

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15139

研究課題名(和文) 逆転写過程の無細胞再構築

研究課題名(英文) Reconstitution of reverse transcription in vitro.

研究代表者

増田 貴夫 (Masuda, Takao)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：80219336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の複製に必須な逆転写過程をリコンビナント逆転写酵素蛋白およびin vitro 合成ウイルスRNAを用い、無細胞条件下での逆転写再構築アッセイ系の樹立に成功した。このアッセイ系を用いて、(1)HIV RNAの5'末端のグアニン(G)の数が、1stストランド転移に重要であること(2)HIVは、逆転写反応において最も効率の良い鋳型RNAである5'-端にGを一つ有するRNAをウイルス粒子に選択的にパッケージングすることを世界に先駆けて見出した。本研究結果は、HIV逆転写制御に關与する新規の分子基盤とウイルスゲノムの転写機構との共進化を示唆する新規知見を提示した。

研究成果の概要(英文)：Reverse transcription of human immunodeficiency virus (HIV) was successfully reconstituted in vitro (cell-free) using recombinant HIV reverse transcriptase and in vitro synthesized HIV RNA. By using this in vitro assay, novel mechanisms to regulate HIV reverse transcription have revealed; 1) Critical role of guanosine (G) number at 5-end of virus RNA for successful 1st strand transfer, and (2) HIV has evolved to package the most efficient RNA into virus particle, providing novel mechanisms to regulate HIV reverse transcription and its coevolution history with viral genome transcription machinery.

研究分野：ウイルス学

キーワード：逆転写 逆転写酵素 レトロウイルス RNA HIV

1. 研究開始当初の背景

逆転写過程はヒト免疫不全ウイルス(HIV)をはじめとするレトロウイルスゲノム複製の特徴でもあり、感染細胞内では「逆転写過程」を阻止する細胞内抑制因子(TRIM5 APOBEC3G、SAMHD1)が存在することが知られている。近年、リンパ系組織に存在するナイーブT細胞にHIVを感染させると、逆転写反応が中途段階で停止し、インフラマゾーム系を介した細胞死が誘導されることも報告された(Nature 505: 509-514, 2014, Science 343: 428-32, 2014)。これらは、逆転写反応制御それ自体がHIVの病原性に大きく関与している可能性を示している。ウイルスゲノムRNAと逆転写酵素(RT)複合体には、他のウイルス因子および宿主因子の関与が示唆される。しかしながら、感染細胞を用いた従来のアッセイ系では、未知の因子の関与する可能性もあるため、個々の因子の具体的作用機序を明確に示す事はできていない。

2. 研究の目的

上記の研究背景および現状をふまえ、合成あるいは精製したウイルスゲノムRNAおよび酵素/構造蛋白による無細胞逆転写アッセイ系の樹立し、既知の必須因子での律速過程と候補補助因子の個々の機能的関与を明確にする必要があると考えた。本アッセイ系が確立されれば、ウイルスゲノム複製のあらたな機構解明に大きな貢献が期待される。

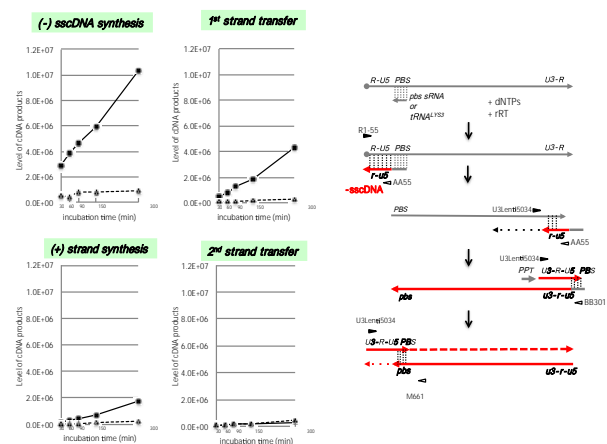
3. 研究の方法

逆転写過程に必須とされる cis-配列(LTR、PBS、ppt)をもつミニ HIV ゲノム RNA (レンチウイルスベクター由来) を、T7 RNAポリメラーゼによる in vitro 転写反応により調整した。HIV 逆転写酵素(RT)の調整は、その前駆蛋白(p66)をまず大腸菌に発現させ、得られた p66 を HIV 由来のプロテアーゼにより処理し、ヘテロ二量体(p66/p51)

を得た。ウイルス RNA を pbs-RNA プライマーとアニーリング後、リコンビナント RT (p66/p51) と dNTPs を添加し、42℃ 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。合成ウイルス RNA は、逆転写反応に必須なシス配列を全て含み、転写開始点すなわち 5' 末端の異なる RNA を数種作成し、宿主転写系による逆転写過程制御の可能性を検討した。逆転写補助因子として、ヌクレオキャプシド、インテグラーゼ蛋白を主軸に、また、律速過程に促進的に作用する宿主因候も逐次評価し、逆転写反応の全素過程の再構築を試みた。

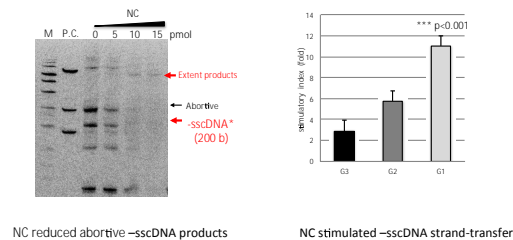
4. 研究成果

1) 無細胞環境下で(-)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た(下図)。

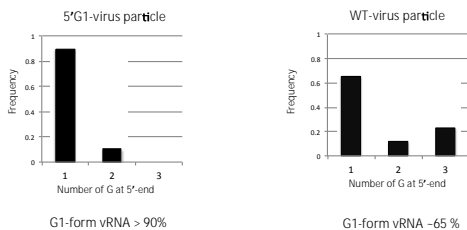


2) ヌクレオキャプシド蛋白およびウイルスゲノムRNAの5'末端のグアニン(G)の数が、

1st ストランド転移に重要であることを見出した(下図)。

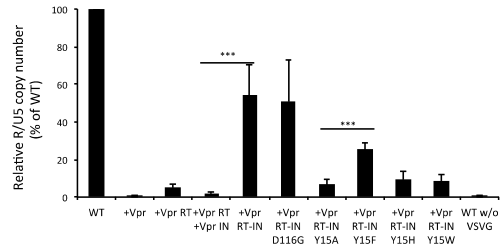


3) HIV-1 は複製サイクルのなかで、逆転写の効率に重要な5'末端のグアニン(G)が1個のものを選択的にウイルス粒子内に取り込み、逆転写の鋳型RNAとして用いることを見出した(下図)。



3) HIV-1 LTR の U3/R 境界に高度に存在されている3つのG (GGG)塩基の欠損変異体を作成し、無細胞再構築およびウイルス複製アッセイ系の両者で評価した。いずれのアッセイ系においても3' GGG の変異の逆転写反応における影響は観察されなかった。また、ウイルス鋳型RNA 5'末端のキャップ構造は、逆転写されないことが示唆された。以上より、U3/R 境界に高度に存在されている3つのG (3' GGG)塩基は、逆転写過程には関与せず、コアプロモーターとしての転写制御に重要である可能性を示した。

4) 逆転写過程には、逆転写酵素に連結したインテグラーゼが重要であることを見出した(下図)。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

Takahata, T., Takeda, E., Tokunaga, K., Yokoyama, M., Huang, Y-L., Hasegawa, A., Shioda, T., Sato H, Kannagi, M., Masuda T. Critical Contribution of Tyr15 in the HIV-1 Integrase (IN) in Facilitating IN Assembly and Nonenzymatic Function through the IN Precursor Form with Reverse Transcriptase. *J. Virol.* (査読有り) 2017, 91, e02003-16.

DOI:10.1128/JVI.02003-16

2) Nomaguchi, M., Doi, N., Sakai, Y., Ode, H., Iwatani, Y., Ueno, T., Matsumoto, Y., Miyazaki, Y., Masuda, T., Adachi, A. Natural single-nucleotide variations in the HIV-1 genomic SA1prox region can alter viral replication ability by regulating Vif expression levels. *J. Virol.* (査読有り). 2016, 90: 4563-4578. DOI: 10.1128/JVI.02939-15.

3) Masuda T., Sato Y, Huang Y, Koi S, Takahata T, Hasegawa A, Kawai G, Kannagi M. Fate of HIV-1 cDNA intermediates during reverse transcription is dictated by transcription initiation site of virus genomic RNA. *Sci. Rep.* (査読有り). 2015, 5:17680. DOI:10.1038/srep17680.

[学会発表](計 4件)

1) Yu-Lun Huang, Tatsuro Takahata, Atsuhiko Hasegawa, Gota Kawai, Mari Kannagi and Takao Masuda. Role of 5' -end modification of HIV-1 RNA during reverse transcription. 第64回日

本ウイルス学会学術集会, 2016年10月23日
(札幌、札幌コンベンションセンター)。

2) Masuda T, Sato Y, Huang Y, Koi S, Takahata T, Hasegawa A, Kawai G, Kannagi M. In vitro reconstitution of HIV-1 reverse transcription revealed an unprecedented role of 5' viral genomic RNA on reverse transcription. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 2015年11月22日(福岡, 福岡国際会議場)。

3) 増田貴夫、佐藤洋子、黄渝倫、高畑辰郎、長谷川温彦、河合剛汰、神奈木真理. HIV-1 RNA 5'末端配列の逆転写過程での重要性. 第29回日本エイズ学会学術集会, 2015年11月30日(東京、東京ドームホテル)。

4) 高畑辰郎、徳永研三、飛梅実、長谷川温彦、神奈木真理、増田貴夫. HIV-1 インテグラーゼの変異が及ぼす酵素活性以外への影響と機序の解析 第29回日本エイズ学会学術集会, 2015年, 11月30日(東京、東京ドームホテル)。

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 貴夫 (Masuda Takao)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：80219336

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()