

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390111

研究課題名(和文) HIV感染抵抗性に関わる宿主因子の解析

研究課題名(英文) Host factors involved in natural HIV resistance

研究代表者

塩田 達雄(Shioda, Tatsuo)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：00187329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：TRIM5 あるいはその関連因子を標的とした新たなエイズ制御法の策定を目指してTRIM5 の HIV感染抵抗性発現機構を解析し、以下の知見を得た。1. TRIM5 に対する耐性を獲得したHIV-1の感染においては脱殻過程が遅延していた。2. ヒトTRIM5 のcoiled-coil領域とSPRY領域の間のリンカー部分の一塩基多型により抗HIV-1効果が減弱していた。3. TRIM5 がトル様受容体4のシグナルの下流に位置するTAB2と結合すること、その結合にはTRIM5 のSPRY領域が必要であること、が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In order to identify novel therapeutic target(s) for AIDS/HIV-infection, we have analyzed detailed molecular mechanisms of anti-viral activity of HIV restriction factor TRIM5alpha. We were able to obtain following results: 1. In situ uncoating assay revealed that an HIV-1 mutant strain, which could replicate in the presence of monkey TRIM5alpha, showed delayed uncoating process. 2. A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5alpha linker region between coiled-coil and SPRY regions affects its anti-HIV-1 activity. 3. TRIM5alpha could bind to TAB2, which is in the TLR4-mediated signal transduction pathway, probably through its SPRY region.

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：HIV感染症 宿主因子 感染抵抗性 生理的リガンド

#### 1. 研究開始当初の背景

TRIM5 $\alpha$ はアカゲザルの抗 HIV-1 因子として 2004 年に同定された。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、そのウイルス感染阻害の分子機構は明らかにされていない。

#### 2. 研究の目的

本研究は、細胞内イメージング技術、TRIM5 $\alpha$ の生理的作用の解明、ならびに構造生物学的アプローチにより、TRIM5 $\alpha$ の HIV 感染阻害機構の詳細を明らかにすることを目的とする。そして、TRIM5 $\alpha$ あるいはその関連因子を標的とした新たなエイズ制御法の策定を目指す。

#### 3. 研究の方法

上記の目的のため、以下の 3 つの研究を行った。

1. 細胞内イメージング技術を用いた HIV と TRIM5 $\alpha$ との相互作用の解明: HIV と TRIM5 $\alpha$ との相互作用は非常に不安定であるため、細胞抽出液や組み換え蛋白質を用いた従来の生化学的手法ではその相互作用を示す事は困難であった。近年、種々の蛍光蛋白質の開発とその応用技術の発展により、細胞内での分子や超分子複合体の挙動の可視化が可能になってきており、本研究は細胞質内に侵入した HIV のコアと TRIM5 $\alpha$ との相互作用を細胞内イメージング技術を用いて時空間的に解析した。具体的には米国 Northwestern 大学の Tom Hope 博士らが開発した *in situ* uncoating assay を用いた。すなわち膜に局在する c-Src のアミノ末端の 15 アミノ酸と赤色蛍光蛋白質 Tomato との融合蛋白質および HIV-1 コアに結合するウイルス蛋白質 Vpr と緑色蛍光蛋白質 GFP との融合蛋白質を HIV-1 粒子に取り込ませ、蛍光顕微鏡を用いて細胞内に正しく侵入した HIV-1 コアのみを検出し、経時的に HIV のカプシド蛋白質に対する抗体を用いて HIV-1 の脱殻状況を検討した。

2. 抗 HIV 作用に関わる TRIM5 $\alpha$ の機能構造相関: ヒト TRIM5 $\alpha$ の coiled-coil 領域と SPRY 領域の間のリンカー部分の一塩基多型により生じる 249 番目のアミノ酸のグリシン (G) からアスパラギン酸 (D) への変異が抗 HIV-1 効果に及ぼす影響を検討した。株化 T 細胞 MT4 にヒト TRIM5 $\alpha$ 、MT4 から得た 249 番目に D を持つ TRIM5 $\alpha$  及び PRYSPTY 領域を欠いた TRIM5 $\alpha$  を発現させるセンダイウイルスベクターを感染させ、9 時間後に HIV-1 NL43 株ならびに HIV-2 GH123 株を感染させた。HIV 感染 1、3、6 日後の培養上清中のカプシド抗原量を ELISA にて測定した。

3. 細胞内シグナル伝達経路における TRIM5 $\alpha$ の役割の解析: 我々はヒト TRIM5 $\alpha$ 遺伝子の RING 領域内の遺伝子多型 H43Y が、もともと微弱なヒト TRIM5 $\alpha$ の HIV-1 感染阻害効果を

さらに減弱させること、しかしその多型は HIV-1 感染者にはむしろ少なく感染抵抗性を付与しているようにも見えること、を見出した。欧米の他のグループも全く同様のパラドキシカルな結果を報告しており、ヒトの TRIM5 $\alpha$ の場合には HIV-1 コアとの直接の相互作用以外にも、別な経路で HIV-1 感染感受性に影響する可能性が考えられる。本研究では、シグナル伝達因子と TRIM5 $\alpha$ との相互作用の解析を通して、インターフェロン誘導を含めた自然免疫系の活性化における TRIM5 $\alpha$ の役割を解明することを試みた。

#### 4. 研究成果

1. 細胞内イメージング技術を用いた HIV と TRIM5 $\alpha$ との相互作用の解明: HIV-1 は宿主細胞に侵入後、コアが崩壊し(脱殻)、逆転写、核移行、インテグレーションの各過程を経てウイルスタンパク質の発現へと至る。これまで脱殻は細胞侵入後速やかに行われ、ゲノム RNA を放出して逆転写を開始させる役割のみを担うと考えられてきた。しかし、最近、カプシドの変異が逆転写をはじめとする様々な HIV の細胞内複製過程に影響するとの報告があり、ゲノム放出以外にも何らかの役割を果たしている可能性が考えられるようになった。我々はサル細胞で増殖可能な HIV-1 (サル指向性 HIV-1) を作成する過程で、カプシド変異によりサル細胞での増殖能を獲得した代わりに、ヒト細胞での増殖能が低下したウイルスを得る事ができた。そこで、本研究ではこのサル指向性 HIV-1 (4/5S6/7S) のヒト細胞での複製能低下をもたらした分子機構を検討した。感染後の細胞内のウイルス cDNA 量をリアルタイム PCR 法で経時的に測定した所、4/5S6/7S は感染初期の逆転写量は野生型よりもむしろ多かったが核内 cDNA 量は低下しており、核移行の過程が阻害されていると考えられた。カプシド変異によりコアの安定性が変化し、その後の複製過程に影響が出たと考えられたので、次に脱殻の速度を測定した。脱殻の速度は、蛍光タンパク質でラベルした HIV-1 を使い、蛍光顕微鏡下でコアの崩壊を観察する *in situ* uncoating assay を行って測定した。その結果、4/5S6/7S の脱殻は野生型と比べ遅延していることが明らかになった。以上の結果、サル指向性 HIV-1 4/5S6/7S においてはカプシド変異による脱殻の遅延が何らかの機構で核移行効率を低下させ、ヒト細胞での複製能が低下したと考えられた。

2. 抗 HIV 作用に関わる TRIM5 $\alpha$ の機能構造相関: 249D のアレル頻度は欧米人では 5%ほどだが、日本人では 40%を超えることがデータベース検索から判明した。抗 HIV-1 効果は 249G の TRIM5 $\alpha$ のほうが 249D の TRIM5 $\alpha$ よりわずかに強いことが、多段階増殖実験ならびに感染初期過程のみを検出する実験の両方で示された。日本人およびインド人において、

249Dのアレル頻度をHIV-1感染者と非感染者で比較したところ、感染者におけるDのアレル頻度が有意に高いことから、この多型による抗HIV-1効果の減弱が個体のHIV-1感染成立にも影響した可能性が示唆された。二次構造予測を行ったところ、G249D変異によりcoiled-coil領域の $\alpha$ -ヘリックスがリンカー部分まで延長するとの結果が得られた。従って、249Dを持つヒトTRIM5 $\alpha$ は、249Gのものよりもリンカー部分の可塑性が失われるために、ウイルスカプシドの認識力が減弱している可能性が考えられる。

3. 細胞内シグナル伝達経路におけるTRIM5 $\alpha$ の役割の解析: TRIM5 $\alpha$ はHIVのカプシドを認識してプロテアソーム分解に導きウイルス感染の初期過程を阻害する因子である。カプシド認識にはC末端のPRYSPRY領域が、抗ウイルス活性にはN末端のRING領域の持つユビキチンリガーゼ活性が関与する。マウスはヒトTRIM5 $\alpha$ のオースログとして、3つのTRIM12と5つのTRIM30遺伝子を持つ。マウスTRIM12とTRIM30は、トル様受容体4(TLR4)のシグナルの下流に位置するTAB2/3のプロテアソーム分解に寄与するとの報告がなされた。そこで我々はヒトTRIM5 $\alpha$ がTLR4シグナルに関与するか否かを検討した。TAB2あるいはTAK1を293T細胞にそれぞれの発現プラスミドを導入したところに同時にヒトTRIM5 $\alpha$ を発現させると、TAB2もTAK1もタンパク質量の低下が観察された。

TLR4のシグナルの下流では、TRAF6、TAB2、TAB3、及びTAK1は複合体を形成している。どの因子とTRIM5 $\alpha$ が直接結合しているのかを調べるために、TRIM5 $\alpha$ と各因子をコムギ胚芽翻訳系にて合成して混合し、蛍光共鳴エネルギー移動を利用したアルファスクリーンシステムでタンパク質間相互作用を測定した。その結果、TRIM5 $\alpha$ はTAB2とのみ相互作用していた。この相互作用はアカゲザルのTRIM5 $\alpha$ では弱く、種特異性が観察された。また、TAB2のN末端半分では全く結合シグナルが観察されず、TAB2のC末端半分にわずかなシグナルが観察されるのみで、TRIM5 $\alpha$ との結合にはTAB2の構造全体が必要であると推測された。また、RINGと隣のB-box領域を欠くTRIM5 $\alpha$ ではシグナルが半減するのみだが、PRYSPRY領域を欠くTRIM5 $\alpha$ ではシグナルが全く観察されないことから、TAB2との結合にもPRYSPRY領域が必要であると考えられた。

#### 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19件)

Moderate Restriction of Macrophage-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 by SAMHD1 in Monocyte-Derived Macrophages. Taya K, Nakayama EE, Shioda

T. PLoS One. 2014 ;9(3):e90969. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0090969.

Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A. J Virol. 2013;87(21):11447-11461. 査読有  
DOI: 10.1128/JVI.01549-13.

Slower Uncoating Is Associated with Impaired Replicative Capability of Simian-Tropic HIV-1. Kono K, Takeda E, Tsutsui H, Kuroishi A, Hulme AE, Hope TJ, Nakayama EE, Shioda T. PLoS One. 2013;8(8):e72531. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0072531.

TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama E, Akari H. J Gen Virol. 2013;94(Pt 6):1318-24. 査読有  
DOI: 10.1099/vir.0.050252-0.

Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. Nomaguchi M, DOI N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, Adachi A. Microbes Infect. 2013;15(4):319-28. 査読有  
DOI: 10.1016/j.micinf.2013.01.005.

A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5 linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection. Nakayama EE, Nakajima T, Kaur G, Mimaya JI, Terunuma H, Mehra N, Kimura A, Shioda T. AIDS Res Hum Retroviruses. 2013;29(6):919-24. 査読有  
DOI: 10.1089/AID.2012.0369.

Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A. Microbes and Infection 2013;15(1):56-65 査読有  
DOI: 10.1016/j.micinf.2012.10.013.

Polymorphisms in Fas gene is associated with HIV-related lipodystrophy in Thai patients. Likansakul S, Rattanatham T, Feangvad S, Uttayamakul S,

Prasithsirikul W, Srisopha S, Nitiyanontakij R, Tengtrakulcharoen P, Tarkowski M, Riva A, Nakayama EE, Shioda T. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013;29(1):142-50. 査読有  
DOI: 10.1089/AID.2012.0114.

Elicitation of Both Anti HIV-1 Env Humoral and Cellular Immunities by Replicating Vaccinia Prime Sendai Virus Boost Regimen and Boosting by CD40Lm. Zhang X, Sobue T, Isshiki M, Makino S, Inoue M, Kato K, Shioda T, Ohashi T, Sato H, Komano J, Hanabusa H, Shida H. *PLoS One*. 2012;7(12):e51633. 査読有  
DOI: 10.3389/fmicb.2012.00206.

The carboxyl-terminus of human immunodeficiency virus type 2 circulating recombinant form 01\_AB capsid protein affects sensitivity to human TRIM5. Miyamoto T, Nakayama EE, Yokoyama M, Ibe S, Takehara S, Kono K, Yokomaku Y, Pizzato M, Luban J, Sugiura W, Sato H, Shioda T. *PLoS One* 2012;7(10):e47757. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0047757.

Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzuki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE and Akari H. *Front. Microbio*. 2012 3:314. 査読有  
DOI: 10.3389/fmicb.2012.00314.

Electrostatic potential of human immunodeficiency virus type 2 and rhesus macaque simian immunodeficiency virus capsid proteins. Bozek K, Nakayama EE, Kono K, Shioda T. *Front Microbiol*. 2012;3:206. 査読有  
DOI: 10.3389/fmicb.2012.00206.

Role of human TRIM5 in intrinsic immunity. Nakayama EE, Shioda T. *Front Microbiol*. 2012;3:97. 査読有  
DOI: 10.3389/fmicb.2012.00097.

A proposal for a new HIV-1 DLS structural model. Sakuragi JI, Ode H, Sakuragi S, Shioda T, Sato H. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(11):5012-22. 査読有  
DOI: 10.1093/nar/gks156.

TRIM5 and Species Tropism of HIV/SIV. Nakayama EE, Shioda T. *Front Microbiol*. 2012;3:13. 査読有  
DOI: 10.3389/fmicb.2012.00013.

Geographic, Genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE. *J Gen Virol*. 2012; 93(Pt.3): 594-602. 査読有  
DOI: 10.1099/vir.0.038075-0.

Influence of ABCB-1 C3435T polymorphisms on Plasma nevirapine and efavirenz levels and their effects on virologic and immunological outcomes in HIV/TB co-infected THAI adults under anti- $\Delta$  retroviral therapy. Uttayamakul S, Likanonsakul S, Manosuthi W, Wichukchinda N, Shioda T and Khusmith S. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2012;43(1):78-88. 査読有  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23082557>

A Single Amino Acid of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Capsid Protein Affects Conformation of Two External Loops and Viral Sensitivity to TRIM5 $\alpha$ . Miyamoto T, Yokoyama M, Kono K, Shioda T, Sato H, Nakayama EE. *PLoS ONE* 2011;6(7): e22779. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0022779.

The relationship between HIV-1 genome RNA dimerization, virion maturation and infectivity. Ohishi M, Nakano T, Sakuragi S, Shioda T, Sano K, Sakuragi JI. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(8):3404-17. 査読有  
DOI: 10.1093/nar/gkq1314.

〔学会発表〕(計 20 件)

櫻木淳一、櫻木小百合、塩田達雄：  
HIV 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 第 27 回日本エイズ学会  
学術集会・総会 2013 年 11 月 20-22 日、熊本

田谷かほる、中山英美、塩田達雄：  
マクロファージ指向性 HIV-1 も、マクロファージおよび単球において SAMHD1 による増殖抑制を受けている。第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会 2013 年 11 月 20-22 日、熊本

櫻木淳一、夏井洋和、櫻木小百合、塩田達雄：  
レンチウイルスの Gag 開始コドンおよび翻訳とゲノムパッケージングに関する解析 第 61 回日本ウイルス学会学術集会  
2013 年 11 月 10-12 日、神戸

武田英里、河野健、Hulme Amy E.、Hope Thomas J.、中山英美、塩田達雄：  
可視化ウイルスをつかった HIV-2 カプシドコアの脱核速度測定法の確立 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 10-12 日、神戸

Eri Takeda, Ken Kono, Hiromi Tsutsui, Ayumu Kuroishi, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, Emi. E Nakayama, Tatsuo Shioda: Slower uncoating is associated with impaired replicative capability of simian-tropic HIV-1. 第 12 回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2013 年 9 月 10-13 日、淡路島

Kahoru Taya, Emi E Nakayama,

Tatsuo Shioda: Moderate restriction of macrophage tropic human immunodeficiency virus type 1 by SAMHD1 in monocyte-derived macrophages. 第 12 回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2013 年 9 月 10-13 日、淡路島

中山英美、中島敏晶、Gurvinder Kaur、三間屋純一、照沼 裕、Narinder Mehra、木村彰方、塩田達雄: ヒト TRIM5 リンカー領域の多型の抗 HIV-1 活性に及ぼす影響 第 26 回エイズ学会学術集会・総会. 2012 年 11 月 24-26 日、横浜

櫻木淳一、櫻木小百合、塩田達雄: SL1 Revisited: Functional analysis of the structure and conformation of HIV-1 Genome RNA. 第 26 回エイズ学会学術集会・総会 2012 年 11 月 24-26 日、横浜

櫻木淳一、大出裕高、櫻木小百合、塩田達雄、佐藤裕徳: HIV ゲノム RNA 二量体化シグナルの新規構造モデル 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 13-15 日、大阪

Emi Nakayama, Toshiaki Nakajima, Gurvinder Kaur, Jun-ich Mimaya, Hiroshi Terunuma, Narinder Mehra, Akinori Kimura, Tatsuo Shioda: A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5 linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection. 第 11 回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2012 年 9 月 11-14 日、淡路島

塩田達雄: HIV 感染症に関わる宿主因子 第 14 回白馬シンポジウム in 京都 2012 年 6 月 7-8 日、京都

E Nakayama, T Nakajima, G Kaur, H Terunuma, J-I Mimaya, H Ohtani, N Mehra, A Kimura, Tatsuo Shioda: A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5 linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection. Cold Spring Harbor Laboratory (Retroviruses)2012. May 21-26, 2012, Seattle(USA).

中山 英美、Likansakul,S., Rattanatham, T., Feangvad, S., Uttayamakul, S., Prasithsirikul, W., Tarkowski, M., Riva, A., 塩田達雄: 抗レトロウイルス療法副作用の発症に関わる宿主因子.第 25 回エイズ学会学術集会・総会 2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京

齋藤暁、河野健、中山英美、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、塩田達雄、明里宏文:サル指向性 HIV-1 への感受性に影響を与えるマカクサル TRIM5 遺伝子の多様性 第 25 回エイズ学会学術集会・総会 2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京

櫻木淳一、大出裕高、櫻木小百合、塩田達雄、佐藤裕徳: HIV-1 ゲノム二量体化シグナルの新規構造モデル 第 25 回エイズ学会学術集会・総会 2011 年 11 月 30 日-12 月

2 日、東京

塩田達雄: Genetic polymorphisms of TRIM5 gene in human and macaques. 第 12 回熊本エイズセミナー・グローバル COE 合同国際シンポジウム 2011 年 10 月 19 日、熊本  
Saito,A., Nomaguchi,M., Kono,K., Nakayama,EE., Shioda T., Yoshida1,T., Yasutomi,Y., Matano,T., Adachi,A., Akari,H. : Genotypic variation of cynomolgus monkey TRIM5Alpha determines the susceptibility to monkey-tropic HIV-1 infection.第 59 回日本ウイルス学会学術集会 (International Congress of Virology) 2011 年 9 月 11-16 日、札幌

Miyamoto, T., Yokoyama,M., Kono,K., Shioda T., Sato,H., Nakayama, EE. : A single amino acid of human immunodeficiency virus type 2 capsid protein affects conformation of two external loops and viral sensitivity to TRIM5 . 第 59 回日本ウイルス学会学術集会 (International Congress of Virology) 2011 年 9 月 11-16 日、札幌

Kono, K., Kuroishi, A., Nakayama, EE., Hulme, AE., Hope, TJ., Shioda T. : Simian-Tropic HIV-1 NL-4/5S6/7SVIFS shows slower capsid uncoating in human Cells. 第 59 回日本ウイルス学会学術集会 (International Congress of Virology) 2011 年 9 月 11-16 日、札幌

<sup>20</sup> Sakuragi, JI., Sakuragi, S., Shioda T. SL1 Revisited: Functional analysis of the structure and conformation of HIV-1 genome RNA. 第 59 回日本ウイルス学会学術集会 (International Congress of Virology) 2011 年 9 月 11-16 日、札幌

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

塩田 達雄 (SHIODA, Tatsuo)  
大阪大学・微生物病研究所・教授  
研究者番号 : 0 0 1 8 7 3 2 9