

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07525

研究課題名（和文）インテグラーゼによるレトロウイルス逆転写過程制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of retrovirus reverse transcription mechanism regulated by integrase.

研究代表者

増田 貴夫（Masuda, Takao）

東京医科歯科大学・医学部・准教授

研究者番号：80219336

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）：レトロウイルスの特徴は、ウイルスゲノムRNAのDNA変換（逆転写過程）と染色体への組み込み（組み込み過程）を起点として増殖する点にある。本研究では、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の逆転写と組み込み過程を触媒する2つのウイルス酵素、逆転写酵素（RT）とインテグラーゼ（IN）の協調的機能を探り、INに依存する逆転写機構の解明を目的とし細胞内局在性や酵素機能を多角的に解析し、細胞に侵入したHIV逆転写複合体がINの特性である強い核局在能とdNTP基質親和性を高める効果により逆転写反応の促進に寄与することを世界で初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

逆転写過程におけるインテグラーゼ（IN）の関与は、HIVのみならずレトロウイルスの原型と考えられるレトロトランスポゾンでも確認されているが、そのメカニズムは不明であった。本研究から、レトロウイルスゲノム複製様式の新規分子機構とその分子基盤を提示することができたことは、学術上の大きな意義を持つと考える。また、本研究結果から、HIV感染症のみならずレトロウイルス様内在性転移因子の制御法としても有用な新規知見が得られ、新規コンセプトを有するレトロウイルス阻害剤開発の分子基盤となり、社会面での貢献に資する研究成果を得たものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Characteristic feature of retrovirus is reverse transcription of viral genome followed by its integration into host chromosome. In this study, we focused on two viral enzymes reverse transcriptase (RT) and integrase (IN) to uncover their intimate interaction during reverse transcription. Here, we found that HIV-1 IN stimulates accumulation of reverse transcription complex into cell nuclear and significantly increase affinity to dNTPs through RT-IN fusion form, demonstrating, for the first time, underlying mechanism for critical contribution of HIV-1 IN during reverse transcription.

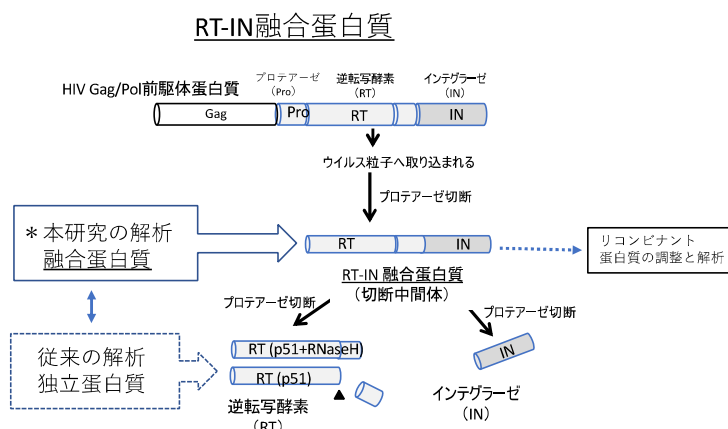
研究分野：ウイルス学、分子生物学

キーワード：HIV 逆転写酵素 インテグラーゼ 核内輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レトロウイルスの特徴は、ウイルスゲノム RNA の DNA 変換(逆転写過程)と染色体への組み込み(組み込み過程)により形成されたプロウイルス DNA を起点として増殖する点にある。申請者の増田らは、HIV インテグラーゼ (IN)の逆転写過程への関与を世界ではじめて報告した。その後、INの逆転写過程への関与は、酵母のレトロトランスポゾン(Ty3)でも確認され、レトロウイルス様因子にも共通する逆転写機構として認識されるまでに至った。逆転写酵素 (RT)と IN は、Gag-Pol 前駆体蛋白質としてウイルス粒子内に取り込まれ、プロテアーゼの切断により生成される(右図)。



研究開発当初申請者らは、RT-IN融合蛋白質がウイルス RNA に作用し、IN 依存的に逆転写過程を制御する可能性を見出し「インテグラーゼによるレトロウイルス逆転写過程制御機構の解明」の手がかりとなる知見を得ていた。しかしながら、その具体的分子機構に関しては解明されていなかった。

2. 研究の目的

レトロウイルス逆転写制御の新たな分子機構の解明を目指し、レトロウイルスゲノムの逆転写過程とその制御機構に関する新規知見を得ることを目的とする(学術貢献)。さらには、新規コンセプト新規コンセプトを有するレトロウイルス阻害剤開発に資する分子基盤を提示する(社会貢献)。

3. 研究の方法

リコンビナントRT-IN蛋白質の調整：BL21株由来でレアコドン相補可能な大腸菌(Roseeta株)にpET発現ベクター系を用いてHIV-1 RT-INを導入し、RT-IN融合蛋白質の発現と可溶性など発現誘導条件の最適条件を決定後、機能解析に十分な量をタグアフィニティカラム法、イオン交換カラム法およびゲル濾過等により精製した。

RT-IN蛋白質の機能解析：申請者が独自に確立した無細胞アッセイ系を用いて、逆転写酵素の3つの特性：RNA依存性DNAポリメラーゼ活性、ストランド転移活性(RNaseH活性)、DNA依存性DNAポリメラーゼ活性の定量解析が可能である。本アッセイ系により、IN蛋白質が融合することによる各RT活性への影響をRT(単独)蛋白質との比較解析により調べた。さらに酵素反応速度論的解析を遂行し、基質親和性(Km値等)の差の有無を合わせて検討し、IN融合によるRT活性促進への具体的関与の分子機構の探索する。

RT-IN蛋白質の変異体解析：逆転写過程でのIN機能を規定するドメイン構造を明らかにするためにINドメイン欠損変異体を調整し、無細胞アッセイ系アッセイ系により機能評価解析を行なった。

組み込み活性：RT-IN蛋白質の組み込み活性も申請者が開発した無細胞「組み込み」アッセイ系^{#2}により評価する。これにより、RT-IN融合蛋白質での「組み込み活性」の有無、もしくはRTとの融合による「組み込み過程」への影響の有無を調べる。

細胞内発現系の樹立：Halo-tag細胞内ライブイメージング法を用いた、RT-IN蛋白質の細胞内発現系を樹立し、細胞内局在の解析を行い、RT-IN蛋白質とウイルスゲノム複製の場との相関性を検討した。

4. 研究成果

大腸菌での発現誘導条件および可溶性条件を最適化することで、RT活性を高く保持した状態可用性分画からのRTINタンパク質の精製法を確立した。

精製されたRTINは、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性、ストランド転移活性(RNaseH活性)およびDNA依存性DNAポリメラーゼ活性を高く保持していた。リコンビナントRTとの比較解析により、RTのRNA依存性DNAポリメラーゼ活性が低濃度dNTP存在下で有意に上昇することを見出した。このRT活性の上昇は、RTINをHIV-1プロテアーゼ処理によりRTとINを切断すると消失した。

HV-1 INは構造上、N-末端ドメイン(NTD：1-55)、中央コアドメイン(CCD：56-212)、C-末端ドメイン(CTD：213-212)の3つのドメインから構成されているが、RTINのCCD及びCTDが蛋白質の可溶性を規定していることが明らかとなった。一方、RT活性の上昇にはINの

全長が必須であり、タンパク質の可溶性と逆相関関係にあった。RTINの組み込み活性は、検出限界以下であった。また、RTINのRT酵素活性には、IN阻害剤は影響しないことが明らかとなった。RTINをプロテアーゼで切断処理すると、組み込み活性が検出されたが、この活性は非常に不安定で一過性であった。ヒト細胞内で発現させたHalo-タグ標識タンパク質の細胞内イメージング解析により、ヒト細胞内で発現させたRTおよびRTINの細胞内局在性を比較した。その結果、RT単独の場合は大部分が細胞質に存在するが、RTINは核内局在を示すことが明らかとなった。

以上、HIV-1のRT活性がINとの融合により促進されることが明らかとなった。分子メカニズムとしては、INとの融合がRTのdNTP基質親和性を高めるシスアロステリック効果によるものと推察される。HIV複製サイクルにおいては、細胞内に侵入したHIV逆転写複合体をINの特性である強い核局在能を介して効率よく核内輸送することで逆転写反応の遂行に貢献している可能性も示唆された。本研究結果は、レトロウイルスの逆転写反応におけるINの機能的関与を明確に示した新規知見である。一方、INの組み込み活性にはプロテアーゼ切断が必須と考えられたが、その活性は非常に不安定であったことから、逆転写反応と組み込み反応は、細胞核内で密に連結して遂行される必要があるものと推察された。これらの研究成果は、INを標的とした逆転写反応阻害剤開発の分子基盤と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Obayashi Camille Michiko, Shinohara Yoko, Masuda Takao, Kawai Gota	4. 巻 11
2. 論文標題 Influence of the 5'-terminal sequences on the 5'-UTR structure of HIV-1 genomic RNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10920
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-90427-9	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 -
1. 著者名 Kondo Nobuyo, Nagano Yoshiko, Hasegawa Atsuhiko, Ishizawa Miku, Katagiri Kuniko, Yoneda Takeru, Masuda Takao, Kannagi Mari	4. 巻 574
2. 論文標題 Involvement of EZH2 inhibition in lenalidomide and pomalidomide-mediated growth suppression in HTLV-1-infected cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 104 ~ 109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.08.051	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 -
1. 著者名 Ishizawa Miku, Ganbaatar Undrakh, Hasegawa Atsuhiko, Takatsuka Natsuko, Kondo Nobuyo, Yoneda Takeru, Katagiri Kuniko, Masuda Takao, Utsunomiya Atae, Kannagi Mari	4. 巻 112
2. 論文標題 Short term cultured autologous peripheral blood mononuclear cells as a potential immunogen to activate Tax specific CTL response in adult T cell leukemia patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1161 ~ 1172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14800	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 Ishizawa Miku, Ganbaatar Undrakh, Hasegawa Atsuhiko, Takatsuka Natsuko, Kondo Nobuyo, Yoneda Takeru, Katagiri Kuniko, Masuda Takao, Utsunomiya Atae, Kannagi Mari	4. 巻 112
2. 論文標題 Short term cultured autologous peripheral blood mononuclear cells as a potential immunogen to activate Tax specific CTL response in adult T cell leukemia patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1161 ~ 1172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14800	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 増田貴夫, 阿部佑哉, 黄渝倫, 長谷川温彦, 河合剛太, 神奈木真理
2. 発表標題 HIV-1 インテグラーゼによる逆転写酵素活性制御の分子基盤
3. 学会等名 第35回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芳田剛, 本田優輝, 増田貴夫, 山岡昇司
2. 発表標題 HIV-1 RNAの機能的分業の分子機序解明
3. 学会等名 第35回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田貴夫, 阿部佑哉, 黄渝倫, 長谷川温彦, 河合剛太, 神奈木真理
2. 発表標題 HIV-1 Pol中間産物の逆転写過程における酵素学的優位性
3. 学会等名 68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Camille Michiko Obayashi, Yoko Shinohara, Takao Masuda, Gota Kawai
2. 発表標題 Influence of the 5' -terminal sequences on the 5' -UTR structure of the HIV-1 genomic RNA
3. 学会等名 日本核磁気共鳴学会年会 (22nd International Society of Magnetic Resonance Conference, 9th Asia-Pacific NMR symposiumおよび第60回電子スピンサイエンス学会と共催) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大林カミエ、美智子、篠原陽子、増田貴夫、河合剛太
2. 発表標題 HIV-1ゲノムRNAの5'末端の違いが構造と機能に与える影響
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田貴夫、黄渝倫、阿部佑哉、長谷川温彦、河合剛太、神奈木真理
2. 発表標題 HIV-1 RNAの5'末端塩基修飾による逆転写反応制御機構の解明
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------