

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460556

研究課題名(和文) HIV-1 pol遺伝子のSLSA1構造内1塩基置換による複製制御基盤の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular basis for modulation of HIV-1 replication by naturally-occurring single nucleotide polymorphisms within the SLSA1 structure of the pol gene

研究代表者

野間口 雅子 (NOMAGUCHI, Masako)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授

研究者番号：80452647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：HIV-1 Vif とAPOBEC3Gとの拮抗はウイルス複製にとってcriticalである。HIV-1の馴化・適応研究から、SLSA1を含むスプライシングアクセプター1近傍の領域(SA1prox)に自然に存在する1塩基置換によりウイルス複製能が変動することを見出した。本研究では、このようなウイルス複製能の変動が、Vif発現量の増減により起こることを明らかにした。さらに、Vif低発現変異体の馴化実験により、vif mRNA産生に關与するSA1prox以外のゲノム領域が存在すること、また、APOBEC3Gにより強力に複製が抑制される環境下でも、HIV-1が極めて高い適応能力を持つことが示された。

研究成果の概要(英文)：Power balance between HIV-1 Vif and APOBEC3G is critical for viral replication. Through HIV-1 adaptation study, we found that virus replication capacity varies by naturally-occurring single nucleotide polymorphisms (nsSNP) within the region proximal to the splicing acceptor 1 (SA1prox) and SLSA1 structure on the HIV-1 genome. Molecular virological analysis in this study revealed that the change of viral growth ability results from the increase and decrease in Vif expression levels by nsSNPs. Thus, the nucleotide sequence of SA1prox region is important for determining the Vif expression level. To investigate how viruses expressing an extremely low level of Vif adapt themselves to environments with a high APOBEC3G level, we performed virus adaptation experiments. The results showed that the region other than SA1prox is also involved in vif mRNA production, and that HIV-1 displays a high adaptation ability even under circumstances where virus replication is strongly restricted.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV Vif APOBEC3G ウイルス複製 変異・適応

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 の遺伝子発現(転写、5'cap/3'ポリ A 付加、選択的スプライシング、mRNA 核外移行、翻訳)は、宿主およびウイルスの蛋白質群とウイルスゲノム内の *cis*-acting element により高度に調節されている。遺伝子発現のバランスの破綻は、ウイルス複製能に劇的な影響を及ぼす。そのため、遺伝子発現の各過程を標的とした HIV-1 複製制御法の開発が試みられている (PLoS Pathog. 9: e1003241, 2013 など)。

申請者らは、複製抑制環境下における HIV-1 の馴化過程で *pol*-integrase(*pol*-IN)3' 末端の非常に狭い領域と *env* 領域に増殖促進変異が再現性高く出現することを見出した (Microbes Infect. 15:319, 2013)。Pol-IN3' 領域内の増殖促進変異の詳細な分子ウイルス学的解析と HIV-1 シークエンスデータとの照合を行った結果、本領域内の「アミノ酸置換を伴わない 1 塩基多型 (naturally-occurring synonymous single nucleotide polymorphism: nsSNP と省略)」によりウイルス複製能が増減することが分かった。複製能の増減は、ウイルス粒子を構成する後期蛋白質の発現量およびウイルス産生量の増減と相関していた。また、これらの nsSNP はいずれもスプライシングアクセプター 1(SA1) 近傍のステムループ構造 (SLSA1, PLoS Pathog. 9: e1003294, 2013) に集中していた。ノーザンプロット解析の結果、SLSA1 内の nsSNP が HIV-1 の全体的な遺伝子発現パターンを量的・質的に変えることが示された。SLSA1 内には、2 つのスプライシングエンハンサー領域が報告されている (ESEVif と ESEM1)。両領域の変異はスプライシングパターンを変えるが、ESEVif 変異はウイルス産生量を著しく低下させ、ESEM1 変異によりウイルス複製能は変化しない。申請者らが同定した SLSA1 内の nsSNP は、ESEVif/ESEM1 以外のサイトにあり、ウイルス複製能に強く影響を及ぼす。HIV-1 ゲノムには複数のスプライシングサイトが存在するが、ウイルス複製能を増減させる nsSNP が集中するサイトは未だ報告がない。ノーザンプロット解析において、選択的スプライシングへの影響と推測される mRNA 発現の質的な変化のみならず、量的な変化も認められるため、nsSNP が他の遺伝子発現過程にも影響を及ぼしていることが強く示唆される。このことは、遺伝子発現の各過程がお互いに影響し合いながら反応が進むという最近の研究結果と合致している (Cold Spring Harb. Perspect. Med. 4: a006916, 2012; Cell 152: 1252, 2013 など)。

2. 研究の目的

本申請課題では SLSA1 内の 1 塩基置換 (nsSNP) による複製制御基盤を解析し、本領域の配列/RNA 構造の HIV-1 遺伝子発現・複製における役割を解明することを目的とす

る。

本申請課題では、SLSA1 内の nsSNP による HIV-1 複製能の増減が、どのような機構によって起こるのか、以下の点について明らかにする。

- (1) nsSNP が遺伝子発現のどの過程(転写、mRNA 安定性、スプライシング、mRNA 核外輸送や翻訳)に影響を及ぼしているのか? 複合的要因なのか?
- (2) SLSA1 配列/構造変化と複製能の増減との間に一定の相関が認められるか?
- (3) 宿主因子の関与があるか否か? 因子の探索と同定を試みる。

3. 研究の方法

SA1prox 内 nsSNP の探索: HIV-1/SIVcpz シークエンスデータベース (<https://www.hiv.lanl.gov>) を用いた。

nsSNP 変異体クローンの構築: HIV-1 NL4-3 株を親株として、nsSNP を site-directed mutagenesis により導入した。

ウイルス複製能の解析: ウイルスは 293T 細胞へのプロウイルスクローンのトランスフェクションにより調製した。ウイルス量は逆転写酵素アッセイ (RT assay) で測定した。等量のウイルスをヒトリンパ球由来 H9 細胞に接種後、継時的に培養上清を回収した。ウイルス増殖は培養上清の RT assay により測定した。

HIV-1 mRNA 産生パターンの解析: プロウイルスクローンをトランスフェクションした 293T 細胞から RNA を抽出後、oligo(dT) を使用し cDNA を合成した。cDNA を鋳型として、HIV-1 mRNA (2k, vif/vpr, vpu-env、全 mRNA 種) 特異的なプライマーを用いた PCR を行った。PCR 産物をアガロースゲルで分離し、HIV-1 mRNA 産生パターンを解析した。

4. 研究成果

本申請課題の目的は、SLSA1 の nsSNP による HIV-1 複製制御機構を明らかにすることである。当初は、SLSA1 の nsSNP が HIV-1 遺伝子発現の各過程 (転写、スプライシング、核外輸送、翻訳) に及ぼす影響を解析する計画であった。しかし、SLSA1 の nsSNP による *vif* mRNA レベルの変動に着目したことにより、研究は順調に進捗し、SLSA1 を含むスプライシングアクセプター 1 近傍領域 (SA1prox) の HIV-1 複製における役割とそのウイルス学的意義を以下に詳述するように明らかにした。

SA1prox の nsSNP は Vif 発現量を変動させた。Vif は、宿主細胞内の内在性抗 HIV 因子である APOBEC3G と拮抗するため、Vif による APOBEC3G 抑制回避はウイルス複製にとってクリティカルである。SA1prox の nsSNP による Vif 発現量変動は、APOBEC3G とのパワーバランスを変え、それによって Vif および APOBEC3G 双方の発現レベル依存的にウイルス複製能に影響を及ぼすことが分かった。こ

れまで、Vif 発現レベルを規定する HIV-1 ゲノム内の配列・領域は明らかにされていなかった。本申請課題の遂行により、SA1prox が塩基レベルで Vif 発現レベルを調節し、Vif と APOBEC3G とのパワーバランスを変える役割を持つことが明らかになった。Vif 発現量を変動させる SA1prox の nsSNP は、全て HIV-1 グループ・サブタイプのゲノム内に自然に存在するものであり、このことは、HIV-1 が SA1prox の塩基配列を変化させ細胞内環境に適応していることを示唆している。以上のことから、SA1prox の nsSNP による HIV-1 複製制御の基盤となるメカニズムを明らかにできたと考えている。

一方、SA1prox の nsSNP の中には、Vif 発現量を親株の 2%程度まで著減させる変異体 (NL-tac) が存在する。そこで、NL-tac の馴化実験により、Vif と拮抗する内在性抑制因子である APOBEC3G 存在下で、ウイルスがどのように変異・適応するのかを調べた。また、馴化実験により獲得した変異を解析することで、*vif* 発現調節に関与する SA1prox 以外の領域の有無を検討した。NL-tac をヒトリンパ球系細胞株 H9 (APOBEC3G 強発現細胞) で長期培養した結果、増殖能を獲得した馴化型ウイルス (NL-tacad1) が出現した。馴化型ウイルスゲノムには複数の変異が認められたが、*vif* 発現量を増加させる (NL-tac の 10 倍程度) 変異は、SA1prox より下流の Vif コード領域内に存在し、SA1prox 以外にも *vif* 発現に影響を及ぼす領域があることが分かった。さらに、HIV-1 は選択的スプライシングにより種々のウイルス蛋白質をコードする mRNA を産生するが、SA1prox nsSNP 変異体では、全体的な HIV-1 mRNA 発現パターンが変化し、特に、*vpr* 発現量は *vif* 発現量の増減と逆相関することも明らかにした。従って、SA1prox の nsSNP は *vif* 発現量のみに影響するわけではなく、逆に、他の領域の変異も *vif* 発現量を変動させ得ると考えられた。これらは、HIV-1 の選択的スプライシング機構の複雑さを示しており、SA1prox nsSNP による *vif* 発現調節機構の解析により、HIV-1 遺伝子発現に関する総合的知見が得られると考えられる。また、NL-tac の馴化実験から、強力に複製が抑制される環境下でも、HIV-1 が極めて高い適応能力を持つことが示された。さらに、長期にわたって馴化実験を続けた結果、NL-tacad1 よりさらに増殖が促進した馴化型ウイルスクローン (NL-tacad2) が得られた。NL-tacad2 は、NL-tacad1 で認められなかった Env 変異を獲得しており、現在、ウイルス増殖に及ぼす影響を解析中である。以上の結果から、Vif 低発現変異体 (NL-tac) は APOBEC3G 抑制下において、まずある一定レベルの Vif 発現量を回復する変異獲得により複製能が改善され、その後 Env 変異等によりさらに適応していくものと推測された。ウイルスの極めて目的適応過程が実証されたと考えられる。

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 10 件)

Y. Sakai, N. Doi, Y. Miyazaki, A. Adachi, M. Nomaguchi, Phylogenetic insights into the functional relationship between primate lentiviral reverse transcriptase and accessory proteins Vpx/Vpr, *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 7, article 1655, 2016
DOI:10.3389/fmicb.2016.01655.

Y. Sakai, A. Miyake, N. Doi, H. Sasada, Y. Miyazaki, A. Adachi, M. Nomaguchi, Expression profiles of Vpx/Vpr proteins are co-related with the primate lentiviral lineage, *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 7, article 1211, 2016
DOI:10.3389/fmicb.2016.01211.

M. Nomaguchi, N. Doi, Y. Sakai, H. Ode, Y. Iwatani, T. Ueno, Y. Matsumoto, Y. Miyazaki, T. Masuda, A. Adachi, Natural single-nucleotide variations in the HIV-1 genomic SA1prox region can alter viral replication ability by regulating Vif expression levels, *Journal of Virology*, 査読有, 90, 4563-4578, 2016
DOI:10.1128/JVI.0239-15.

T. Sultana, E.E. Nakayama, S. Tobita, M. Yokoyama, Y. Seki, A. Saito, M. Nomaguchi, A. Adachi, H. Akari, H. Sato, T. Shioda, Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis, *Journal of General Virology*, 査読有, 97, 963-976, 2016
DOI:10.1099/jgv.0.000408.

*M. Yokoyama, *M. Nomaguchi, N. Doi, T. Kanda, A. Adachi, H. Sato, In silico analysis of HIV-1 Env-gp120 reveals structural bases for viral adaptation in growth-restrictive cells, *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 7, article 110, 2016, *, Co-first authors
DOI:10.3389/fmicb.2016.00110.

N. Doi, Y. Sakai, Y. Miyazaki, A. Adachi, M. Nomaguchi, Single-amino acid mutation 66SR in Gag-matrix enhances viral single-cycle infectivity of R5-tropic HIV-1rmt, *Journal of Medical Investigation*, 査読有, 62, 228-232, 2015
DOI:10.2152/jmi/62/228

M. Nomaguchi, E.E. Nakayama, M. Yokoyama, N. Doi, T. Igarashi, T.

Shioda, H. Sato, A. Adachi, Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 α , *Microbes and Infection*, 査読有, 16, 936-944, 2014

DOI:10.1016/j.micinf.2014.08.017

N. Doi, A. Adachi, M. Nomaguchi, Growth properties of macaque-tropic HIV-1 clones carrying vpx/vpr genes from simian immunodeficiency viruses in place of their vpr regions, *Journal of Medical Investigation*, 査読有, 61, 374-379, 2014

DOI:10.2152/jmi/61/374

M. Nomaguchi, N. Doi, A. Adachi, Virological characterization of HIV-2 vpx gene mutants in various cell systems. *Microbes and Infection*, 査読有, 16, 695-701, 2014

DOI:10.1016/j.micinf.2014.06.004

M. Nomaguchi, A. Miyake, N. Doi, S. Fujiwara, Y. Miyazaki, Y. Tsunetsugu-Yokota, M. Yokoyama, H. Sato, T. Masuda, A. Adachi, Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability, *Journal of Virology*, 査読有, 88, 4145-4160, 2014
DOI:10.1128/JVI.01859-13.

[学会発表](計 17 件)

K. Fujimoto, N. Doi, Y. Sakai, A. Adachi, M. Nomaguchi, Effects of mutations HIV-1 Gag-CA helix 7 and linker domain on the virion production, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日~10 月 25 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

A. Adachi, N. Doi, Y. Sakai, K. Fujimoto, M. Nomaguchi, An ultra-low vif type of HIV-1 SA1D2prox variant can adapt and evolve under the high level of APOVE3G, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日~10 月 25 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

M. Nomaguchi, N. Doi, K. Fujimoto, Y. Sakai, S. Nakanishi, A. Adachi, Identification of cis-elements involved in the HIV-1 vif mRNA production, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日~10 月 25 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

N. Doi, C. Ishifune, K. Yasutomo, T. Miura, Y. Sakai, K. Fujimoto, S. Harada, K. Yoshimura, M. Nomaguchi, A. Adachi, Replication and pathogenicity of HIV-1rmt: towards evaluation of viral

growth ability in gut-derived cells, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日~10 月 25 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Y. Sakai, K. Fujimoto, N. Doi, M. Nomaguchi, A. Adachi, Studies on the adaptation process of HIV-1 Env in macaque cells, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日~10 月 25 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

川上朗彦、姫野愛、菊川美奈子、石田裕樹、野間口雅子、足立昭夫、三浦智行、中和抵抗性かつ CCR5 指向性の新規 HIV-1rmt の構築、第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23~25 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

T. Sultana, E.E. Nakayama, S. Tobita, M. Yokoyama, Y. Seki, A. Saito, M. Nomaguchi, A. Adachi, H. Akari, T. Shioda, Novel mutant human immunodeficiency virus type 1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis, The 23rd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2016 年 2 月 22 日~2 月 25 日、Boston(USA)

野間口雅子、サル指向性 HIV-1 構築の視点から、第 29 回日本エイズ学会学術集会、2015 年 11 月 29 日~12 月 1 日、東京ドームホテル(東京都文京区)

野間口雅子、土肥直哉、吉田知哉、酒井遥介、宮崎恭行、足立昭夫、SA1prox の 1 塩基置換による HIV-1 Vif 発現量変動機構、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日~11 月 24 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

足立昭夫、土肥直哉、酒井遥介、吉田知哉、宮崎恭行、野間口雅子、HIV-1 Vif 発現量を増減させる SA1D2prox 塩基配列の同定、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日~11 月 24 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

土肥直哉、野間口雅子、酒井遥介、足立昭夫、CCR5-tropic アカゲザル指向性 HIV-1 の構築とウイルス学的性状解析、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日~11 月 24 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

酒井遥介、土肥直哉、宮崎恭行、足立昭夫、野間口雅子、HIV-1 Gag-CA I134/I135/S149 の 1 アミノ酸変異はウイルス複製後期過程に影響する、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日~11 月 24 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

T. Sultana, E.E. Nakayama, S. Tobita, A. Saito, M. Nomaguchi, A. Adachi, H.

Akari, T. Shioda, Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis, The 63rd Annual Meeting of The Japanese Society for Virology, 2015年11月22日~11月24日, Fukuoka International Congress Center (Fukuoka, Fukuoka)
野間口雅子、土肥直哉、酒井遥介、泉泰輔、宮崎恭行、足立昭夫、SA1prox の遺伝子配列は Vif/APOBEC3G 依存的にウイルス複製能を変動させる、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日~11月12日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
酒井遥介、笹田ひかり、土肥直哉、泉泰輔、宮崎恭行、足立昭夫、野間口雅子、HIV/SIV Vpx 蛋白質の発現調節に寄与する領域の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日~11月12日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
宮崎恭行、泉泰輔、野間口雅子、内山恒夫、足立昭夫、In vitro 構築系を用いた HIV-1/HIV-2 CA 重合能に関する研究、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日~11月12日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
土肥直哉、宮崎恭行、酒井遥介、泉泰輔、内山恒夫、足立昭夫、野間口雅子、HIV-1 Gag-CA ヘリックス 7 の変異がウイルス複製後期過程に及ぼす影響の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日~11月12日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野間口 雅子 (NOMAGUCHI, Masako)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：80452647

(2) 研究分担者

足立 昭夫 (ADACHI, Akio)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特命教授
研究者番号：90127043

宮崎 恭行 (MIYAZAKI, Yasuyuki)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：70607233