

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790434

研究課題名（和文） HIV-1 増殖の多様な過程に関わるインテグラーゼの機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of HIV-1 integrase that involves in various steps of viral replication

研究代表者

三宅 在子 (MIYAKE ARIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：20548622

研究成果の概要（和文）：マカクザル細胞指向性 HIV-1 のマカクザル細胞への適応変異を解析したところ、インテグラーゼの C 末端領域に集中して存在することが明らかとなった。アミノ酸を変えない 1 塩基置換（同義置換）でも増殖促進効果があった。増殖効率の促進は Gag や Gag-Pol 蛋白質の発現レベルで起こっていた。このインテグラーゼ領域を詳細に解析した結果、同義置換で増殖効率の顕著な増減が認められ、同義置換でウイルス増殖効率を制御する能力があることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Analysis of adaptive mutations in macaque cell-tropic HIV-1 has shown that these alterations cluster in the C-terminal portion of integrase-coding region in the viral genome. Even a synonymous mutation was found to have a growth-enhancing effect. This effect was due to the enhanced expression of Gag and Gag-Pol proteins. Extensive analysis of the C-terminal integrase region has revealed that synonymous mutations generate both positive and negative effects on viral replication. It is thus evident that this integrase region modulates viral replication ability.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス、HIV-1、Pol-IN

1. 研究開始当初の背景

マカクザル細胞におけるプロトタイプマ

カクザル細胞指向性 HIV-1 (HIV-1mt) の増殖効率を向上させるため、ウイルスの細胞馴化

を試みた。増殖能が向上したウイルスクローンのゲノムを解析した結果、これに関わる増殖適応変異（アミノ酸置換をもたらす1塩基置換；非同義置換）がインテグラーゼC末端領域（アミノ酸番号222、223、229 および234に対応）に集中して起こることがわかった。見出された4個の増殖適応変異はヒト細胞でもサル細胞でもウイルス増殖促進能があり、細胞特異性や種特異性はなかった。また、上記の変異を二つ持つクローンでも一つのものと増殖特性に差は認められず、それぞれ同等の効果を持つことが示された。

インテグラーゼはレトロウイルスゲノムを宿主染色体DNAに組み込む酵素であり、感染成立に必須である。加えて、近年の研究により、ウイルスゲノムの脱核、ウイルスRNAの逆転写、ウイルスDNAの核移行など、様々なウイルス増殖過程に関与していることが明らかにされている。インテグラーゼは大きく3個の機能領域（N末端領域NTD、中央酵素活性領域CCDおよびC末端領域CTD）に分かれており、NTDはインテグラーゼ構造の安定化に関与すること、CCDには組み込みに重要な酵素活性中心が存在することが報告されている。一方、CTDに関する知見は少なく、その機能も不明であった。

2. 研究の目的

異種細胞（マカクザル由来）でのHIV-1の増殖過程で生じた適応変異の本態について詳細に解析する。具体的には次の通りである。

(1) これらの変異がウイルス増殖サイクルのどの段階に影響するのかを決定する。(2) これらの変異によるウイルス増殖促進のメカニズムを解明する。これらにより、インテグラーゼ(C末端領域CTD)の機能が明らかとなり、レトロウイルス複製に必須のインテグラーゼに関する理解が深まる。

3. 研究の方法

主として分子遺伝学的手法で研究目的の達成を目指す。これまでに報告のあったインテグラーゼ各種変異体の解析結果を念頭に、増殖サイクルにおける作用点およびウイルス増殖促進機構について検討する。詳細は以下の通りである。(1) 各変異体のシングルサイクル感染価（ルシフェラーゼ活性を指標にした感染前期の感染価）およびマルチサイクル感染価（細胞特異性や種特異性は観察されていないが、念のため標的細胞はヒトおよびサル細胞を使用する）を測定する。(2) リアルタイムPCR法にて、ポストエントリーの逆転写、核移行および組み込み過程を定量する。標的細胞はヒトおよびサル細胞を使用する。(3) トランスフェクション法にて、感染後期過程のウイルス産生量を定量（逆転写酵素RTアッセイ、Gag-ELISAおよびRT-ELISA）する。また、Westernブロット法やGag-ELISAおよびRT-ELISAによりGagやGag-Pol蛋白質の発現量を定量する。標的細胞は各種ヒトおよびサル細胞を使用する。(4) ウイルスの増殖促進にアミノ酸置換が必要であるか否かを検討する。必要に応じて、インテグラーゼCTDに変異を導入し、その効果を検証する。

4. 研究成果

複製効率の上昇したインテグラーゼCTD変異体について詳細に解析し、要約以下の成果を得た。(1) シングルサイクル感染価、リアルタイムPCRおよびトランスフェクションの結果、これら変異体は全てウイルス産生量が向上していた。Env欠損を加えて検討したところ、この結果はリンパ球細胞株でも確認された。(2) これらの変異体にはインテグラーゼの機能として通常認められているウイルスRNAの逆転写、ウイルスDNAの核移行および組み込みには変化がなかった。(3)

Western ブロット法や Gag-ELISA および RT-ELISA による解析の結果、細胞内の Gag や Gag-Pol 蛋白質のプロセッシングには変化がなく、単に発現量が増大しているだけであることがわかった。(4) アミノ酸を変えない同義置換でもウイルス増殖効率が向上する変異を見出した。

上記(4)の結果に基づき、インテグラーゼ CTD に変異(同義置換)を導入しウイルス増殖能(マルチサイクル感染価)に及ぼす効果を解析した。アミノ酸番号の 226、229、233 および 234 に対応するコドンに同義置換を導入したウイルスクローンで増殖効率の顕著な違い(上下)が認められた。したがって、インテグラーゼ CTD には核酸レベル(同義置換)でウイルス増殖効率を制御する特性のあることが示された。

HIV-1mt を主として解析に用いたが、同様の結果は HIV-1 の標準クローンである NL4-3 でも得られているので、本研究の結論は HIV-1 インテグラーゼ CTD の特性として一般化できる。核酸レベルの変化でウイルス蛋白質の発現が増強され、ウイルス粒子産生が増大し、その結果として、ウイルス増殖効率が向上することが示された。サル細胞では HIV-1 の複製は著しく抑制されており、本研究の成果はウイルスの新規の適応機構として非常に注目される。今後は、このインテグラーゼ CTD の性質が他のレトロウイルスにも当てはまるのかどうか、インテグラーゼ CTD 以外のゲノム領域にも該当する領域があるのか否かを検討する必要がある。また、ウイルス蛋白質発現増強の機構についても詳細に検討しなければならない。これらを解明することにより、レトロウイルスの適応/進化機構の理解に向け新しい方向性を提示できると考えられる。

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 4 件)

- 1) Miyazaki, Y., Miyake, A., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2011. Structural dynamics of retroviral genome and the packaging. *Frontiers in Microbiology* 2: 264. doi:10.3389/fmicb.2011.00264. 査読有
- 2) Miyake, A., Ishida, T., Yamagishi, M., Hara, T., Umezawa, K., Watanabe, T., and Horie, R. 2010. Inhibition of active HIV-1 replication by NF- κ B inhibitor DHMEQ. *Microbes and Infection* 12: 400-408. 査読有
- 3) Nagao, T., Yamashita, T., Miyake, A., Uchiyama, T., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010. Different interaction between HIV-1 Vif and its cellular target proteins APOBEC3G/APOBEC3F. *Journal of Medical Investigation*, 57: 89-94. 査読有
- 4) Yamashita, T., Nomaguchi, M., Miyake, A., Uchiyama, T., and Adachi, A. 2010. Status of APOBEC3G/F in cells and progeny virions modulated by Vif determines HIV-1 infectivity. *Microbes and Infection* 12: 166-171. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- 1) Kobayashi-Ishihara, M., Yamagishi, M., Hara, T., Matsuda, Y., Miyake, A., Nakano, K., Ishida, T., Watanabe, T. A novel antisense RNA of HIV-1 ale,

functions as a self-limiting factor for the HIV-1 infection. XV International Congress of Virology, Sept. 13, 2011, Sapporo Convention Center (Sapporo, Japan).

- 2) 野間口雅子、齊藤 暁、明里宏文、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 サル細胞で効率よく増殖する HIV-1 の構築ーアカゲザル TRIM5 α と tetherin による抑制の回避ー. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、2010 年 11 月 24 日、グランドプリンスホテル高輪 (東京) .
- 3) 三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫、野間口雅子 HIV-1 増殖過程におけるインテグラーゼ (IN)C 末端領域 (CTD) の影響. (ワークショップ) 第 24 回日本エイズ学会学術集会、2010 年 11 月 24 日、グランドプリンスホテル高輪 (東京) .
- 4) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 アカゲザルに存在する抗 HIV-1 因子 TRIM5 α と tetherin を回避するサル細胞指向性 HIV-1 の構築. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 8 日、徳島県郷土文化会館 (徳島) .
- 5) 土肥直哉、齊藤 暁、明里宏文、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫、野間口雅子 サル指向性 HIV-1 CA の 1 アミノ酸変異はサル細胞での増殖を促進する. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 8 日、徳島県郷土文化会館 (徳島) .
- 6) 三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫、野間口雅子 HIV-1 インテグラーゼ (IN) C 末端領域 (CTD) における 1 塩基置換によるウイルス増殖促進機構の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7 日、徳島県郷土文化会館 (徳島) .
- 7) Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M.

Analysis of growth adaptive mutations in HIV-1 genome identifies a pol-integrase region that enhances virion production in a cell-independent and codon triplet-dependent manner. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 9, 2010, Awaji Yumebutai International Conference Center (Awaji, Japan).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 在子 (MIYAKE ARIKO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：20548622