

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08435

研究課題名(和文) HIV-1キャプシド構造タンパク質自壊と脱殻の新たな機構解明

研究課題名(英文) Investigation of novel mechanism(s) regarding HIV-1 capsid protein degradation and uncoating

研究代表者

天野 将之 (Amano, Masayuki)

熊本大学・病院・特別研究員

研究者番号：30575080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：HIV-1(HIV)に必須の構造蛋白でありウイルス遺伝子を包む殻を形成するキャプシド(CA)は、ウイルス内で遺伝子を保護する為に一定以上の強度で殻構造を維持する。一方細胞に感染後CA殻がスムーズに壊れる(脱殻)為に、CAはある程度の“不安定性”を相反的に有する事が必要である。我々はCAのC末端側(CTD)が9AA欠損(CA CTD-9)するとCA自己崩壊(自壊)が生じなくなる事、及びCA CTD-9を導入した変異HIVでは感染・複製が著明に障害される事を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではHIV-1の必須構造蛋白であるキャプシド(CA)で認めるCA自己崩壊(自壊)の責任領域やその機序を検討し、更にHIV-1の脱殻・複製に対しCA自壊が及ぼす影響について評価するものであり、不明な点が多いHIV-1の細胞感染初期、特に脱殻時におけるCAの動態に関し、新たなコンセンサスの確立に貢献し得る可能性がある。更に得られた知見はCAを有する他のウイルスに関しても応用可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Capsid protein (CA), which is an essential structural protein for HIV-1 and forms a shell that encloses a viral RNA, maintains the shell structure with a certain strength in order to protect the viral RNA in the virion. On the other hand, in order to collapse CA shell smoothly and transport viral RNA to the nuclease (so-called “uncoating”) while new infection, it is also necessary for CA to have a certain degree of “instability”. In this project, we newly discovered that 9 amino acids sequence (9AA) of CA C-terminal domain (CTD) is important factor for CA degradation, and that infectivity and replicative capacity are significantly impaired in HIV-1 variants containing CTD-9AA deleted CA.

研究分野：感染症内科

キーワード：HIV-1 キャプシド蛋白 蛋白自己崩壊 脱殻

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 に必須の構造蛋白でありウイルス遺伝子を包む殻を形成するキャプシド(CA)は、ウイルス内で遺伝子を保護する為に一定以上の強度で円錐状の殻構造を維持する。一方細胞に感染後、脱殻時に CA 殻がスムーズに壊れる為には、CA が構造上ある程度の“不安定性”を相反的に有する事が必要であると考えられる。我々はこれまでアミノ酸(AA)挿入変異による HIV-1 の構造学・ウイルス学的特性の変容について検討を行い、CA 遺伝子領域の特定部位に AA 挿入変異を有する HIV-1 変異株において、CA の異常な自己崩壊(自壊)が起こる事を発見、同現象に関して詳細に検討を行う事で、挿入変異 CA を有する HIV-1 変異株は複製能が著しく低下・欠損し、単独発現させた挿入変異キャプシドにおいても著しい自壊を認め、挿入変異 CA における CA の自壊は CA の C 末端側(CTD)を発端として経時的に進行する事などの研究成果を発表した(Amano, *Sci Rep*, 2019)。

2. 研究の目的

前項で述べた CA の自壊現象は、軽度であるが野生型 CA(CA^{WT})においても認められる事を我々は新たに同定、野生型 HIV-1 での CA の自壊現象は HIV-1 の増殖において何らかの意義を有するのではないかと仮説のもと、CA^{WT} 及び種々の長さの AA を欠損させた変異 CA 発現プラスミド群を網羅的に作成し、CA の安定性に影響を及ぼす領域を評価した結果、CA の CTD 側が少なくとも 9AA 欠損(CA CTD Δ 9)すると CA 自壊は生じなくなる事が判明した。更に CA CTD Δ 9 を導入した変異 HIV-1 では感染性・複製能が著明に障害された。本研究では HIV-1 の必須構造蛋白である CA で認める CA 自壊の責任領域やその機序を検討し、更に HIV-1 の脱殻・複製に対し CA 自壊が及ぼす影響について評価するものであり、不明な点が多い感染初期、特に脱殻時における CA の動態に関し、新たなコンセンサスの確立に貢献し得る可能性がある。

3. 研究の方法

我々は CA 領域に挿入変異を有する HIV-1 変異株において顕著な CA の自壊が起こる事を見出した。この CA 自壊は CA^{WT} でも軽度認められ、HIV-1 生活環において何らかの意義を有すると考えられる。本研究では CA^{WT} で認める CA 自壊の責任領域を詳細に検討、更に HIV-1 の感染・増殖に対し CA 自壊が及ぼす影響について評価した。CA^{WT} 発現プラスミド、CTD の AA を一部欠損した変異 CA 発現プラスミドを網羅的に作成、それらを強制発現させた細胞溶解液を 37 で定温静置した際の野生/欠損変異 CA の経時的变化を、抗 CA 特異抗体を用いた ELISA 法や Western blotting 法で評価した。CA の CTD 9 アミノ酸欠損変異株(HIV^{CA CTD Δ 9})を作成し、変異株の形態を顕微鏡で観察した。また MT-4 細胞を用いて変異株の複製能を評価、更に Magi 細胞を用いて変異株の感染性を評価した。野生株・変異株の逆転写酵素活性を ELISA 法で測定した。加えて CA の CTD 8 アミノ酸欠損変異株(HIV^{CA CTD Δ 8})を作成し、HIV^{CA CTD Δ 9} との相違を評価した。

また環境因子を変化させる事で CA 自壊への影響を検討した。

4 . 研究成果

その結果、CA の CTD 側が少なくとも 9AA 欠損 ($CA^{CTD\Delta 9}$) すると CA 自壊は生じなくなる事が判明した。HIV^{CA CTD Δ 9} 内の CA 殻は野生株と比べ小型であり、CA 殻の過剰凝集が疑われた。HIV^{CA CTD Δ 9} の感染性・複製能は著しく障害されており、前期過程における障害が考えられたが、HIV^{CA CTD Δ 9} 粒子における逆転写酵素活性は野生株と同程度であり、脱殻過程の障害を来している事と矛盾しない結果であった。溶媒中の pH を弱酸性 (仮想ウイルス内環境) から中性 (仮想細胞内環境) に変化させた際、 CA^{WT} において自壊の増強を認めたが、 $CA^{CTD\Delta 9}$ ではその効果は認めず、pH 変化が CTD 9AA により惹起される CA 自壊 (CA 殻分解/脱殻) のトリガーとなっている可能性が示唆された。CA CTD 9AA の特性が CA 固有のものか、他の蛋白においても同様に惹起されるか検討するため、C 末端に CA の CTD 9AA 配列を付加した HIV のマトリックス (MA) 発現プラスミドを作成し、細胞に強制発現させた後 MA 安定性の変化を評価した結果 MA 安定性の低下を認め、CA CTD 9AA 配列特有の作用である事が疑われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ghosh Arun K., Kovala Satish, Osswald Heather L., Amano Masayuki, Aoki Manabu, Agniswamy Johnson, Wang Yuan-Fang, Weber Irene T., Mitsuya Hiroaki	4. 巻 63
2. 論文標題 Structure-Based Design of Highly Potent HIV-1 Protease Inhibitors Containing New Tricyclic Ring P2-Ligands: Design, Synthesis, Biological, and X-ray Structural Studies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 4867 ~ 4879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.0c00202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tomofumi Nakamura, Teruya Nakamura, Masayuki Amano, Toshikazu Miyakawa, Yuriko Yamagata, Masao Matsuoka, Hiroto Nakata.	4. 巻 94(19)
2. 論文標題 A Conformational Escape Reaction of HIV-1 against an Allosteric Integrase Inhibitor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00486-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00486-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masayuki Amano, Haydar Bulut, Sadahiro Tamiya, Tomofumi Nakamura, Yasuhiro Koh, Hiroaki Mitsuya.	4. 巻 9
2. 論文標題 Amino-acid inserts of HIV-1 capsid (CA) induce CA degradation and abrogate viral infectivity: Insights for the dynamics and mechanisms of HIV-1 CA decomposition.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports.	6. 最初と最後の頁 9806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46082-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Masayuki Amano, Pedro Miguel Salcedo-Gomez, Ravikiran S. Yedidi, Rui Zhao, Hironori Hayashi, Kazuya Hasegawa, Tomofumi Nakamura, Cuthbert D. Martyr, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya.	4. 巻 63
2. 論文標題 Novel Central Nervous System (CNS)-Targeting Protease Inhibitors for Drug-Resistant HIV Infection and HIV-Associated CNS Complications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy.	6. 最初と最後の頁 e00466-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.00466-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yuki Takamatsu, Manabu Aoki, Haydar Bulut, Debananda Das, Masayuki Amano, Venkata Reddy Sheri, Ladislau C. Kovari, Hironori Hayashi, Nicole S. Delino, Arun K. Ghosh, Hiroaki Mitsuya.	4. 巻 63
2. 論文標題 Novel Protease Inhibitors Containing C-5-Modified bis-Tetrahydrofuranylurethane and Aminobenzothiazole as P2 and P2 Ligands That Exert Potent Antiviral Activity against Highly Multidrug-Resistant HIV-1 with a High Genetic Barrier against the Emergence of Drug Resistance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy.	6. 最初と最後の頁 e00372-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.00372-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 1.Hiroki Kumamoto, Shuhei Imoto, Masayuki Amano, Nobuyo Kuwata-Higashi, Masanori Baba, Hiroaki Mitsuya, Yuki Odanaka, Satoko Shimbara Matsubayashi, Hiromichi Tanaka, Kazuhiro Haraguchi.	4. 巻 9(12)
2. 論文標題 Synthesis, Anti-HBV, and Anti-HIV Activities of 3'-Halogenated Bis(hydroxymethyl)-cyclopentenyladenines.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters.	6. 最初と最後の頁 1211-1216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.8b00374	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 2.Arun K. Ghosh, Prasanth R. Nyalapatla, Satish Kovala, Kalapala Venkateswara Rao, Margherita Brindisi, Heather L. Osswald, Masayuki Amano, Manabu Aoki, Johnson Agniswamy, Yuan-Fang Wang, Irene T. Weber, Hiroaki Mitsuya.	4. 巻 61(10)
2. 論文標題 Design and Synthesis of Highly Potent HIV-1 Protease Inhibitors Containing Tricyclic Fused Ring Systems as Novel P2 Ligands: Structure-Activity Studies, Biological and X-ray Structural Analysis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry.	6. 最初と最後の頁 4561-4577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.8b00298	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 3.Satoru Kohgo, Shuhei Imoto, Ryoh Tokuda, Yuki Takamatsu, Nobuyo Higashi-Kuwata, Manabu Aoki, Masayuki Amano, Hisao Kansui, Kengo Onitsuka, Kenji Maeda, Hiroaki Mitsuya.	4. 巻 3(11)
2. 論文標題 Synthesis of 4' Substituted Purine 2' Deoxynucleosides and Their Activity against Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Hepatitis B Virus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemistrySelect.	6. 最初と最後の頁 3313-3317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/slct.201800527	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Travis Chia, Masayuki Amano, Tomofumi Nakamura, Hiroto Nakata, Masao Matsuoka.
2. 発表標題 Determining the Mechanism of a Possible HIV-1 Capsid Inhibitor: ACAi-028
3. 学会等名 第34回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村朋文、天野将之、Travis Chia、松岡雅雄、中田浩智
2. 発表標題 感染効率を上昇させるHIV-1ヌクレオカプシド内に認められた薬剤耐性変異
3. 学会等名 第34回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 天野 将之、Pedro Miguel Salcedo-Gomez、Ravikiran S. Yedidi、趙 睿、林 宏典、長谷川 和也、Cuthbert D. Martyr、Arun K. Ghosh、満屋 裕明
2. 発表標題 高い中枢神経系移行性と強力な抗HIV活性を有する新規HIV関連神経認知障害（HAND）予防/治療薬の開発
3. 学会等名 第29回抗ウイルス療法学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野 将之、中村 朋文、Pedro Miguel Salcedo-Gomez、趙 睿、中田 浩智、宮川 寿一、Travis Chia Ren Teen、松岡 雅雄、満屋 裕明
2. 発表標題 HIV-1 capsid (CA) 構造蛋白に作用し、その過剰安定化を誘導する事でHIV-1増殖阻害活性を發揮する化合物群の同定
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野 将之、中村 朋文、杉浦 正晴、高宗 暢暁、松岡 雅雄、満屋 裕明
2. 発表標題 HIV-1の必須構造蛋白であるキャプシドに対する新規阻害剤の開発
3. 学会等名 第47回構造活性相関シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野 将之、趙 睿、中村 朋文、中田 浩智、宮川 寿一、松岡 雅雄、満屋 裕明
2. 発表標題 HIV-1 capsid (CA) 構造蛋白において、C末端アミノ酸が寄与するCA蛋白不安定性に関するウイルス学的考察
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 天野 将之
2. 発表標題 Identification and Development of Novel Anti-HIV-1 Compounds which Induce Hyper-stabilization of HIV-1 's Capsid Structural Protein (CA)/ HIV-1 キャプシド構造蛋白の過剰安定化を促進させる事でウイルス増殖を抑制する、新規抗HIV-1化合物の開発
3. 学会等名 BioJapan 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 53.天野 将之、中村 朋文、Salcedo Gomez Pedro Miguel、趙 睿、中田 浩智、宮川 寿一、松岡 雅雄、満屋 裕明
2. 発表標題 HIV-1 capsid構造蛋白 (CA) の安定性を变化させる事で抗ウイルス作用を発揮する、CA自己崩壊誘導化合物 (CA decomposers) 及びCA安定化過剰促進化合物 (CA hyper-stabilizers) の開発
3. 学会等名 第20回白馬シンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗HIV医薬組成物	発明者 天野 将之、中村 朋文	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-102088	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関