

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：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390141

研究課題名（和文） HIV-1 の進化・適応機構に関する構造および機能的解析

研究課題名（英文） Structural and functional analysis of the mechanism for HIV-1 evolution/adaptation

研究代表者

足立 昭夫（ADACHI AKIO）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：90127043

研究成果の概要（和文）：ウイルスの細胞馴化や遺伝子工学的改変を適宜組み合わせることで、マカクザル細胞に存在する既知の全ての抗 HIV-1 因子（CypA、TRIM5 α 、APOBEC3 および Tetherin）の抗ウイルス効果を回避するマカクザル指向性 HIV-1（HIV-1mt）の構築に成功した。HIV-1mt とマカクザルの感染系を更に改善すれば、HIV-1・宿主攻防戦の実験的解析が可能となり、これまで不可能であった HIV-1 の個体内評価システムが完成する。

研究成果の概要（英文）：Using the viral adaptation in cells and genetic engineering in vitro, we have successfully generated macaque-tropic HIV-1 (HIV-1mt) that evades the anti-viral effect of all known anti-HIV-1 factors present in macaque cells (CypA, TRIM5 α , APOBEC3 and Tetherin). By improving the infection system of HIV-1mt and macaque monkeys, it would be possible to analyze experimentally the battle between HIV-1 and hosts. This would lead to the accomplishment of in vivo evaluation system for HIV-1 otherwise impossible.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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、適応進化、ゲノム解析、アクセサリ蛋白質

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 は宿主域が狭く、実験用霊長類を用いた個体感染実験が不可能であった。我々が

世界に先駆けて遺伝子工学的に構築したプロトタイプ HIV-1mt (NL-DT5R) は、サル CypA

と APOBEC3 の抗ウイルス効果を回避していたが、依然としてサル細胞での複製効率が悪く、サル個体実験には不適當であった。

2. 研究の目的

NL-DT5R を改良し、実験に頻用されるカンクイザルやアカゲザルで SIVmac239 (サル病原性標準ウイルスクローン) と同様の増殖能を持つ新しい HIV-1mt を構築する。これにより、種々の基礎・臨床研究を目指した本格的なサル個体感染実験に備える。

3. 研究の方法

HIV-1mt のサル細胞での馴化によって得られる基盤情報および Gag 蛋白質とアクセサリ一蛋白質の分子遺伝学的解析の結果を総合し、新しい HIV-1mt をデザイン、構築する。

4. 研究成果

NL-DT5R が回避していなかった抗ウイルス因子 TRIM5 α や Tetherin に抵抗性の HIV-1mt (X4 ウイルスおよび R5 ウイルスの二種類) を作製した結果、サル細胞での増殖効率が著しく上昇した。これにより本格的なサル個体感染実験に向け大きく前進した。

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)

- 1) Saito, A., Kono, K., Nomaguchi, M., Yasutomi, Y., Adachi, A., Shioda, T., Akari, H., and Nakayama, E.E. 2012. Geographical, genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *Journal of General Virology* 93: 594-602. 査読有
- 2) 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

- 3) Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Mwimanzi, P., Ueno, T., Adachi, A., Ode, H., Sato, H., Fackler, O.T., Okada, S., and Suzu, S. 2011. The identification of a small molecule compound that reduces HIV-1 Nef-mediated viral infectivity enhancement. *PLoS One* 6: e27696. doi:10.1371/journal.pone.0027696. 査読有
- 4) Adachi, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2011. Commentary on a new era of investigating 3D structure-based human-virus protein network dynamics. *Frontiers in Microbiology* 2: 186. doi:10.3389/fmicb.2011.00186. 査読有
- 5) Fujii, H., Ato, M., Takahashi, Y., Otake, K., Hashimoto, S., Kaji, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Fujita, M., Adachi, A., Nakayama, T., Taniguchi, M., Koyasu, S., and Takemori, T. 2011. HIV-Nef impairs multiple T cell functions in antigen-specific immune response in mice. *International Immunology* 23: 433-441. 査読有
- 6) Nomaguchi, M., Fujita, M., and Adachi, A. 2011. The fourth major restriction factor against HIV/SIV. *Frontiers in Microbiology* 2: 132. doi: 10.3389/fmicb.2011.00132. 査読有
- 7) Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2011. Rhesus M1.3S cells suitable for biological evaluation of macaque-tropic HIV/SIV clones. *Frontiers in Microbiology* 2: 115. doi: 10.3389/fmicb.2011.00115. 査読有

- 8) Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2011. HIV-1 Vpr and G2 cell cycle arrest. *Future Microbiology* 6: 375-378. 査読有
- 9) Saito, A., Nomaguchi, M., Iijima, S., Kuroishi, A., Yoshida, T., Lee, Y.-J., Hayakawa, T., Kono, K., Nakayama, E. E., Shioda, T., Yasutomi, Y., Adachi, A., Matano, T., and Akari, H. 2011. Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes and Infection* 13: 58-64. 査読有
- 10) Nomaguchi, M., Doi, N., Fujiwara, S., Fujita, M., and Adachi, A. 2010. Site-directed mutagenesis of HIV-1 *vpu* gene demonstrates two clusters of replication-defective mutants with distinct ability to down-modulate cell surface CD4 and tetherin. *Frontiers in Microbiology* 1: 116. doi: 10.3389/fmicb.2010.00116. 査読有
- 11) Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2010. Growth ability in various macaque cell lines of HIV-1 with simian cell-tropism. *Journal of Medical Investigation* 57: 284-292. 査読有
- 12) Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010. Virology as biosystematics: towards understanding the viral infection biology. *Frontiers in Microbiology* 1: 2. doi: 10.3389/fmicb.2010.00002. 査読有
- 13) Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010. Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions. *Reviews in Medical Virology* 20: 68-76. 査読有
- 14) 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
- 15) 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
- 16) Jere, A., Fujita, M., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2010. Role of HIV-1 Nef protein for virus replication *in vitro*. *Microbes and Infection* 12: 65-70. 査読有
- 17) Kuroishi, A., Saito, A., Shingai, Y., Shioda, T., Nomaguchi, M., Adachi, A., Akari, H., and Nakayama, E.E. 2009. Modification of a loop sequence between α -helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) *vif* and CA α -helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells. *Retrovirology* 6: 70. 査読有
- 18) Kamada, K., Yamashita, T., Hatcho, K., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2009. Evasion from CypA- and APOBEC-mediated restrictions is insufficient for HIV-1 to efficiently grow in simian cells. *Microbes and Infection* 11: 164-171. 査読有
- 19) Nagao, T., Hatcho, K., Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2009. Amino acid alterations in Gag that confer the ability to grow in simian cells on HIV-1 are located at a narrow CA region. *Journal of Medical Investigation* 56: 21-25. 査読有

[学会発表] (計 25 件)

- 1) 齊藤 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回日本エイ

- ズ学会学術集会、2011年12月2日、ハイアットリージェンシー東京（東京）
- 2) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫: Gag-CAおよびVpuの改変によるサル細胞でのHIV複製の増強. 第25回日本エイズ学会学術集会、2011年12月1日、ハイアットリージェンシー東京（東京）
 - 3) 高橋尚史、齊藤 暁、野間口雅子、松岡佐織、足立昭夫、明里宏文、俣野哲朗：サル指向性HIV-1感染慢性潜伏期のカニクイサルからの感染性ウイルスの回収. 第25回日本エイズ学会学術集会、2011年11月30日、ハイアットリージェンシー東京（東京）
 - 4) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Nakayama, EE, Shioda T, Yoshida T, Yasutomi Y, Matano T, Adachi A, Akari H: Genotypic variation of cynomolgus monkey trim5alpha determines the susceptibility to monkey-tropic HIV-1 infection. XV International Congress of Virology, Sept 15, 2011, Sapporo Convention Center (Sapporo, Japan)
 - 5) Takahashi N, Saito A, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Matano T: Viral recovery from cynomolgus macaques controlling a simian-tropic HIV-1 challenge. XV International Congress of Virology, Sept. 13, 2011, Sapporo Convention Center (Sapporo, Japan)
 - 6) 足立昭夫、野間口雅子：HIV-1 宿主域を規定する細胞因子とウイルス蛋白質. (シンポジウム4) 第24回日本エイズ学会学術集会、2010年11月25日、グランドプリンスホテル高輪（東京）
 - 7) 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）
 - 8) 齊藤 暁、河野 健、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、安富康宏、俣野哲朗、明里宏文：カニクイザル TRIM5 allele がサル指向性 HIV-1 の増殖に与えるインパクト. 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）
 - 9) 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）
 - 10) 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）
 - 11) 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）
 - 12) 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）
 - 13) 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)

- 14) 齊藤 暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文：第2世代サル指向性 HIV-1 クローンはカニクイザル個体において効率よく増殖する。第23回日本エイズ学会学術集会、2009年11月28日、名古屋国際会議場(名古屋)
- 15) 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：サル細胞指向性 HIV-1 の細胞馴化による増殖適応変異の解析。第23回日本エイズ学会学術集会、2009年11月28日、名古屋国際会議場(名古屋)
- 16) 横山 勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳：HIV-1 Env V3 ループ構造の安定性を制御するアミノ酸。第23回日本エイズ学会学術集会、2009年11月26日、名古屋国際会議場(名古屋)
- 17) 黒石 歩、齊藤 暁、新開泰宏、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美：サル指向性 HIV-1 のサル細胞でのウイルス増殖におけるカプシド α -ヘリックス 6-7 間のループの重要性。第23回日本エイズ学会学術集会、2009年11月26日、名古屋国際会議場(名古屋)
- 18) 三宅在子、野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫：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。第23回日本エイズ学会学術集会、2009年11月26日、名古屋国際会議場(名古屋)
- 19) 横山 勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳：HIV-1 Env V3 ループ構造の安定性を制御するアミノ酸。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月27日、都市センターホテル(東京)
- 20) 黒石 歩、齊藤 暁、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美：サル指向性 HIV-1 のサル細胞でのウイルス増殖におけるカプシド α -ヘリックス 6-7 間のループの重要性。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月26日、都市センターホテル(東京)
- 21) 齊藤 暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文：SIV 由来 CA h6/7 loop を持つ第2世代サル指向性 HIV-1 クローンはカニクイザル個体で効率よく増殖する。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月26日、都市センターホテル(東京)
- 22) 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：HIV-1 Env の1アミノ酸変異による増殖促進機構の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月26日、都市センターホテル(東京)
- 23) 土肥直哉、野間口雅子、藤原佐知、三宅在子、足立昭夫：サル細胞指向性 HIV-1 の増殖適応変異の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月26日、都市センターホテル(東京)
- 24) 三宅在子、野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫：HIV-1インテグラーゼ(IN) C末端領域(CTD)における1アミノ酸変異によるウイルス増殖促進機構の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月25日、都市センターホテル(東京)
- 25) Kuroishi, A., Saito, A., Shingai, Y., Shioda, T., Nomaguchi, M., Adachi, A., Akari, H., and Nakayama, E. E.: 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. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 10, 2009, Awaji Yumebutai International Conference Center (Awaji, Japan)

[図書] (計1件)

- 1) Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Adachi A : InTech, HIV-Host Interactions, 2011, 325-348.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 昭夫 (ADACHI AKIO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：90127043

(2) 研究分担者

野間口雅子 (NOMAGUCHI MASAKO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授
研究者番号：80452647

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