

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08810

研究課題名(和文) HIVゲノムRNAの感染後期における細胞内動態・形態に関する解析

研究課題名(英文) The analysis on intracellular dynamics and morphology of HIV-1 RNA at a late stage of infection.

研究代表者

櫻木 淳一 (SAKURAGI, JUNICHI)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：90273705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：エイズの病原体ヒト免疫不全ウイルス(HIV)が属するレンチウイルスのゲノムは約9000塩基の(+)側一本鎖のRNAである。これはウイルス粒子内で二量体化シグナル(DLS)というRNA構造を介して二量体化しているが、その理由や機序など不明な点が多い。そこで本研究において研究代表者は、発現から粒子内にいたるレンチウイルスRNAの特異な動態・形態の変遷を解明することを目的とした。これまでの自身の研究による成果を更に発展させることによって得られる、ウイルスの増殖に大きく影響するこれらの現象の詳細な解析を通して、レンチウイルスの本質とその理解に近づくことをねらいとして本研究を計画した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1) DLS内の最重要部位であるHIV-1のSL1に関して、いくつかの新知見を見いだした。特にステム最基部及び最上部の塩基対は分子内対形成しておらず、最基部は分子間(二量体間)対形成している可能性を示唆。こうした知見を元に新規SL1構造モデルを提唱した。2) ウイルスゲノムRNA翻訳とパッケージングは連動しておらず、翻訳されたGag蛋白は鋳型RNAを直接リクルートしないことがレンチウイルス共通のドグマであることを初めて示した。これまでに知られていなかったウイルスゲノムの普遍的性状を明らかにしたことによってレンチウイルスの深い理解と制圧に向けた基礎的知見を積み上げ、学術的にも社会的にも貢献した。

研究成果の概要(英文)：The genome of lentivirus including HIV is a positive sense single stranded RNA. The viral RNAs dimerize within virion connected each other by cis-RNA structure called dimer linkage structure (DLS). The reason, mechanism and process of dimerization are still unclear. In this research, I aimed to clarify the transition of a dynamic state and a morphology of lentiviral RNA in cell, from expression to virion packaging. This attempt will be achieved by the expansion of my research outcome so far. I planned this project for better understanding of the nature of lentiviruses.

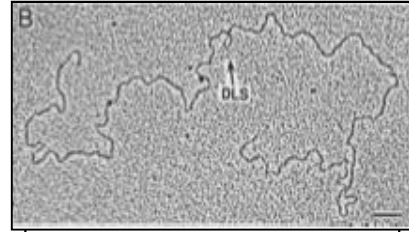
研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV RNA 構造 RNA標識 レンチウイルス レトロウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ここ四半世紀において最悪の伝染病の一つとなっているエイズの病原体ヒト免疫不全ウイルス(HIV)はレトロウイルス科に属している。HIV は制圧されるべき病原体としてはもとより遺伝子導入ベクターとして高いポテンシャルを持つことから、いまなお未知の部分が多いその生活環に関する基礎的研究は大きな意義を持つ。HIV ゲノムは約9000塩基の(+)側一本鎖のRNAであり、ウイルス由来のヌクレオカプシド蛋白(NC)と特異的に結合し核酸蛋白複合体(RNP)を形成して粒子内にパッケージされている。レトロウイルスのゲノムRNAは粒子内で常に二量体化しているがこれは他に例を見ないユニークな現象であり、その理由や機序など不明な点は多い。



HIV-1RNA 二量体の電顕像

Virology. 1999. 233; 271-

研究代表者は長年にわたりレトロウイルスのゲノムRNAに着目し、様々な角度から研究・考察を行ってきた。これまでに HIV-1 ゲノムRNA 二量体化の程度を測定する独自の実験系を確立した上で、パッケージングにおけるゲノム二量体化シグナル(Dimer Linkage Structure; DLS)の重要性やゲノム二量体化の果たす役割の新しい可能性を示唆し、DLSの必要十分領域を世界で初めて詳細に同定した(J.Virol. 75, 2557-, J.Virol. 76, 959-, J.Virol. 77, 4060-, J.Virol. 81, 7985-)。近年の論文においては HIV 粒子の成熟に着目し、ゲノム二量体化と粒子成熟の相関に関して様々な新知見を報告し(Nucleic Acids Research. 39: 3404-17) また HIV-1DLS 中に RNA 偽結節様構造が存在することを強く示唆してきた(Nucleic Acids Res. 40:5012-22.)。レトロウイルスは自身の持つ逆転写酵素によってゲノムRNAをDNAに逆転写する。この際に二量体化したゲノム間で組換え反応が起きることが知られているが、研究代表者はゲノム組換えと二量体化の厳密な相関についても指摘・考察を行い(Microbes Infect. 10:396-404., Microbes Infect. 12: 1002-)、また HIV-1 の組換え部位のRNA配列条件について非常に重要な基本的知見を見だし報告した(J Gen Virol. 2015 Nov;96(11):3382-)。ゲノム組換えは HIV を始めとするレンチウイルスに見られる遺伝的多様性をもたらす要因の一つではあるが、一方で遺伝的多様性がほとんど見られないレトロウイルスも存在するため、多様性獲得が二量体化の必須の存在理由ではないと考えられる。研究代表者はゲノム二量体化がウイルスのパッケージングや感染能獲得に重要な役割を果たすことを再三指摘してきたが、限られた物理的キャパシティしか持たないウイルスがわざわざゲノムRNAという巨大分子を二個ひと組で保持することには、さらなる未知の理由が存在する可能性がある。

2. 研究の目的

レトロウイルスゲノムRNAはイントロンを複数持ちながらスプライシングを受けないまま核外輸送される極めて特異な形態をとる。その後ウイルス構造蛋白の翻訳鋳型になる一方で、ウイルス粒子へのパッケージもされるという複数の目的を持った非常にユニークな存在である。これまでの解析により HIV-1 型においてウイルス粒子へパッケージされるRNAは翻訳の有無に因らないことが指摘されているが、HIV-2 型では相反する結果が報告されており、論争となっている。また、他のレトロウイルスに関してはまったく検討がなされていないのが現状である。

細胞質に移行したウイルスゲノムは翻訳の場であるリボソームや、パッケージングの起きる形質膜直下へと輸送されるが、近年 HIV ゲノムの細胞質内輸送に関して注目すべき報告が為

された(PNAS. 2014 Dec 2;111(48):E5205-13)。細胞内 HIV-1 RNA の動態を可視化観察したこの論文において、ウイルス RNA の移動は主として自由拡散に因っており、ウイルス粒子蛋白 Gag とも、細胞骨格とも相互作用していないと報告されたのである。従来ウイルスゲノムは、細胞質内に大量に存在する RNA 分解機構を逃れるために Gag による物理的保護や迅速な能動輸送を経ていると自明のように考えられてきたが、この報告が正しければゲノム RNA はいわば“丸腰”のまま細胞内の RNA 品質管理機構を潜り抜けていることになる。ここで発揮されている未知のステルス性には細胞性因子の関与が想定されるが、ウイルスゲノム自体の特異な形態が関わっていることは大いに考えられる。また他に類を見ない RNA の二量体化という現象がウイルスゲノムの独特な動態を制御する鍵になっている可能性も検討に値すると考える。

一方レトロウイルスゲノムは細胞内輸送の終着点としてウイルス粒子にパッケージされると激しく断片化することが古くから知られている。切断の機序や理由は不明であり、解析の試みもほとんど為されていない。一般に RNA が断片化することはゲノム情報の複製・増幅を困難にすると考えられ、なぜウイルスが一見生残に不利な現象を起こすのかは興味深い。

そこで本研究において研究代表者は、発現からウイルス粒子内にいたるレトロウイルスゲノム RNA のこうした特異な動態・形態の変遷を解明することを目的とした。これまでの自身の研究による成果を更に発展させることによって得られる、ウイルスの増殖に大きく影響するこれらの現象の詳細な解析を通して、レトロウイルスの本質とその理解に近づくことをねらいとして本研究を計画した。

3．研究の方法

1) HIV-1 のパッケージングシグナル(Psi)形態に関する解析

研究代表者はこれまでにリアルタイム RT-PCR を用いてレトロウイルスゲノムのパッケージング能を精密に定量する実験系を確立した。これを応用して、HIV-1 の Psi 内の最重要部位であるステムループワン(SL1)に一連の詳細な変異導入を行い、パッケージング能の変化を解析した。同時に一連の変異体のウイルス学的性状・計算機科学的安定性の解析も行い、併せて導入変異の及ぼす影響からその変異塩基の SL1 機能構造における重要性を検討した。

2) レンチウイルスのパッケージングと翻訳に関する解析

上記パッケージング能定量系を用いて、ウイルスゲノムが翻訳を受けるか否かでその後のパッケージングに差があるのかの検討を行った。題材として HIV-1、2 の他 SIVmac、SIVagm も用いてレンチウイルスに共通の性質の有無を追求した。併せてレンチウイルスの Gag 遺伝子の AUG 配列がパッケージングに及ぼす影響の解析も行った。

3) HIV-1 の細胞内ゲノム動態解析の試み

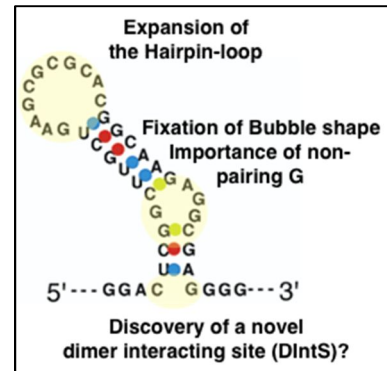
様々な生体内 RNA 蛍光標識法を用いて、ウイルスゲノム RNA の細胞内動態を観察することを試みた。

4) HIV-1 粒子内ゲノム断片化の解析

ウイルス粒子から RNA を抽出し、ランダムプライマーと逆転写酵素を用いて鋳型 DNA を調製して NGS による大規模配列解析を行った。断片情報をそのまま読み取るために逆転写時の組換えに必要な RNaseH 活性を不活化した酵素を用いたキットを使用した。

4．研究成果

1) HIV-1 の SL1 に関して、いくつかの新知見を見いだした。
 a)二通りの構造を取る可能性が示唆されていたステム部位のバルジについては、3 塩基突出が正規構造である。b)ステム最基部の塩基対は分子内ではなく分子間(二量体間)で形成されている可能性を示唆。c)ステム最上端の塩基対は対形成していない、つまりヘアピンループが従来の 9 塩基ではなく 11 塩基で形成されている可能性がある。d)ヘアピンループ上端の 6 塩基回文配列を G あるいは C のストレッチに変異導入すると、ウイルスの増殖能は低下するが両変異体を共産生させることで活性の補償が見られた。



新規 SL1 構造モデル

(Retrovirology v13, 79-)

これらの知見を元に新規 SL1 構造モデルを提唱し、発表した(雑誌論文 1)。

2) HIV-1 以外に調べたすべてのレンチウイルスにおいてゲノム RNA 翻訳とパッケージングは連動しておらず、少なくとも翻訳された Gag 蛋白は鋳型 RNA を直接リクルートしないことがレンチウイルス共通のドグマであることを初めて示した。また HIV-1 ゲノムにおいては DLS 構造を維持するように Gag 蛋白開始コドン AUG を不活化するとパッケージングへの影響は無かったが、構造を壊すように塩基置換すると被パッケージング能が低下した。一方多くのサルレンチウイルスにおいては DLS 予測構造を維持するように AUG を不活化しても大幅に被パッケージング能は低下した。これらの知見を論文にまとめ、発表した(雑誌論文 2)。

3) 細胞内ウイルスゲノムの可視化についてはベクター作成に時間がかかり、細胞内可視化についても技術的困難な部分がマイナスとなった。MS2-GFP 系を用いた間接標識、Kusabira-Green を用いた再構成系、新規技術として着目した蛍光性核酸配列である Spinach および Broccoli による RNA 直接標識系、それらの性状検討に着手することはできたが、自家蛍光や蛍光強度には依然として問題が山積し現状での実用化は困難であった。しかしこれらの技術を導入した研究成果は複数の研究室から着実に発表されてきており、今後の知見の蓄積による技術の成熟に期待したい。

4) ウイルスとしては Env あり、Env なし、プロテアーゼ不活化変異体について解析を行ったが 3 つの間に質的な差は見られなかった。手法上 RNA の 5'末端については末端情報が維持されているはずだが、配列読取り用に付加したリンカーの影響か、末端にウイルス由来ではない配列が存在しており、正確なデータを得ることが困難であった。また、ウイルスゲノムの情報量に偏りがあり、下流側の 3000 塩基ほどが他領域と比べ多量に存在していることが示唆され、これが何に起因しているのかを追求する必要が生じた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Relationship between genome packaging and Gag translation/AUG of primate lentiviruses. Sakuragi S, Shioda T, Sakuragi JI. *Microbes Infect.* 2019 Mar;21(2):119-123. doi: 10.1016/j.micinf.2018.09.002. Epub 2018 Oct 4. PMID: 30292880 査読有。
2. SL1 revisited: functional analysis of the structure and conformation of HIV-1 genome RNA. Sakuragi S, Yokoyama M, Shioda T, Sato H, Sakuragi JI. *Retrovirology.* 2016 Nov 11;13(1):79. PMID: 27835956 査読有。

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 櫻木淳一・櫻木小百合・塩田達雄. HIV-1 Psi 領域の機能構造に関する解析. 口頭発表 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2018 年 12 月 2 日(日)~4 日(火) 大阪(大阪国際会議場)
2. Sakuragi J. Independent roles of SL3 stem-loop nucleotides on HIV-1 biological properties. Poster Presentation. Frontiers in Retrovirology conference 2018, Sept. 11-13, 2018, Leuven, Belgium.
3. Sakuragi S, Kotani O, Yokoyama M, Shioda T, Sato H, Sakuragi J., The analysis of HIV-1 genomic packaging by comparison of subtype sequences. Poster Presentation. Cold Spring Harbor Laboratory 43rd annual meeting on Retroviruses, May 21 - 26, 2018, NY, USA,
4. HIV-1 サブタイプ比較によるゲノムパッケージングに関する解析. 口頭発表、櫻木淳一、日本エイズ学会学術集会、2017.11、東京。
5. The analysis of HIV-1 genome packaging by comparison of subtype sequences. ポスター発表、櫻木淳一、日本ウイルス学会学術集会、2017.10、大阪。
6. The analysis of HIV-1 genome packaging by comparison of subtype sequences. Oral Presentation, Jun-ichi Sakuragi, RETROPATH 2017 Workshop. 2017.8, Prague, Czech.
7. HIV-1 Gag p1 の機能的解析、口頭発表、櫻木淳一、第 30 回日本エイズ学会学術集会、20161124-26、鹿児島。
8. Functional Analysis of HIV-1 Gag p1. Oral Presentation, Sakuragi JI., 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、20161023-25、札幌。
9. SL1 revisited: functional analysis of the structure and conformation of HIV-1 genome RNA. Oral Presentation, Sakuragi JI., 10th IRNCAS, 20160918-21, Montpellier, France.
10. SL1 revisited: functional analysis of the structure and conformation of HIV-1 genome RNA. Poster Presentation, Sakuragi JI., Frontiers of Retrovirology Conference 2016, 20160912-14, Erlangen, Germany.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。