

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590471

研究課題名（和文）レトロウイルスゲノム二量体化及び組換えの分子機構と責任因子の探求

研究課題名（英文）Pursuit of molecular mechanism and responsible factor for retroviral genome dimerization and recombination.

研究代表者

櫻木 淳一（SAKURAGI JUNICHI）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：90273705

研究成果の概要（和文）：独自に構築したレトロウイルスゲノム二量体化測定系並びに組換え測定系を駆使して解析実験を行った。その結果、ゲノム二量体化が直接ゲノム組換えを規定するという合理的な機構の存在を示唆することが出来たが、これは古くから予想されていたがこれまで直接的な証拠は示されておらず、大きな意義を持つと考えられた。また粒子成熟とウイルスゲノム成熟の様々な相関を明らかにしたが、これらの知見は今まで遅れていたウイルス粒子成熟過程の理解に大きな進展をもたらすものと期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed the unique systems to analyze retroviral genome dimerization or recombination, and performed the experiment to pursue the nature of HIV genome RNA within virus particles. As a result, we suggested the reasonable evidence that genome dimerization directly controls the genome recombination. As this hypothesis has long been proposed but the direct evidence has not been shown, this data has a great significance. We also unveiled the precise relationship between virion maturation and viral genome maturation process. These results are expected to accelerate analyzing of virion maturation mechanism of HIV-1, which has been largely unclear.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：基礎医学・ウイルス学

キーワード：HIV, RNA, 二量体化、組換え、パッケージング

1. 研究開始当初の背景

AIDS の病原体である HIV はレトロウイルス科に属し、一本鎖RNAをそのゲノムとする。ゲノムはウイルス粒子内で二量体として存在しており、ゲノム二量体化はウイルスの増殖にとって必須の事象であると考えられているがその生成機序や働きなどについては明らかでないことが多く存在する。HIV のゲノム二量体化機構を解析することはウイルスの増殖メカニズムの理解につながり、ひいては抗ウイルス戦略を構築するための重要な礎となるものであり、その必要性は非常に高いと考えられた。

2. 研究の目的

独自に構築したレトロウイルスゲノム二量体化測定系並びに組換え測定系を駆使して解析実験を行った。その際 DLS を始めアクセサリ蛋白や構造蛋白など様々なウイルス感染に係わる因子についてウイルスサブタイプやウイルス種の変更・変異導入あるいは交換を行い、しかるのちそれら因子のゲノム組換え効率に及ぼす影響を検討し、考察を繰り返すことでレトロウイルス独自のゲノム動態の本質に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

HIV-1 プロウイルス型プラスミド pNL43 を母体としてすべての変異体を作成した。Env 遺伝子内にフレームシフト変異を導入して不活化すると共に、Gag 遺伝子内の 5 箇所の PR 切断部位に様々な組合せで変異を導入した一連の変異体、および様々なウイルスサブタイプ由来の HIV ゲノム二量体化効率測

定用ベクターを作成した。

これらの分子クローンを 293T 細胞にリン酸カルシウム法でトランスフェクトし、ウイルスを産生した。ウイルスの精製・ノザン・ウェスタンハイブリダイゼーションおよびウイルス内逆転写アッセイは定法に従って行った。透過電子顕微鏡によるウイルス粒子形態観察および計数は大阪医科大の微生物学研究教室との共同研究にて行われた。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮を必要とする研究は行っていない。

4. 研究成果

(1) ゲノム二量体化と組換えとの相関についての解析

様々な HIV-1 サブタイプ間のヘテロゲノム二量体化および組換えウイルス生成機構の解析を行った。その結果変異導入実験の結果二量体化開始部位 (DIS) が効率決定に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。ゲノム二量体化効率と平行してヘテロゲノム間組換え効率を測定した結果、この二つの効率にほぼ完全な順相関が確認された。これはゲノム二量体化が直接ゲノム組換えを規定するという合理的な機構の存在を示唆している。このことは古くから予想されていたがこれまで直接的な証拠は示されておらず、今回の結果は大きな意義を持つと考えられた。

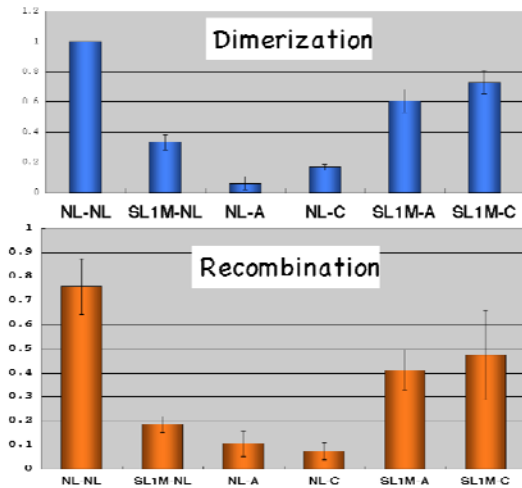


図) 二量体化効率 (上) と組換え効率 (下) のほぼ完全な一致。

(2) HIV ゲノム二量体化とウイルス粒子産生時の粒子成熟との相関に関する解析
 粒子の成熟ステップを模倣する一連の変異体を作成して観察した結果、最初のステップ (p2-NC 間切断) で急速にゲノム二量体化が進行した後、引き続き他サイトの切断によって徐々に均一な二量体として成熟していくことが明らかとなった。また、粒子内 RNA の被逆転写能力は粒子成熟の最初のステップによってほぼ十分に獲得されることが明らかとなった。これらの知見は今まで遅れていたウイルス粒子成熟過程の理解に大きな進展をもたらすものである。

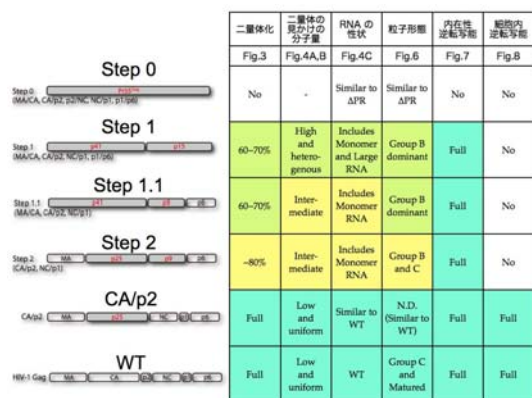


図) ウイルス粒子成熟過程における RNA や感染能の性状の変遷。

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 6 件)

- ① M. Ohishi, T. Nakano, S. Sakuragi, T. Shioda, K. Sano and J. I. Sakuragi. The relationship between HIV-1 genome RNA dimerization, virion maturation and infectivity. *Nucleic Acids Res*, 2011 (in press.) 査読有。
- ② Sakuragi J, Sakuragi S, Ohishi M, Shioda T. Direct correlation between genome dimerization and recombination efficiency of HIV-1. *Microbes Infect.* Nov;12 (12-13):1002-11. 2010 査読有。
- ③ H. Maegawa, T. Miyamoto, J.-i. Sakuragi, T. Shioda, and E. E. Nakayama. Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5alpha depends on combination of host and virus. *Virology*, Apr 10;399 (2):212-20. 2010 査読有。
- ④ 櫻木淳一. HIV ゲノム二量体化の機構. *日本エイズ学会誌*, vol.10, 25-32. 2008 査読無。
- ⑤ J.-i. Sakuragi*, S. Sakuragi, M. Ohishi, and T. Shioda. A rapid recombination assay of HIV-1 using murine CD52 as a novel biomarker. *Microbes Infect.* 10: 396-404, 2008. 査読有。

[学会発表] (計 10 件)

- ① 櫻木淳一 他、HIV-1 粒子・ゲノム RNA の成熟ステップと感染能獲得との相関、第 24 回日本エイズ学会学術集会 ワークショップ 1、2010. 11. 24、東京

- ② 櫻木淳一、ポストバディングに何が起きているか？第58回日本ウイルス学会学術集会 シンポジウム2、2010.11.07、徳島。
- ③ M Ohishi and J-I Sakuragi. Relationship between virion maturation steps and genome dimerization of human immunodeficiency virus type 1. IRNCS, 2009.9.14. Minneapolis, MN, USA.
- ④ 櫻木淳一 他、レトロウイルスゲノム二量体化とウイルスゲノム組換えの厳密な相関、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008.10.26、岡山。
- ⑤ Jun-ichi Sakuragi. COMPLETE COINCIDENCE OF GENOME DIMERIZATION AND RECOMBINATION EFFICIENCIES OF HIV-1. CSHL Retrovirus meeting, 2008.5.27, Cold Spring Harbor, NY, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻木 淳一 (SAKURAGI JUNICHI)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：90273705