

総説 (教授就任記念講演)

HIV-1の生存戦略—変異と適応の視点から—

野間口 雅 子

徳島大学大学院医歯薬学研究部微生物病原学分野

(平成30年11月2日受付) (平成30年11月8日受理)

はじめに

ウイルスは宿主細胞の機構を巧みに利用して子孫を残す最小の生命体である。ウイルスが生存し続けるためには、変化し続ける環境の下で、ウイルス自身も変わり続けなければならない。この変異・適応能の高さは、ウイルスの根源的特性であり、生存力と密接に関連する。ウイルスがどのように変異し、その機能・構造を変化させるのかを知ることは、複製制御手法の確立に重要である。われわれは、独自に開発したサル指向性HIV-1/サル細胞感染系を用いて、HIV-1の変異・適応能について実証的研究を行ってきた。本総説では、われわれの実験系を用いて解明・同定された、¹⁾サル細胞に存在する内在性抑制因子の回避に寄与するHIV-1のゲノム領域、²⁾HIV-1ゲノム上のVif発現量調節領域、について概説する。

HIV-1/エイズとサル指向性HIV-1について

エイズはHIVを病原因子とするCD4陽性リンパ球の減少を伴う後天性免疫不全症候群である。HIV感染者は2016年末段階で世界中で約3670万人、年間の新規感染者が約180万人とされる(WHO統計)。新規感染者やHIV関連死亡者の数は年々減少しているが、今なお拡がり続けているウイルスである。

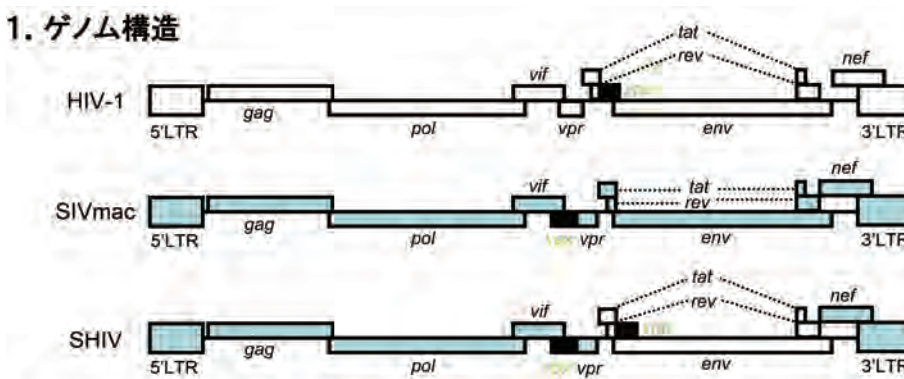
HIVはレトロウイルス科レンチウイルス属に分類され、さらに2つのタイプ、HIV-1とHIV-2に分けられる。全世界に分布し、エイズの主たる要因になっているのは、HIV-1である。HIV-1は宿主域が非常に狭く、ヒトでのみ感染・増殖し、病原性を示す。病原性発現機構に関する研究において、HIV-1感染動物モデルは必須であるが、HIV-1の狭い宿主域は動物モデル確立の最大の障害となっている¹⁻³⁾。そのため、HIV-1に近縁のサル免疫不

全ウイルス(SIV)を用いた病原性発現系モデル(SIVmac/サル感染系)が使用されている。しかし、図1に示すように、HIV-1とSIVmacではゲノム構造、あるいは、ウイルスがコードするタンパク質の機能に違いがあることが報告されている。これらとは別にHIV-1 envの周辺領域がSIVmacに組み込まれた、HIV-1とSIVのキメラウイルス(SHIV)もサル病原性標準株として用いられている(図1)。SIVmac/サル感染系はSIVによるエイズ発症機構の研究、また、SHIV/サル感染系はHIV-1 Env特異的な中和抗体誘導の研究等の進展に貢献している。これらの感染系も非常に有用であるが、われわれは、HIV-1/ヒト感染・病態を最大限反映できる動物モデルの確立がHIV-1病原性発現機構の解析に極めて重要であると考え、HIV-1ゲノムを最小限に改変しサルに病原性を示すサル指向性HIV-1の構築に取り組んでいる。

サル指向性HIV-1の構築とその意義

最近の研究によると、HIV-1は種々のサルを宿主とする複数のSIVが種間伝播と新しい宿主内での組換えや適応を繰り返し出現してきたとされる^{4,5)}。つまり、元々はサルで増殖していたSIVが何らかの形でヒトに種間伝播、増殖できるウイルスに変容し、ヒトでさらにその増殖を適応させることによって、現在のようなヒトでのみ特異的に増殖するウイルスになったと考えられている。一方、われわれが目指すサル指向性HIV-1の構築は、SIVからHIV-1が出現してきた過程とは逆向きの過程であると捉えることができる(図2)。サル指向性HIV-1の構築では、ヒトでの増殖に特化しているHIV-1を新しい宿主(サル)での増殖に適応させることが必要となる。サル指向性HIV-1の構築は、病原性発現機構の解明等、エイズの基礎・臨床研究の進展に大きく貢献するだけで

1. ゲノム構造



2. HIV-1およびSIVmac239のアクセサリー蛋白質の機能の違い

| | HIV-1 | SIVmac239 |
|-----|---|---|
| Vpx | 存在しない | マクロファージに存在する未知の抑制因子の中和に必要(HUSH?) |
| Vpr | マクロファージでの増殖に影響する? | マクロファージでの増殖にほとんど影響しない |
| Vpu | Tetherinに対する拮抗作用あり | 存在しない |
| Nef | Tetherinに対する拮抗作用なし CD3 downregulation能なし | Tetherinに対する拮抗作用あり CD3 downregulation能あり |

図1. 各種ウイルスのゲノム構造とタンパク質の機能の比較
HIV-1 (白) と SIVmac (水色), および, SHIV のゲノム構造を示した。黒四角は HIV-1 と SIVmac で異なる遺伝子を示す。

エイズモデルの確立 ⇒ 病原性発現機構の理解や基礎・臨床研究に大きく貢献
ウイルスの種間伝播・新宿主での変異・適応 ⇒ ウイルス生存のための基盤情報

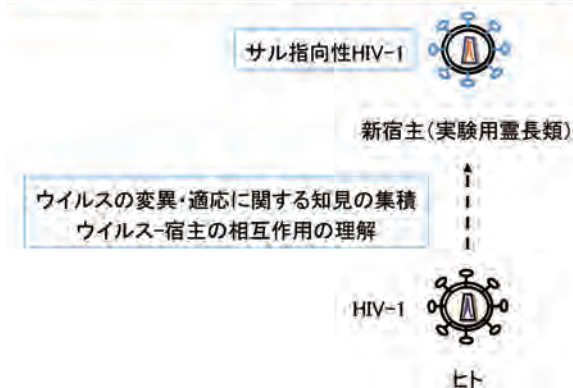


図2. サル指向性 HIV-1構築の目的と意義

なく、ウイルスが新しい宿主でどのような変異を獲得し、適応していくのか、新しい宿主での増殖・適応に関するウイルス側の必須の変化が分かる。このような知見は、HIV-1がヒトでのみ増殖、病原性を示すための分子基盤

の理解を深化させ、これに基づく複製制御手法の確立につながるかと考えている。

サルへの種間伝播を可能にする HIV-1の構築

サル細胞には HIV-1の宿主域を規定する、強力な内在性抑制因子が存在する。APOBEC3タンパク質群、シクロフィリン A (CypA) /TRIM5タンパク質群、および、テザリンである (表1)^{6,7)}。HIV-1は、ヒト細胞に存在するこれら3種類の内在性抑制因子には、自身がコードするタンパク質、それぞれ、Vif, Gag-capsid, および、Vpu で拮抗できる。しかし、サル細胞に存在するこれらの内在性抑制因子には拮抗できないため、HIV-1はサル細胞への吸着・侵入後に複製が阻害される。

サル指向性 HIV-1の構築にあたり、最初の課題は「サル細胞に存在する内在性抑制因子による宿主域の壁を越える」ことであった。このためにわれわれがとった戦略は2つである。(1) サル細胞でのウイルス馴化 (複製抑制環境下におけるウイルスの自然な変異・適応に基づく)、および、(2) assisted evolution (配列と構造の比較解析による人為的な変異導入に基づく) による HIV-1 ゲノムの改変である。まず、APOBEC3タンパク質群に拮抗できるよう HIV-1の Vif を SIVmac239 (サル病原性標準株) の Vif に置換し、HIV-1 capsid タンパク質の CypA 結合領域も SIVmac239の対応領域に置換した。これらのゲノム改変によりプロトタイプサル指向性 HIV-1 (NL-DT5R および NL-DT562) を構築した⁸⁾。次に、サル細胞での増殖能の向上を図るためサル細胞での馴化を行った結果、インテグラーゼ (Pol-IN) とエンベロープ (Env) の領域にそれぞれ増殖促進変異を見出した⁹⁾。さらに、ウイルス馴化と assisted evolution を繰り返して、TRIM5タンパク質群抵抗性の HIV-1 capsid を構築した。最終的に、テザリンを不活化できる SIV の vpu 配列を利用して HIV-1 Vpu にサルテザリンに対する拮抗能を賦与した。これらの改変により、サル細胞に存在する内在性抑制因子を全て回避するサル指向性 HIV-1

(MN4/LSDQgtu および MN5/LSDQgtu) の構築に世界で初めて成功した¹⁰⁻¹³⁾。

今後は、サル指向性 HIV-1が新宿主 (サル) での増殖に適応し、病原性を示すか否かが課題である (図3)。これまでのサル指向性 HIV-1の構築過程では、サル細胞での増殖能の向上と相関してサル個体での増殖能も改善されてきた^{14,15)}。一方、MN4/LSDQgtu のサル細胞での増殖能は SIVmac239 と比肩するものであったが、サル個体での増殖能は SIVmac239には及ばなかった¹⁶⁾。サル個体での増殖能向上のためには、HIV-1が出現してきた歴史に倣い、サル個体での適応 (=馴化) が必要かもしれない。また、SHIV がサル病原性であるのに対し、サル指向性 HIV-1は病原性を示さないことを考えると、HIV-1ゲノムの前半側 (gag から pol の領域) に病原性に関連する要因があると予測される。サル指向性・病原性 HIV-1の構築が達成されれば、「なぜヒトのみが HIV-1 に感染し、エイズになるのか?」という命題の解明につながると考え、現在、本領域の改変を進めている。

Pol-IN で見出した増殖促進変異の解析による Vif 発現調節領域の新規同定

プロトタイプサル指向性 HIV-1の馴化実験では、出現した馴化型ウイルスクローンのゲノム全長にわたって変異が認められるが、増殖を促進する変異は Pol-IN と Env の領域のみに存在していた。これらの領域の増殖促進変異は、馴化実験を繰り返しても再現性をもって高頻度に出現してくるため HIV-1の増殖に何らかの意義を持つ変異であろうと考えられた。Pol-IN 領域内での増殖促進変異について詳細に解析したところ、以下の結果を得た。(1) HIV シークエンスデータベースを用いた配列解析により、増殖促進変異と同一のアミノ酸を持つ HIV-1株が認められる、(2) 塩基配列依存性に増殖

表1. 内在性抑制因子と相互作用する HIV-1タンパク質

| 内在性抑制因子 | 抑制因子の作用 ¹⁾ | 抑制因子と相互作用する HIV-1タンパク質 |
|------------------|-----------------------|------------------------|
| APOBEC3タンパク質群 | HIV-1ゲノムへの致死的変異導入 | Vif |
| CypA/TRIM5タンパク質群 | 脱殻過程の阻害 | Gag-capsid |
| テザリン | ウイルス粒子放出の阻害 | Vpu |

¹⁾代表的な作用のみを示した。

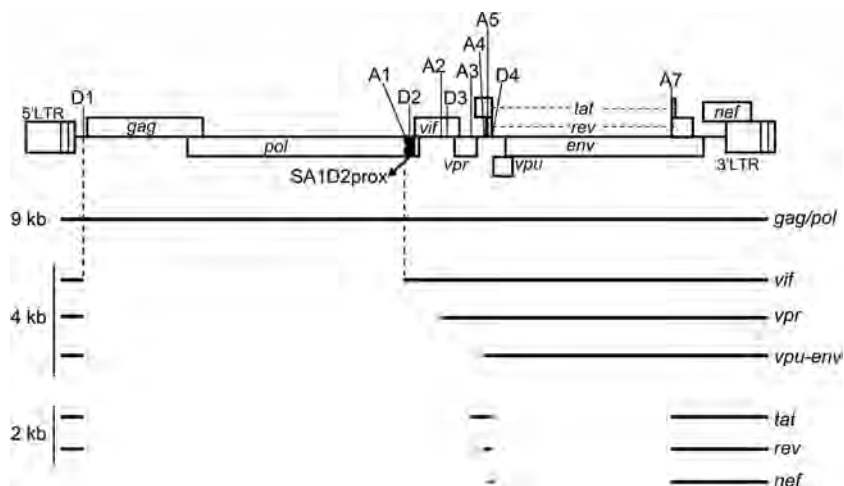


図4. HIV-1における選択的スプライシング
 HIV-1標準株 (NL4-3) のSDおよびSAサイトを示した^{18,19)}。HIV-1はこれらのスプライシングサイトを組み合わせることにより、40種以上の mRNA 種を産生する。図示している mRNA 種は、各ウイルスタンパク質をコードする代表的なものである。Vif mRNA に対して、SD1とSA1を見やすいように点線を引いた。

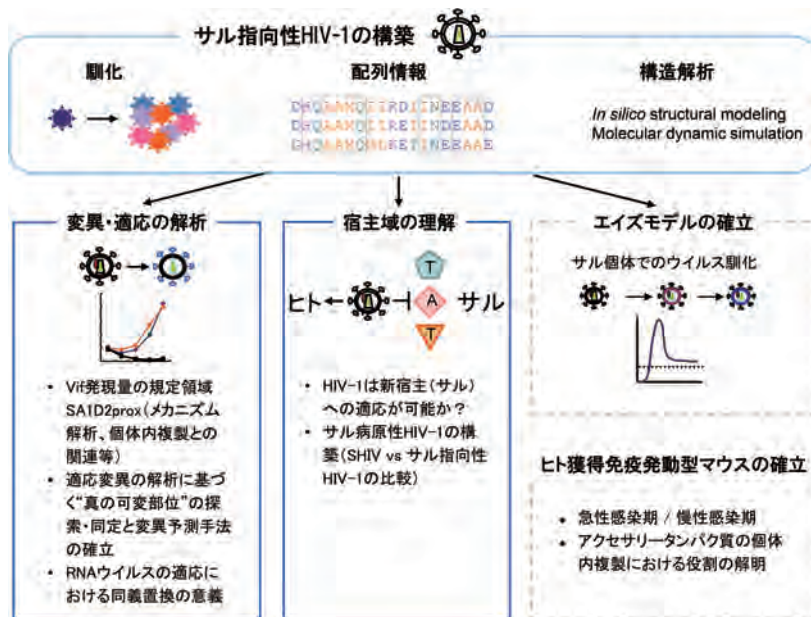


図5. 今後の展望

エンハンサー領域やスプライシングサイレンサー領域が報告されているか²²⁻²⁵⁾、われわれが見出した HIV-1 ポピュレーション内で自然に存在する 1 塩基置換による Vif 発現量変動は、これまでの HIV-1 スプライシング研究とは異なる、ウイルスの変異や適応と密接に関わる調節領域を同定し、新しいコンセプトを打ち出すもので

あったと考えている。

おわりに

われわれの分野における今後の展望を図5に示す。サル指向性 HIV-1 によるサルエイズモデルの確立について

ては、宿主域の理解を含めた研究を展開していくが、今後はヒト化マウスでの HIV-1 個体内感染動態に関する研究も視野に入れている。そのためには、ヒト獲得免疫を発動するマウスの構築が不可欠であり、これに関する研究を進めていく。また、SA1D2prox による Vif 発現量変動機構の解析とこれに基づく複製制御手法の確立も重要な課題である。Vif 発現量調節領域である SA1D2prox は、プロトタイプサル指向性 HIV-1 の馴化実験、および、増殖促進変異の解析を行ったからこそ新たに同定できた領域である。今後も、われわれが独自に有するサル指向性 HIV-1/サル細胞感染系を活用し、ウイルスの biology とリンクする変異・適応に関する研究を行い、ウイルスの病原性や存続に寄与する要因の解明につなげたい。

文 献

- 1) Nomaguchi, M., Doi, N., Kamada, K., Adachi, A.: Species barrier of HIV-1 and its jumping by virus engineering. *Rev. Med. Virol.* 2008 ; 18 : 261-275. doi : 10.1002/rmv.576.
- 2) Nomaguchi, M., Doi, N., Matsumoto, Y., Sakai, Y., Fujiwara, S., Adachi, A.: Species tropism of HIV-1 modulated by viral accessory proteins. *Front Microbiol.* 2012 ; 3 : 267. doi : 10.3389/fmicb.2012.00267.
- 3) Hatzioannou, T., Evans, D.T.: Animal models for HIV/AIDS research. *Nat Rev Microbiol.* 2012 ; 10 : 852-867. doi : 10.1038/nrmicro2911.
- 4) Kirchhoff, F.: Is the high virulence of HIV-1 an unfortunate coincidence of primate lentiviral evolution? *Nat Rev Microbiol.* 2009 ; 7 : 467-476. doi : 10.1038/nrmicro2111.
- 5) Sharp, P.M., Hahn, B.H.: Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011 ; 1 : a006841. doi : 10.1101/cshperspect.a006841.
- 6) Malim, M.H., Bieniasz, P.D.: HIV restriction factors and mechanisms of evasion. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 ; 2 : a006940. doi : 10.1101/cshperspect.a006940.
- 7) Blanco-Melo, D., Venkatesh, S., Bieniasz, P.D.: Intrinsic cellular defenses against human immunodeficiency viruses. *Immunity.* 2012 ; 37 : 399-411. doi : 10.1016/j.immuni.2012.08.013.
- 8) Kamada, K., Igarashi, T., Martin, M.A., Khamsri, B., Hatcho, K., Yamashita, T., Fujita, M., Uchiyama, T., Adachi, A.: Generation of HIV-1 derivatives that productively infect macaque monkey lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2006 ; 103 : 16959-16964.
- 9) Nomaguchi, M., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Nakayama, E.E., Shioda, T., Yokoyama, M., Sato, H., Adachi, A.: Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes Infect.* 2013 ; 15 : 319-328. doi : 10.1016/j.micinf.2013.01.005.
- 10) Kuroishi, A., Saito, A., Shingai, Y., Shioda, T., Nomaguchi, M., Adachi, A., Akari, H., Nakayama, E. E.: 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.* 2009 ; 6 : 70. doi : 10.1186/1742-4690-6-70.
- 11) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H., Adachi, A.: Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes Infect.* 2013 ; 15 : 56-65. doi : 10.1016/j.micinf.2012.10.013.
- 12) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Miyakawa, K., Ryo, A., Ode, H., Iwatani, Y., Miura, T., Igarashi, T., Sato, H., Adachi, A.: Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *J. Virol.* 2013 ; 87 : 11447-11461. doi : 10.1128/JVI.01549-13.
- 13) Nomaguchi, M., Nakayama, E.E., Yokoyama, M., Doi, N., Igarashi, T., Shioda, T., Sato, H., Adachi, A.: Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 α . *Microbes Infect.* 2014 ; 16 : 936-944. doi : 10.1016/j.micinf.2014.08.017.

- 14) Igarashi, T., Iyengar, R., Byrum, R.A., Buckler-White, A., Dewar, R.L., Buckler, C.E., Lane, H.C., Kamada, K., Adachi, A., Martin, M.A.: Human immunodeficiency virus type 1 derivative with 7% simian immunodeficiency virus genetic content is able to establish infections in pig-tailed macaques. *J Virol.* 2007 ; **81** : 11549-11552.
- 15) Saito, A., Nomaguchi, M., Iijima, S., Kuroishi, A., Yoshida, T., Lee, Y.J., Hayakawa, T., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Yasutomi, Y., Adachi, A., Matano, T., Akari, H. : Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes Infect.* 2011 ; **13** : 58-64. doi:10.1016/j.micinf.2010.10.001.
- 16) Doi, N., Miura, T., Mori, H., Sakawaki, H., Koma, T., Adachi, A., Nomaguchi, M. : CXCR4- and CCR5-tropic HIV-1 clones are both tractable to grow in rhesus macaques. *Front Microbiol.* 2018 ; **9** : article 2510. doi : 10.3389/fmicb.2018.02510.
- 17) Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yokoyama, M., Sato, H., Masuda, T., Adachi, A. : Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of the HIV-1 *pol* gene modulate viral replication ability. *J Virol.* 2014 ; **88** : 4145-4160. doi : 10.1128/JVI.01859-13.
- 18) Amendt, B.A., Si, Z.H., Stoltzfus, C.M. : Presence of exon splicing silencers within human immunodeficiency virus type 1 *tat* exon 2 and *tat-rev* exon 3 : evidence for inhibition mediated by cellular factors. *Mol Cell Biol.* 1995 ; **15** : 4606-4615. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.15.8.4606>.
- 19) Purcell, D.F.J., Martin, M.A. : Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J. Virol.*, **67** : 6365-6378, 1993
- 20) Nomaguchi, M., Doi, N., Sakai, Y., Ode, H., Iwatani, Y., Ueno, T., Matsumoto, Y., Miyazaki, Y., Masuda, T., Adachi, A. : Natural single-nucleotide variations in the HIV-1 genomic SA1prox region can alter viral replication ability by regulating Vif expression levels. *J Virol.* 2016 ; **90** : 4563-4578. doi : 10.1128/JVI.02939-15.
- 21) Nomaguchi, M., Doi, N., Yoshida, T., Koma, T., Adachi, S., Ode, H., Iwatani, Y., Yokoyama, M., Sato, H., Adachi, A. : Production of HIV-1 *vif* mRNA is modulated by natural nucleotide variations and SLSA1 RNA structure in SA1D2prox genomic region. *Front Microbiol.* 2017 ; **8** : 2542. doi : 10.3389/fmicb.2017.02542.
- 22) Kammler, S., Otte, M., Hauber, I., Kjems, J., Hauber, J., Schaal, H. : The strength of the HIV-1 30 splice sites affects Rev function. *Retrovirology.* 2006 ; **3** : 89. doi : 10.1186/1742-4690-3-89.
- 23) Exline, C.M., Feng, Z., Stoltzfus, C.M. : Negative and positive mRNA splicing elements act competitively to regulate human immunodeficiency virus type 1 *vif* gene expression. *J Virol.* 2008 ; **82** : 3921-3931. doi : 10.1128/JVI.01558-07.
- 24) Mandal, D., Exline, C.M., Feng, Z., Stoltzfus, C.M. : Regulation of *vif* mRNA splicing by human immunodeficiency virus type 1 requires 5' splice site D2 and an exonic splicing enhancer to counteract cellular restriction factor APOBEC3G. *J Virol.* 2009 ; **83** : 6067-6078. doi : 10.1128/JVI.02231-08.
- 25) Brillen, A.L., Walotka, L., Hillebrand, F., Müller, L., Widera, M., Theiss, S., Schaal, H. : Analysis of competing HIV-1 splice donor sites uncovers a tight cluster of splicing regulatory elements within exon 2/2b. *J Virol.* 2017 ; **91** : e00389-17. doi : 10.1128/JVI.00389-17.

Strategy of HIV-1 for survival : mutation, adaptation and evolution

Masako Nomaguchi

Department of Microbiology, Tokushima University Graduate School of Medical Science, Tokushima, Tokushima, Japan

SUMMARY

Viruses are the smallest self-replicating organisms in nature. Without a metabolic system of their own, they survive in their hosts by ably utilizing host's cellular machinery. To this end, viruses must continue to mutate and adapt in host's varying environments. This adaptation ability is a fundamental property of viruses, closely linking to their survival. Understanding molecular bases for viral mutation and adaptation would certainly lead to the establishment of novel strategies against viruses.

HIV-1 exhibits a narrow host range, and disease-inducing infections are observed only in human population. The important question "Why and how does HIV-1 cause disease only in human?" must be demonstratively solved. To address this issue, HIV-1 infection models for AIDS are essential. Since valid animal models for this purpose have not been established yet, we now aim at constructing a novel class of HIV-1 (HIV-1rmt) that infects experimental macaques and causes AIDS. Recent studies suggested that HIV-1 emerged in human population following repeated species transmission/adaptation to new hosts of different SIVs from various hosts. Generation of HIV-1rmt could be considered as an opposite process to HIV-1 emergence, i.e., adapting human-specific HIV-1 to replicate in new host macaques. HIV-1rmt is a good model virus to determine functional and structural changes for survival in new hosts. To overcome species barrier, we modified HIV-1 genome by using two techniques : virus adaption and assisted evolution. Finally, we successfully constructed HIV-1rmt clones which can antagonize all intrinsic restriction factors in macaque cells. Moreover, virological analyses of growth-enhancing mutations appeared in adaptation processes of the prototype HIV-1rmt led to the identification of novel genomic regulatory elements for Vif expression. Our experimental system using HIV-1rmt and macaque cells provides pivotal information on molecular bases for species-specific HIV-1 replication, and would thus contribute to understanding the HIV-1 pathogenesis.

Key words : HIV-1, adaptation, macaque-tropic HIV-1, pathogenesis, replication control