Y, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, <u>Tamamura H</u> .	A CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitor: Pharmacokinetics.	Bioorg Med Chem	21	7884-89	2013
Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Nakahara T, Yamamoto N, Murakami T, <u>Tamamura H</u> .	CXCR4-derived Synthetic Peptides Inducing Anti-HIV-1 Antibodies.	Bioorg Med Chem	21	6878-85	2013
Otsuki H, Hishiki T, Miura T, Hashimoto C,	Generation of a Replication-competent	J Gen Virol	94	2710-16	2013

Narumi T, <u>Tamamura H</u> , Yoshimura K, Matsushita S, Igarashi T.	Simian–human Immunodeficiency Virus, the Neutralisation Sensitivity of Which can be Enhanced in the Presence of a Small Molecule CD4 Mimic.				
Nomura W, Aikawa H, Ohashi N, Urano E, Metifiot M, Fujino M, Maddali K, Ozaki T, Nozue A, Narumi T, Hashimoto C, Tanaka T, Pommier Y, Yamamoto N, Komano J, Murakami T, <u>Tamamura H</u>	Cell-Permeable Stapled Peptides Based on HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Product.	ACS Chem Biol	8	2235–44	2013
Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Tsutsumi H, Haseyama M, Yamamoto N, Murakami T, <u>Tamamura H</u>	Anti-HIV-1 Peptide Derivatives Based on the HIV-1 Co-receptor CXCR4.	ChemMedC hem	8	1668-72	2013
Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Ohashi N, Fujino M, Murakami T, Yamamoto N, <u>Tamamura H</u>	Multimerized CHR-derived Peptides as HIV-1 Fusion Inhibitors.	Bioorg Med Chem	21	4452–58	2013
Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, <u>Tamamura H</u>	CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors: Lead Optimization Studies of the Aromatic Substituents.	Bioorg Med Chem	21	2518–26	2013
Narumi T, Aikawa H, Tanaka T, Hashimoto C, Ohashi N, Nomura W, Kobayakawa T, Takano H, Hirota Y, Murakami T, Yamamoto N, <u>Tamamura H</u>	Low Molecular Weight CXCR4 Ligands with Variable Spacers.	ChemMedC hem	8	118-24	2013
Ohashi N, Nomura W,	Peptide-based Ligand	Biopolymers	100	613-20	2013

Narumi T, <u>Tamamura H.</u>	Screening and Functional Analysis of Protein Kinase C.				
村上 努					
Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Nakahara T, Yamamoto N, <u>Murakami T</u> , Tamamura H	CXCR4-derived synthetic peptides inducing anti-HIV-1 antibodies.	Bioorg Med Chem	21	6878-85	2013
Nomura W, Aikawa H, Ohashi N, Urano E, Métifiot M, Fujino M, Maddali K, Ozaki T, Nozue A, Narumi T, Hashimoto C, Tanaka T, Pommier Y, Yamamoto N, Komano J, <u>Murakami T</u> , Tamamura H	Cell-Permeable stapled peptides based on HIV-1 Integrase Inhibitors derived from HIV-1 gene products.	ACS Chemical Biology	8	1668-72	2013
Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Tsutsumi H, Haseyama M, Yamamoto N, <u>Murakami T</u> , Tamamura H	Anti-HIV-1 Peptide derivatives based on the HIV-1 co-receptor CXCR4.	ChemMed Chem	8	1668-72	2013
Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Ohashi N, Fujino M, <u>Murakami T</u> , Yamamoto N, Tamamura H	Multimerized CHR-derived peptides as HIV-1 fusion inhibitors.	Bioorg Med Chem	21	4452-58	2013
Takemura T, Kawamata M, Urabe M, <u>Murakami T</u>	Cyclophilin A-dependent restriction to capsid N121K mutant human immunodeficiency virus type 1 in a broad range of cell lines.	J Virol	87	4086-90	2013
Checkley MA, Luttge BG, Mercredi, Kyere SK, Donlan J, <u>Murakami T</u> , Summers MF, Cocklin S, Freed EO.	Reevaluation of the requirement for TIP47 in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein incorporation.	J Virol	87	3561-70	2013
Narumi T, Aikawa H, Tanaka T, Hashimoto C, Ohashi N, Nomura W, Kobayakawa T, Takano H,	Low-molecular-weight CXCR4 ligands with variable spacers.	Chem Med Chem	8	118-24	2013

Hirota Y, <u>Murakami T</u> , Yamamoto N, Tamamura, H.					
--------------------------------------------------------------	--	--	--	--	--

書籍

著者氏名	論文 タイトル	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Nomura W, Ohashi N, Narumi T, <u>Tamamura H.</u>	Tag-Probe System for Imaging of Intracellular Proteins.	Michal Lebl (Eds.)	Proceedings of the Twenty-Thir d American Peptide Symposium	The American Peptide Society	Hawaii	2013	174-75
Nomura W, Tanaka T, Aoki T, Narumi T, <u>Tamamura H.</u>	Biological Effects of Bivalent-Type CXCR4 Ligands with Rigid Linkers.	Michal Lebl (Eds.)	Proceedings of the Twenty-Thir d American Peptide Symposium	The American Peptide Society	Hawaii	2013	176-77
Nomura W, Narumi T, Aikawa H, <u>Tamamura H.</u>	Development of Cell-Penetrating ZIP Tag-Probe Systems for Fluorescent Imaging of Protein Dynamics in Cells.	Kazuhisa Sugimura	Peptide Science 2012	The Japanese Peptide Society	Osaka	2013	113-14
Masuda A, Nomura W, <u>Tamamura H</u>	Quantitative Analysis of Sequence-Speci fic Reactions by Artificial DNA Recombinases.	Kazuhisa Sugimura	Peptide Science 2012	The Japanese Peptide Society	Osaka	2013	21-22
Hashimoto C, Nomura W, Komano JA, Tamamura H.	Synthesis of an Artificial gp41-C34 Trimer as an HIV-1 Fusion Inhibitor.	Kazuhisa Sugimura	Peptide Science 2012	The Japanese Peptide Society	Osaka	2013	45-46