

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460567

研究課題名(和文) HIV-1 RNA コア偽結節を標的とした新規抗ウイルス戦略の構築

研究課題名(英文) Establishment of novel anti-virus strategy targeting HIV-1 RNA psi pseudoknot.

研究代表者

櫻木 淳一 (Sakuragi, Jun-ichi)

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：HIVのゲノムは粒子内で常に二量体化しており、ウイルスの感染能・病原性に深く関わっていると考えられる。研究代表者はウイルスゲノム上の二量体化シグナル(DLS)中にRNA偽結節様構造の存在を示唆した。本研究では偽結節周辺の構造に着目しSL1やPBS領域の機能構造に関する知見を掘り下げると共に、ウイルスの粒子成熟に関わるp1領域を詳細に解析することでゲノムパッケージや感染性獲得に関する考察を行った。

研究成果の概要(英文)：The genome of HIV-1 always forms dimer in virion. The genome dimerization is believed to have important roles on viral infectivity and/or pathogenicity. Previously I suggested the dimerization signal region RNA (DLS) of HIV-1 forms pseudoknot-like structure. In this project, I explored a precise functional structures around the pseudoknot, such as SL1 and primer binding site applying virological/molecular biological approach. In addition, I focused on the p1 region, which is important for viral maturation process and examined its roles on viral infectivity and genome packaging.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 RNA ウイルスゲノム パッケージング 二量体化

1. 研究開始当初の背景

後天性免疫不全症候群 (AIDS) はここ四半世紀で最悪の伝染病の一つであり、現在までにその病原体 HIV に対する様々な抗ウイルス薬が開発されている。しかし HIV 特有の易変異性と選択圧逃避能から薬剤耐性ウイルス株の出現は避けられない問題であり、従来の標的と異なる作用点を持った新規薬剤の探索は常に求められている。

HIV はレトロウイルス科に属し、そのゲノムは粒子内で常に二量体化していることが知られており、ゲノム二量体化はウイルスの感染能・病原性にも深く関わっていると考えられる。また、ウイルスの遺伝情報がすべて含まれたウイルスゲノムはウイルスのいわば本体であり、レトロウイルス粒子中に二分子のみ存在するためそれを標的とした阻害剤の開発は効果的な抗ウイルス療法となりうる。

研究代表者はウイルス増殖におけるパッケージングシグナル(Psi)および Psi 内部にあ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。研究代表者はこれらの研究を継続発展させていく過程で、HIV-1DLS中にRNA偽結節様構造(Pseudoknot; PK)が存在することを強く示唆するデータを得た。通常のRNA構造と比べてPKは特異的な立体構造をとっており、薬剤標的として好適である。またRNA-PKの独自構造を解析し、形成機序の考察を行うことにより基礎科学的視点からの新知見を多数得ることも期待された。

2. 研究の目的

HIV-1DLS内部のPK周辺の構造に着目し、Stem-Loop 1 (SL1)やプライマー結合部位(Primer Binding Site; PBS)領域の機能構造に関する知見を掘り下げると共に、ウイルスの粒子成熟に関わる重要なウイルス因子

である p1 領域を詳細に解析することでゲノムパッケージや感染性獲得に関する考察を行った。

3. 研究の方法

すべての変異体は HIV-1 感染性クローン pNL-43 を母体として作成した。トランスフェクション、ウイルス精製、ウイルス増殖実験、ウェスタンブロットティング、RNA 定量、ネイティブノザンブロットティング、サイトメーター解析は定法に従って行った。

4. 研究成果

PK 形成に影響を与える DLS 内部の PK 周辺の機能に着目して解析を行った結果、以下のことが示唆された。以下の成果は HIV のゲノム RNA の構造や機能の理解に大きく寄与するものである。

二量体化開始点(Dimer Initiation Site: DIS)を含み DLS 内でも非常に重要な領域である SL1 の構造に関して、ウイルス学的解析から従来の理解とは異なりヘアピンループ部が大きく、ステム基部が短い可能性が示唆された。計算機科学によりこの構造を検討した結果、これまでよりもヘアピンループ方向に長く伸びた構造をとることが明らかとなり、ループ部で分子間結合を起こすために合理的な形状になっていると考えられた。また分子動力的シミュレーションの結果、RNA 単体では新規構造を保つことは困難であり、RNA 構造維持のため介在する他因子の存在が示唆された。

HIV-1 サブタイプ間のクロスパッケージング効率の解析によって、遺伝的距離が最も近いサブタイプ B と D の間のクロスパッケージング効率が相対的に低いことを見いだした。組換えウイルスを多数作成してウイルスゲノム上の責任領域を追求した結果、PBS 周辺領域に存在することが明らかとなった。PBS はこれまで HIV-1 のパッケージングには不要と考え

られてきたため、非常に注目される結果である。

ゲノム二量体化によってもたらされる RNA 逆転写時のゲノム組換えについて、独自の実験系を構築して定量的解析を行った。その結果効率的な組換えに必要な相同部位は長さ 60 塩基以上・相同性 95% 以上が必要とされること、逆転写酵素の進行を物理的に止めるような RNA の高次構造が重要な役割を果たすことが明らかとなった。これらは今までに明示されたことの無い重要な情報である。

HIV 粒子はプロテアーゼによる粒子蛋白 Gag の切断を受けて初めて成熟し、感染を持つようになるが成熟過程で明らかになっていないことは多い。Gag 内のペプチドである p1 を切断単離されないように変異導入すると、変異体は感染細胞内でのみウイルス RNA の逆転写が不能となることを研究代表者は明らかにしてきた。今回は特殊な変異体を作成することで従来不可能だった p1 領域への詳細な変異導入を行うことに成功し、p1 とウイルス成熟とウイルス RNA の関係を解析した結果、NC-p1 切断阻害変異はウイルスのコア形成不全を引き起こしているという新しい可能性が示唆された。また、p1 がウイルス粒子内に存在すること、p1 の成熟阻害がウイルス増殖能低下の重要な要因であることが明らかとなった。

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4件)

- 1) Hashimoto M, Nasser H, Bhuyan F, Kuse N, Satou Y, Harada S, Yoshimura K, Sakuragi J, Monde K, Maeda Y, Welbourn S, Strebel K, Abd El-Wahab EW, Miyazaki M, Hattori S, Chutiwitoonchai N,

Hiyoshi M, Oka S, Takiguchi M, Suzu S. Fibrocytes Differ from Macrophages but Can Be Infected with HIV-1. *J Immunol*. 2015 Nov 1; 195 (9): 4341-50. doi: 10.4049/jimmunol.1500955. 査読有。

- 2) Properties of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase recombination upon infection. Sakuragi S, Shioda T, Sakuragi J. *J Gen Virol*. 2015 Nov; 96(11): 3382-8. doi: 10.1099/jgv.0.000265. 査読有。

- 3) 櫻木 淳一 HIVの複製プロセス～ウイルスゲノムを中心として～ ウイルス 63, 175-186, 2013. doi: 10.2222/jsv.63.175. 査読無。

- 4) Sudo S, Haraguchi H, Hirai Y, Gatanaga H, Sakuragi J, Momose F, Morikawa Y. Efavirenz enhances HIV-1 gag processing at the plasma membrane through Gag-Pol dimerization. *J Virol* 87, 3348-60, 2013. doi: 10.1128/JVI.02306-12. 査読有。

[学会発表](計12件)

- 1) 櫻木 淳一
HIV-1 Gag p1 ペプチドのウイルス生活環における機能的解析
第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015 Nov.22-24. 福岡。

- 2) 櫻木 淳一
HIV-1 Gag p1 ペプチドのウイルス生活環における機能的解析
第 29 回日本エイズ学会学術集会 2015 Nov.29-Dec.1 東京。

3) 櫻木 淳一

HIV-1 ゲノム RNA 二量体化領域 DLS の機能的構造に関する解析 日本 RNA 学会 2015 年 7 月 15 日～17 日 札幌。

4) 櫻木 淳一、櫻木 小百合、塩田 達雄

HIV-1 パッケージングシグナル内最重要領域 SL1 の機能的構造に関する多角的解析 日本エイズ学会 2014 年 12 月 3 日～5 日、大阪。

5) 櫻木 淳一

HIV ゲノム RNA とその周辺 シンポジウム 13 「HIV のウイルス学」 日本エイズ学会 2014 年 12 月 3 日～5 日、大阪。

6) 櫻木 淳一、櫻木 小百合、塩田 達雄

HIV-1 パッケージングシグナル内最重要領域 SL1 の機能的構造に関する多角的解析 日本ウイルス学会 2014 年 11 月 10 日～12 日、横浜。

7) Sayuri Sakuragi, Tatsuo Shioda and Jun-ichi Sakuragi.

SL1 REVISITED: FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE STRUCTURE AND CONFORMATION OF HIV-1 GENOME RNA. Retrovirus meeting at Cold Spring Harbor Laboratory. May 19-24, 2014, NY, USA.

8) 櫻木 淳一・夏井 洋和・櫻木 小百合・塩田 達雄

レトロウイルスの GagAUG および翻訳とゲノムパッケージングに関する解析
第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日～6 日 神戸。

9) 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 日～22 日 熊本。

10) 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 日～12 日 神戸。

11) Sakuragi J.

Virology. Training Course, The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity
Sep 10-13, 2013, Awaji, Japan.

12) Sakuragi J.

Relationship between genome packaging and Gag translation of various mammal retroviruses. 25th Workshop on Retroviral Pathogenesis. August 7-10, 2013, Reykjavik, Iceland.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻木 淳一 (Sakuragi, Jun-ichi)

大阪大学微生物病研究所ウイルス感染制御分野 助教

研究者番号 : 90273705