

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590472

研究課題名 (和文) ヒト免疫不全ウイルス 1 型感染初期過程に関わる宿主因子の探索

研究課題名 (英文) Research on host factors involved in early steps of HIV-1 replication

研究代表者

中山 英美 (NAKAYAMA EMI)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：70324845

研究成果の概要 (和文)：ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の感染初期過程に関わる宿主因子の解析を行い、TRIM5・に加えてサイクロフィリン A もサル細胞内で HIV の増殖を阻害すること、TRIM5・の抗ウイルス作用にはプロテアソーム依存性経路と非依存性経路とが混在し、サルとウイルスの種の組み合わせによって使用される経路が決まること、広範な抗ウイルス作用を示すアカゲザル TRIM5・はウイルスカプシドの広範な領域を認識していることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：We analyzed host factors involved in early steps of HIV-1 replication and found that cyclophilin A suppressed HIV-1 replication in Old World Monkey cells. We also found that the mechanisms of retrovirus restriction by TRIM5・ vary depending on the combination of host and virus. Furthermore, we found that multiple regions of the SIVmac capsid protein are necessary for complete evasion from rhesus monkey TRIM5・ restriction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：HIV, TRIM5 α , Cyclophilin A

1. 研究開始当初の背景

エイズの原因ウイルスヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) はチンパンジー以外のサルのリンパ球では逆転写の過程が効率良く進行せず、増殖できない。この性質はサル細胞に存在する阻害因子によるものとされていた。TRIM5 α はアカゲザルにおける HIV-1 感染抵抗性因子として 2004 年に同定された。当時、申請者はアフリカミドリザルの細胞 CV 1 は、HIV-1 のみならずサル免疫不全ウイルス SIVmac に対し

でも感染抵抗性であることを見いだしており、アフリカミドリザルの TRIM5 α をクローニングし、その SIVmac 感染阻害効果を担うドメインが TRIM5 α の SPRY 領域であることを報告した (Nakayama et al. J. Virol. 2005)。また、TRIM5 α は coiled-coil 領域を有することから、多量体を形成すると予想されたが、SIVmac の感染を阻害できる TRIM5 α と阻害できない TRIM5 α の両者を同時に発現させると、多量体を形成した結果 SIVmac の増殖を阻害できなく

なるドミナントネガティブ現象を観察し、TRIM5 α は多量体を形成することによって始めて感染阻害能を発揮することも報告した (Nakayama et al. Virology 2006)。しかし、長期継代されたアフリカミドリザル由来の CV1 細胞が、長期継代される前の CV1 細胞や CV1 細胞を SV40 で形質転換した COS7 細胞と比べて、HIV-1 増殖の初期過程の進行が著しく低下しており、TRIM5 α の発現を siRNA でノックアウトしても殆ど回復しないことから、申請者は TRIM5 α によっても説明がつかない HIV-1 感染阻害が存在することに気が付いた。SIVmac の増殖は TRIM5 α の発現をノックアウトすると顕著に回復するのと対象的である。

2. 研究の目的

本研究は上記の背景に記載した状況を踏まえ、HIV-1 の感染初期過程に関わる宿主因子の役割を解明し、HIV-1 感染予防やエイズ制御のための新たな標的を見出すことを目的とする。そのために以下の3つの研究を行う。

- (1) 旧世界サル細胞内に存在する TRIM5 α 以外の HIV-1 増殖の阻害因子を同定する。
- (2) TRIM5 α による HIV-1 ならびに SIVmac 感染抑制機構の詳細を解明する。
- (3) 広範な抗ウイルス作用を示すアカゲザル TRIM5 α が認識するウイルスカプシドタンパク質の領域を同定する。

3. 研究の方法

- (1) 旧世界サル細胞 CV1、Vero、あるいは LLC-MK2 やヒト細胞 293T あるいは MT4 に、センダイウイルスベクターを用いてサイクロフィリン A や SPRY 領域を欠損した TRIM5 を発現させ、HIV-1 あるいはサイクロフィリン A との結合能を失う変異をカプシド遺伝子に導入した HIV-1 を感染させ、培養上清中のカプシドタンパク質の量を ELISA 法で経時的に測定した。
- (2) TRIM5 α の種々の領域に変異を導入し、HIV-1 ならびに SIVmac に対する抗ウイルス作用を(1)と同様の方法で検討した。
- (3) アカゲザル TRIM5 α による感染抑制を受ける HIV-2 と受けけない SIVmac239 のカプシドキメラウイルスを作成し、それぞれのキメラウイルスのアカゲザル TRIM5 α 感受性を(1)と同様の方法で検討し、アカゲザル TRIM5 α が認識するウイルスカプシド内の領域を決定した。

4. 研究成果

- (1) HIV-1 は、宿主域が狭くアカゲザルやアフリカミドリザルの細胞には侵入するが逆転写が進行しない。旧世界サル細胞中のレトロウイルス抑制因子

TRIM5 α が HIV-1 のカプシドに結合してこの増殖抑制機能を担う。一方、HIV-1 のカプシドにはサイクロフィリン A も結合する。旧世界サル細胞中におけるサイクロフィリン A の HIV-1 増殖抑制に果たす役割を検討するために、まず、旧世界サルの細胞に SPRY ドメインを欠損した TRIM5 を発現させ TRIM5 α の機能を抑制した。その上でサイクロフィリン A を発現させると HIV-1 感染感受性が低下した。一方ヒト細胞で同様の実験を行っても、感染感受性は全く変化せず、サイクロフィリン A による HIV-1 感染阻害効果は旧世界サル細胞特異的であることが明らかになった。サイクロフィリン A との結合能を失う変異をカプシド遺伝子に導入した HIV-1 の感受性はサイクロフィリン A の発現により影響されず、また、HIV-1 カプシドとの結合能を失う変異を導入したサイクロフィリン A の発現では、HIV-1 感染阻害効果は認められなかった。本研究により、旧世界サル細胞における抗 HIV-1 作用は、TRIM5 α とサイクロフィリン A の二つの因子によって担われていることがはっきりした。また、旧世界サルにおけるサイクロフィリン A の感染抑制効果は TRIM5 α に依存しない作用であることも明らかになった。サイクロフィリン A のアミノ酸配列はヒトと旧世界サルの間で同一であるため、サイクロフィリン A と相互作用する旧世界サル細胞中の何らかの因子が、HIV-1 感染阻害を決定しているものと考えられた。

- (2) TRIM5 α は種間で多型に富んでおり、ヒト由来のものは HIV-1 も SIVmac も感染を抑制できないが、アフリカミドリザル由来の TRIM5 α は HIV-1 も SIVmac も感染を抑制することができる。TRIM5 α は RING、B-box、coiled-coil、SPRY の4つの領域からなるが、我々は種々の変異 TRIM5 α を作成し、SPRY 領域がウイルスを認識し、TRIM5 α は RING 領域依存的に自己ユビキチン化し、プロテアソームにより分解されることを示した。ところが、自己ユビキチン化能を失った RING 領域の変異体であっても、HIV-1 の感染を抑制できる一方で、SIVmac の感染は抑制できなくなることから、SIVmac の感染抑制はプロテアソームを介する経路が主体であるのに対して、HIV-1 の感染はプロテアソームを介する分解経路以外に、プロテアソームを介さない別の感染抑制機構があることが判明した。HIV-1 にはサイクロフィリン A が結合しウイ

ルス感染を抑制するが、SIVmac にはサイクロフィリン A は結合しない。HIV-1 のサイクロフィリン A 結合領域を SIVmac のものに置換したキメラウイルスも、RING 変異 TRIM5 α による感染抑制を受けたことから、プロテアソームを介さない感染抑制機構には、サイクロフィリン A 以外の因子の関与が示唆された。現在、HIV/SIVmac の別のキメラウイルスを用いて、プロテアソームを介さないウイルス感染抑制機構の解析を進めている。

- (3) HIV-1 は宿主域が極めて狭く人以外に感染する動物はチンパンジーのみで、アカゲザル、カニクイザルなどの旧世界ザルには感染しないが、HIV2 型 (HIV-2) は、HIV-1 と異なり旧世界ザルに感染できる株も存在する。我々はこれまでにカニクイザル TRIM5 α はウイルスのコアを形成するカプシドタンパク質 (CA) の 120 番目のアミノ酸がプロリンである HIV-2 株の感染を阻害する事ができるが、グルタミン又はアラニンである HIV-2 株の感染を阻害できない事、また HIV-1 の Vif に加えて CA の 120 番目のアミノ酸を含む 4 アミノ酸を SIVmac 由来の配列に置換することにより、HIV-1 がカニクイザル TRIM5 α から逃避してカニクイザルの末梢血 CD4 細胞で増殖可能になることを明らかにした。しかし、このウイルスはアカゲザル細胞では未だ増殖不能であり、アカゲザル TRIM5 α はカニクイザル TRIM5 α より広い領域を認識する可能性が示唆された。そこで本研究では、アカゲザル TRIM5 α による感染抑制を受ける HIV-2 と受けない SIVmac239 の CA キメラウイルスを作成し、アカゲザル TRIM5 α が認識する領域を決定したところ、120 番目のアミノ酸に加えて、CA のアミノ末端領域、4 番目と 5 番目の α -ヘリックス間のループ、6 番目の α -ヘリックスが重要であること、これらの領域は CA の多量体であるコア構造を取った場合に外側に位置することが判明した。HIV-1 のワクチンの効果判定には HIV-1 の感染サルモデルが必要である。アカゲザルに感染可能な HIV-1 の作成に、この知見は役立つものと考えられた。

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 17 件)

- ① Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee Y, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H. A novel

monkey-tropic HIV-1 derivative encoding only minimal SIV sequences can replicate in cynomolgus monkeys. *Microbes Infect* 13:58-64, 2011. 査読有

- ② Nakayama EE, Shioda T. Anti-viral effect of TRIM5 α . *Rev Med Virol* 20:77-92, 2010 査読有
- ③ Kono K, Song H, Yokoyama M, Sato H, Shioda T, Nakayama EE**. Multiple sites in the N-terminal half of simian immunodeficiency virus capsid protein contribute to evasion from rhesus monkey TRIM5 α -mediated restriction. *Retrovirology* 7: 72, 2010. 査読有
- ④ Kuroishi A, Bozek K, Shioda T, Nakayama EE**. A single amino acid substitution of the human immunodeficiency virus type 1 capsid protein affects viral sensitivity to TRIM5 α . *Retrovirology* 7:58, 2010. 査読有
- ⑤ Uttayamakul S, Likanonsakul S, Manosuthi W, Wichukchinda N, Kalambhaheti T, Nakayama EE, Shioda T, Khusmith S. Effects of CYP2B6 G516T polymorphisms on plasma efavirenz and nevirapine levels when co-administered with rifampicin in HIV/TB co-infected Thai adults. *AIDS Res Ther* 7:8, 2010. 査読有
- ⑥ Wichukchinda N, Nakajima T, Saipradit N, Nakayama EE, Ohtani H, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T, and Kimura A. TIM1 haplotype may control the disease progression to AIDS in a HIV-1-infected female cohort in Thailand. *AIDS* 24: 1625-1631, 2010. 査読有
- ⑦ Maegawa H, Miyamoto T, Shioda T, Nakayama EE. Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5 α depends on combination of host and virus species. *Virology* 399: 212-220, 2010. 査読有
- ⑧ Onyango C, Lekigdowicz A, Yokoyama M, Sato H, Song H, Nakayama EE, Shioda T, Townend J, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S, Cotton M. HIV-2 Capsids Distinguishing High and Low Virus Load Patients in a West African Community Cohort. *Vaccine* 28S2: B60-67, 2010. 査読有
- ⑨ Likanonsakul S, Rattanatham T, Feangvad S, Uttayamakul S,

- Prasithsirikul W, Tuntanathip P, Nakayama EE, Shioda T. HLA-C-dependent rash in HIV-1 patients treated with nevirapine in Thailand. *AIDS Res Ther* 6:22, 2009. 査読有
- ⑩ Nakajima T, Nakayama EE*, Kaur G, Terunuma H, Mimaya J, Ohtani H, Mehra N, Shioda T, Kimura A. Impact of novel TRIM5 α variants, Gly110Arg and G176del, on the anti-HIV-1 activity and the susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS* 23: 2091-2100, 2009. 査読有
- ⑪ Kuroishi A, Saito A, Shingai Y, Shioda T, Nomagushi M, Adachi A, Akari H, Nakayama EE. Modification of a loop between α -helices 6 and 7 of virus capsid protein improves human immunodeficiency virus type 1 replication in cynomolgus monkey cells. *Retrovirology* 6: 70, 2009. 査読有
- ⑫ Kono K, Bozek K, Domingues FS, Shioda T, Nakayama EE. Impact of a single amino acid in the variable region 2 of the Old World monkey TRIM5 α SPRY(B30.2) domain on anti-human immunodeficiency virus type 2 activity. *Virology* 388: 160-168, 2009. 査読有
- ⑬ Maegawa H, Nakayama EE, Kuroishi A, Shioda T. Silencing of tripartite motif protein (TRIM) 5 α mediated anti-HIV-1 activity by truncated mutant of TRIM5 α . *J Virol Methods* 151: 249-256, 2008. 査読有
- ⑭ Nakayama EE, Shingai Y, Kono K, Shioda T, TRIM5 α -independent anti-human immunodeficiency virus type 1 activity mediated by cyclophilin A in Old World monkey cells. *Virology* 375: 514-520, 2008. 査読有
- ⑮ Kono K, Song H, Singai Y, Shioda T, and Nakayama EE. Comparison of anti-viral activity of rhesus and cynomolgus monkey TRIM5 α s against HIV-2 infection. *Virology* 373: 447-456, 2008. 査読有
- ⑯ Wichukchinda N, Nakayama EE, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Auwanit W, Vongsheree S, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, and Shioda T. Effects of CCR2 and CCR5 Polymorphisms on HIV-1 Infection in Thai Females. *J Acquir Immune Defic Syndr* 47: 293-297, 2008. 査読有
- ⑰ Sugimoto C, Nakayama EE, Shioda T, Villinger F, Ansari AA, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y, and Mori K. Impact of Glycosylation on Antigenicity of Simian Immunodeficiency Virus SIV239: Induction of Rapid V1/V2 Specific Non-neutralizing Antibody and Delayed Neutralizing Antibody Following Infection with an Attenuated Deglycosylated SIV239 Mutant. *J Gen Virol* 89: 554-66, 2008. 査読有
- [学会発表] (計 14 件)
- ① 中山英美、HIV 感染制御因子 TRIM5 α 、第 24 回エイズ学会学術集会・総会、2010 年 11 月 24 日、東京
- ② 黒石歩、HIV-1 の TRIM5 α 感受性に影響するカプシド内の 1 アミノ酸置換、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 9 日、徳島
- ③ 中山英美、TRIM5 α と HIV/SIV の種特異性、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 9 日、徳島
- ④ Emi E. Nakayama, A single amino acid of the human immunodeficiency virus type 2 capsid affects its replication in the presence of cynomolgus monkey and human TRIM5 α s. BIT's 1st World Congress of Virus and Infections, 2010 年 8 月 1 日、Bussan, Korea
- ⑤ Emi E. Nakayama, Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5 α , 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI2010), 2010 年 2 月 18 日、san Francisco, USA
- ⑥ 中山英美、HIV 感染抑制因子 TRIM5 α の感染抑制機構の解析 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、2009 年 11 月 28 日、名古屋
- ⑦ 中山英美、HIV-2 感染症と TRIM5 α 、第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、2009 年 11 月 27 日、名古屋
- ⑧ 中山英美、HIV 感染抑制因子 TRIM5 α の感染抑制機構の解析、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25 日、

東京

- ⑨ Emi E. Nakayama Modification of a loop between α -helices 6 and 7 of capsid improves Human immunodeficiency virus replication in cynomolgus monkey cells, 21st International Workshop on Retroviral Pathogenesis, 2009年9月14日、Lucca, Italy
- ⑩ Emi E. Nakayama The Old World monkey TRIM5a restriction of human immunodeficiency virus type 2, 21st International Workshop on Retroviral Pathogenesis, 2009年9月14日、Lucca, Italy
- ⑪ Emi E. Nakayama Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5a depends on combination of host and virus species. 21st International Workshop on Retroviral Pathogenesis, 2009年9月14日、Lucca, Italy
- ⑫ 中山英美、カプシド変異とウイルス増殖、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月27日、大阪。
- ⑬ 中山英美、HIV感染阻害因子 TRIM5 α 、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26日、大阪。
- ⑭ 中山英美、カプシド変異とウイルス増殖、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月27日、岡山。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 英美 (NAKAYAMA EMI)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：70324845

..