

分子ウイルス学特別研究ユニット

Viral Infectious Diseases Research Unit

ユニットリーダー 間 陽子

AIDA, Yoko

現在、世界の死亡原因の約 3 割が感染症であり、今後その割合は急上昇する恐れがある。近年、SARS、インフルエンザを初めとする新興ウイルス感染症が次々と現れているからである。本ユニットでは、新興ウイルス感染症であるヒト免疫不全症候群（エイズ）の原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス 1 型（HIV-1）、成人 T 細胞白血病（ATL）の原因ウイルスである成人 T 細胞白血病ウイルス（HTLV）およびそれに近縁の牛白血病ウイルス（BLV）の複製機構とそれらの発症機構の全容解明を目指すと共に、これらウイルスの新しい制御方法の確立を目指している。さらに、多くのウイルスに共通する複製機序の探索、それを標的にした抗ウイルス薬を開発、新たに出現するウイルスに対抗するための方法論の確立を目指す。

1. HIV-1 によるエイズ発症機構の解明と創薬の開発

（間、松田^{*1}、野中^{*2}、橋本^{*3}、北原^{*3}、鈴木^{*4}、上田^{*5}、清水^{*5}）

HIV-1 は感染後に RNA ゲノムが逆転写されて形成された核酸 - 蛋白複合体であるブレインテグレーション複合体（PIC）という巨大分子を形成して核移行する。PIC のマクロファージにおける核移行にはその構成因子の一つである HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr が重要な役割を担っている。我々は Vpr は核膜孔複合体と結合した後、アダプター分子 Importin α との結合を介して、核輸送担体 Importin β 非依存的に核移行するという新規核移行を有すること明らかにしてきた。本年度は、抗-Importin α 抗体を用いてマクロファージの細胞質画分から Importin α を除去した結果、Vpr の核移行能は著しく低下し、siRNA による Importin α ノックダウン細胞でも同様の結果が得られたことから、Vpr の核移行およびウイルス複製において Importin α の重要性が証明した。さらに、Importin α との結合および核移行能を消失した Vpr 変異体を組み込んだウイルスはマクロファージにおける複製能が激減することを立証した。そこで、Vpr と Importin α との結合を標的にして、その相互作用を阻害する低分子化合物をスクリーニングしたところ、Vpr の *in vitro* での核移行およびマクロファージにおけるウイルス複製を阻害する細胞傷害性の低い低分子化合物の同定に成功した。さらに、この化合物は Vpr に結合することで、Vpr の核移行能以外の機能である Apoptosis 誘導能を阻害することを明らかにした。このように、低分子化合物が Vpr の多機能を阻害することは、多剤併用療法と同程度の効果を持つ新たな抗 HIV-1 薬としての可能性が考えられることから、更なる薬理機構の解明が必要である。

2. ヒトおよびウシレトロウイルスによる白血病発症機構の解明とその制御方法の確立

（間、竹嶋^{*1}、松本^{*3}、神馬^{*5}）

HTLV は全世界に 2000 万人、日本に 200 万の患者が存在する人類の難治疾患 ATL を誘発するがその発症機構は不明な点が多い。同様に HTLV に最も近縁なレトロウイルスである BLV は全世界に蔓延し、地方病性牛白血病を引き起こすことによって世界規模で畜産界に甚大な被害を与え続けている。牛白血病は、BLV 感染に加えて、複数の遺伝的背景が複雑にからみあって病態の悪化や発症が規定される慢性感染症であり、その予防法と治療法は未だ確立されていない。我々は牛白血病の病態の進行に関わる疾患責任遺伝子の一つが要組織適合性遺伝子複合体(MHC)クラス II であることを突き止め、牛白血病発症に対して抵抗性と感受性を規定する MHC 対立遺伝子を同定し、抵抗性と感受性対立遺伝子を識別する簡易 DNA 診断法を確立した。さらに、ウイルスロードの定量技術を開発し、抵抗性の対立遺伝子を少なくとも一つでも有する BLV 感染牛はウイルスロードが著しく低いことを明らかにした。さらに、牛白血病の発症に対して抵抗性と感受性を規定するウシ MHC 対立遺伝子のアメリカ大陸における分布の解析と既に日本において実用化された診断技術のアメリカ大陸での実用化の可能性を検討している。

3. インフルエンザウイルスの核移行機序の解明と創薬の開発

（間、萩原^{*1}）

インフルエンザウイルスはその宿主細胞膜由来の脂質二重膜よりなる外被で囲まれたウイルス粒子の中に、NP 蛋白質をとりまく 8 本の分節型マイナス鎖 RNA ゲノムとウイルス RNA ポリメラーゼからなる RNP が存在する。NP は各々の RNA と結合しており、その核移行シグナルにより核輸送担体 Importin α/β を介して核内に移行することによってインフルエンザウイルスの 8 本の分節型マイナス鎖 RNA ゲノムを核内に運ぶ。NP と核輸送担体 Importin α/β の結合が阻害されるとウイルスの核移行は阻害され、ウイルスの複製も阻害される。本年度は NP と Importin α/β の結合を阻害する低分子化合物を同定するために、NP の既存の立体構造情報に基づいた *in silico* スクリーニングを行った。

*1 協力研究員、*2 訪問研究員、*3 研究補助員、*4 ジュニア・リサーチ・アソシエート、*5 研修生

Currently, infections account for about 30% of annual mortalities worldwide, and it is feared that the ratio may rise abruptly in the future. This is because new viral infections have recently emerged one after another. One representative of such infections is AIDS, which kills about three million people every year. As well as human immunodeficiency virus type I (HIV-I) is the etiologic agents of AIDS, human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) induced adult T-cell leukemia (ATL) and bovine leukemia virus (BLV) induced enzootic bovine leukosis (EBL) constitute a unique subgroup within the retrovirus family. The main subject of our unit is to understand the molecular mechanisms of AIDS induced by HIV-I and leukemogenesis induced by HTLV-I and BLV, and, in addition, to develop new methods for prevention for these viral pathogenesis. In preparation for the coming threats from newly-emerging viruses, our unit focuses on the development of a new drug targeting a replication mechanism shared by many viruses.

1. Pathogenesis of HIV-1-induced AIDS and development of anti-HIV-1 strategy

Vpr, one of the accessory gene products of HIV-1, is essential for the nuclear import of preintegration complex (PIC) in these cells, although the role of Vpr in the entry mechanism of PIC remains to be clarified. We have shown previously that Vpr is targeted to the nuclear envelope and then transported into the nucleus by importin α alone in an importin β -independent manner. Here we demonstrate that the nuclear import of Vpr is strongly promoted by the addition of the cytoplasmic extract from macrophages but not from monocyte, and the nuclear import activity is lost by immunodepletion of importin α from the cytoplasmic extract and by siRNA transfection corresponding to importin α , indicating requirement the expression of importin α for a nuclear import of Vpr. Furthermore, interaction between importin α and the N-terminal α -helical domain of Vpr is indispensable not only for the nuclear import of Vpr but also for HIV-1 replication in macrophages. This study suggested the possibility that the binding of Vpr to importin α that precedes a novel nuclear import process is potential target for therapeutic intervention. Interestingly, by ELISA-based binding assay, we isolated small molecules that inhibit not only the binding between Vpr and importin α but also HIV-1 replication in macrophages. Finally, this lead compound interacted Vpr and interfered Vpr-induced apoptosis.

2. Mechanisms of leukemogenesis by human and bovine leukemia viruses and development of new methods for prevention

BLV, which is closely related to human T-cell leukemia viruses types 1 and 2, is the etiologic agent of enzootic bovine leukosis (EBL). We investigated the molecular analysis of influence of host genetic differences on development of BLV-induced leukemogenesis. We here demonstrated that bovine MHC class II alleles associated with resistance or susceptibility to development of BLV-induced bovine lymphoma and developed a new DNA typing method for the diagnosis of alleles associated with resistance or susceptibility. Moreover, we established a new real time quantitative PCR assay of quantitation of BLV proviral load using SYBR Green interaction and found that the proviral load of BLV-infected cattle with the resistance-associated alleles was significantly higher in those of cattle with the susceptibility-associated alleles. Now we try to clarify the distribution of alleles associated with resistance or susceptibility and to apply our new method in North America continent.

3. Molecular mechanisms of nuclear entry of influenza virus and development of new antiviral strategy

Influenza virus is a negative strand RNA virus and its one of the rare RNA viruses to replication in the nuclear. Its virus genome is split up into 8 RNA and the complex consisting of viral RNA, the polymerase complex and the stoichiometrically bound NP is called the ribonucleoproteins (RNP) complex. The 8 RNPs represent independent units for transcription and replication inside the host cells. Nuclear import of influenza virus RNPs are imported into the nucleus with interaction between NP and importin α/β . Therefore, we performed *in silico* screening for NP to isolate small molecules that inhibit the interaction between NP and importin α/β .

Staff

Head

Dr. Yoko AIDA

Members

Dr. Shin-nosuke TAKESHIMA *1

Dr. Go MATSUDA*1

Dr. Kyoji HAGIWARA*1

Ms. Yoshie HASHIMOTO*2

Ms. Yuki MTSUMOTO*2

Mr. Genta KITAHARA*2

Mr. Tatsunori SUZUKI*3

*1 Contract Researcher *2 Technical Staff *3 JRA

Visiting Members

Dr. Mizuho NONAKA (Jpn. Health Sci. Found)

Dr. Norio YAMAMOTO (Med. Sch., Univ. Tokyo Dent. Med.)

Dr. Misao ONUMA (Fac. Vet. Med., Univ. Hokkaido)

Dr. Xianfeng ZHANG (Med. Sch., Univ. Hokkaido)

Dr. Chieko HASHIZUME (Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba)
Dr. Konomi KURAMOCHI (Morioka Coll. Petworld Technol.)

Trainees

Ms. Atsushi UEDA (Grad. Sch. Frontia Sci., Tokyo Univ.)

Mr. Yasuo SHIMIZU (Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba)

Ms. Mayuko JIMBA (Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba)