

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390132

研究課題名 (和文) HIV-1 増殖に関わる新たな宿主因子の探索

研究課題名 (英文) Novel host factors in HIV-1 replication

研究代表者

塩田 達雄 (SHIODA TATSUO)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：00187329

研究成果の概要 (和文) : DNA チップを用いたゲノム多型解析など網羅的ゲノム情報解析技術を用いて HIV-1 感染感受性に関わる宿主因子の候補を複数見出した。また、抗レトロウイルス因子 TRIM5・とシグナル伝達因子 TAB2 が相互作用することを見出した。現在、さまざまな抗 HIV 薬が市販されているが、薬剤耐性ウイルスの出現は免れられない。そのため切り口の異なる抗 HIV 薬の登場が望まれているが、本研究の成果から新たな因子が同定できれば、その因子は新しい抗 HIV 薬開発の糸口になるものと考えられる。

研究成果の概要 (英文) : From the Genome-Wide Association Study of human genetic polymorphisms of HIV-1-infected and non-HIV-1-infected individuals, we were able to identify several single nucleotide polymorphisms which are potentially involved in natural HIV-1 resistance. Furthermore, we have shown that the anti-retroviral factor TRIM5・ binds to TAB2, which also binds to a signal transducer TAK1. These host factors involved in HIV-1 replication may be potential targets for developing novel anti-HIV-1 therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

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：分子、感染抵抗性、ゲノム、一塩基多型、HIV 感染症、DNA チップ

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) 感染感受性には明らかな個人差があり、HIV-1 に繰り返し暴露されながらも感染を免れている少数の人々が存在する。この HIV-1 感染感受性の個人差には、ヒトの遺伝子多型の関与が示されており、HIV-1 感染感受性の個人差に影響する遺伝子多型は主に白色人種において HIV のコレセプタ

ーであるケモカインレセプターの中に見出されている。しかし、これらの多型は HIV-1 感染抵抗性のごく一部を説明するのみである。また、多型の頻度は人種間で大きく異なり (Nakayama et al. JID 2002)、同じ遺伝的多型が白色人種と黒色人種で全く異なる効果を示すことも報告されていて、日本国外の知見はそのまま国内にはあてはまらない (Shioda et al. J. Virol.

2001, Liu et al. Inter. J. Immuno. 2007)。

- (2) 酵母は真核生物でありながら遺伝子改変が容易であり、また HIV-1 粒子形成 (Sakuragi et al. Microbe. Infect. 2006) やウイルス蛋白質の核輸送あるいは核外輸送の過程が再現できるが、逆転写等、細胞内侵入直後の複製初期過程が再現できるか否かは明らかではない。
- (3) TRIM5 \cdot はアカゲザルにおける HIV 感染抵抗性因子として 2004 年に同定された。レトロウイルスに対する自然免疫を担う重要な分子であるが、その HIV 感染阻害の分子機構の詳細は全く明らかにされていない。TRIM5 \cdot は、アミノ末端から RING 領域、B-box 領域、coiled-coil 領域、および SPRY 領域からなる。RING 領域は一部のユビキチンリガーゼ E3 に認められ、ユビキチンと結合した E2 が結合する領域と考えられている。coiled-coil 領域は TRIM5 \cdot の多量体形成に必須であり、我々は TRIM5 \cdot の多量体形成が抗 HIV 作用に必須であることを見出した (Nakayama et al. Virology 2006)。また、SPRY 領域はリガンドとの結合領域と考えられており、我々も TRIM5 \cdot 上の HIV との結合領域が SPRY 領域であること (Nakayama et al. J. Virol. 2005)、HIV 側の標的はカプシドの 6 番目と 7 番目の alpha-helix 間のループ構造であること (Song et al. J. Virol. 2007)、を明らかにしてきたが、TRIM5 \cdot の生理的リガンドは明らかではない。

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、DNA チップを用いたゲノム多型解析や酵母細胞での感染過程の再現など網羅的ゲノム情報解析技術を用いて HIV-1 感染感受性に関わる宿主因子を解明し、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。このため、以下の 3 つの研究を行う。

- (1) 非加熱血液製剤を投与されながらも感染を免れた血友病の非感染者の遺伝子多型を、DNA チップを利用したゲノムワイドスキャンを行って HIV 感染症との関わりが明らかなものから HIV 感染症との関連が全く不明なものまで、網羅的な解析を行う。
- (2) 酵母細胞内で HIV-1 の生活環の中で粒子形成以外の過程、特に HIV-1 の細胞内侵入直後の複製初期過程が再現できるか否かを明らかにする。
- (3) TRIM5 \cdot と相互作用を行う細胞内因子を同定し、TRIM5 \cdot による感染抵抗性の分子機構の詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 非加熱血液製剤を投与されながらも感

染を免れた血友病の非感染者 47 名と HIV-1 感染血友病患者 94 名の約 1 万箇所の一塩基多型についての遺伝子型を、Affymetrix 社の Human mapping 10K Array を利用して決定し、HIV 感染症との関わりが明らかなものから HIV 感染症との関連が全く不明なものまで、ゲノムワイドに網羅的な解析を行った。

- (2) HIV-1 の生活環の中で粒子形成以外の過程、特に感染初期の細胞侵入以降の過程が酵母細胞内でどこまで再現できるか、HIV-1 粒子そのものを酵母細胞に導入することにより検討する。
- (3) 蛍光エネルギー遷移の原理で溶液中でのタンパク質間の相互作用を高感度で検出できるアルファスクリーン法を用いて、マウスにおける TRIM5 \cdot のオーソログの一つと考えられる TRIM30 \cdot と結合する事が報告されているシグナル伝達因子 TAB2 と TRIM5 \cdot との結合を検討する。

4. 研究成果

(1) 非加熱血液製剤を投与されながらも感染を免れた血友病の非感染者 47 名と HIV-1 感染血友病患者 94 名の約 1 万箇所の一塩基多型についての遺伝子型を、Affymetrix 社の Human mapping 10K Array を利用して決定し、HIV 感染症との関わりが明らかなものから HIV 感染症との関連が全く不明なものまで、ゲノムワイドに網羅的な解析を行った。その結果、1 番から 22 番染色体上の 9,901 箇所の多型のうち非感染者では 99.8%、感染者では 99.6%の遺伝子多型を決定できた。674 カ所の遺伝子型については検討した集団内での多型は検出されず、以降の解析から除外した。解析に用いた 9,227 箇所の多型のうち、感染者と非感染者の間で $P < 0.01$ の危険率で頻度に差のあった多型は 127 カ所、 $P < 0.001$ の危険度の差は 13 カ所、 $P < 0.0001$ の差は 4 カ所、 $P < 0.00001$ の差は 2 カ所あり、相関が実際には存在しない場合に予想される擬陽性の数よりも多く有意差のある多型が観察された。特に $P < 0.00001$ の危険率でも有意差を認めた二カ所の多型は、9,227 回の多重検定を Bonferroni 補正してもまだ $P = 0.034$ と $P = 0.0004$ の有意差が認められ、これらの多型と HIV-1 感染抵抗性あるいは感受性との間に真の相関が存在する可能性が強く示唆された。これら二カ所の多型はいずれも既知の遺伝子の間に存在するため、近傍の遺伝子内への連鎖不平衡を現在解析している。近傍の遺伝子との間に連鎖不平衡が認められたら、その遺伝子産物が HIV-1 の伝搬や増殖に関わるか否か、あるいは HIV-1 に対する免疫反応に影響するか否かを検討する予定にしている。

- (2) 出芽酵母は遺伝子改変が容易で、HIV-1

の感染後期過程（粒子形成過程）に働く宿主因子の同定に用いられている。我々は出芽酵母を用いて HIV-1 の感染前期に関与する宿主因子を解析する目的で、HIV-1 が細胞壁を除去された出芽酵母内で逆転写を行うことが可能かどうかを検討した。まず、HIV-1 の外被膜糖タンパク質に変異を導入し、代わりに出芽酵母の細胞壁を除去したスフェロプラストとの間で膜融合を起こし得る水疱性口内炎ウイルスの外被膜糖タンパク質 (VSV-G) の発現ベクターとともに 293T 細胞株に導入して VSV-G-pseudotyped HIV-1 ウイルスを作成した。次に、出芽酵母のスフェロプラストに VSV-G-pseudotyped HIV-1 ウイルスを吸着させて培養を行い、全 DNA を回収した。逆転写がスフェロプラスト内で行われたかどうかを調べるために Realtime-PCR 法を用いてスフェロプラスト内の HIV-1 の逆転写産物量を定量した。その結果、微量の逆転写産物が検出されたものの、予め熱で不活化しておいたウイルスと不活化していないウイルスの間に逆転写産物の量の差はほとんど見られなかった。このことから、VSV-G-pseudotyped HIV-1 ウイルスは出芽酵母スフェロプラスト内では逆転写を行うことができないことが分かった。HIV-1 ウイルスは試験管内で逆転写をさせることが可能であるので、出芽酵母スフェロプラスト内に HIV-1 の逆転写を抑制する因子が存在することが示唆された。

(3) TRIM5 \cdot はアカゲザルの抗 HIV 因子として 2004 年に同定された。ヒトや旧世界ザルなど霊長類のレトロウイルスに対する自然免疫を担う重要な因子であるが、その抗ウイルス作用の詳細は明らかでない。一方、マウスにおいては長年 TRIM5 \cdot のオーソログは明らかでなかったが、近年 TRIM5 \cdot と同様に PRYSPRY 領域を持つ TRIM30 \cdot が、マウスにおける TRIM5 \cdot のオーソログの一つと考えられるようになった。また、マウスの TRIM30 \cdot は、To11 様受容体からの NF- κ B 活性化シグナルを TAB2 の分解を促すことで抑制することが報告されている。TAB2 は、MAP キナーゼの活性化を制御する TAK1 の活性化に関わるアダプタータンパク質である。そこで、蛍光エネルギー遷移の原理で溶液中でのタンパク質間の相互作用を高感度で検出できるアルファスクリーン法を用いて、TAB2 が未だ生理的なリガンドが不明な TRIM5 \cdot のリガンドである可能性を検討した。その結果、対照としたデヒドロ葉酸還元化酵素とヒト TAB2 との間ではバックグラウンド程度のシグナルしか検出されなかったが、ヒト TRIM5 \cdot とヒト TAB2 との間では有意に増幅したシグナルが検出され、これらのタンパク質の間に相互作用が存在することが示唆された。一方、TAB2 と複合体を形成する TAK1 や TRAF6 と TRIM5 \cdot

との間ではごく弱いシグナルが検出されたのみであり、ヒト TRIM5 \cdot とヒト TAB2 との間の相互作用は特異的なものであることが示唆された。もしヒト TRIM5 \cdot の TAB2 への影響がマウス TRIM30 \cdot と同一であるならば、TRIM5 \cdot は抗レトロウイルス因子でありながら別な抗ウイルス因子であるインターフェロン産生にはむしろ抑制的に働くことになる。従って TRIM5 \cdot の抗ウイルス作用機構の全容を解明するためにはさらなる解析が必要である。

本研究により TRIM5 \cdot の感染抵抗性の分子機構の詳細が明らかになれば、HIV-1 そのものが感染できる真の意味での HIV-1 の動物モデル開発にも繋がり、現在、動物モデルが存在しないために停滞している HIV-1 のワクチン開発を加速できる。また、申請者らは現在、TRIM5 \cdot の結晶構造の解明を試みているが、SPRY 領域が結晶化を妨げておりリガンドとの共結晶を試みる必要がある。HIV のカプシド単体ではリガンドにはなり得ないために、SPRY 領域に結合する宿主側因子が同定できれば、その因子と結合した状態での TRIM5 \cdot の結晶構造が解明できる可能性がある。旧世界サルスの TRIM5 \cdot の結晶構造の解明はヒトに HIV-1 に対する感染抵抗性を付与する糸口となるかもしれない。

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 21 件)

① Onyango CO, Leligdowicz A, Yokoyama M, Sato H, Song H, Nakayama EE, Shioda T, Silva T, Townend J, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S, Cotton M. HIV-2 Capsids Distinguish High and Low Virus Load Patients in a West African Community Cohort. *Vaccine*. 28S2:B60-B67, 2010. 査読有り

② Maegawa H, Miyamoto T, Sakuragi J, Shioda T, Nakayama EE. Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5 α depends on combination of host and Virus. *Virology* 399:212-220, 2010. 査読有り

③ Wichukchinda N, Nakajima T, Saipradit N, Nakayama EE, Ohtani H, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T, Kimura A. TIM1 haplotype may control the disease progression to AIDS in a HIV-1-infected female cohort in Thailand. *AIDS*. 24:1625-31, 2010. 査読有り

④Uttayamakul S, Likanonsakul S, Manosuthi W, Wichukchinda N, Kalambhaheti T, Nakayama EE, Shioda T, Khumsmith 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 Research and Therapy*. 7:8, 2010. 査読有り

⑤Kuroishi 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 TRIM5alpha. *Retrovirology*. 7(1):58, 2010. 査読有り

⑥Sakuragi JI, Sakuragi S, Ohishi M, Shioda T. Direct correlation between genome dimerization and recombination efficiency of HIV-1. *Microbes Infect*. 12(12-13):1002-11, 2010. 査読有り

⑦Kono 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 TRIM5alpha-mediated restriction. *Retrovirology*. 7(1):72, 2010. 査読有り

⑧Kono 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 TRIM5a SPRY (B30.2) domain on anti-human immunodeficiency virus type 2 activity. *Virology*. 388(1):160-8, 2009. 査読有り

⑨Kuroishi A, Saito A, Shingai Y, Shioda T, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Nakayama EE. Modification of a loop sequence between alpha-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 alpha-helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells. *Retrovirology*. 6:70, 2009. 査読あり

⑩Nakajima T, Nakayama EE, Kaur G, Terunuma H, Mimaya JI, Ohtani H, Mehra N, Shioda T, Kimura A. Impact of novel TRIM5alpha variants, Gly110Arg and G176del, on the anti-HIV-1 activity and

the susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS*. 23(16):2091-100, 2009. 査読あり

⑪Likanonsakul S, Rattanatham T, Feangvad S, Uttayamakul S, Prasithsirikul W, Tunthanathip P, Nakayama EE, Shioda T. HLA-Cw*04 allele associated with nevirapine-induced rash in HIV-infected Thai patients. *AIDS Res Ther*. 6(1):22, 2009. 査読あり

⑫Kono K, Song H, Shingai Y, Shioda T, Nakayama EE. Comparison of anti-viral activity of rhesus monkey and cynomolgus monkey TRIM5alphas against human immunodeficiency virus type 2 infection. *Virology*. 373(2):447-56, 2008. 査読あり

⑬Sakuragi J, Sakuragi S, Ohishi M, Shioda T. A rapid recombination assay of HIV-1 using murine CD52 as a novel biomarker. *Microbes Infect*. 10(4):396-404, 2008. 査読あり

⑭Nakayama EE, Shingai Y, Kono K, Shioda T. TRIM5alpha-independent anti-human immunodeficiency virus type 1 activity mediated by cyclophilin A in Old World monkey cells. *Virology*. 375(2):514-20, 2008. 査読あり

⑮Maegawa H, Nakayama EE, Kuroishi A, Shioda T. Silencing of tripartite motif protein (TRIM) 5alpha mediated anti-HIV-1 activity by truncated mutant of TRIM5alpha. *J Virol Methods*. 151(2):249-56, 2008. 査読あり

⑯Sugimoto C, Nakayama EE, Shioda T, Villinger F, Ansari AA, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y, Mori K. Impact of Glycosylation on Antigenicity of Simian Immunodeficiency Virus SIV239: Induction of Rapid VI/V2 Specific Non-neutralizing Antibody and Delayed Neutralizing Antibody Following Infection with an Attenuated Deglycosylated SIV239 Mutant. *J Gen Virol*. 89(Pt2):554-66, 2008. 査読あり

⑰Hosoya N, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Shioda T, Odawara T, Nakamura T, Kitamura Y, Kano M, Kato A, Hasegawa M, Nagai Y, Iwamoto A. Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors to transduce HIV-1 genes into human dendritic

cells. J Med Virol. 80:373-82, 2008. 査読あり

⑱Wichukchinda N, Nakayama EE, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Auwanit W, Vongsheree S, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T. Effects of CCR2 and CCR5 polymorphisms on HIV-1 infection in Thai females. J Acquir Immune Defic Syndr. 47:293-97, 2008. 査読あり

〔学会発表〕(計26件)

①黒石歩、塩田達雄、中山英美：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、徳島、2010年11月9日

②河野健、横山勝、佐藤裕徳、塩田達雄、中山英美：アカゲザルTRIM5 α はHIV-2/SIVmacキャプシドの複数領域を認識する、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月8日

③中島敏晶、Nuanjun Wichukchinda、Nongluk Saipradit、中山英美、大谷仁志、Archawin Rojanawiwat、Panita Pathipvanich、有吉紅也、Pathom Sawanpanyalert、塩田達雄、木村彰方：タイ人女性HIV-1感染集団におけるTIM1遺伝子多型とHIV-1感染感受性および予後との関わり、第55回日本人類遺伝学会、大宮、2010年10月29日

④Tatsuo Shioda: Retrovirus restriction factor TRIM5 α . The 10th Awaji International Forum for Infection and Immunity. Awaji, Japan. 2010年9月9日

⑤塩田達雄：HIV感染症に関わる宿主因子第12回白馬シンポジウム in 徳島。徳島、2010年5月15日

⑥中山英美、前川彦一郎、宮本直、塩田達雄：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、名古屋、2009年11月28日

⑦河野健、塩田達雄、中山英美：旧世界ザル抗HIV因子TRIM5 α の種決定領域の解析、第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月26日

⑧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、東京、2009年10月26日

⑨宮本直、塩田達雄、中山英美：HIV-2カプシドの1アミノ酸変異がもたらすウイルス増殖への影響、第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月26日

⑩中山英美、前川彦一郎、宮本直、塩田達雄：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、東京、2009年10月25日

⑪中島敏晶、中山英美、Gurvinder Kaur、三間屋純一、照沼裕、大谷仁志、Narinder Mehra、塩田達雄、木村彰方：日本人およびインド人集団におけるTRIM5 α 遺伝子多型とHIV感染感受性の関わり、第54回日本人類遺伝学会、東京、2009年9月25日

⑫塩田達雄：Gagと相互作用する細胞因子、第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月27日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩田 達雄 (SHIODA TATSUO)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：00187329