

平成26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

HIVGag 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26年度

総括・分担研究報告書

平成27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)

研究組織

研究者名	分 担	所 属	役 職
佐藤 裕徳	研究代表者	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター	室 長
野間口雅子	研究分担者	徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部	准教授
塩田 達雄	研究分担者	大阪大学微生物病研究所 感染機構研究部門	教 授
増田 貴夫	研究分担者	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	研究分担者	横浜市立大学 医学部微生物学	教 授
蝦名 博貴	研究分担者	京都大学ウイルス研究所 附属ヒトレトロウイルス研究施設	助 教
間 陽子	研究分担者	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
櫻木 淳一	研究分担者	大阪大学微生物病研究所 感染機構研究部門	助 教
玉村 啓和	研究分担者	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所	教 授
村上 努	研究分担者	国立感染症研究所 エイズ研究センター	室 長
足立 昭夫	研究協力者	徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部	教 授
横山 勝	研究協力者	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター	主任研究官

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. HIV Gag ^{p24} カプシド蛋白質の治療標的候補部位の絞り込み	5
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	9
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	13
塩田 達雄 (大阪大学微生物病研究所)	
4. HIV ゲノム逆転写新規制御における Gag 蛋白質と関連因子	17
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	21
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	24
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	28
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 Gag 蛋白質とウイルスゲノム RNA との相互作用に関する解析	32
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	34
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	40
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(2014)	43

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）

1. 研究目的

HIV 感染症に苦しむ患者は現在も 3,000 万人を超える。治療法は格段に進歩し、感染者のエイズ発症を阻止できるようになった。しかし、現在の方法では HIV を完全に制御すること（治癒：cure）はできず、エイズを発症しなくても様々な問題が生じうる。引き続き、より良い制御法の開発に向けて基盤的研究を継続する必要がある。そこで本研究では、まだ治療標的となっていない HIV 「Gag」蛋白質に着目し、その構造、機能、変化能の理解を深め、新しい HIV 制御法を開発するための基盤を作る。

Gag 蛋白質は、HIV 粒子の主要な構造蛋白質として、ウイルス粒子形成と感染性維持、および細胞におけるウイルス複製の進行、など HIV 生活環全般に重要な役割を果たす。また自然免疫と獲得免疫の標的となる。有力な治療標的候補だが、この分子を標的とする HIV 制御法は確立していない。生細胞内における Gag の多彩な機能を評価する実験系の構築が難しいこともあり、一般には、機能部位を標的とする分子の論理的な設計、あるいは抗 HIV 分子の作用点や特異性の評価は難しい。

そこで本研究では、生命科学、及び異分野の先端技術を取り入れながら新たな Gag 解析プラットフォームを構築し、Gag 蛋白質の構造、機能、変化能に関わる新知見を集積し、得られた成果を基に抗 HIV 分子候補の設計、合成、改変を進め、低分子化合物等を利用した新しい HIV 制御法を開発するための情報・技術基盤を作る。

2. 研究方法

研究代表者の *in silico* 構造解析を軸に異種研究グループが連携して Gag 解析プラットフォームを構築する。これを用いて機能部位を同定し、構造特性と可変性を明らかにする。有力な弱点部位が見つければこれを標的とする分子を設計・合成し、抗 HIV 活性を評価する。

柱 1 . 構造解析研究 (計算科学) : コンピュータを用いる分子シミュレーションと数理解析の解析基盤を構築し、Gag 機能部位の保存される構造特性や相互作用を明

らかにする (佐藤 . 研究協力者 : 横山勝) 。

柱 2 . HIV 複製研究 (ウイルス学) : ライブイメージング等を活用して細胞内 Gag 前駆体の局在、ゲノム RNA との会合の場、細胞内動態、あるいは細胞に侵入した HIV コアの動態等を解析する実験系を構築し、変異導入解析や宿主因子の発現制御実験により、細胞における Gag 機能を制御するシス・トランス因子を明らかにする。研究代表者と共同で、Gag の機能を司る構造特性を明らかにする (塩田、蝦名、増田、野間口、間、梁、櫻木、佐藤) 。

柱 3 . 創薬シード探索 (ケミカルバイオロジー) : 有機合成化学の技術を用いて細胞内に導入可能な Gag 部分ペプチド誘導体のライブラリーを作製し、抗 HIV 活性を評価する。柱 1、2 の研究者と共同で、抗 HIV 分子候補の設計、合成、改変を進め、抗 HIV 活性を評価する (玉村、村上、佐藤) 。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え生物等を用いる実験については、所属機関の承認を得て、「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」を遵守して行なった。

3. 研究結果

(1) Gag カプシド (CA) 蛋白質の治療標的候補部位の選定 : 有力な治療標的候補部位として CA 蛋白質 α ヘリックス 9 (h9) を選別した。h9 由来ペプチド誘導体が抗 HIV 活性をもつ (玉村、村上) 。 h9 内に HIV/SIV で高度に保存されるトリプトファン残基 (W184) が存在し、疎水性相互作用のネットワークを形成することで CA 二量体の安定化に寄与する (佐藤) 。 h9 近傍の変異は、CA 二量体の不安定化、自然免疫エフェクター TRIM5 α への感受性亢進、感染者ウイルス量の低下につながる (塩田、佐藤、Vaccine. 2010, 28 Suppl 2: B60-7) 。

(2) HIV コア脱殻・逆転写の分子機序 : HIV コア脱殻の動態解析系の構築に成功し、TRIM5 α は侵入してきたコアを細胞質内で認識して破壊することで感染を阻害すること、Gag マトリクス蛋白質 (MA) の N 末変異が脱殻を促進し、同時にゲノム逆転写障害をも

たらずこと、等がわかった(塩田、村上)。HIV ゲノム逆転写の素過程の効率を定量解析する無細胞再構築系の樹立に成功し、逆転写反応の律速段階がストランド転移過程であること、Gagヌクレオカプシド(NC)は1stストランド転移効率を上昇させることがわかった(増田)。(3) 感染後期過程の分子機序: 細胞内のGag前駆体とHIV RNAを観測するライブイメージング系の構築に成功し、CAアミノ酸残基134と149がGag前駆体の細胞質膜での集合、細胞質輸送の制御部位であることがわかった(蝦名、野間口)。HIVゲノムパッケージングの独自解析系を構築し、HIVゲノムLTR SL1領域は未報告のバルジ・ループ・ステム機能構造をとることがわかった(櫻木)。Gag翻訳後修飾を司る宿主蛋白質を包括的に同定する実験系を構築し、Gag p6 Ser487がaPKCによりリン酸化されること、aPKC阻害剤がp6リン酸化の減弱を介してウイルス粒子感染性の低下に結びつくことがわかった(梁)。(4) 創薬シード探索: Tsg101-Gag p6結合阻害分子を同定した。これらの化合物はマクロファージでのウイルス複製を阻害した(間)。MAおよびCA部分ペプチドライブラリーの中から、抗HIV活性をもつものを特定した、二次構造を維持するように共有結合で架橋したステーブルペプチドは、細胞膜を透過することができ、細胞で抗HIV活性を示した(玉村、村上)。

4. 考察

柱1-3の異なるアプローチで得られた結果は、全て、CA蛋白質のh9がHIV/SIVの急所の一つであることを強く示唆した。W184を介する疎水性相互作用ネットワークを破綻させる分子を設計・合成できれば、ウイルス粒子形成や細胞内コア脱殻を阻害するHIV複製阻害剤のリード化合物が得られると期待される。

HIVの発見後30年を経たが、生細胞におけるGagの機能については未解決課題が多く残されている。Gagを標的とする制御法開発の蓋然性を高めるには、Gagの弱点となる機能の理解が不可欠となる。本研究の実施により、ライブイメージング等の技術を取り入れた細胞内Gag観察系の構築が進み、班員の共同研究でHIV複製制御機構の新知見が集積した。いずれも、今後の解析結果次第で、治療標的部位の同定に結びつく。本研究の継続により、異種分野が連携する新たなGag解析プラットフォームの構築が進み、Gag機能を制御するシス・トランス制御因子の新たな新知見が蓄積し、Gagを標的とする新しいHIV制御法の開発・情報基盤が形成されると期待される。

5. 自己評価

1) 達成度について

当初計画は順調に達成された。*in silico*構造解析を軸に異種研究グループが有機的に連携するGag解析プラットフォームの構築が順調に進み、HIV複製におけるGagの機能と自然免疫エフェクターの作用機構に関する新知見が集積し、治療標的部位候補の構造特性と変化能の解析が進んだ。特にGag CA蛋白質について、HIVの弱点候補が特定された。これらの研究活動により、Gagを標的とする創薬シード探索の情報・技術基盤の構築が進んだ。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究では、異種分野連携によりHIV複製研究に新たな道を開き、成果をHIV制御戦略の構築に活用する。この試みは、世界的にも極めてユニークである。研究を通じて種々の新しいGag解析手法が創成され、Gagの構造・機能・進化の特徴とHIV複製機構の理解が深まる。これによりGagを標的とするHIV制御法を論理的に開発する新しい技術・情報基盤が構築される。すでに種々の新たなGag機能アッセイ系の構築に成功し、有力な治療標的候補を同定する、などの成果を得ている。ウイルス学の進展を通じて科学と技術の進展と普及に寄与することから、学術的、国際的な意義が高い。さらに、新たなHIV制御戦略の構築に貢献する点から社会的意義も高い。

3) 今後の展望について

異種分野連携基盤の構築も順調に進み、HIVの弱点と目されるGag CA蛋白質の相互作用を明らかにしていることから、新しいHIV制御法の開発基盤を作るとの当初目標の達成は可能と考えられる。最終年度は、柱1-3のGag CAの成果を基に創薬シード探索を行う。一方、依然としてGagの機能に不明な点が多く、未同定の治療標的部位が存在する可能性も高い。このため引き続き柱1-3の研究を継続し、HIVの弱点候補を探索する。

6. 結論

ウイルス学・計算科学・ケミカルバイオロジーが有機的に連携する独自性の高いGag解析基盤の構築が順調に進み、Gag機能を制御するシス・トランス制御因子の構造と可変性の知見が順調に蓄積した。また、Gag CAの有力な弱点部位候補が判明し、その構造特性も明らかになった。これらの研究成果により、Gagを標的とするHIV制御法を開発する蓋然性が高まった。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

該当無し。

研究発表

研究代表者

佐藤裕徳

- 1) Nomaguchi, M., Nakayama, E.E., Yokoyama, M., Doi, N., Igarashi, T., Shioda, T., Sato, H., and Adachi, A. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 α . *Microbes Infect.* Nov; 16(11) : 936-944, 2014.
- 2) Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., Tsunetsugu, Y., Yokoyama, M., Sato, H., Masuda, T., and Adachi, A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. *J Virol.* Apr; 88(8) : 4145-4160, 2014.
- 3) 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., and Sacha, J. Tertiary mutations stabilize CD8⁺ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol.* Mar; 88(6) : 3598-3604, 2014.
- 4) 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., and Ryo, A. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology.* Jan 22; 11(1) : 9, 2014.
- 5) Motozono, C., Yokoyama, M., Sato, H., and Ueno, T. Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths. *Microbes Infect.* Apr; 16(4) : 320-327, 2014.

研究分担者

塩田達雄

- 1) Hayasaka, H., Kobayashi, D., Yoshimura, H., Nakayama, E.E., Shioda, T., and Miyasaka, M. The HIV-1 gp120/CXCR4 axis promotes CCR7 ligand-dependent CD4 T cell migration: CCR7 homo- and CCR7/CXCR4 hetero-oligomer formation as a possible mechanism for up-regulation of functional CCR7. *PLoS One* 2014 Accepted.
- 2) Nomaguchi, M., Nakayama, E.E., Yokoyama, M., Doi, N., Igarashi, T., Shioda, T., Sato, H., and Adachi, A. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 α . *Microbes infect.* 16(11) : 936-944, 2014.
- 3) Taya, K., Nakayama, E.E., and Shioda, T. Moderate restriction of macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 9(3) : e90969, 2014.

増田貴夫

- 1) Kinpara, S., Itoh, S., Takahata, T., Saitoh, Y., Hasegawa, A., Kijiyama, M., Utsunomiya, A., Masuda, M., Miyazaki, Y., Matsuoka, M., Nakamura, M., Yamaoka, S., Masuda, T., and Kannagi, M. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and anti-sense viral RNA in the constitutive NF κ B activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Leukemia* (in press).
- 2) Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., Tsunetsugu, Y., Yokoyama, M., Sato, H., Masuda, T., and Adachi, A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. *J Virol.* 88:4145-4160, 2014.

野間口雅子

- 1) Doi, N., Adachi, A., and Nomaguchi, M. Growth properties of macaque-tropic HIV-1 clones carrying vpx/vpr genes from simian immunodeficiency viruses in place of their vpr regions. *Journal of Medical Investigation* 61: 374-379, 2014.
- 2) Nomaguchi, M., Nakayama, E.E., Yokoyama, M., Doi, N., Igarashi, T., Shioda, T., Sato, H., and Adachi, A. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 α . *Microbes and Infection* 16: 936-944, 2014.
- 3) Nomaguchi, M., Doi, N., and Adachi, A. Virological characterization of HIV-2 vpx gene mutants in various cell systems. *Microbes and Infection* 16: 695-701, 2014.
- 4) Miyake, A., Miyazaki, Y., Fujita, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. Role of poly-proline motif in HIV-2 Vpx expression. *Frontiers in Microbiology* 5: 24. doi: 10.3389/fmicb.2014.00024, 2014.
- 5) Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., Yokoyama, M., Tsunetsugu, Y., Sato, H., Masuda, T., and Adachi, A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. *Journal of Virology* 88: 4145-4160, 2014.
- 6) Miyake, A., Fujita, M., Fujino, H., Koga, R., Kawamura, S., Otsuka, M., Ode, H., Iwatani, Y., Sakai, Y., Doi, N., Nomaguchi, M., Adachi, A., and Miyazaki, Y. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient

translation. *Journal of General Virology* 95: 179-189, 2014.

梁 明秀

- 1) Watashi, K., Sluder, A., Daito, T., Matsunaga, S., Ryo, A., Nagamori, S., Iwamoto, M., Nakajima, S., Tsukuda, S., Borroto-Esoda, K., Sugiyama, M., Tanaka, Y., Kanai, Y., Kusuhara, H., Mizokami, M., and Wakita, T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Hepatology* 59:1726-1737, 2014.
- 2) Kurotaki, D., Yamamoto, M., Nishiyama, A., Uno, K., Ban, T., Ichino, M., Sasaki, H., Matsunaga, S., Yoshinari, M., Ryo, A., Nakazawa, M., Ozato, K., and Tamura, T. IRF8 inhibits C/EBP α activity to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. *Nat Commun.* 5:4978, 2014.
- 3) Nishi, M., Akutsu, H., Kudoh, A., Kimura, H., Yamamoto, N., Umezawa, A., Lee, S.W., and Ryo, A. Induced cancer stem-like cells as a model for biological screening and discovery of agents targeting phenotypic traits of cancer stem cell. *Oncotarget* 5:8665-8680, 2014.
- 4) Okayama, A., Miyagi, Y., Oshita, F., Nishi, M., Nakamura, Y., Nagashima, Y., Akimoto, K., Ryo, A., and Hirano, H. Proteomic Analysis of Proteins Related to Prognosis of Lung Adenocarcinoma. *J Proteome Res.* 13:4686-4694, 2014.
- 5) 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., and 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.
- 6) Furukawa, A., Sugase, K., Morishita, R., Nagata, T., Kodaki, T., Takaori, A., Ryo, A., and Katahira, M. Quantitative analysis of the location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 53:2349-2352, 2014.
- 7) Nishi, M., Sakai, Y., Akutsu, H., Nagashima, Y., Quinn, G., Masui, S., Kimura, H., Perrem, K., Umezawa, A., Yamamoto, N., Lee, S.W., and Ryo, A. Induction of cells with cancer stem cell properties from nontumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene.* 33:643-652, 2014.

岡陽子

- 1) Hagiwara, K., Ishii, H., Murakami, T., Takeshima, S-n., Chutiwitoonchai, N., Kondo, Y., Honda, K., Osada, H., Tsunetsugu-Yokota, Y., Suzuki, M., and Aida, Y. Synthesis of a Vpr-binding derivative for use as a novel HIV-1 inhibitor. *Antivirus Res.*, in press.
- 2) Murakami, T., and Aida, Y. Visualizing 1 Vpr-induced G2 arrest and apoptosis. *PloS ONE* 9(1):e86840, 2014.
- 3) Zahoor, M. A., Xue, G., Sato, H., Murakami, T., Takeshima, S-n., and Aida, Y. Visualizing 1 Vpr-induced G2 arrest and apoptosis. *PloS ONE* 9(8):e106418, 2014.
- 4) Miyatake, H., Sanjoh, A., Unzai, S., Matsuda, G., Tatsumi, Y., Miyamoto, Y., Dohmae, N., and Aida, Y. Crystal structure of human importin- α 1 (Rch1), revealing a potential autoinhibition mode involving homodimerization. *PloS ONE* 9(8):e106418, 2014.

玉村善和

- 1) Masyuk, M., Abduekmula, A., Morosan-Puopolo, G., Ödemis, V., Rehimi, R., Khalida, N., Yusuf, F., Engele, J., and Tamamura, H. Carsten Theiss & Beate Brand-Saberi, Retrograde Migration of Pectoral Girdle Muscle Precursors Depends on CXCR4/SDF-1 Signaling. *Histochem. Cell. Biol.* 142(5): 473-488, 2014.
- 2) Yamamoto, J., Maeda, N., Komiya, C., Tanaka, T., Denda, M., Ebisuno, K., Nomura, W., Tamamura, H., Sato, Y., Yamauchi, A., Shigenaga, A., and Otaka, A. Development of a Fluoride-responsive Amide Bond Cleavage Device that is Potentially Applicable to a Traceable Linker. *Tetrahedron* 70(34): 5122-5127, 2014.
- 3) Takano, H., Narumi, T., Ohashi, N., Suzuki, A., Furuta, T., Nomura, W., and Tamamura, H. Development of the 8-Aza-3-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl Group as a New Entry of Photolabile Protecting Groups. *Tetrahedron* 70(29): 4400-4404, 2014.
- 4) Yamamoto, J., Denda, M., Maeda, N., Kita, M., Komiya, C., Tanaka, T., Nomura, W., Tamamura, H., Sato, Y., Yamauchi, A., Shigenaga, A., and Otaka, A. Development of a Traceable Linker Containing a Thiol-responsive Amino Acid for the Enrichment and Selective Labelling of Target Proteins. *Org. Biomol. Chem.* 12(23): 3821-3826, 2014.
- 5) Narumi, T., Tsuzuki, S., and Tamamura, H. Imidazolium Salt-Catalyzed Friedel-Crafts-Type Conjugate Addition of Indoles: Analysis of Indole/Imidazolium Complex by High Level ab Initio Calculations. *Asian J. Org. Chem.* 3(4): 497-503, 2014.
- 6) Narumi, T., Takano, H., Ohashi, N., Suzuki, A., Furuta, T., and Tamamura, H. Isostere-Based Design of 8-Azacoumarin-type Photolabile Protecting Groups: A Hydrophilicity Increasing Strategy for Coumarin-4-ylmethyls. *Org. Lett.* 16(4): 1184-1187, 2014.

研究課題： HIV Gag^{p24} カプシド蛋白質の治療標的候補部位の絞り込み

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 室長）
研究協力者：横山 勝（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官）
玉村 啓和（東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授）
村上 努（国立感染症研究所 エイズ研究センター 室長）
塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所 教授）

研究要旨

柱1-3の連携により、HIV Gag^{p24} カプシド蛋白質の有力な治療標的候補部位を絞り込んだ。
-helix 9(h9)は、W184を介する疎水性相互作用により HIV コアの安定化に重要な役割を果たしている。
W184は、HIV/SIVで極めて高度に保存されている。玉村・村上らが報告した抗 HIV ペプチド誘導体（19L；玉村らの分担報告書参照）は、h9に合致する。Cotten、塩田、佐藤らが報告した HIV-2 CA CTD 変異（CA 二量体の不安定化、TRIM5 α 感受性亢進、感染者血中ウイルス量の低下を誘起する変異；Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7）は、h9に近接している。以上の結果と既報のウイルス学・免疫学情報は、h9のW184が介する疎水性相互作用が HIV/SIVの急所の一つであることを強く示唆する。

A. 研究目的

HIV Gag蛋白質は、HIV粒子の主要な構造蛋白質として、ウイルス粒子形成と感染性維持、および細胞におけるウイルス複製の進行、などHIV生活環全般に重要な役割を果たす。また自然免疫と獲得免疫の標的となる。有力な治療標的候補だが、この分子を標的とするHIV制御法は確立していない。本研究では、Gag蛋白質の一つ「Gag^{p24} カプシド蛋白質」の構造・機能・可変性の理解を基に、治療標的部位の論理的な特定を試みた。

B. 研究方法

(1) 多様性解析：ロス・アラモス研究所（HIV databases <http://www.hiv.lanl.gov/content/index>）より HIV-1/SIVcpz Gag 全長アミノ酸配列（n=6,225）と HIV-2/SIVsmm のそれ（n=101）を取得し、既法（Yokoyama et al., Front Microbiol. 2012, 3:312など）で、個々のアミノ酸残基の Shannon 情報エントロピーを計算した。

(2) 構造解析：コア安定化に寄与する相互作用は、HIV-1 コア構造情報（成熟型）（Zhao G et al., Nature 497,643-646, 2013）を材料として、MOE (Chemical Computing Group Inc., Montreal, Quebec, Canada) を用いて探索した。カプシド二量体の安定性は、二量体の結合エネルギー

（ $E_{bind} = E_{dimer} - 2E_{monomer}$ ）を指標として数値化した（Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7）。

(3) CA部分ペプチド誘導体の合成と抗 HIV 活性評価：合成は玉村らの研究グループ、活性評価は村上らの研究グループが行った。詳細は、分担研究報告書（玉村）に記載されている。

(4) HIV-2のTrim5 感受性の解析：塩田らの研究グループ（柱2）が実施した。MT4にTrim5 発現用センダイウイルスとHIV-2を重感染させ、培

養上清に放出されるGag CA量をELISAで測定した（Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7）。

（倫理面への配慮）

遺伝子組換え生物等を用いる実験については、所属機関の承認を得て、「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」を遵守して行なった。

C. 研究結果

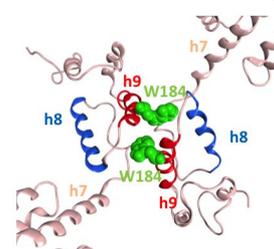
構造解析（図1；成熟コア中のCA CTDドメイン二量体境界面の構造）：現時点で得られる最も精密なHIV-1コア構造情報（成熟型）を材料とし、MOEを用いてコア安定性に寄与する相互作用を探索した。その結果、当初想定していたCAヘキサマー間には強い相互作用は認められなかった。一方でCAのC末ドメイン（CTD）の -helix 9(h9)のW184が介する強い疎水性相互作用ネットワークが見出された。このネットワークを基盤としてCA二量体と六量体の安定化がおき、その後弱い相互作用でコアが安定化すると考えられる。

図1. 構造解析(柱1)

コアの安定化に重要なアミノ酸残基の探索



コアの窪み (CA CTD dimer interface) の構造

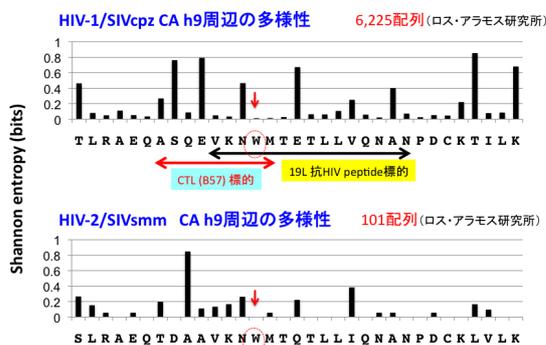


“W184”を介する「疎水性相互作用」で安定化

多様性解析 (図 2): ロス・アラモス研究所に登録されている HIV-1/SIVcpz (n=6, 225) および HIV-2/SIVsmm (n=101) の CA 全長配列のアライメント情報を用い、個々のアミノ酸サイトの情報エントロピーを調べた。その結果、W184 残基は情報エントロピーがほぼ 0 で、情報の揺らぎが無いことがわかった。すなわち W184 残基は HIV/SIV 集団において極めて高度に保存されている。サル、並びにヒトで感染・増殖を繰り返す過程で変化することのできないアミノ酸残基と考えられる。

図2. 多様性解析 (柱1)

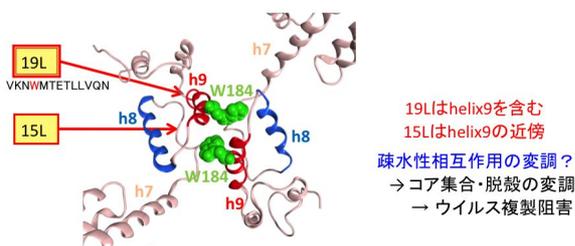
“W184” は、長期に渡る HIV/ SIV の増殖や流行の間に変化しない(できない)



ケミカルバイオロジー (玉村、村上らの分担研究報告書、及び図 3): 玉村・村上らは、 HIV-1 CA 全長を網羅する合成ペプチドライブラリーを構築し、培養細胞を用いた HIV 感染系で個々のペプチドの抗 HIV 活性を評価した。抗 HIV 活性をもつペプチドが CA の立体構造上でどの領域に位置するのかを MOE を用いて調べた。その結果、19L は、h9 にほぼ一致することがわかった。また他の CTD 由来抗 HIV ペプチド誘導体 (15L) も、h9 の近傍に位置することがわかった。これらのペプチドは、h9 が介在する疎水性相互作用の変調を誘起することで抗 HIV 活性を発現する可能性が示唆された。なお、15L は細胞障害性があることから、CA 以外の分子を標的にしている可能性もある。

図3. ケミカルバイオロジー (柱3)

CA CTD 由来抗 HIV ペプチド誘導体 (15L と 19L) は、h9 近傍に位置する

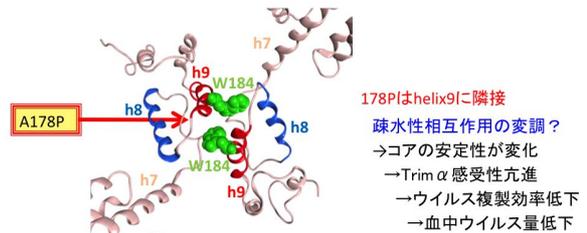


構造生物学研究 (図 4): Cotton M、塩田、佐藤らは、 HIV-2 感染者の CA 蛋白質 CTD ドメイン生じる 3 種の変異 (A119P, S159P, A178P) の構造生物学的意義を調べた。その結果、これらの変異が CA 二量体の不安定化、自然免疫エフェクター TRIM5 α への感受性亢進、感染者の血中ウイルス量の低下を誘起することを見出した (Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7)。今回、これらの変異の立体構造上での位置を調べた。これらは CTD 7-h9 の間に生じ、立体構造上は h9 に近接しており、その 1 つ (A178P) は h9 に隣接することがわかった。

また、その周辺は、感染者のウイルス量を制御する活性をもつ CTL エピトープ B57 の標的となっていることもわかった (図 2)。これらの変異は感染者におけるウイルスの適応度を低下させる。それにもかかわらず一部の感染者で維持されるのは、CTL が強い選択圧として働き、HIV はまず増殖能を犠牲にしても CTL を逃避する必要があるからかもしれない。

図4. 構造生物学 (柱1 & 2)

血中ウイルス量、Trim5 α 感受性、CA 二量体安定性を制御する HIV-2 Gag CA 変異 (Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7) は、h9 に隣接



D. 考察

柱 1-3 の異なるアプローチで得られた結果は、CA 蛋白質の h9 の W184 が介在する疎水性相互作用ネットワークが HIV/SIV の急所の一つであることを強く示唆する。この相互作用は、カプシド二量体の安定化を通じてコアの安定化を保障する (図 1)。塩田、佐藤らは CA 二量体並びにコア安定性の変調が TRIM5 α 感染阻害感受性を増強することを示している (Vaccine. 2010, 28 Suppl 2:B60-7、および塩田の分担研究報告書)。コア安定性には適切な範囲の CA 二量体安定性が必要で、この安定性の変調はウイルスの増殖能の変調や喪失につながると考えられる。W184 は、 HIV/SIV の感染と増殖の間に維持され、長期にわたって全く変化しない (図 2)。W184 が介在する「適切な」相互作用ネットワークの維持は、CA 二量体とコアの「適切な」安定性の維持に必須なため、絶対に変化できないと考えられる。

最近、海外のグループにより、感染性ウイルス粒子形成の前提となるGag前駆体の順序だった集合のしくみについて興味深い知見が報告された。(Robinson B A et al. *J. Virol.* 2014;88:5718-5741、Woodward CL et al. *J. Virol.* 2015;15:1267-1277、Schur FK et al. *Nature.* 2015;517:505-508)。これらの研究により、ウイルスコア成熟において、184Wを含むh9の疎水性アミノ酸残基が、適切なGag前駆体集合の進行に重要な働きをしていることが示された。

我々の研究班の解析結果と併せて考えると、CA CTD h9のW184は、HIV複製サイクル前期・後期の全般で一貫して重要な働きをしており、このため非常に強い「構造・機能変化の制約」がはたらくために全く変化できないと考えられる。そこで、W184を標的とし、これを介する疎水性相互作用ネットワークの変調、もしくは破綻を招く分子を設計・合成できれば、感染性ウイルス粒子の形成や細胞内での適切なコア脱殻を阻害する感染・複製阻害剤が得られると期待される。

仮にW184を標的とする阻害剤が得られたとしても、周辺の変異性部位(図2)の変異で薬剤耐性ウイルスが発生するかもしれない。しかし、同時に変異による増殖能の低下効果も期待できる。すなわち、逃避変異が生じて、その変異はCA二量体の安定化に影響を与え、HIVの感染力低下を招き、結果的に感染者のウイルス量が低下する可能性がある。例えばW184を標的とするB57をもつ感染者のウイルス量は優位に低い(*Nat Med.* 2007,13(1):46-53)。また、エリートコントローラの40%前後はB57をもつ。これらの報告は、B57によるウイルス制御は強力であると同時に、仮にCTL逃避変異が出現しても変異ウイルスの増殖能は低下していることを示唆する。上述のCotten、塩田、佐藤らの報告した3種のCA CTD変異(A119P, S159P, A178P)は、ウイルスのTRIM5 α 感受性亢進を招くにも関わらず、一部の感染者体内で維持される。この一見矛盾した観察結果も、CTLの関与を考えると説明できる。CTLが強い選択圧として働くため、HIVは増殖能を犠牲にしても変異する必要があると考えられる。同様に、W184を標的とする強力な選択圧となる薬剤を創成できれば、これを用いてHIVの増殖能が低下する方向に進化を誘導することで、エリートコントローラのようにHIVのより良い制御が可能となるかもしれない。

E. 結論

柱1-3研究が連携し、HIV Gag^{p24} カプシド蛋白質の有力な治療標的候補部位を絞り込んだ。最終年度は、CA CTD h9 W184を標的とする創薬シード探索を行う。

F. 知的所有権の取得状況

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

: Gag 論文., 無印: 計算科学

- 1) Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of a large outbreak of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir in the 2103-14 influenza season in Japan. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy*** (in press)
- 2) Kuroda M, Niwa S, Sekizuka T, Tsukagoshi H, Yokoyama M, Ryo A, Sato H, Kiyota N, Noda M, Kozawa K, Shirabe K, Kusaka T, Shimajo N, Hasegawa S, Sugai K, Obuchi M, Tashiro M, Oishi K, Ishii H, Kimura H. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C. ***Sci Rep.*** 5:8185, 2015.
- 3) Nomaguchi M, Nakayama EE, Yokoyama M, Doi N, Igarashi T, Shioda T, Sato H, Adachi A. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 α ***Microbes Infect.*** 16:936-44, 2014.
- 4) 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.*** 88:4145-60, 2014.
- 5) 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, and Sacha J. Tertiary mutations stabilize CD8+ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus. ***J. Virol.*** 88:3598-604, 2014.
- 6) Motozono C, Yokoyama M, Sato H, and Ueno T. Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths. ***Microbes and Infection*** 16:320-7, 2014.
- 7) 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.

2. 学会発表等

: Gag., 無印: 計算科学

1. 佐藤裕徳. 病原性ウイルス研究と計算科学. MOEフォーラム2014, 7月8日(火), 2014年, 東京.
2. 佐藤裕徳. シンポジウム「抗HIV薬の移り変わりから未来を考える」指定発言者(基礎) 第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 2014年12月3-5日(水-金), 大阪(大阪国際会議場).
3. 佐藤裕徳. 「コンピュータ予測がHIVを追いつめる」市民公開講座・エイズ予防財団成果発表会「HIV感染症のCureは可能か? -基礎研究者の挑戦」第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 2014年12月3-5日(水-金), 大阪(大阪国際会議場).
4. Sato H, Yokoyama M, Nakamura H, Motomura K. Strong constraints on changes in capsid protein of norovirus pandemic lineage GII.4_2006b after the onset of outbreaks. XVI International Congress of Virology (The IUMS 2014). July 27 -August 1, 2014, Montreal, Canada.
5. Yokoyama M and Sato H. Structural dynamics and correlated motions of HIV-1 gp120 revealed by molecular dynamics simulation. XVI International Congress of Virology (The IUMS 2014). July 27 -August 1, 2014, Montreal, Canada.
6. 佐藤裕徳, 横山勝, 本村和嗣, 中村浩美, 田村務, 吉澄志磨, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和, 野田衛, 田中智之, Norovirus Surveillance Group of Japan. ヒト集団におけるノロウイルス流行株の多様性と進化. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水), 横浜.
7. 横山勝, 中村浩美, 佐藤裕徳. ノロウイルス GII.4カプシドにおける共変異部位の推定. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水), 横浜.
8. 高下恵美, 江島美穂, 藤崎誠一郎, 横山勝, 中村一哉, 白倉雅之, 菅原裕美, 佐藤彩, 佐藤裕徳, 小田切孝人, 全国地方衛生研究所. 2013/14シーズンにおけるNA阻害剤耐性A(H1N1)pdm09ウイルスの地域流行. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水), 横浜.
9. 引地優太, 横山勝, 竹村太地郎, 藤野真之, 熊倉成, 山本直樹, 佐藤裕徳, 俣野哲朗, 村上努. 新規CXCR4阻害剤 KRH-3955耐性HIV-1の誘導とその解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水), 横浜.
10. 関紗由里, 野村拓志, 西澤雅子, 横山勝, 佐藤裕徳, 團塚愛, 三浦智行, 小柳義夫, 俣野哲朗. SIVの持続感染・伝播における変異蓄積に関する研究. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水), 横浜.
11. 原田恵嘉, 横山勝, Boonchawalit Samatchaya, 佐藤裕徳, 松下修三, 吉村和久. CD4類似低分子化合物誘導体(CD4 MCs)の耐性プロファイルと分子動力的機構解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日(月-水), 横浜.
12. 佐藤裕徳, 本村和嗣, 横山勝. 環境ウイルスとヒト集団の関わり. 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25-27日(火-木), 横浜.
13. 横山勝, 佐藤裕徳. ランダム行列理論によるHIV gp120の動的性質の解析. 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25-27日(火-木), 横浜.
14. 横山勝, 佐藤裕徳. HIV-1 gp120における中和逃避ためのアロステリックパス. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 2014年12月3-5日(水-金), 大阪(大阪国際会議場).

研究課題：HIV Gag の致死的変異の解析

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

研究要旨

HIV-1 は、ヒトで効率良く増殖するための配列・機能・構造を有する。Gag-capsid (CA) には、HIV/SIV 間で良く保存されたアミノ酸部位・領域と HIV-1 が固有に有するアミノ酸部位・領域とが存在する。HIV-1 のヒトでの増殖に必須の Gag-CA のアミノ酸部位・領域を明らかにするため、HIV-1 に固有の Gag-CA アミノ酸部位に SIVmac 型のアミノ酸変異を導入し半致死的・致死的変異を同定した。これらの変異の中には、ウイルス複製前期過程にのみ影響を及ぼすもの (A31K、S41Q、Q50Y) とウイルス複製後期過程にのみ影響を及ぼすもの (S149N) とが存在した。Gag プロセシングの欠損が示唆される特徴的な変異 (I134Q) も認められた。I134Q や S149N を含むヘリックス 7 とそれに続くリンカードメインの変異体 (11 種) では、ウイルス産生量が著しく低下しており、HIV-1 粒子形成に重要な領域であると考えられる。これまでも immature capsid assembly に関するアミノ酸部位・領域が報告されているが、ヘリックス 7 とリンカードメインに関する解析は少ない。今後、本領域の変異が HIV-1 粒子形成に及ぼす影響を詳細に解析し、ウイルス複製における役割を解明することにより、HIV-1 の脆弱部位を明らかにする。

A. 研究目的

HIV-1 はヒトでの増殖に非常に良く適応している。このため、HIV-1 がコードする蛋白質はヒトで特異的かつ効率良く増殖するための配列を持ち、ウイルス複製に必須の機能・構造を維持している。HIV-1 Gag-capsid (CA) は、ウイルス複製能や宿主指向性の決定に寄与し、宿主細胞におけるウイルスの複製前期過程および後期過程に機能する。HIV/SIV の Gag-CA が形成するウイルスコア構造は類似しているが、Gag-CA のアミノ酸配列は異なる。Gag-CA には、HIV/SIV 間で良く保存されたアミノ酸部位・領域と、HIV-1 が特異的 (HIV/SIV 間で保存されていない) に持つアミノ酸部位・領域とが存在する。前者は Gag-CA の機能・構造を保つために必須の配列であり、後者は HIV-1 がヒトで効率良く増殖するために有する配列であると考えられる。従来、HIV/SIV 間で良く保存されたアミノ酸部位の変異体解析により、ウイルス複製における Gag-CA の機能・役割が研究されてきた。本研究では、HIV-1 がヒトで増殖するために必須の Gag-CA の機能・構造を明らかにするため、HIV-1 Gag-CA 特異的なアミノ酸部位を SIVmac 型に変え、HIV-1 の致死的変異を探索・同定する。HIV-1 Gag-CA の致死的変異がウイルス複製過程に及ぼす影響を調べ、Gag-CA の脆弱部位および変異箇所のウイルス複製における役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 変異体構築：HIV および SIV の Gag-CA アミノ酸配列を比較し、HIV-1 の配列が他のウイルスと異なるアミノ酸部位を抽出した。HIV-1 (NL4-3 クローン) を親株として、これらの抽出した部位に SIVmac239 型のアミノ酸を導入した変異体を site-directed mutagenesis により構築した。

2. ウイルス調製：ウイルスは、293T 細胞へのトランスフェクション (Lipofectamine2000 もしくはリン酸カルシウム法) により調製した。ウイルス産生量は、逆転写酵素 (RT) アッセイもしくは HIV-1 p24 ELISA kit により測定した。
3. ウイルス増殖能 (Multi-cycle replication)：ヒトリンパ球系 H9 細胞 (10^5) に等量のウイルス (10^4 RT units) を接種後、継時的に培地を回収した。培養上清中のウイルス産生量を RT アッセイにより測定した。
4. ウイルス感染価 (Single-cycle infectivity)：ルシフェラーゼレポーター TZM-bl 細胞 (4×10^3) に等量のウイルス ($1 \sim 4 \times 10^4$ RT units) を接種後、細胞を回収しルシフェラーゼ活性を測定した。
5. Gag 発現：293T 細胞にプロウイルスクローンを Lipofectamine2000 でトランスフェクションした。細胞粗抽出液をウェスタンブロッティングに供し、抗 Gag-p24 抗体を用いて Gag 蛋白質を検出した。
6. ウイルス産生量：AMD3100 存在下で、H9 細胞 (10^6) にプロウイルスクローン ($2 \mu\text{g}$) と pGL3 ベクター ($2 \mu\text{g}$) を Nucleofector II でコトランスフェクション (Nucleofector kit V、プログラム X-005) 後、培養上清中の Gag-p24 量を ELISA kit で測定した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来臨床材料を使用する研究や動物実験は行わない。組換え DNA 実験は徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会 (委員長 足立昭夫教授) の承認を得て行う。「キメラゲノムによる HIV-1 の分子遺伝学的研究」をする間に執る拡散防止措置については文部科学大臣の確認が得られている (21 受文科振第 935 号)。

C. 研究結果

HIV-1 Gag-CAアミノ酸配列がHIV-2/SIVの配列とは異なるアミノ酸部位を抽出した。これらの部位にSIVmac239型のアミノ酸変異を導入し、24種のGag-CA変異体を構築した(図)。H9細胞でのウイルス増殖特性を調べた結果(表) 構築した変異体のうち、4種(E79D、R100S、I153V、Q179A)は親株と同程度の増殖特性を示したが、多くは半致命的(ウイルス増殖が著しく減少)あるいは致命的(感染実験期間15日中のウイルス増殖検出不能)変異であった。これらの変異がウイルス複製前期過程に及ぼす影響を調べるため、ルシフェラーゼレポーターTZM-bl細胞でのウイルス感染価を比較した(表)。大部分の変異体でウイルス感染価は低下し、A31K、K70R、R82L、T119Y、E128Nでは親株の5%以下となった。一方、S149N変異のみは、半致命的変異であるにも関わらず、親株と同程度のウイルス感染価を示した。

ウイルス複製後期過程に及ぼす影響について、プロウイルスクローンをH9細胞にトランスフェクション後、ウイルス産生量を比較した結果(表) A31K、S41Q、Q50Yは親株と同程度のウイルス産生能を示すことが分かった。他の変異体は全てウイルス産生能が減弱しており、S149Nは複製後期過程への影響により半致命的となることが分かった。そこで、S149において変異させるアミノ酸によってウイルス複製に及ぼす影響が変わり得るか否かを検討した(表)。S149A/S149D/S149Kは、いずれも致命的変異であり、複製前期過程・後期過程とも親株よりも著しく低下していた。また、I135Qでは、TZM-bl細胞での感染価が10%程度にまで低下したので、直近の高度に保存されているI134に同じ変異Qを導入しウイルス複製への影響を調べた(表)。I134Qでは、ウイルス産生量をRTアッセイで測定できたが、p24 ELISAでは検出できなかった。そこで、I134QのGag発現を293T細胞へのプロウイルスクローンのトランスフェクションにより調べた。その結果、細胞内およびウイルス粒子でGag-p24が検出されず、Gagのプロセッシングに異常があることが示唆された。I134Qは、細胞内でのGag蛋白質の安定性にも影響している可能性があるため、今後、検討していく必要がある。

以上の結果(表)から、本研究で構築した半致命的・致命的変異体では、ウイルス複製前期過程にも後期過程にも悪影響を及ぼすものが多かったが、前期過程にのみ欠損(A31K、S41Q、Q50Y)および後期過程にのみ欠損(S149N)がある特徴的な変異を同定できた。特に、S149は変異させるアミノ酸をA/D/Kに変更すると、S149Nよりも複製前期・後期過程とも著しく低下することが分かり、アミノ酸の物理化学的性状によりGagの機能・構造が変わり得ることが分かった。

I134QやS149Nを含むGag-CAヘリックス7とそれに続くリンカードメインでは、構築した他の変異体(E128N、K131R、I135Q、N139Q、I141C、S146N、S149A、S149D、S149K)も全てウイルス産生量を減じ、ウイルス複製に致命的であったことから、本領域のHIV-1粒子形成における重要性が示唆された。本領域内で変異させたアミノ酸部位はHIV-1内では高度に保存されており(E128、I135を除く) HIV-1がヒトで増殖するために必須の部位・領域であると考えられた。

D. 考察

Gag-CAヘリックス8近傍には、immature capsid assemblyに関わるmajor homology region (MHR)が存在するが、ヘリックス7近傍での解析は少ない(図)。本研究で見出したヘリックス7近傍の変異体(11種)は、ウイルス粒子産生を著しく減弱させることから、HIV-1アセンブリー・粒子形成に關与する新たな領域を同定できたと考えている(表)。また、S41とQ50(表)はGag-CA N-terminal domain間相互作用に關与することが示唆されており、今後、変異が複製素過程(逆転写、核移行)に及ぼす影響を調べ、これらのアミノ酸部位の複製前期過程における役割を解析していく必要がある。

E. 結論

これまでに報告のないHIV-1複製後期過程に重要な役割を持つ領域(Gag-CAヘリックス7とリンカードメイン)を新たに見出した(図および表)。本領域において変異導入したアミノ酸部位のHIV-1内での保存性の高さ、および、変異させるアミノ酸によるウイルス複製に及ぼす影響の違いから、これらのアミノ酸部位の機能・構造上の重要性が示唆される。今後、さらに詳細にウイルス学的解析を行うことにより、ウイルス複製抑制のための標的となり得る脆弱部位を明らかにできると考えている。

F. 知的所有権の取得状況

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) [Nomaguchi M](#), Nakayama EE, Yokoyama M, Doi N, Igarashi T, Shioda T, Sato H, Adachi A. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5. *Microbes Infect.* 16: 936-944, 2014.
- 2) Doi N, Adachi A, [Nomaguchi M](#). Growth properties of macaque-tropic HIV-1 clones carrying vpx/vpr genes from simian immunodeficiency viruses in place of their vpr regions. *J Med. Invest.* 61: 374-379, 2014.

- 3) Nomaguchi M, Doi N, Adachi A. Virological characterization of HIV-2 *vpx* gene mutants in various cell systems. *Microbes Infect.* 16: 695-701, 2014.
- 4) Nomaguchi M, Miyake A, Doi N, Fujiwara S, Miyazaki Y, Yokoyama M, Tsunetsugu-Yokota Y, Sato H, Masuda T, Adachi A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 *pol* gene modulate viral replication ability. *J Virol.* 88: 4145-4160, 2014.

2. 学会発表等

- 1) 野間口雅子、土肥直哉、酒井遥介、泉泰輔、宮崎恭行、足立昭夫：SA1proxの遺伝子配列はVif/APOBEC3G依存的にウイルス複製能を変動させる。第62回日本ウイルス学会学術集会。2014年11月10-12日(月水)、横浜。

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

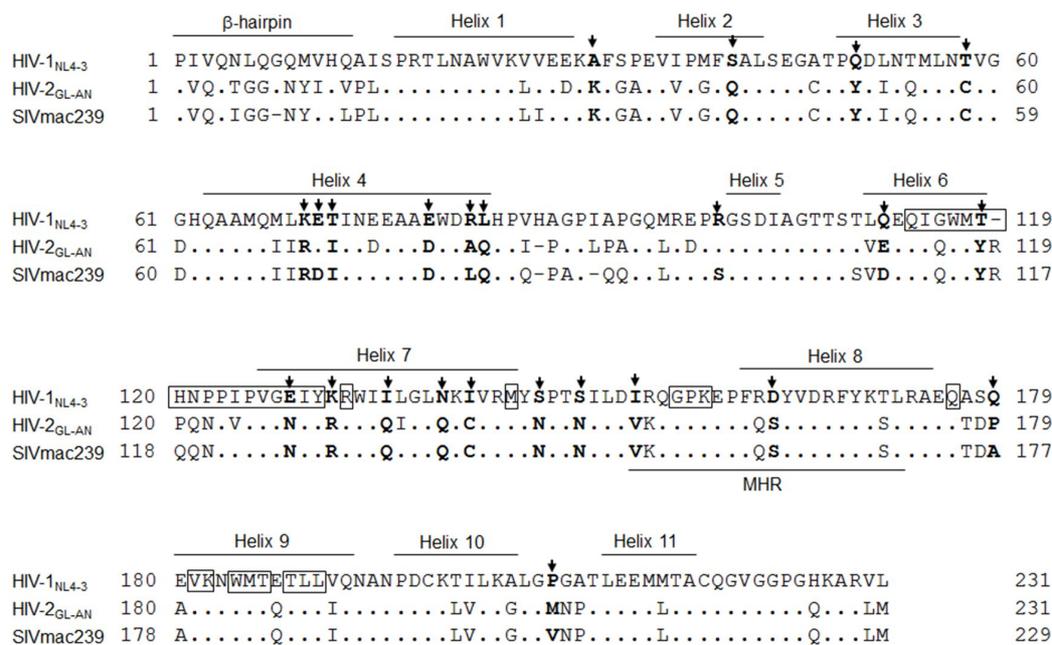


図 HIV-1 (NL4-3)、HIV-2 (GL-AN)、SIVmac239 の Gag-CA アミノ酸配列 本研究で初めて変異を導入した 24 種のアミノ酸部位を黒太字/黒矢印で示す。黒枠は、ヘリックス 6 ~ 9 の間で immature capsid assembly に影響を及ぼすことが報告されているアミノ酸部位・領域を示す。MHR, major homology region

表 本研究において構築した Gag-CA 変異体のウイルス学的特性

変異	ドメイン	ウイルス増殖 ¹	ウイルス感染価 ²	Gag 発現 ³	ウイルス産生量 ⁴
NL4-3		+++	1.00	++	1.00 ± 0.00
A31K	Helices 1/2	-	0.01	++	0.86 ± 0.33
S41Q	Helix 2	-	0.17	++	1.04 ± 0.36
Q50Y	Helix 3	-	0.06	+	0.93 ± 0.24
T58C	Helices 3/4	+	0.16	++	ND

K70R	Helix 4	-	0.04	++	NA
E71D	Helix 4	++	ND	ND	ND
T72I	Helix 4	+	0.35	++	ND
E79D	Helix 4	+++	ND	ND	ND
R82L	Helix 4	-	0.01	+	0.35 ± 0.09
L83Q	Helix 4	+	0.37	+ / ++	ND
R100S	Helices 4/5	+++	ND	ND	ND
Q112D	Helix 6	+	0.61	ND	ND
T119Y	Helix 6	-	0.03	+	0.31 ± 0.05
E128N	Helix 7	-	0.02	++	0.39 ± 0.09
K131R	Helix 7	-	ND	ND	0.46 ± 0.08
I134Q	Helix 7	-	0.00	-	-
I135Q	Helix 7	-	0.10	ND	0.09 ± 0.07
N139Q	Helix 7	-	ND	ND	0.46 ± 0.16
I141C	Helix 7	-	0.12	++	0.37 ± 0.08
S146N	Linker	-	0.10	++	0.45 ± 0.08
S149N	Linker	+	0.99	++	0.37 ± 0.17
S149A	Linker	-	0.06	ND	0.11 ± 0.02
S149D	Linker	-	0.00	ND	0.06 ± 0.01
S149K	Linker	-	0.01	ND	0.19 ± 0.06
I153V	Linker	+++	ND	ND	ND
D163S	Helix 8	-	0.28	ND	ND
Q179A	Helices 8/9	+++	ND	ND	ND
P207V	Helices 10/11	++	0.69	+	ND

¹ ウイルス増殖 (Multi-cycle replication) は、H9 細胞での増殖特性 (ウイルス感染から 15 日間) を半定量的に表記した。

² ウイルス感染価 (Single-cycle infectivity) は、NL4-3 を接種した TZM-bl 細胞でのルシフェラーゼ活性を 1 として各変異体の感染価を相対値で表した。

³ Gag 発現は、293T 細胞へのプロウイルスクローンのトランスフェクション後の細胞内発現量を半定量的に表記した。

⁴ ウイルス産生量は、NL4-3 の H9 細胞へのプロウイルスクローンへのトランスフェクション後の培養上清中の Gag-p24 量を 1 として各変異体のウイルス産生量を相対値で表した。

ND, not determined; NA, not applicable

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

旧世界サル（旧世界サル）の TRIM5 α の HIV 感染阻害の分子機構の詳細は未だ明らかにされていない。今のところ、細胞全体の融解液中のコアの崩壊状況を蔗糖密度勾配遠心により検討する生化学的実験結果から、TRIM5 α は細胞質内に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。本研究では、蛍光色素で HIV 粒子とコアとを標識して培養細胞に感染させ、経時的に蛍光色素の解離を蛍光顕微鏡で観察することにより HIV の脱殻過程を観察する *in situ* uncoating assay を用いて、カニクイザル、アカゲザル等の旧世界サルの TRIM5 α 存在下での HIV-1 ならびに HIV-2 の脱殻状況を観察した。その結果、旧世界サルの TRIM5 α 存在下では、HIV-1 の脱殻が促進されること、カニクイザル TRIM5 α に感受性を示す HIV-2 株の場合にはカニクイザル TRIM5 α 存在下で脱殻が促進されるが、カニクイザル TRIM5 α に耐性を示す HIV-2 変異株の場合には脱殻は促進されないこと、が明らかになった。これらの結果から、従来、生化学的手法で示唆されたコアの速やかな破壊が、TRIM5 α の感染阻害の本態であることが明確になった。

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) 因子として報告された。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 HIV 感染阻害の分子機構の詳細は明らかにされていない。アカゲザル、カニクイザルの TRIM5 α は強い抗 HIV-1 作用を示す一方、ヒトの TRIM5 α はごく弱い抗 HIV-1 作用を持ち、その結果ヒトでの HIV-1 感染は拡大を続けていると考えられる。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の障害となっている。

今のところ、感染細胞全体の融解液中のコアの崩壊状況を蔗糖密度勾配遠心により検討する生化学的実験結果から、TRIM5 α は細胞質内に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。しかしこの方法では、細胞に非特異的に取り込まれ、その後の感染成立には至らない HIV コアの崩壊状況も併せて観察することになり、感染成立に至る経路に入った HIV 粒子のカプシドの崩壊状況を正しく観察していると言うことは出来なかった。そこで我々は、異なる蛍光色素で HIV 粒子のエンベロップ、コア内の Vpr、コアの構成成分である P24 を染め分けることにより、感染成立に至る経路に正しく入った HIV 粒子のカプシドのみの崩壊状況を蛍光顕微鏡により解析する *in situ* uncoating assay を用いて、旧世界サルの TRIM5 α が HIV カプシドの崩壊を引き起こしているか否かを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. カニクイザル TRIM5 α 発現ヒト細胞の作成

ハイグロマイシン耐性遺伝子を持つ発現ベクター-pCEP4 に HA タグを付したカニクイザル TRIM5 α 遺伝子を挿入してヒト HeLa 細胞に導入し、hygromycin B 存在下で培養してカニクイザル TRIM5 α 発現細胞を選別した。カニクイザル TRIM5 α の発現は HA タグに対する抗体で導入細胞を染色して確認した。カニクイザル TRIM5 α の抗 HIV 活性は、緑色蛍光蛋白質 (GFP) を発現する HIV-1 あるいは HIV-2 を感染させ、GFP 発現細胞数がベクターのみを導入した細胞と比べて低下することにより確認した。

2. *In situ* uncoating assay

Campbell らの方法によった (Campbell et al. (2007) *Virology* 360: 286-293)。まず、Env 遺伝子にフレームシフト変異を導入した HIV-1 あるいは HIV-2 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 あるいは Vpx、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 p24 (CA) 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。正しくエンベ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. カニクイザルTRIM5 α 発現ヒト細胞の作成

TRIM5 α 発現ベクター導入後、3つの独立したHeLa細胞株を樹立した。図1にこれらの細胞株でのカニクイザルTRIM5 α の発現を示す。ウエスタンブロット(図1A)、蛍光染色(図1B)とも3つの細胞株で同様にカニクイザルTRIM5 α が発現していることが確認できた。また、GFPを発現するHIV-1あるいはHIV-2をこれらの細胞株に感染させると、GFP発現細胞の数がベクターのみを導入した細胞株と比べて低下することから、発現したカニクイザルTRIM5 α が抗HIV活性を保持していることが確認された(図1C)。

2. In situ uncoating assay

1. で作製したカニクイザル TRIM5 α を発現するHeLa細胞に、dTomatoでエンベロープを標識しコア内にGFPで標識したVprあるいはVpxを持ち、水疱性口内炎ウイルスのGタンパク質でシュードタイプしたHIV-1あるいはHIV-2を感染させ、経時的に細胞を固定してコアの構成成分であるP24(CA)をCy5で染色して蛍光顕微鏡で観察した。dTomatoの蛍光を失って感染成立の経路に正しく入ったHIV粒子について、脱殻前と考えられるGFPとCy5の蛍光が共局在するものと脱殻が完了したと考えられるCy5の蛍光と共局在しないGFPの数を数えて脱殻した粒子の割合を計算した。その結果、カニクイザル TRIM5 α により感染が抑制されるHIV-1(NL-Nh:NL43株のenv欠損株)とHIV-2(GH123-Nh:GH123株のenv欠損株)は、カニクイザル TRIM5 α 発現細胞株においてはCAと共局在しないGFP粒子の割合がベクターのみを導入した細胞株においてより有意に減少し、脱殻がカニクイザル TRIM5 α の存在により亢進していることが明らかになった(図2の左側と中のグラフ)。一方、カニクイザル TRIM5 α によってその感染がほとんど抑制されないHIV-1の変異株(ASA-Nh:GH123ASA株のenv欠損株)については、カニクイザル TRIM5 α の存在によりCAと共局在しないGFP粒子の割合は変化せず、脱殻の速度に影響がないことが明らかになった(図2の右側のグラフ)。

D. 考察

本研究によりエンベロープを失って感染成立に至る経路に正しく入ったHIV粒子のカプシドのみの崩壊状況を検討しても、カニクイザルTRIM5 α により感染が抑制されるHIV-1とHIV-2は、カニクイザルTRIM5 α の存在によりその脱殻が促進されること、カニクイザルTRIM5 α により感染が抑制されないHIV-2変異株においては脱殻の促進は観察されないことが明らかになった。ASA-Nhは

GH123-NhとカニクイザルTRIM5 α の認識に関わるCAの3アミノ酸のみが異なっており、ウイルスのTRIM5 α 感受性の違いが確かに脱殻速度に反映されていることが確認された。本研究により脱殻の制御が新規の抗HIV戦略策定に繋がることが示唆された。

E. 結論

感染成立に至る経路に正しく入ったHIV粒子のカプシドのみの崩壊状況を検討しても、カニクイザルTRIM5 α により感染が抑制されるHIV-1とHIV-2はカニクイザルTRIM5 α の存在によりその脱殻が促進されること、カニクイザルTRIM5 α により感染が抑制されないHIV-2変異株においては脱殻の促進は観察されないことが明らかになった。従って、従来、生化学的手法で示唆されたコアの速やかな破壊が、TRIM5 α の感染阻害の本態であることが明確になった。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takeda E, Kono K, Hulme AE, Hope TJ, Nakayama EE, Shioda T. Fluorescent image analysis of HIV-1 and HIV-2 uncoating kinetics in the presence of old world monkey TRIM5 α . *PLoS one* 2015 Accepted

2) Hayasaka H, Kobayashi D, Yoshimura H, Nakayama EE, Shioda T, Miyasaka M. The HIV-1 gp120/CXCR4 axis promotes CCR7 ligand-dependent CD4 T cell migration: CCR7 homo- and CCR7/CXCR4 hetero-oligomer formation as a possible mechanism for up-regulation of functional CCR7. *PLoS one* 2015 Accepted

3) Nomaguchi M, Nakayama EE, Yokoyama M, Doi N, Igarashi T, Shioda T, Sato H, Adachi A. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 α . *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 16:936-944, 2014.

2. 学会発表等

1) Tatsuo Shioda: Host Factors in the Pathogenesis of HIV Infection. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) AIDS Panel Meeting 2015年1月26日-29日 Taipei, Taiwan

2) 櫻木小百合, 塩田達雄, 櫻木淳一: HIV パッケージシグナル内最重要領域 SL1 の機能的構造に関する多角的解析. 第28回日本エイズ学会学

術集会・総会 2014年12月3日-5日 大阪,日本

3) 中山英美, Uttayamakul Sumonmal, Tiphaine Oudot-Mellakh, Pimrapat Tengtrakulcharoen, Julien Guergnon, Jean-Francois Delfraissy, Srisin Khusmith, Chariya Sangsajja, Sirirat Likanonsakul, Ioannis Theodorou, 塩田達雄: Genome-wide association study of HIV-related lipoatrophy in Thai patients: Association of a DLGAP1 polymorphism with fat loss. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会 2014年12月3日-5日 大阪,日本

4) 武田英里,河野健, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, 中山英美, 塩田達雄: TRIM5 存在下における HIV-1 および HIV-2 のカプシドコアの脱殻 第28回日本エイズ学会学術集会・総会 2014年12月3日-5日 大阪,日本

5) 田谷かほる, 武田英里, 中山英美, 塩田達雄, 明里宏文, 金子新. 再生医療技術のエイズ研究応用のためのアカゲザル iPS 細胞樹立と CD34 陽性細胞への分化. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会 2014年12月3日-5日 大阪,日本

6) Tahmina Sultana, 中山英美, 飛田哲志, 齊藤暁, 明里宏文, 塩田達雄: Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会 2014年12月3日-5日 大阪,日本

7) 櫻木淳一, 櫻木小百合, 塩田達雄: HIV-1 パッケージングシグナル内最重要領域 SL1 の機能的構造に関する多角的解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014年11月10日-12日 横浜,日本

8) 武田英里,河野健, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, 中山英美, 塩田達雄: TRIM5 による HIV-1 および HIV-2 のカプシドコアの脱殻促進:可視化ウイルスによる解析. 第62回日本ウ

イルス学会学術集会 2014年11月10日-12日 横浜,日本

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

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

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

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

13) Emi E. Nakayama, Satoshi Tobita, Tahmina Sultana, Akatsuki Saito, Hirofumi Akari, Tatsuo Shioda: Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings & Courses Program (RETROVIRUSES) 2014年5月19日-24日 Cold Spring Harbor, USA.

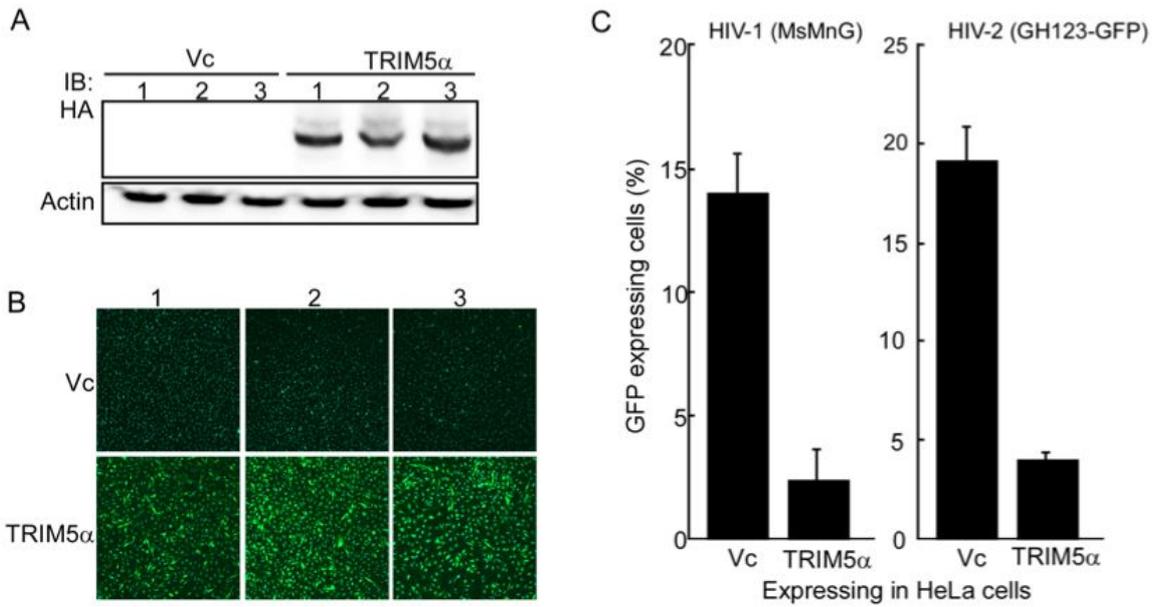


図1：ヒト HeLA 細胞におけるカニクイザル TRIM5 α の発現。 ウェスタンブロット (A) と蛍光抗体法 (B) によりカニクイザル TRIM5 α の発現を確認した (Bは DAPI との共染色)。 緑色蛍光蛋白質 (GFP) を発現する HIV-1 あるいは HIV-2 を感染させ、発現させたカニクイザル TRIM5 α が抗 HIV 活性を保持していることを確認した。

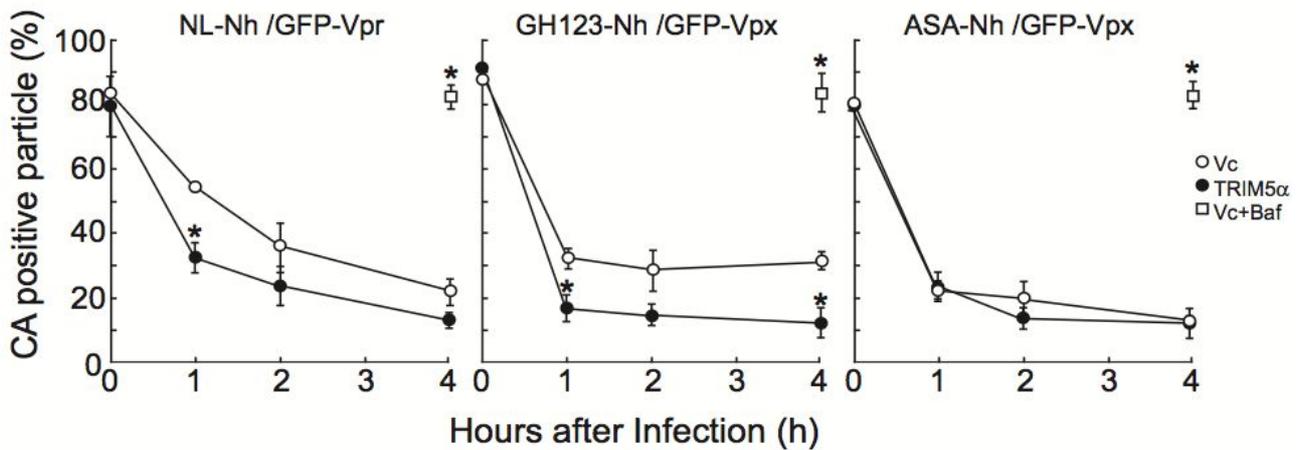


図2：In situ uncoating assay。 カニクイザル TRIM5 α により感染が抑制される NL-Nh や GH123-Nh はカニクイザル TRIM5 α 存在下 (黒丸) ではベクターのみの細胞 (白丸) と比べて有意 (*) に脱殻速度の亢進が認められた。一方、カニクイザル TRIM5 α により感染が抑制されない ASA-Nh では脱殻速度の亢進は認められなかった。なお、パフィロマイシン存在下では膜融合が生じないためにコアが細胞内へ侵入しないため脱殻は全く進行しない (Baf : 白四角)。

研究課題：HIV ゲノム逆転写新規制御における Gag 蛋白質と関連因子

研究分担者：増田貴夫（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 准教授）

研究要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

(倫理面への配慮)
該当無し

C. 研究結果

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

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

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

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

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

D. 考察

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

E. 結論

HIV-1感染初期過程の主要反応である逆転写過

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

F. 知的所有権の取得状況

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kinpara S, Itoh S, Takahata T, Saitoh Y, Hasegawa A, Kijiyama M, Utsunomiya A, Masuda M, Miyazaki Y, Matsuoka M, Nakamura M, Yamaoka S, Masuda T, and Kannagi M. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and anti-sense viral RNA in the constitutive NFkB activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Leukemia* (in press).
 2) Nomaguchi M, Miyake A, Doi N, Fujiwara S, Miyazaki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Yokoyama M, Sato H, Masuda T, and Adachi A. Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability. *J Virol*. 88:4145-4160, 2014.

2. 学会発表等

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

2) 増田貴夫, 佐藤洋子, 高畑辰郎, 加藤義一, 厚井聡志, 長谷川温彦, 河合剛太, 神奈木真理. HIV-1 逆転写過程のストランド転移におけるウイルスストランド転移におけるウイルスゲノム RNA 5' 末端配列の重要性. 第28回日本エイズ学会, 2014年、大阪。

3) 高畑辰郎, 徳永研三, 長谷川温彦, 神奈木真理, 増田貴夫. HIV-1 インテグラーゼの逆転写過程以前における機能の解析. 第28回日本エイズ学会, 2014年、大阪。

4) 高畑辰郎, 徳永研三, 長谷川温彦, 神奈木真理, 増田貴夫. HIV-1 インテグラーゼの非酵素的機能の解析. 第62回日本ウイルス学会, 2014年、横浜。

5) 増田貴夫, 佐藤洋子, 高畑辰郎, 加藤義一, 厚井聡志, 長谷川温彦, 河合剛太, 神奈木真理. HIV-1 逆転写過程におけるストランド転移制御に關与するシスおよびトランス因子. 第62回日本ウイルス学会, 2014年、横浜。

6) 三浦和樹, 長谷川温彦, 増田貴夫, 山岡昇司, 神奈木真理. Latent HIV Infection and Potential Role of IFN α in CD4 Memory T Cells. 第62回日本ウイルス学会, 2014年、横浜。

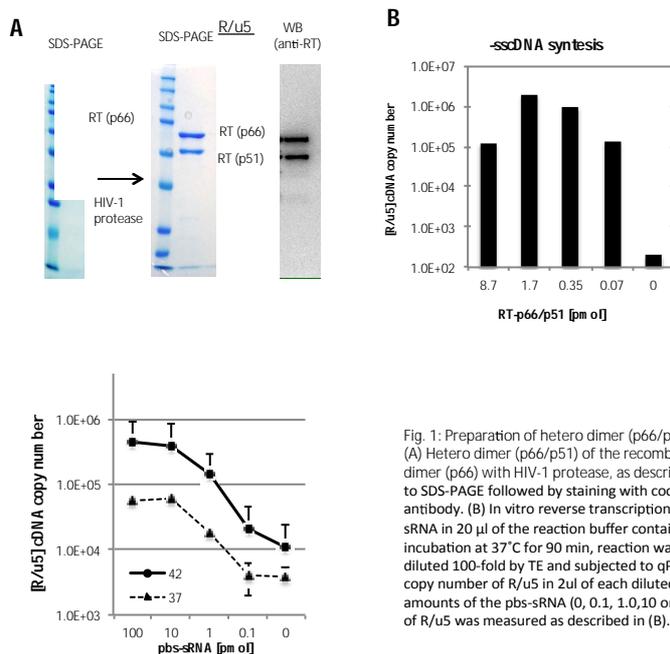


Fig. 1: Preparation of hetero dimer (p66/p51) of the recombinant HIV-1 RT (A) Hetero dimer (p66/p51) of the recombinant HIV-1 RT (rRT) was generated by proteolysis of the rRT in homo dimer (p66) with HIV-1 protease, as described in the "Methods". Final preparation of the p66/p51 was subjected to SDS-PAGE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

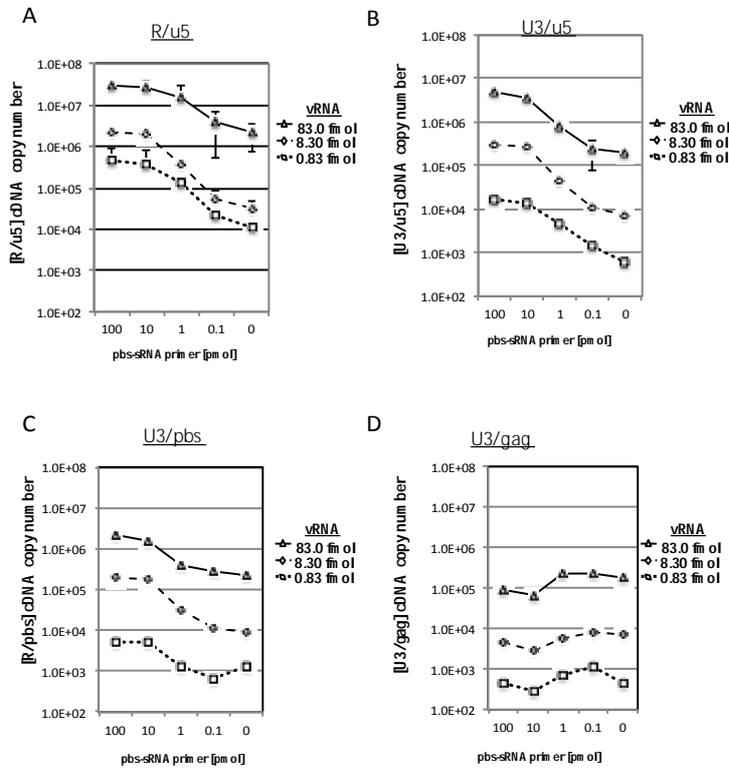


Fig. 2. Primer-dose dependency of cDNA synthesis and its strand transfers. In vitro reverse transcription was performed with several amounts of the pbs-sRNA (0, 0.1, 1.0, 10 or 100 pmol per reaction) at 42°C for 90 min. Primer-dose dependency of the cDNA synthesis was examined with three different amounts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

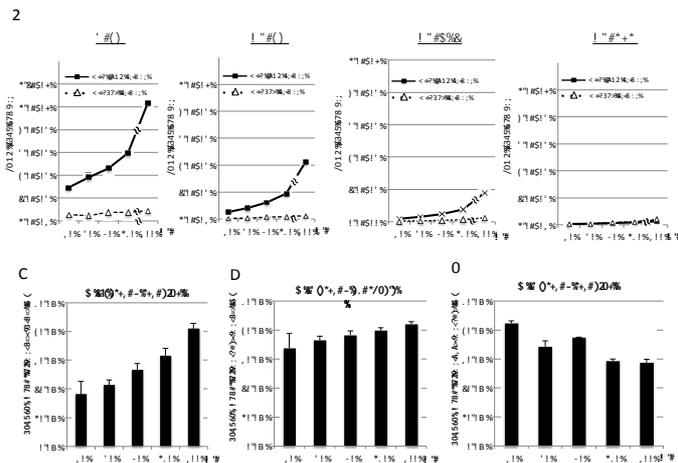


FIG 3. Time course analysis of cDNAs and their strand transfer. (A) In vitro RT assay was performed with 83 fmol of HIV-1 RNA and 100 pmol of pbs-sRNA primer and aliquots of the reaction were periodically harvested at 30, 60, 90 and 300 min after incubation at 42°C. The level of each cDNA intermediate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

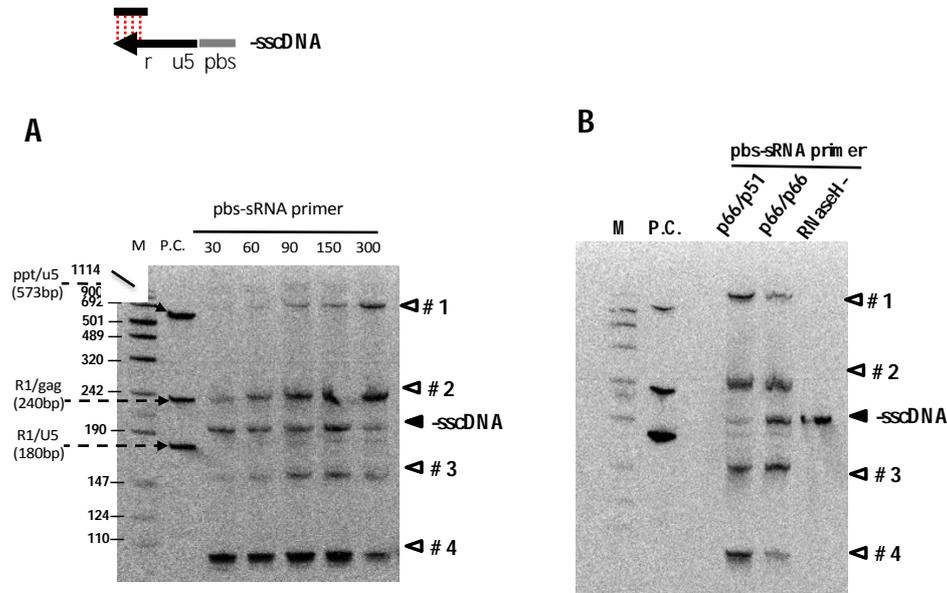


Fig. 4 . Aliquot of each reaction performed for the time-course analysis (Fig. 3) were subjected to southern blot analysis under denatured condition. (A) Dig-labeled HIV-1 primer R1-25 (Dig-R1-25 probe) was used to detect $-sscDNA$. The bands corresponding to $-sscDNA$ (200 nt) and aberrant product generated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

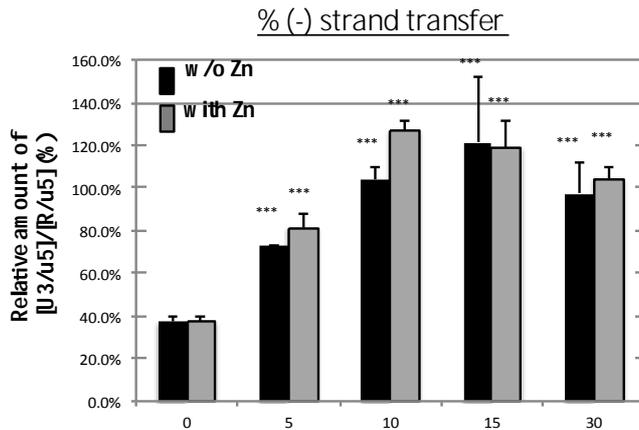


FIG 5. Stimulatory effects of HIV-1 NC. HIV-1 RNA (68 pmol) and pbs-sRNA (100 pmol) were pre-incubated with serial dilutions of sNC (0, 5, 10, 15 or 30 pmol) by ddw for 5 min at 37°C. The same serial dilutions of sNC that were pre-treatment of with $ZnCl_2$ (with Zn) or without $ZnCl_2$ (w/o Zn) were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

研究課題：Gag の細胞内輸送機構に関する研究～翻訳後修飾を中心に

研究分担者：梁 明秀（横浜市立大学医学部 微生物学 教授）

研究協力者：宮川 敬、工藤 あゆみ、松永 智子

研究要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

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

C. 研究結果

1. HIV粒子産生におけるc-CBLの機能解析

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

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

2. HIV粒子産生におけるAPCの機能解析

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

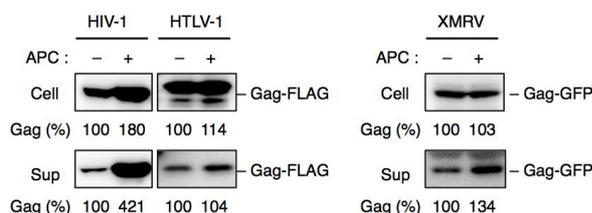


図1 APCのHIV Gag特異的なVLP産生促進。HEK293細胞にHIV-1, HTLV-1またはXMRV由来のGag発現ベクターとAPC発現ベクターを共発現し、48時間後の細胞内および細胞上清中のGag量をウェスタンブロット法で解析した。

D. 考察

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

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

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

E. 結論

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

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表等

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

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

研究課題：HIV Gag 蛋白質と関連因子の治療標的構造の解明に向けた統合的研究

研究分担者：蝦名 博貴（京都大学ウイルス研究所 助教）

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

研究要旨

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

A. 研究目的

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

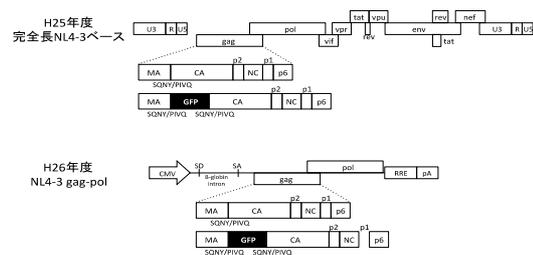
B. 研究方法

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

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

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

図 1：蛍光標識 Gag 蛋白質発現コンストラクト



(倫理面への配慮)

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

する機関承認実験、ならびに大臣確認実験の手続きも完了している。

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

C. 研究結果

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

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

ゲノム編集法を使った DNA レベルでのウイルスの脆弱部位の検索実験系の検証には、LTR の non functional region (T295)、NF- κ B 結合領域 (T6)、TAR (T5) を標的とする gRNA を用いた (図 4)。それぞれの gRNA と Cas9 を恒常的に発現する Jurkat 細胞を作製し、HIV-1_{NL4-3} を感染させ、上清中の p24 を測定することで CRISPR 導入細胞におけるウイルス増殖を検証した (図 5)。その結果、HIV 標的 CRISPR 導入細胞においてウイルス増殖の遅延が確認された (図 6)。また、それぞれの CRISPR 導入細胞から増殖したウイルスゲノムの配列をシーケンス解析した結果、CRISPR 標的部位に変異が誘導されていた。興味深い事に、non functional region (T295) を標的とする CRISPR 導入細胞で増殖したウイルスには、ゲノム編集法で導入される典型的なランダム indel 変異が誘導されていたが、ウイルス増殖に必須な NF- κ B binding region (T6) と TAR (T5) を標的とする CRISPR 導入細胞で増殖したウイルスには、ランダムな indel 変異ではなく、その変異導入に傾向

図 2: Gag 変異体の局在の共焦点顕微鏡解析

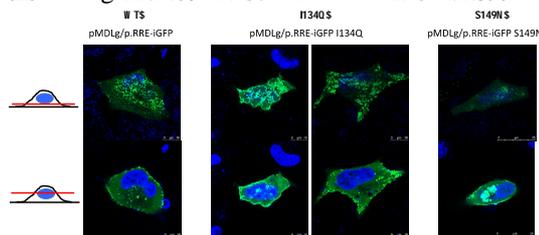


図 3: 細胞質における蛍光標識 Gag 蛋白質のばらつき

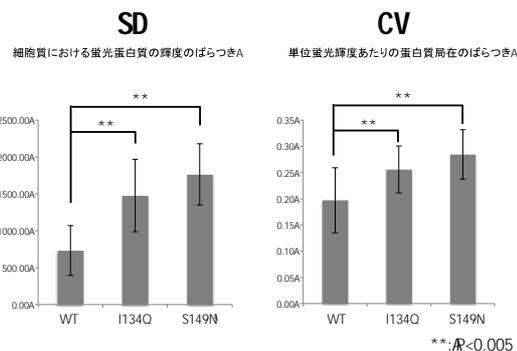


図 4: gRNA の設計

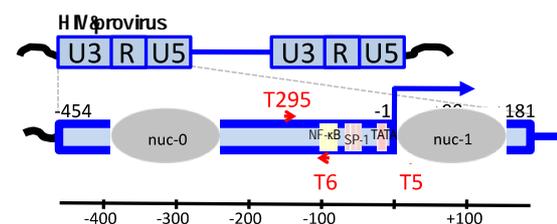
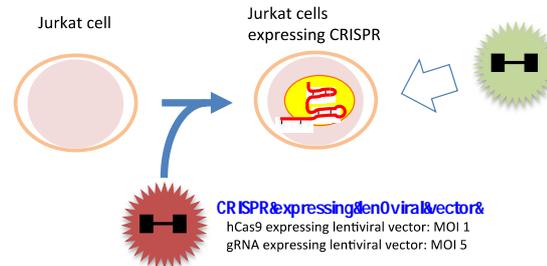


図 5: 感染実験概要



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

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

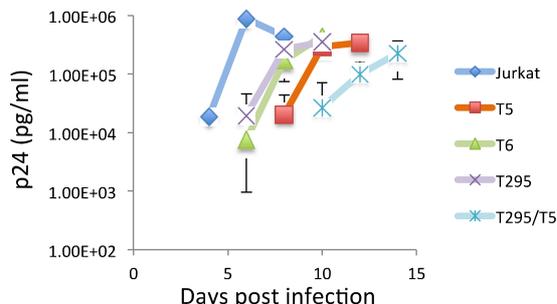


図 7: CRISPR 導入 Jurkat 細胞で増殖したウイルス RNA 配列

T5: TAR sequence is essential for transcription of vRNA

```
WT      !GTCCTCTGTTAGACCAAGATCTGGAGCCTGGGAGCTCTCTG!
!
!GTCCTCTGTTAGACCAAGATCTGGAGCCTGGGAGCTCTCTG!
!GTCCTCTGTTAGATCAGATCTGGAGCCTGGGAGCTCTCTG!
!GTCCTCTGTTAGACCAAGATCTGGAGCCTGGGAGCTCTCTG!
!GTCCTCTGTT-----CCTGGAGCTCTCTG!
```

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

```
WT      !CTTGCTACAAGGGACTTTCC-----AGGGAGGC!
           NF-kB           NF-kB
!CTTGCTACAAGGGACTTTCC-----AGGGAGGC
!CTTGCTACAAGGGACTTTCCGCTGG-----AGGC
```

T295: non functional region

```
WT      !TCACGTGGCCGAG-----AGCTGCATCCGGAGTACTTCAAG!
!TCACGTGGCCCG-----AGCTGCATCCGGAGTACTTCAAG!
!TCACGTGGCCCGAGTAGTAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAG!
!TCAC-----GCTGCATCCGGAGTACTTCAAG!
```

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

D. 考察

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

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

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

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

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

E. 結論

Gag を標的とする HIV 治療法開発の基盤とな

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

F. 知的所有権の取得状況

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ebina H, Kanemura Y, Misawa N, Sakuma T, Kobayashi T, Yamamoto T, Koyanagi Y. A high excision potential of TALENs for integrated DNA of HIV-based lentiviral vector. *PLoS One*. In press.
- 2) 蝦名博貴、小柳義夫. ゲノム編集とエイズ治療. 医学の歩み. 医歯薬出版株式会社, 2015.
- 3) 蝦名博貴、小柳義夫. ゲノム編集技術を用いたエイズ根治療法の可能性. 今すぐ始めるゲノム編集, 羊土社, 2014.

2. 学会発表等

- 1) 蝦名博貴: 感染者からのウイルスの除去. 市民公開講座 HIV 感染症の Cure は可能か? -基礎研究者の挑戦. 2014年12月5日(金), 大阪
- 2) 蝦名博貴: ゲノム編集法を用いたエイズ治療戦略の展望. 第28回日本エイズ学会学術集会. 2014年12月3-5日(水-金), 大阪.

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

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

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

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

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

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

研究課題： HIV-1 アクセサリー蛋白質のパッケージングにおける Gag の機能の研究
研究分担者： 間 陽子 (理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット ユニットリーダー)
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・エイズ予防財団 リサーチレジデント)

研究要旨

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

A. 研究目的

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

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

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

B. 研究方法

1) Fluorescence resonance energy transfer (FRET) 法：eCFP-TSG101/pCAGGS, Gag-Venus/pCAGGS および mRFP-Vpr/pCAGGS 発現ベクターを作製し、HeLa 細胞へ導入後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて FRET 法を行った。

2) ウイルス様粒子(VLP)の産生：Gag/pCAGGS ベクターを 293T 細胞に導入して Gag を発現させ、48 時間後に培養上清を回収して 20%ショ糖密度勾配超遠心法により VLP を精製し、Western blot 法を行った。この時、Flag-TSG101/pCAGGS あるいは Vpr/pCAGGS 発現ベクターを共導入した。

3) GagとTsg101の結合阻害を標的とした低分子化合物のスクリーニング：GST-VprとHis-Tsg101を大腸菌で大量合成し、ELISA binding assayを構築した。合成したPTAPペプチドを添加することでGagとTsg101蛋白質の結合阻害を確認した。9600個の小分子化合物を含むCore Library用いて

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

(倫理面への配慮) 特になし

C. 研究結果

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

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

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

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

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

D. 考察

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

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

E. 結論

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

F. 知的所有権の取得状況 無し

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

4) Hagiwara K, Ishii H, Murakami T, Takeshima S-n, Chutiwitoonchai N, Kondoh Y, Honda K., Osada H, Tsunetsugu-Yokota Y, Suzuki M, and Aida Y. Synthesis of a Vpr-binding derivative for use as a novel HIV-1 inhibitor. *Antivirus Res.*, revised.

2. 学会発表等

(1) Kamori D, Murakami T, Hasan Z, Carlson J, Siarot L, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Gatanaga H, Oka S, Aida Y, Ueno T. : Effects of naturally arising mutations in HLA-A*02-restricted immunodominant region on the functions of HIV-1 Vpr, 第 16 回白馬シンポジウム, 2014.6.14、熊本

(2) Zahoor A. M, 薛光愛, 佐藤洋隆, 村上知行, 竹嶋伸之輔, 間陽子 : HIV Vpr 発現マクロファージにおけるマイクロアレイによる遺伝子発現解析, 第 157 回日本獣医学会学術集会, 2014.9.9-12、札幌

(3) Siarot L, 佐藤洋隆, Chutiwitoonchai N, 間陽子 : Screening of small molecules interfering the specific interaction between human immunodeficiency virus-type I(HIV-1) Gag and ESCRT Tsg 101, 第 157 回日本獣医学会学術集会, 2014.9.9-12、札幌

(4) 村上知行, 間陽子 : Vpr は新規 Vpr 結合因子 HIP1 のリン酸化の制御を介して G2 期停止を調節する, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014.11.10-12、横浜

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

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

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

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

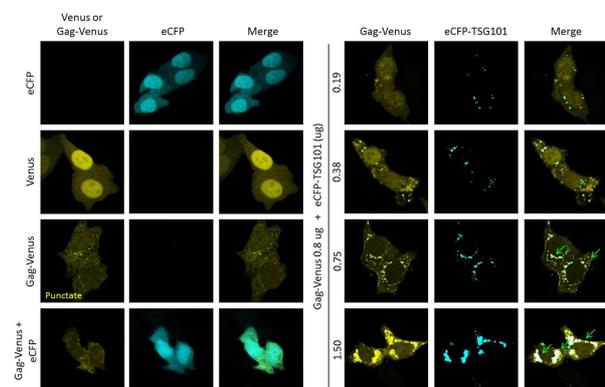


Figure 1 TSG101 induced Gag aggregation. HeLa cells were transfected with Gag-Venus plasmid alone or co-transfected with the indicated amount of eCFP-TSG101 plasmid for 48 hr. The green arrows indicate co-localization of Gag/TSG101.

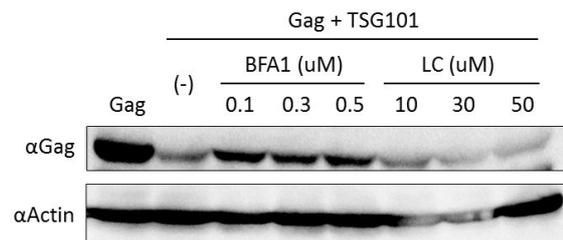


Figure 4 TSG101 down-regulated Gag through lysosomal pathway. 293T cells were co-transfected with Gag + FLAG-TSG101 plasmids for 24 h. The inhibitors, BFA1 (Bafilomycin A1) or LC (Lactacystin) at indicated concentrations were added and the cells were cultured for 6 h before collecting total cells for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

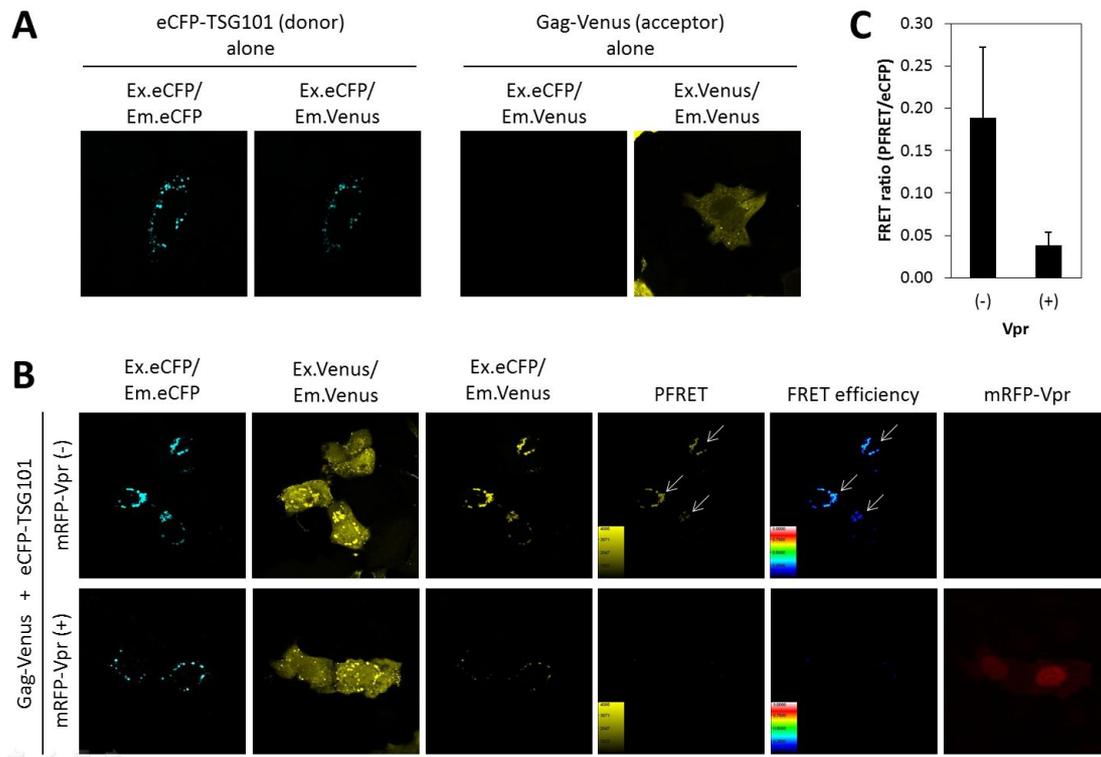


Figure 2 FRET analysis of Vpr rescued TSG101 induced Gag aggregation. HeLa cells were transfected with eCFP-TSG101 or Gag-Venus plasmid alone (A), or co-transfected with eCFP-TSG101 + Gag-Venus plasmids (B, upper row), or eCFP-TSG101 + Gag-Venus + mRFP-Vpr plasmids (B, lower row) for 48 hr. The precision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

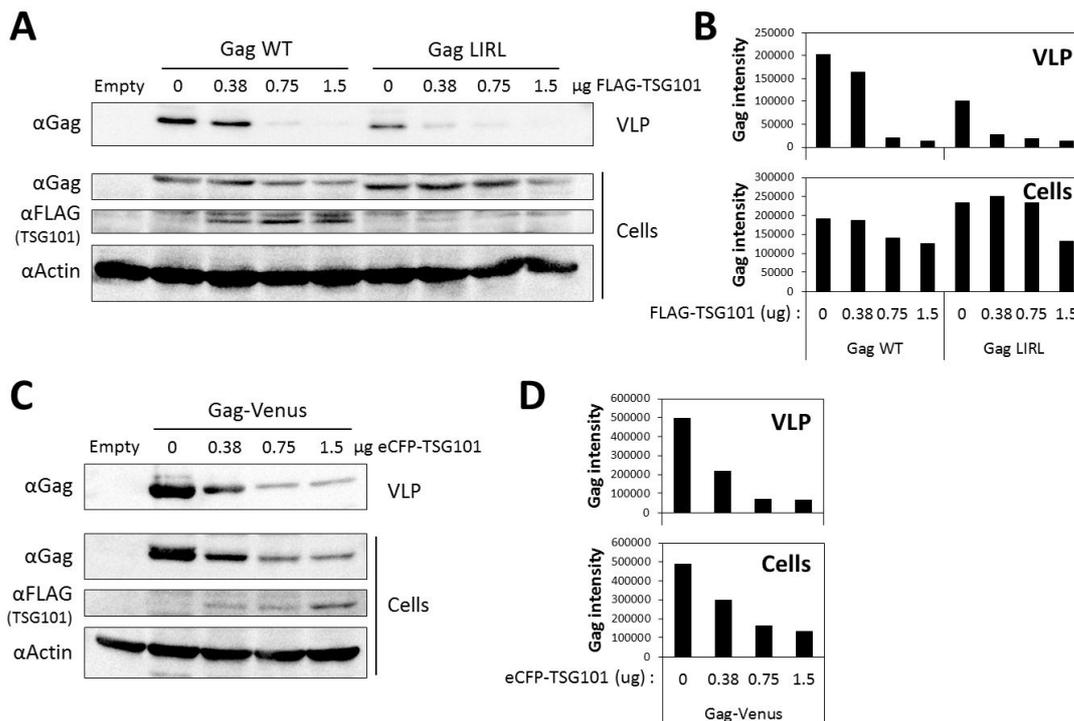


Figure 3 TSG101 induced Gag down-regulation and decreased VLP production. 293T cells were co-transfected with Gag (WT or LIRL, Δ PTAP) + FLAG-TSG101 plasmids (A) or Gag-Venus + eCFP-TSG101 plasmids (C). After 48 hr, the VLP was collected by 20% sucrose cushion/ultracentrifugation method and the total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

研究課題：HIV Gag 蛋白質とウイルスゲノム RNA との相互作用に関する解析

研究分担者：櫻木 淳一（阪大微研 ウイルス感染 助教）

研究要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

(倫理面への配慮)

倫理的配慮を必要とする研究は実施していな

い。

C. 研究結果

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

1. RNA二次構造予測プログラムによってSL1の構造予測を行うと二種類の代表的な構造が算出される。Model Aは多くの論文において標準的なモデルである一方、構造の安定性はわずかにModel Bの方が高い(Fig. 1)。実際にウイルス中で機能しているのはどちらの構造であるかを知るために、塩基置換変異によってそれぞれのモデルに特異的な塩基対形成を破壊・再構築した一連の変異体を作成して解析した。その結果Model Aが機能的構造として居る可能性が強く示唆された。
2. SL1のステム領域は上部と下部とに分かれるが、それぞれに3カ所ずつ存在するG-C塩基対についての機能解析を行った。その結果上部については2カ所のG-C塩基対は機能発揮に重要であったが最上部のヘアピンループに隣接した1カ所(G254-C264)については塩基対形成が不要である可能性が示唆された。
3. 同様に下部ステムの3カ所のG-C塩基対について解析を行った結果2カ所のG-C塩基対は機能発揮に重要であったが、最基部の1カ所(C243-G277)については分子内塩基対形成よりも分子間塩基対形成の方が機能的に重要である可能性が示唆された。この可能性はゲノム組換えアッセイの結果からも裏付けされた。
4. ヘアピンループ部の回文配列(GCGCGC)を変異導入によりG6個あるいはC6個のストレッチに変化させて二量体化頭を観察した結果、通説通りヘアピンループは二量体

形成に非常に重要な領域であることが確認された。

D. 考察

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

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

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

E. 結論

HIVゲノム二量体化における最重要領域であるゲノムRNA 5' 端非翻訳領域のパッケージングシグナル内に存在するステム-ループ 1 (SL1)は、計算機による構造予測と異なるパルジ・ループ・ステム構造をとることで様々な機能を発揮している可能性が示唆された。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表等

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

2) 櫻木淳一、櫻木小百合、塩田達雄 HIV-1 パッケージングシグナル内最重要領域 SL1 の機能的構造に関する多角的解析 日本ウイルス学会 2014、横浜

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

4) 櫻木淳一、櫻木小百合、塩田達雄 HIV-1 パッケージングシグナル内最重要領域 SL1 の機能的構造に関する多角的解析 日本エイズ学会 2014、大阪

Fig.1

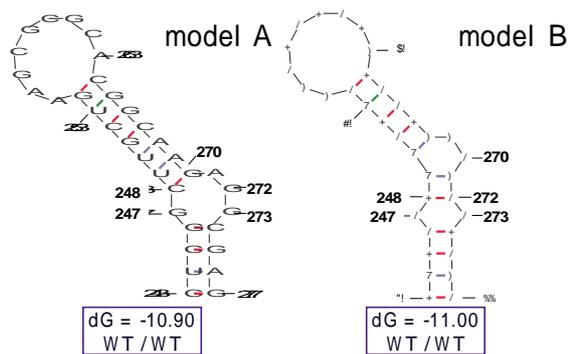
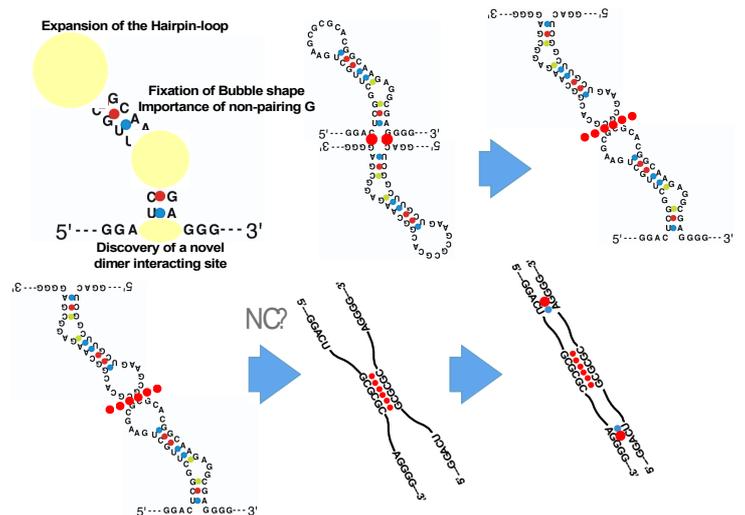


Fig.2



研究課題: HIV Gag 蛋白質と関連因子の治療標的構造の解明に向けた統合的研究

研究分担者: 玉村 啓和 (東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授)

研究要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1) MA 部分ペプチドの最適化

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

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

GSEELRSLYN[TIAVL]YSVHQRIDVK (MA-8, MA-9 をカバーする全配列: 25 残基)

SEELRSLYN[TIAVL]Y

EELRSLYN[TIAVL]YS

ELRSLYN[TIAVL]YSV

LRSLYN[TIAVL]YSVH

RSLYN[TIAVL]YSVHQ

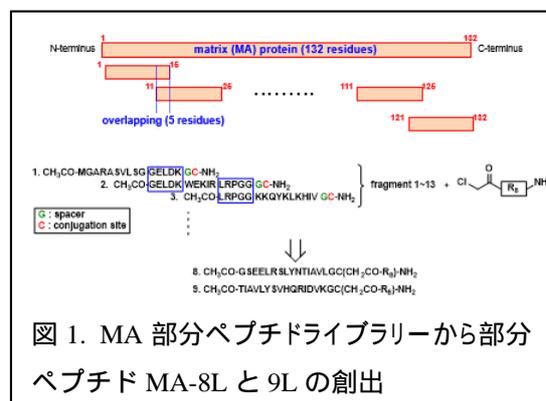
SLYN[TIAVL]YSVHQ

LYN[TIAVL]YSVHQRI

YN[TIAVL]YSVHQRID

N[TIAVL]YSVHQRIDV

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



具体的に MA-8L と 9L の間の配列 ~ の部分



ペプチドを設計した(図2)。また、以前と同様、スペーサーとして Gly、octa-Arg との reaction point として Cys を導入した(図3)。MA 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4に示す。合成した MA 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。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(図3)。

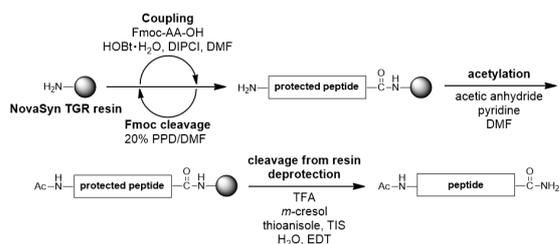


図4. MA 部分ペプチドの合成スキーム

2) CA 部分ペプチドライブラリーの調製

前年度より、全長 231 残基の CA タンパク質をカバーする CA 部分ペプチドライブラリーを構築し、上述の MA 部分ペプチドの合成と同様にそれぞれに細胞膜透過性配列 octa-Arg を付加した(CA-1L~23L)。なお、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ペプチド(CA-1C~23C)も調製した(図5)。

No.	CA 部分ペプチドの配列
-----	--------------

1	H ₂ N-PIVQNLQGQMVHQAIGC-CONH ₂
2	Ac-HN-VHQAI SPRTLNAWVKGC-CONH ₂
3	Ac-HN-NAWVKVVEEKAFSPEGC-CONH ₂
4	Ac-HN-AFSPEVPMFSALSEGC-CONH ₂
5	Ac-HN-SALSEGATPQDLNTMGC-CONH ₂
6	Ac-HN-DLNTMLNTVGGHQAAGC-CONH ₂
7	Ac-HN-GHQAAMQMLKETINEGC-CONH ₂
8	Ac-HN-ETINEEAAEWDRLHPGC-CONH ₂
9	Ac-HN-DRLHPVHAGPIAPGQGC-CONH ₂
10	Ac-HN-IAPGQMREPRGSDIAGC-CONH ₂
11	Ac-HN-GSDIAGTTSTLQEIQGC-CONH ₂
12	Ac-HN-LQEIQGWMTHNPPIPGC-CONH ₂
13	Ac-HN-NPIPVGIEYKRWIIGC-CONH ₂
14	Ac-HN-KRWIILGLNKIVRMVGC-CONH ₂
15	Ac-HN-IVRMYSPTSILDIRQGC-CONH ₂
16	Ac-HN-LDIRQGPKEFRDYVGC-CONH ₂
17	Ac-HN-FRDYVDRFYKTLRAEGC-CONH ₂
18	Ac-HN-TLRAEQASQEVKNWMGC-CONH ₂
19	Ac-HN-VKNWMTETLLVQNANGC-CONH ₂
20	Ac-HN-VQNANPDSKTILKALGC-CONH ₂
21	Ac-HN-ILKALPGATLEEMMGC-CONH ₂
22	Ac-HN-LEEMMTASQGVGGPGGC-CONH ₂
23	Ac-HN-VGGPGHKARVLGC-CONH ₂

図5. CA 部分ペプチドライブラリーの配列。細胞膜透過性ペプチドは各番号の配列の C 末端 Cys のチオール基に octa-Arg を付加(CA-1L~23L)、コントロールペプチドはチオール基を acetamide でキャッピング(CA-1C~23C)した。

3) 細胞膜透過性の検討

本研究では、部分ペプチドを細胞内へ導入するために、細胞膜透過性配列 octa-Arg を付加している。しかし最近、二次構造を維持し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ステイブルペプチド(staple peptide)が使用されている。このステイブルペプチド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、ステイプルペプチドを応用できるかどうかを検討した。ペプチド性インテグラーゼ阻害剤をモデルとして、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(図 6)。

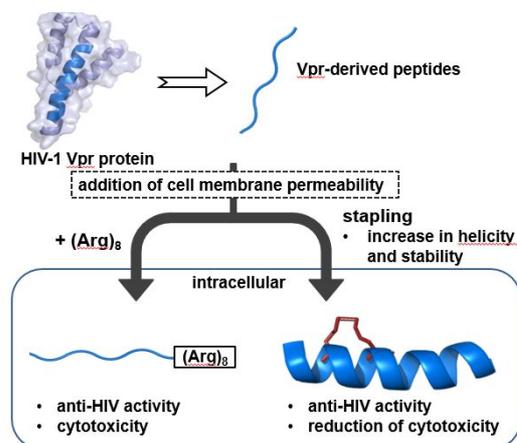


図 6. ペプチド性インテグラーゼ阻害剤を基にしたステイプルペプチドのデザイン

(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) 新たな MA 部分ペプチドの合成

以前高活性を示した MA-8L と 9L の間の配列 ~ の部分ペプチドの合成を、今年度までにすべて終了した。合成した細胞膜透過性 MA 部分ペプチド ~ の ESI-TOF MS のデータと収率を表 1 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。なお、ネガティブコントロールとして、MA-9L のアミノ酸配列をシャッフルさせたペプチド 9R を合成した。

表 1. 新たな MA 部分ペプチドの ESI-TOF MS データと収率

compd	calcd. for [M+H ⁺]	found	yield (%) ^a
	1970.98	1972.76	17
	1970.98	1973.48	11
	1941.00	1943.61	2
	1949.02	1951.05	7
	1963.99	1966.08	16
	1963.99	1966.13	15
	1990.05	1992.23	18
	1991.99	1994.19	18
	1927.99	1930.14	1
9R	1942.05	1944.16	trace

^a 樹脂からの全工程収率

2) 新たな MA 部分ペプチドの活性試験

合成した細胞膜透過性 MA 部分ペプチド ~ の抗 HIV-1 活性および細胞毒性の評価を村上努博士(国立感染症研究所、エイズ研究センター)に依頼した。これらの評価には MT-4 細胞、NL4-3 株を使用する MTT アッセイを用い、アッセイにはクロロキン 5 μM 添加した(表 2)。以前の MA 部分ペプチドライブラリーのアッセイでは、MT-4 細胞が薬剤に対して感受性が高く、抗 HIV-1 活性を示す濃度に至るまでに細胞毒性を示した。この原因として、エンドサイトーシスにより細胞内に導入された MA 部分ペプチドがエンドソームから細胞質に放出されにくいこと、アルギニン残基数が多いことが挙げられる。そこで、本研究ではクロロキンを添加したアッセイ系に変更した。クロロキンは、弱い塩基性であるため、エンドソーム内に H⁺ が取り込まれる。そのためエンドソーム内の濃度が上昇し、エンドソーム膜が破られることで MA 部分ペプチドが細胞質に放出される。

表 2. 新たな MA 部分ペプチドの抗 HIV 活性

と細胞毒性

compd	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
	>9.0	9.0
	>7.2	7.2
	1.8	9.4
	>5.9	5.9
	0.80	4.5
	1.0	3.7
	0.65	5.2
	0.80	5.5
	2.0	10
MA-9L	0.78	4.5
9R	>4.8	4.8

結果として、MA-8Lと9Lの間の配列ではC末端側の部分ペプチドのほうが高活性を示し、～の部分ペプチドがMA-9Lとほぼ同等の抗HIV活性を示した。

3) CA部分ペプチドライブラリーの活性試験

合成したCA部分ペプチドライブラリーの抗HIV-1活性および細胞毒性の評価を村上努博士(国立感染症研究所、エイズ研究センター)に依頼した。これらの評価にはMT-4細胞、NL4-3株を使用するMTTアッセイを用いた。今回は、最初のスクリーニングであるためアッセイにクロロキンを添加しなかった。表3には、C末端Cysのチオール基にocta-Argを付加した細胞膜透過性ペプチド(CA-1L~23L)のみを記載した。いくつかの部分ペプチドに顕著な抗HIV活性が見られた。とくに、N端側のCA-1L, 2Lと6L, 15Lは高活性を示した。

表3. 細胞膜透過性CA部分ペプチドの抗HIV

活性と細胞毒性

compd	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
1L	4.5	>50
2L	8.8	>50
3L	50	>50
4L	41	>50
5L	35	>50
6L	9.3	>50
7L	46% inh. at 50 μM	>50
8L	15	>50
9L	33% inh. at 50 μM	>50
10L	35	>50
11L	35% inh. at 50 μM	>50
12L	>50	>50
13L	>35	35
14L	>9	9
15L	4.6	9.3
16L	33	>50
17L	>25	25
18L	>50	>50
19L	47% inh. at 50 μM	>50
20L	33	>50
21L	>50	50
22L	46% inh. at 50 μM	>50
23L	36% inh. at 50 μM	>50
AZT	0.078	>100
AMD3100	0.033	>50
SCH-D	>5	>5

4) 細胞膜透過性の検討

インテグラーゼ(IN)阻害活性ペプチド中に、アルキルタイプの側鎖を有する非天然アミノ酸を導入し調製したステイブルペプチドとocta-Argペプチドを付与したペプチドを検討した。CDスペクトルより、リニアペプチドやocta-Argペプチドを付与したペプチドよりも側鎖を架橋したステイブルペプチド

ドの方がより高い α -ヘリックス性を有していた。蛍光イメージングにより、顕著な細胞膜透過性を有することが明らかになった。

D. 考察

Gag を標的とする治療標的部位の探索、目的化合物の設計、合成ができ、有機合成化学およびケミカルバイオロジーの技術の有用性を示した。いくつかの MA および CA 部分ペプチドに顕著な抗 HIV 活性が見られ、構造活性相関のデータが得られた。二次構造を維持するように共有結合で架橋したステイブルペプチドは、細胞膜を透過することができ、細胞で抗 HIV 活性を示す化合物を創出できた。

E. 結論

Gag を標的とする治療標的部位の探索、MA/CA 由来の抗 HIV リード化合物の最適化、細胞内導入の効率化、リード化合物の構造活性相関の情報基盤の提供を目指して、十分な研究成果を得ることができた。

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) Ohashi N, Nomura W, Minato N, Tamamura H. Screening for Protein Kinase C Ligands Using Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Chem. Pharm. Bull.* 62(10): 1019–1025, 2014.
- 2) Masyuk M, Abdueilmula A, Morosan-Puopolo G, Ödemis V, Rehimi R, Khalida N, Yusuf F, Engele J, Tamamura H., Theiss C, Brand-Saberi B. Retrograde Migration of Pectoral Girdle Muscle Precursors Depends on CXCR4/SDF-1 Signaling. *Histochem. Cell. Biol.* 142(5): 473–488, 2014.
- 3) Yamamoto J, Maeda N, Komiya C, Tanaka T, Denda M, Ebisuno K, Nomura W, Tamamura H.

Sato Y, Yamauchi A, Shigenaga A, Otaka A. Development of a Fluoride-responsive Amide Bond Cleavage Device that is Potentially Applicable to a Traceable Linker. *Tetrahedron* 70(34): 5122–5127, 2014.

4) Takano H, Narumi T, Ohashi N, Suzuki A, Furuta T, Nomura W, Tamamura H. Development of the 8-Aza-3-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl Group as a New Entry of Photolabile Protecting Groups. *Tetrahedron* 70(29): 4400–4404, 2014.

5) Yamamoto J, Denda M, Maeda N, Kita M, Komiya C, Tanaka T, Nomura W, Tamamura H. Sato Y, Yamauchi A, Shigenaga A, Otaka A. Development of a Traceable Linker Containing a Thiol-responsive Amino Acid for the Enrichment and Selective Labelling of Target Proteins. *Org. Biomol. Chem.* 12(23): 3821–3826, 2014.

6) Narumi T, Tsuzuki S, Tamamura H. Imidazolium Salt-Catalyzed Friedel-Crafts-Type Conjugate Addition of Indoles: Analysis of Indole/Imidazolium Complex by High Level ab Initio Calculations. *Asian J. Org. Chem.* 3(4): 497–503, 2014.

7) 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.* 16(4): 1184–1187, 2014.

8) 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. *Peptide Science*, 57-58, 2014.

9) 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. *Peptide Science*, 337-338, 2014.

10) Nomura W, Masuda A, Tamamura H. Creation of Zinc Finger Nucleases Targeting Telomerase Promoter Region. *Peptide Science*, 241-242, 2014.

11) 野村渉、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プ。化学工業 特集「ペプチド化学の新潮流(1)」(化学工業社 川崎) 65巻、11号、頁8~14、2014年(11月)

2. 学会発表等

(1) Tamamura H. Chemical Biology Studies on the Elucidation of a Dimerization State of a GPCR CXCR4 and the Development of Recognition Probes for Cancerous Cells. Seminar in University of Cologne, Sep 11, 2014, Cologne, Germany.

(2) Tamamura H. Development of peptide-lead anti-HIV agents. The 15th Akabori Conference 2014: Japanese-German Symposium on Peptide Science, Sep 7-9, 2014, Boppard, Germany.

(3) Nomura W, Hashimoto C, Fujino M, Murakami T, Ohashi N, Tamamura H. Multimerized Peptides Derived from the C-Terminal Region of HIV-1 gp41 as Fusion Inhibitors. The 33rd European Peptide Society Symposium, Aug 31-Sep 5, 2014, Sofia, Bulgaria.

(4) Nomura W, Métifiot M, Ohashi N, Fujino M, Mizuguchi T, Yamamoto N, Pommier Y, Komano JA, Murakami T, Tamamura H. Cell-permeable

Stapled Peptides with Integrase Inhibitory Activity Derived from HIV Gene Products. The 15h Kumamoto AIDS Seminar, Oct 1-3, 2014, Kumamoto, Japan.

(5) Yamada Y, Hashimoto C, Otsuki H, Hirota Y, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Mizuguchi T, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, Tamamura H. A CD4 Mimic as an HIV Entry Inhibitor: Pharmacokinetics. The 15h Kumamoto AIDS Seminar, Oct 1-3, 2014, Kumamoto, Japan.

(6) Irahara Y, Kotani M, Harada S, Narumi T, Yamada Y, Hirota Y, Ohashi N, Mizuguchi T, Nomura W, Matsushita S, Yoshimura K, Tamamura H. A New Type of Small CD4 Mimic Molecules Targeting an HIV Envelope Protein gp120. The 15h Kumamoto AIDS Seminar, Oct 1-3, 2014, Kumamoto, Japan.

(7) Kotani M, Hirota Y, Irahara Y, Harada S, Yamada Y, Ohashi N, Mizuguchi T, Nomura W, Matsushita S, Yoshimura K, Tamamura H. Structure-activity Relationship Studies of CD4 Mimic Molecules. The 15h Kumamoto AIDS Seminar, Oct 1-3, 2014, Kumamoto, Japan.

(8) 玉村啓和. エイズ発症防止と疾患予防科学. 東京医科歯科大学大学院 生命理工学系専攻「疾患予防科学コース」ミニシンポジウム「疾患予防科学で何を学ぶのか」疾患予防のための理工学: その魅力と大学院キャリアセミナー「研究紹介セミナー」, 2014年7月19日, 東京.

(9) 本田柚子奈, 野村 渉, 武富昇平, 大橋南美, 橋本知恵, 玉村啓和. HIV-gp41 の膜融合阻害ペプチドの二量体化を基にした誘導体の創製研究. 第 58 回日本薬学会関東支部大会, 2014年10月4日, 東京.

(10) Honda Y, Mizuguchi T, Nomura W, Tamamura H. Development of Dimeric Peptide Derivatives Based on gp41 Fragments as HIV-1 Fusion Inhibitors. 第 51 回ペプチド討論会, 2014年10月22-24日, 徳島.

(11) 野村 渉, 大橋南美, 水口貴章, Mathieu Metifiot, 藤野真之, Yves Pommier, 村上 努, 玉村啓和. ステーブルペプチドを活用した HIV-1 遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害剤の創出. 第 32 回メデイシナルケミストリーシンポジウム, 2014年11月26-28日, 神戸.

(12) 野村 渉, 水口貴章, 大橋南美, Mathieu Metifiot, 藤野真之, Yves Pommier, 駒野 淳, 村上 努, 玉村啓和. HIV-1 遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害活性を持ったステーブルペプチド. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2014年12月3-5日, 大阪.

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）

塩田達雄（大阪大学 微生物病研究所 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。H26 年度は、HIV-1 CA 部分ペプチドライブラリーを作製し、それらの抗 HIV-1 活性と細胞毒性を評価した。その結果、細胞膜透過性を付与することにより 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として、fragment 1、6、8、15 を特定できた。興味深いことに、fragment 15 は細胞膜透過性を付与しなくても弱いながら抗 HIV-1 活性を有していた（玉村先生との共同研究の成果）。次に、HIV-1 複製前期過程に障害を有することが推定されている Gag MA 領域の変異体（V6R）を用いて、前期過程の詳細な解析（VSV-G シュードタイプ HIV-1 の HeLa 細胞への感染系において種々の段階のウイルス DNA 合成を real-time PCR で解析）を行った。その結果、V6R 変異体は、逆転写の過程に障害を有することが明らかになった（共同研究者の塩田先生の研究から、V6R 変異体はその脱殻速度が亢進しているという結果も同時に得た）。

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) 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。

(2) MA 変異体 V6R の HIV-1 複製前期過程における障害がどこに存在するかを明らかにするために、VSV-G シュードタイプ HIV-1 (NL4-3) を HeLa 細胞に感染させた。経時的にウイルス

DNA を抽出し、各種プライマーを用いた real-time PCR によって、後期逆転写産物、2-LTR、宿主 DNA に組み込まれたウイルス DNA を定量した。

(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) CA 部分ペプチドの抗 HIV-1 活性および細胞毒性測定試験：Octa-Arg を C 末に付与し、細胞膜透過性を付与することにより 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は、fragment 1、6、8、15 の 4 つであった (表 1)。興味深いことに、fragment 15 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においても弱いながら X4、R5 HIV-1 に対して抗ウイルス活性を有していた。

(2) MA 変異体 V6R の HIV-1 複製前期過程における障害部位を real-time PCR によって特定する実験：V6R 変異によって逆転写の過程に障害が生じ (図 1)、それが組み込まれる DNA 量やウイルスの感染価の低下につながっていることが明らかになった。

D. 考察

(1) 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。

(2) 共同研究者の塩田先生の研究から、V6R 変異体はその脱殻速度が亢進しているという結果も同時に得ており、これまでの報告のように、脱殻と逆転写は相互に関連して進行していることが示唆された。

E. 結論

(1) CA 部分ペプチド fragment 1、6、8、15 の4つは新規抗 HIV 薬のためのシードと考えられる。

(2) MA 蛋白質の N 末の変異(V6R)によって、ウイルス複製前期過程におけるウイルス DNA の逆転写の過程に障害が生じることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1) 引地優太、横山 勝、竹村太地郎、藤野真之、

熊倉 成、山本直樹、佐藤裕徳、俣野哲朗、村上 努。新規 CXCR4 阻害剤 KRH-3955 耐性 HIV-1 の誘導とその解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会，横浜，2014 年 11 月 10 日-12 日

2) 引地優太、武田英里、藤野真之、Eric O. Freed、中山英美、塩田達雄、俣野哲朗、村上 努。HIV-1 マトリックス(MA)変異体を用いた複製前期過程の解析。第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会，大阪，2014 年 12 月 3 日-5 日

3) 野村 涉、水口貴章、大橋南美、Mathieu Metifiot、藤野真之、Yves Pommier、駒野 淳、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 28 回日本エイズ学会学術集会・総会，大阪，2014 年 12 月 3 日-5 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。

表1. CA部分ペプチドの抗HIV-1活性および細胞毒性				
CA 部分ペプチド	抗HIV-1活性		細胞毒性	
	MT-4/NL4-3	PM1/CCR5/NL(AD8)	MT-4	PM1/CCR5
	EC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
1L	4.5	6.2	>50	>50
6L	8.1	13	>50	>50
8L	14	14% inh. (50 μM)	>50	>50
15L	6.6	1.2	9.3	18
15C	47	27	>50	>50
AZT	0.066	5.3	>100	>100
AMD3100	0.033	>50	>50	>50
Vicriviroc	>5	0.0081	>5	>5

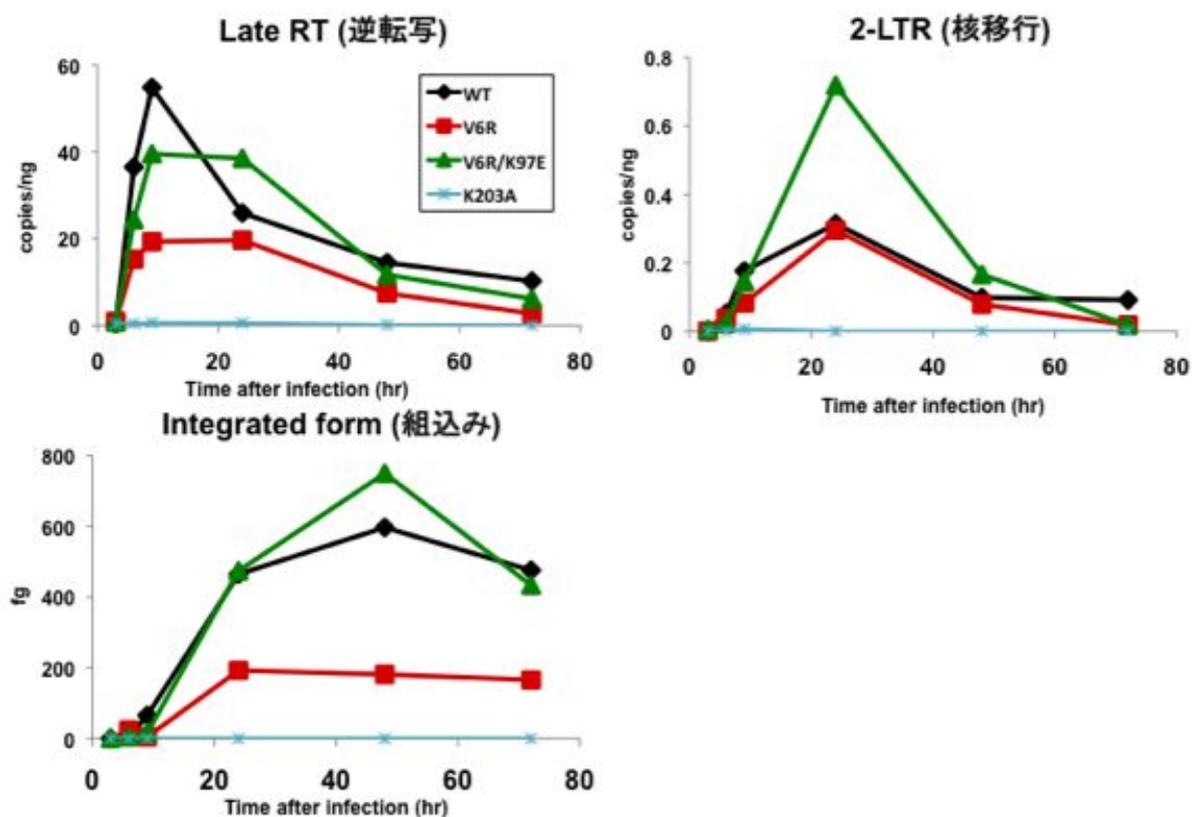


図1. MA変異体(V6R)、復帰変異体(V6R/K97E)、CA変異体(K203A)のウイルスDNA合成の経時変化

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, Nimiyongskul 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.	88	3598-604	2014
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	16	320-7	2014
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.		11	9	2014
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.	88	4145-60	2014
Nomaguchi M, Nakayama EE, Yokoyama M, Doi N, Igarashi T, Shioda T, <u>Sato H</u> , Adachi A.	Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 α	Microbes Infect.	16	936-44	2014
野間口 雅子					
<u>Nomaguchi M</u> , Nakayama EE, Yokoyama M, Doi N, Igarashi T, Shioda T,	Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1	Microbes and Infection	16	936-44	2014

Sato H, Adachi A.	resistance to rhesus TRIM				
Doi N, Adachi A, <u>Nomaguchi M.</u>	Growth properties of macaque-tropic HIV-1 clones carrying vpx/vpr genes from simian immunodeficiency viruses in place of their vpr regions.	Journal of Medical Investigation	61	374-79	2014
<u>Nomaguchi M.</u> , Doi N, Adachi A.	Virological characterization of HIV-2 vpx gene mutants in various cell systems. Microbes Infect.	Microbes and Infection	16	695-701	2014
<u>Nomaguchi M.</u> , Miyake A, Doi N, Fujiwara S, Miyazaki Y, Yokoyama M, Tsunetsugu-Yokota Y, Sato H, Masuda T, Adachi A.	Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability.	Journal of Virology	88	4145-60	2014
塩田 達雄					
Takeda E, Kono K, Hulme AE, Hope TJ, Nakayama EE, <u>Shioda T.</u>	Fluorescent image analysis of HIV-1 and HIV-2 uncoating kinetics in the presence of old world monkey TRIM5 α .	PloS one			Accepted
Hayasaka H, Kobayashi D, Yoshimura H, Nakayama EE, <u>Shioda T.</u> , Miyasaka M.	The HIV-1 gp120/CXCR4 axis promotes CCR7 ligand-dependent CD4 T cell migration: CCR7 homo- and CCR7/CXCR4 hetero-oligomer formation as a possible mechanism for up-regulation of functional CCR7.	PloS one			Accepted
Nomaguchi M, Nakayama EE, Yokoyama M, Doi N, Igarashi T, <u>Shioda T.</u> , Sato H, Adachi A.	Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 α .	Microbes and infection / Institut Pasteur	16	936-44	2014
増田貴夫					
Kinpara S, Itoh S, Takahata T, Saitoh Y, Hasegawa A, Kijiyama M, Utsunomiya A, Masuda M, Miyazaki Y, Matsuoka M,	Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and anti-sense viral RNA in the constitutive	Leukemia			In press

Nakamura M, Yamaoka S, <u>Masuda T</u> , Kannagi M.	NFkB activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells.				
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	88	4145-60	2014
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	53	2349-52	2014
蝦名 博貴					
<u>Ebina H</u> , Kanemura Y, Misawa N, Sakuma T, Kobayashi T, Yamamoto T, Koyanagi Y.	A high excision potential of TALENs for integrated DNA of HIV-based lentiviral vector.	PLoS One			In Press
<u>蝦名 博貴</u> 、小柳 義夫	ゲノム編集と AIDS 治療	医学のあゆ み	252	189-93	2015
岡陽子					
Hagiwara K, Ishii H, Murakami T, Takeshima S-n, Chutiwitoonchai N, Kondo Y, Honda K, Osada H, Tsunetsugu-Yokota Y, Suzuki M, <u>Aida Y.</u>	Synthesis of a Vpr-binding derivative for use as a novel HIV-1 inhibitor	Antiviral Research		in press	2015
Miyatake H, Sanjoh A, Unzai S, Matsuda G, Tatsumi Y, Miyamoto Y, Dohmae N, <u>Aida Y.</u>	Crystal structure of human importin- α 1 (Rch1), revealing a potential autoinhibition mode involving homodimerization.	PloS ONE	10	e011599 5	2015
Murakami T, <u>Aida Y.</u>	Visualizing 1 Vpr-induced G2 arrest and apoptosis.	PloS ONE	9	e86840	2014
Zahoor M A, Xue G, Sato H, Murakami T, Takeshima S-n, <u>Aida Y.</u>	HIV-1 Vpr induces interferon-stimulated genes in human monocyte-derived	PloS ONE	9	e106418	2014

	macrophages.				
玉村 啓和					
Ohashi N, Nomura W, Minato N, <u>Tamamura H.</u>	Screening for Protein Kinase C Ligands Using Fluorescence Resonance Energy Transfer.	Chem. Pharm. Bull.	62	1019-25	2014
Masyuk M, Abduelmula A, Morosan-Puopolo G, Ödemis V, Rehimi R, Khalida N, Yusuf F, Engele J, <u>Tamamura H.</u> Theiss C, Brand-Saberi B.	Retrograde Migration of Pectoral Girdle Muscle Precursors Depends on CXCR4/SDF-1 Signaling.	Histochem. Cell. Biol.	142	473-88	2014
Yamamoto J, Maeda N, Komiya C, Tanaka T, Denda M, Ebisuno K, Nomura W, <u>Tamamura H.</u> Sato Y, Yamauchi A, Shigenaga A, Otaka A.	Development of a Fluoride-responsive Amide Bond Cleavage Device that is Potentially Applicable to a Traceable Linker.	Tetrahedron	70	5122-7	2014
Takano H, Narumi T, Ohashi N, Suzuki A, Furuta T, Nomura W, <u>Tamamura H.</u>	Development of the 8-Aza-3-bromo-7-hydroxyco umarin-4-ylmethyl Group as a New Entry of Photolabile Protecting Groups.	Tetrahedron	70	4400-4	2014
Yamamoto J, Denda M, Maeda N, Kita M, Komiya C, Tanaka T, Nomura W, <u>Tamamura H.</u> Sato Y, Yamauchi A, Shigenaga A, Otaka A.	Development of a Traceable Linker Containing a Thiol-responsive Amino Acid for the Enrichment and Selective Labelling of Target Proteins.	Org. Biomol. Chem.	12	3821-6	2014
Narumi T, Tsuzuki S, <u>Tamamura H.</u>	Imidazolium Salt-Catalyzed Friedel-Crafts-Type Conjugate Addition of Indoles: Analysis of Indole/Imidazolium Complex by High Level ab Initio Calculations.	Asian J. Org. Chem.	3	497- 503	2014
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.	16	1184-7	2014

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
蝦名博貴	ゲノム編集 技術を用い たエイズ根 治療法の可 能性	山本卓	今すぐ始める ゲノム編集	羊土社	日本	2014	21-22
野村涉、 <u>玉村啓和</u>	ターゲット タンパク質 を特異的に 認識するプ ローブ		化学工業 特集 「ペプチド化 学の新潮流(I)」	化学工業社	川崎	2014	8-14
Nomura W, Ohashi N, Métifiot M, Fujino M, Pommier Y, Murakami T, <u>Tamamura H.</u>	Peptides as HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Products.	Yuji Nishiuchi and Tadashi Teshima	Peptide Science	The Japanese Peptide Society	Osaka	2014	57-8
Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Honda Y, Ohashi N, Fujino M, Murakami T, Yamamoto N, <u>Tamamura H.</u>	Multimerized C34-Related Peptides as HIV-1 Fusion Inhibitors.	Yuji Nishiuchi and Tadashi Teshima	Peptide Science	The Japanese Peptide Society	Osaka	2014	337-8
Nomura W, Masuda A, <u>Tamamura H.</u>	Creation of Zinc Finger Nucleases Targeting Telomerase Promoter Region.	Yuji Nishiuchi and Tadashi Teshima	Peptide Science	The Japanese Peptide Society	Osaka	2014	241-2