

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16324

研究課題名（和文）HIV-1タンパク質とRNAによるウイルス粒子形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of viral particle formation based on HIV-1 proteins and RNA

研究代表者

中村 朋文（Nakamura, Tomofumi）

熊本大学・病院・診療助手

研究者番号：00772526

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ある薬剤がHIV integrase (IN)のHIV-1 RNAの結合を阻害することで、リボヌクレオチドタンパク質（RNP）がHIV coreから逸脱する現象を踏まえて、薬剤耐性HIV-1のプロファイル、HIV-1 RNAおよびHIV-1 タンパク質の相互作用から、HIV-1粒子形成メカニズムを解明することを目的とした。薬剤耐性アミノ酸を有するHIV-1クローンのウイルス粒子形態、感染性、複製能力を評価し、それらのHIV-1タンパク質とHIV-1 RNAの相互作用および相分離現象を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、高次構造依存的なHIV-1 RNAおよびHIV-1 タンパク質の相互作用、HIV-1 タンパク質の相分離現象等のアプローチから、HIV-1粒子形成メカニズムを解明することを目的とした。本研究は、タンパク質とRNAの相互作用による高次構造形成に新しい知見をもたらし、その学術的意義は非常に高いと言える。さらに、本研究での解析結果は、新薬開発における新たな標的部位の発見や阻害様式のヒントとなり、COVID-19に代表されるウイルス感染症の治療薬開発等に応用可能な新知見となり得る。

研究成果の概要（英文）：Ribonucleotide proteins (RNPs) have been reported to egress the HIV core by inhibiting HIV integrase (IN) binding to HIV-1 RNA. In this study, we investigated the profile of drug-resistant HIV-1 including HIV-1 RNA and HIV-1 protein interactions to elucidate the mechanism of HIV-1 particle formation. The viral particle morphology, infectivity, and replication ability of HIV-1 clones with the drug-resistant amino acids were evaluated. The phase separation and interaction between HIV-1 protein and HIV-1 RNA of these HIV-1 clones were investigated.

研究分野：感染症、HIV感染症、真菌感染症、薬剤開発

キーワード：HIV-1 NCINI耐性変異 HIV-1 RNA HIV-1 integrase HIV-1 nucleocapsid

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

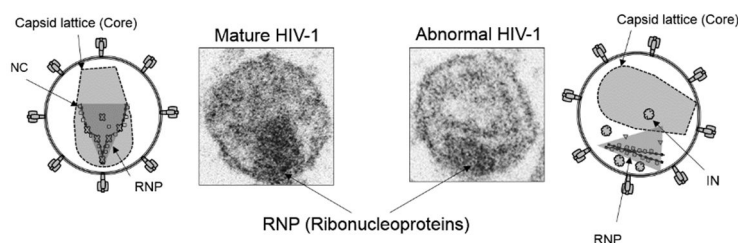
HIV-1 は、感染細胞によって作り出された HIV-1 ポリタンパク質および HIV-1 RNA を細胞膜表面に集合させ、出芽し、成熟過程を経て、感染可能な成熟 HIV-1 となる。HIV-1 成熟過程において、HIV-1 ポリタンパク質は感染細胞から出芽後に HIV-1 プロテアーゼの修飾により、様々な機能的なタンパク質に切り出される。しかし、切り出された HIV-1 タンパク質がどのようにウイルス粒子を形成し、感染性を有する HIV-1 として成熟するのか？ そのメカニズムは未だ完全に解明されていない。

2. 研究の目的

このような HIV-1 粒子形成過程において、HIV-1 RNA および複数の HIV-1 タンパク質で形成される HIV-1 core に着目し研究を行っているが、HIV-1 RNA と HIV-1 タンパク質の高次構造依存的な相互作用や HIV-1 タンパク質の相分離現象が HIV-1 粒子形成に重要な役割を果たしていると考えた。したがって、本研究では高次構造依存的な HIV-1 RNA および HIV-1 タンパク質の相互作用、HIV-1 タンパク質の相分離現象等のアプローチから、HIV-1 粒子形成メカニズムを解明することを目的とする。さらに、その HIV-1 粒子形成メカニズムの解明によって、革新的な治療法や新規治療薬の開発に繋がる新しい知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

現在、主たる HIV-1 RBP, HIV-1 RNA 結合タンパク質 (RNA Binding Protein, RBP) として、NC および IN が特定されている。特に IN の多量体形成異常は HIV-1 RNA と IN の結合を阻害し、最終的に非感染性の未熟な HIV-1 (HIV-1 core から RNP の逸脱) を産生



することが報告されている(上図)。本研究代表者は、異常に IN 多量体形成を促進させることによって HIV-1 RNA の結合を阻害する Non-catalytic site integrase inhibitors (NCINI) に関して分析してきた。HIV-1 は NCINI から逃れるために IN 内に耐性アミノ酸変異を蓄積させ、IN の多量体形成能を低下させる。その多量体形成が低下した IN は HIV-1 RNA との結合力が野生株に比べて増加し、その結合によって IN 多量体形成が改善していたことを報告した。さらに解析を進めた結果、耐性 HIV-1 の標的部位ではない NC 領域内にアミノ酸変異が獲得されていることを発見した。まとめると、IN 内の NCINIs 耐性アミノ酸変異によって IN と RNA の結合が変化すると HIV-1 RNA に結合している NC も影響を受け、さらに NC 内にアミノ酸変異が獲得されたと考えられ、HIV-1 RNA、IN、NC は HIV-1 core の構造維持(複製維持)の為に協調的に働いていることが推察された。現時点では NC 内のアミノ酸変異の役割は不明である。以上の結果も踏まえ以下に示す実験を計画した。

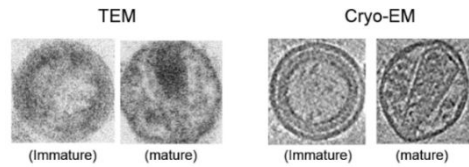
(1) NCINI 耐性アミノ酸変異を有する HIV-1 clone の解析

IN 内の NCINI 耐性アミノ酸変異 (IN:4 力所) 変異は NCINI に関連する耐性変異である。NC 内の変異 (NC:2 力所) は 2nd Zinc finger domain 内の変異であり、HIV-1 RNA の結合や逆転写への影響が推察される。まずは、それぞれの IN および NC 内のアミノ酸変異を組み合わせで作成した複数の HIV-1 clone の感染性および複製能を解析した。

(2) NCINI-3 耐性 HIV-1 を用いた HIV-1 genome RNA 内の NC および IN 結合部位の特定および結合プロファイル解析

CLIP-seq 法は、近年 RBP と RNA 相互作用に関連した研究分野にブレイクスルーを与えた。HIV の分野において 2016 年 Cell 誌に CLIP-seq 法を用いて IN と HIV-1 RNA の結合が証明され、HIV-1 粒子形成に重要であることが報告された。本研究代表者は CLIP-seq 法を用いて HIV-1 genome RNA 上の NC および IN の結合配列をさらに詳細に解析し、前述した NCINIs 耐性変異ウイルスの HIV-1 genome RNA を用いた IN および NC の結合配列も比較することを目指す。特定の部位の HIV-1 RNA と HIV-1 RBP の結合プロファイルに関しては、Alpha LISA (PerkinElmer) を用いて分析し、HIV-1 RNA の予想される 2 次・3 次構造と HIV-1 RBP の結合プロファイルに関する情報を収集・解析する。

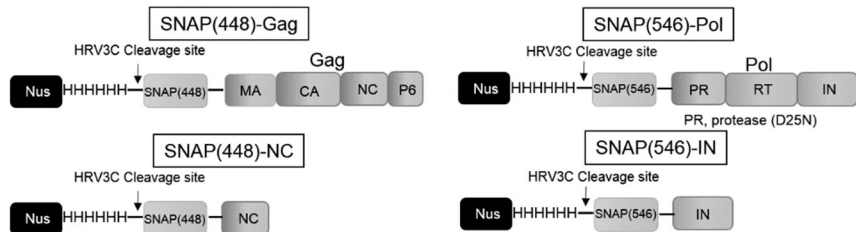
(3) 高次構造学的解析および HIV-1 粒子形態解析より詳細な HIV-1 RNA と HIV-1 RBP の高次構造学的相互作用を分析するために、X-ray 結晶構造解析や HIV-1 粒子形態解析は、TEM による解析を検討した。



(4) HIV-1 RBP および HIV-1 RNA 複合体評価
相分離現象を確認するための HIV-1 タンパク質 (NC, IN) を E. coli を用いて発現させ精製する。精製した CA, NC, IN のタンパク質と HIV-1 RNA をさまざまな条件下で反応させて、タンパク質安定性、肉眼的に凝集・出現した構造物を確認する。

(5) 蛍光複合体 (SNAP-448-NC (Gag), SNAP-546-IN (Pol)) の相分離現象の解析

相分離現象を確認するために蛍光物質 (SNAP-Surface 488 または 546) を HIV-1 タンパク質に結合させた複合体を作成する。これら SNAP-IN および SNAP-NC がどのような挙動を示すか蛍光顕微鏡を用いて、時間及び空間的な計測および解析を行う。

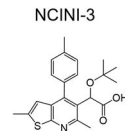
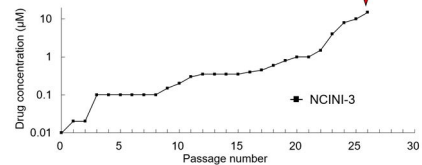


4. 研究成果

(1) NCINI-3 耐性アミノ酸変異を有する HIV-1 clone の解析

右図に示すように IN の多量体形成を促進すし、IN と HIV-1 RNA が結合を阻害する NCINI-3 に対して、HIV-1 耐性誘導を行い、NCINI-3, 10 μM 以上で生存可能な passage 26 (P26) の NCINI-3 耐性 HIV-1 を作成した。その耐性経過および HIV-1 タンパク質内に生じたアミノ酸変異を右図に示す。NCINI-3 の標的である IN 以外に様々な部位に変異が蓄積した。特に HIV-1 RNA と結合に重要な NC 内に耐性アミノ酸変異が出現したことは興味深い。

Emergence of NCINI-3 resistance mutations



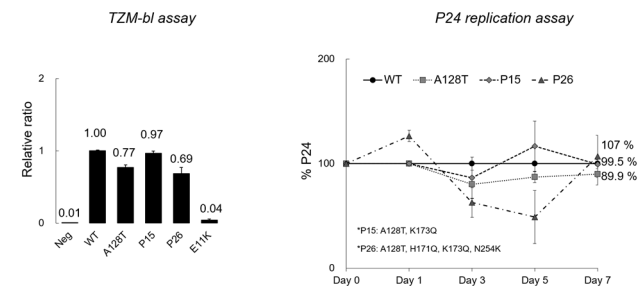
Passage	Gag region			Pol region			Accessory proteins	
	MA	CA	NC	PR	RT (RNase)	IN	Vif	Vpr
P26	-	-	D48N, R75K	-	-	A128T, H171Q, K173Q, N254K	T67P	E13K

Matrix (MA)
Capsid (CA)
Nucleocapsid (NC)
Protease (PR)
Reverse Transcriptase (RT)
Integrase (IN)
Viral infectivity factor (Vif)
Viral protein R (Vpr)
- : No mutations

NCINI-3 耐性 HIV-1 clone の作成とそのウイルス学的特性

我々は、IN 内のアミノ酸変異に着目し、A128T、P15 (A128T、K173Q)、P26 (A128T、H171Q、K173Q、N254K) の NCINI-3 の耐性アミノ酸変異を有する HIV-1 クローンを作成し、その感染性および複製能力を TZM-bl assay および p24 assay を用いて評価した。耐性変異の蓄積によって NCINI-3 耐性 HIV-1 は、右図に示されるように軽度の感染性および複製能の低下を認めた。

The infectivity and replication fitness of HIV-1 clones carrying the NCINI-related mutations in IN regions

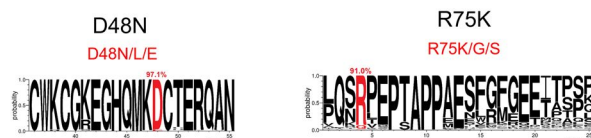


続いて、NCINI-3 耐性 HIV-1 の NC 内のアミノ酸変異 (D48N、D48N/R75K) に着目した。この

NC 内のアミノ酸変異が、実際に流行し報告されている HIV-1 のアミノ酸配列 (polymorphism) に存在する変異か、NC 部位のアミノ酸の保存度がどの程度であるか、HIV-1 および SIVcpz198 株が登録されている Los Alamos data を用いて比較検討した。これらのアミノ酸部位の保存度は 97.1% と 91.0% であり、通常ではアミノ酸変異が生じにくい部位であることが推測された。

Polymorphism of amino acids at the NC mutations

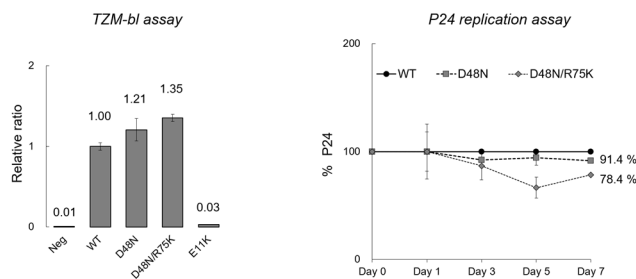
D48 and R75 residues in NC are conserved at 97.1% and 91.0%, respectively in HIV-1 and SIV_{cpz}



Among 198 NC sequences of HIV-1 (SIV_{cpz}) registered in HIV Sequence Compendium 2019

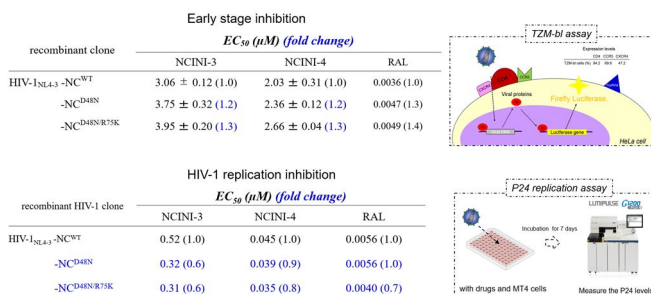
さらに、これらの変異を有する HIV-1 クローンを作成し、それぞれの感染性および複製能を TZM-bl assay および p24 assay を用いて評価した。興味深いことに、NC に変異を有する HIV-1 クローンは、TZM-bl assay 用いて評価した感染性は軽度 (1.21 ~ 1.35 程度) 増加していた。一方で、p24 assay を用いて評価した複製能は、野生株と比較して差を認めなかった。IN の変異によって NCINI-3 耐性 HIV-1 の感染性が低下していた一方で、NC 内の変異はわずかではあるが、細胞に対して感染性を上昇させていることが示唆された。

The infectivity and replication fitness of HIV-1 clones carrying NC^{D48N} or -NC^{D48N/R75K}



また、この NC 内のアミノ酸変異が直接的な NCINI-3 の耐性を有しているか? TZM-bl assay および p24 assay を用いて確認したところ、感染性および複製能に影響を与える有意な耐性変異ではなかった。したがって、NC 内のアミノ酸変異は、直接的な NCINI 耐性変異ではなくて、NCINI 耐性変異に伴う副次的な役割の変異 (ウイルス感染性、複製能の維持・改善) であることが推察された。

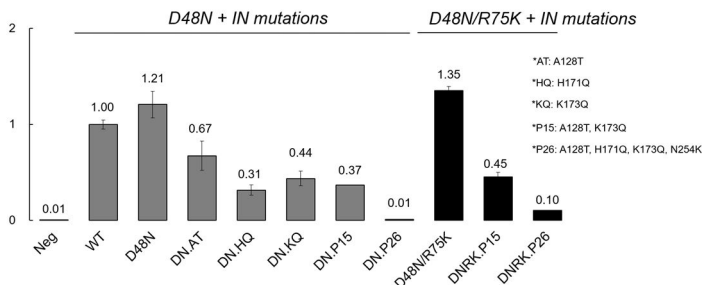
The susceptibility of HIV-1 -NC^{D48N} and -NC^{D48N/R75K} against NCINI-3, -4, and RAL



次に、これらの IN と NC 内のアミノ酸変異が混在した NCINI-3 耐性 HIV-1 クローンを作成し、その感染性や複製能に関するウイルス学的特性を評価した。

The infectivity of HIV-1 clones carrying the both NC and IN mutations

The NC mutations plus the IN mutations decrease the infectivity of these HIV-1 clones

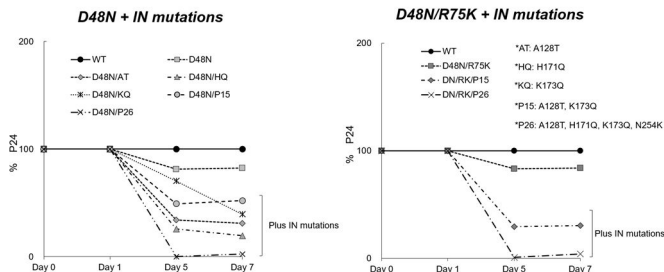


興味深いことに、D48N の変異クローンに単独変異である A128T、H171Q、K173Q、N254K のそれぞれ変異を導入したクローンや複数変異である P15、P26 を導入した HIV-1 クローンおよび D48N/R75K の変異 HIV-1 クローンに複数変異である P15 や P26 を導入した HIV-1 クローンは、アミノ酸変異が蓄積されるほど、その HIV-1 クローンの感染性および複製能は低下していた。すなわち、さまざまなタイプの HIV-1 (野生株や耐性ウイルス) が共存することによって、感染性および複製能を維持していると推定される。

したがって、NC および IN の変異は同一クローン上に存在すると変異ウイルスの感染性および増殖能に不利な影響を与えることが示唆された。実際に NCINI 耐性ウイルスの同一クローン上に変異がどの程度存在するか現在確認中であるが、どのような抗 HIV-1 薬剤であっても耐性 HIV-1 の塩基配列を確認すると、野生株が 10-20% 存在していると報告されており、我々も実際に野生株の残存を経験している。

The replication kinetics of HIV-1 clones carrying the both NC and IN mutations

The NC mutations plus the IN mutations decrease the replication fitness of these HIV-1 clones



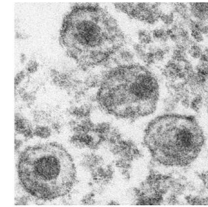
(2) 変異ウイルスを用いた HIV-1 genome RNA 内の NC および IN 結合部位の特定および結合プロファイル

CLIP-seq 法による結合部位の同定を行うために、必要な様々な消耗品および物品を準備した。しかし、使用予定であった次世代シーケンスが不慣れなために、安定したデータを得ることができず、完全な実験の構築が困難であった。したがって、現在はこの方法を確立している研究者と共同研究を模索している。

(3) 高次構造学的解析および HIV-1 粒子形態解析

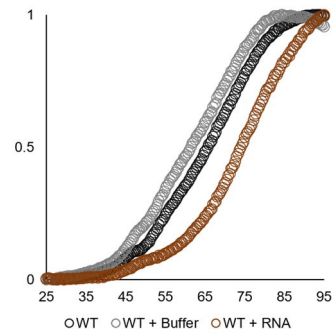
TEM を用いて、上記(1)で作成した NCINI 耐性変異を有する HIV-1 クローン粒子の一部を形態観察した。確認したその他の HIV-1 クローンは、現時点で明らかな形態異常は認めなかったが、HIV core がやや丸みを帯びている印象を受けた。今後も作成した HIV-1 クローンの形態観察を行う予定である。

HIV-1^{P26}粒子



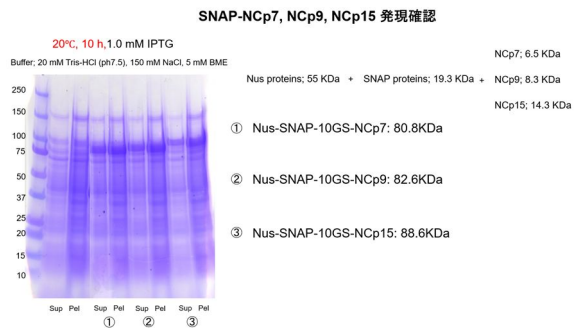
(4) HIV-1 RBP および HIV-1 RNA 複合体評価

まず、pet50b 発現システムと E. coli (Rosetta™ 2・DE3) を用いて、IN、NC を発現させ、His-tag 精製、ゲルろ過、限外ろ過法で精製した。続いて、TAR を含む HIV-1 RNA (1Kbp) のサイズを RT-PCR、T7RNA ポリメラーゼ、DNAase を用いて増幅および精製した。HIV-1 RNA は、ある一定の濃度のタンパク質 (IN および NC) に濃度依存的に添加した。特に肉眼的な目立った変化 (タンパク質の沈殿など) は認めなかった。しかし、DSF (Differential Scanning Fluorimetry) によるタンパク質の熱安定性を確認したところ、HIV-1 RNA を添加するとあるタンパク質で有意な安定性の上昇を認めた。この結果から HIV-1 RNA との結合でタンパク質が安定化したことが示唆された。すなわち高次構造が変化している可能性が推察された。



(5) 蛍光複合体 (SNAP-448-NC (Gag)、SNAP-546-IN (Pol)) の相分離現象の解析

SNAP-448-NC および SNAP-546-IN を上記の発現システムを利用して、E. coli (Rosetta™ 2・DE3) に発現させ、His-tag 精製、ゲルろ過、限外ろ過法を用いて、精製した。右図は、Nus-SNAP-NC として E. coli に発現させ、発現確認用の CCB 染色を行ったゲルである。現在は、精製したタンパク質を、様々な buffer、温度、濃度条件下で蛍光顕微鏡を用いて、相分離の現象を観察中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Chia Travis, Nakamura Tomofumi, Amano Masayuki, Takamune Nobutoki, Matsuoka Masao, Nakata Hiroto	4. 巻 65
2. 論文標題 A Small Molecule, ACAI-028, with Anti-HIV-1 Activity Targets a Novel Hydrophobic Pocket on HIV-1 Capsid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.01039-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Tomofumi, Okumura Mayu, Takamune Nobutoki, Hirotsu Tatsunori, Sugiura Masaharu, Yasunaga Junichiro, Nakata Hiroto	4. 巻 3
2. 論文標題 Conversion of raltegravir carrying a 1,3,4-oxadiazole ring to a hydrolysis product upon pH changes decreases its antiviral activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgad446	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Tomofumi, Uchiba Mitsuhiro, Nakata Hiroto, Mizumoto Takao, Beppu Toru, Matsushita Shuzo	4. 巻 16
2. 論文標題 Partial Splenic Embolization in a Patient with Hemophilia A and Severe Thrombocytopenia: A Case Report	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Hematology Reports	6. 最初と最後の頁 185 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/hematolrep16020019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村 朋文, 高宗 暢暁, Travis Chia, 奥村 真由, 中田 浩智, 松岡 雅雄, 天野 将之
2. 発表標題 HIV-1 capsid (CA) を標的とする新規抗HIV-1阻害剤の作用機序の解明
3. 学会等名 日本エイズ学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村朋文 , 奥村真由 , 高宗暢暁 , 弘津辰徳 , 松岡雅雄 , 中田浩智
2. 発表標題 ドラッグデリバリーシステム(DDS)による薬剤の安定性および局在変化による抗HIV-1効果への影響
3. 学会等名 日本エイズ学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 朋文 , 奥村 真由 , 高宗 暢暁 , 弘津 辰徳 , 杉浦 正晴 , 安永 純一郎 , 中田 浩智
2. 発表標題 1,3,4-oxadiazole環を有するRaltegravirは強酸性下で加水分解され、抗HIV活性が低下する
3. 学会等名 日本エイズ学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------