

2. HIV-1 インテグラーゼの新たな機能： ウイルスゲノムの脱殻から組み込みまで

増田 貴夫

インテグラーゼは、レトロウイルスが感染を成立する際に、逆転写酵素により DNA に変換されたウイルスゲノムを宿主細胞の核内染色体に組み込む酵素である。インテグラーゼは、ウイルス感染成立の最終ステップを司る酵素であるから、逆転写反応の1本鎖 RNA から2本鎖 DNA 変換というダイナミックなゲノム変換の前後あるいは感染細胞の核膜通過中において、なんらかのかたちでウイルス遺伝子との相互作用を保持する機能をもちあわせている蛋白であろうと考えた。本稿では、我々のインテグラーゼ変異体による機能解析を中心に、インテグラーゼの新たな機能として、本来の酵素活性の場であるウイルスゲノムの組み込み（インテグレーション）に加え、脱殻、逆転写、核移行等ウイルス感染初期過程の各ステップにおける機能的関与についてまとめた。

レトロウイルス感染成立機構

ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）を含むレトロウイルスは感染標的細胞に吸着／侵入後、ウイルス粒子内にパッケージされている一本鎖 RNA 遺伝子を脱殻後、二本鎖 DNA に変換（逆転写反応）し、宿主染色体に組み込む（インテグレーション反応）ことで感染を樹立させる。逆転写反応およびインテグレーション反応はいずれもウイルス pol 遺伝子産物である逆転写酵素およびインテグラーゼにより触媒されるレトロウイルス特有の反応過程である。レトロウイルスの逆転写反応およびインテグレーション反応といった個々のステップの反応機構に関してはこれまでの研究により詳細が明らかにされてきた。しかしながら、各ステップをつなぐ動的変化の機構に関しては依然不明な点が多く残されている。ウイルスの吸着・侵入後の過程、すなわち脱殻、逆転写反応、核移行、組み込みといった反

応はいずれもウイルス遺伝子に会合するウイルス酵素および構造蛋白を主体とした複合体のなかでおこなわれる。ウイルス感染直後の細胞質分画には逆転写反応後のウイルス DNA を含む核酸-蛋白複合体が存在し、この複合体はウイルス DNA を外來性のプラスミド DNA に組み込む活性があることが示され、プレインテグレーション複合体 (Pre-integration complex) と名付けられた^{1,2)}。HIV のプレインテグレーション複合体は沈降係数で80-320S の大きさをもち、マトリックス蛋白、逆転写酵素、インテグラーゼに加えて Vpr 蛋白などがその構成蛋白として報告されている³⁾。HIV-1 は分裂増殖している細胞（例えば、活性化 T 細胞）のみならず、マクロファージを代表とする非分裂細胞にも効率よく感染を成立し得る。一方、マウス白血病ウイルス (MuLV) を代表とするオンコレトロウイルスは非分裂細胞における感染効率が非常に低い。この違いは、オンコレトロウイルスが細胞分裂 M 期前後の核膜が消失する際、単純拡散により、染色体にウイルス遺伝子の組み込みを行うのに対して、HIV-1 では、能動的にプレインテグレーション複合体を細胞核内に輸送する、すなわち核膜を通過し得る能力があるためと考えられている。これまでに、HIV-1 プレインテグレーション複合体に含まれる、マトリックス蛋白、インテグラーゼ、Vpr 蛋白に核移行機能の存在が報告されている。この非分裂細胞における効率のよい感染性により、HIV は外來遺伝子導入としての

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科免疫治療
(〒113-8519 文京区湯島 1-5-45)

Functional aspects of HIV-1 integrase : From uncoating to integration of viral genome.

Takao Masuda

Department of Immunotherapeutics, Medical Research
Division, Tokyo Medical and Dental University
1-5-45, Yusima, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan
TEL : 03-3813-6111

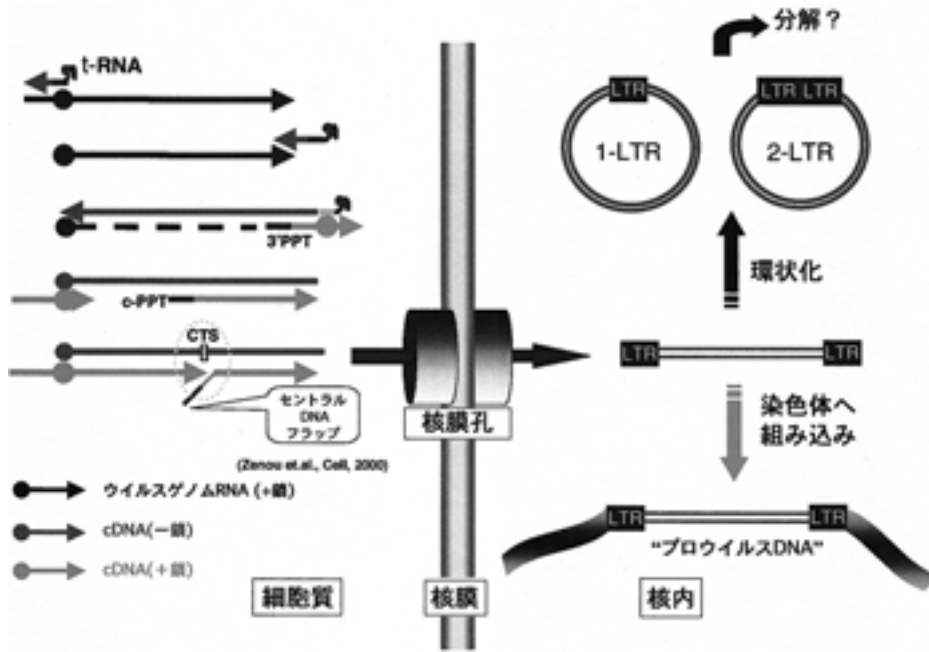


図1 HIV-1 ゲノムの逆転写反応と組み込み過程

逆転写反応において HIV-1 ゲノムの +鎖 DNA 合成は cPPT および CTS 配列により不連続におこなわれる (本文参照). 3'PPT: 3'ポリプリン配列, cPPT: セントラルポリプリン配列 (central polypurine tract) CTS: central termination sequence. 逆転写反応後, ウイルス DNA は核内に輸送され染色体に組み込まれ, プロウイルス DNA となる. 非組み込み型のウイルス DNA として環状化 (2 LTR 型, 1 LTR 型) したものが存在する.

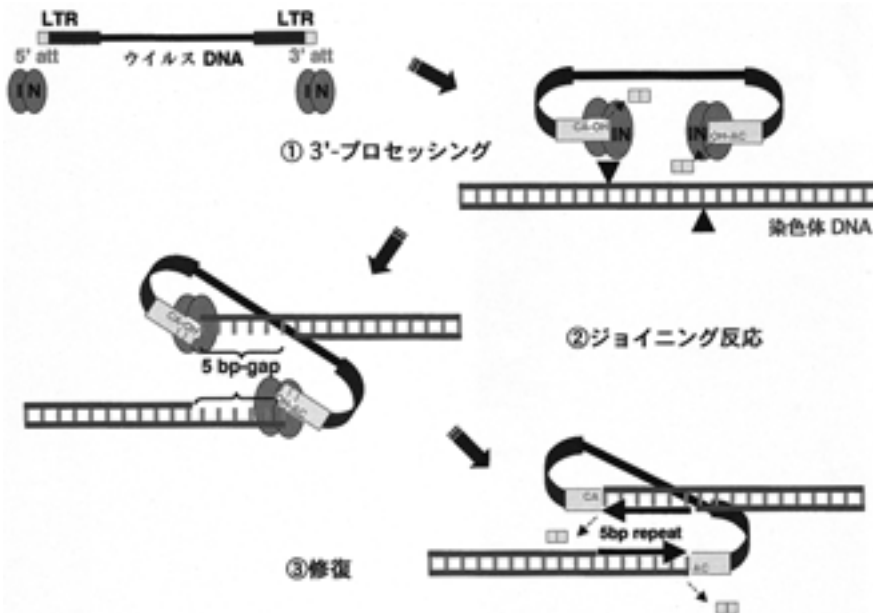


図2 レトロウイルス遺伝子組み込み機構

① 3'-プロセッシング反応: インテグラーゼは逆転写反応により DNA に変換されたウイルス DNA の両末端に作用し, 各 3' 末端の 2 のヌクレオチド (HIV-1 の場合は GT) を切断除去する. ② ジョイニング反応: 3'-プロセッシング反応を終えたウイルス DNA は核内へ移行し, 宿主染色体 DNA と会合する. 3'-プロセッシング反応で生じた新たなウイルス DNA 3' 末端-OH 基の求核反応により宿主染色体 DNA は 5' 端が数塩基 (HIV-1 の場合 5 塩基) 突出したかたちで切れ目をいれる. それと同時に切断された宿主染色体 DNA の各 5' 末端リン酸基とウイルス DNA 3' 末端-OH 基が各々エステル結合する (ストランドトランスファー反応とも呼ばれる). ③ 修復: ウイルス DNA の両 5' 末端の一本鎖部分の 2 塩基 (HIV-1 の場合は CA) は切断除去され宿主染色体 DNA の一本鎖部分はその相補鎖の合成により埋められる. 最後にウイルス DNA の各 5' 末端と宿主染色体 DNA の各 3' 末端が結合しインテグレーション反応は完結する.

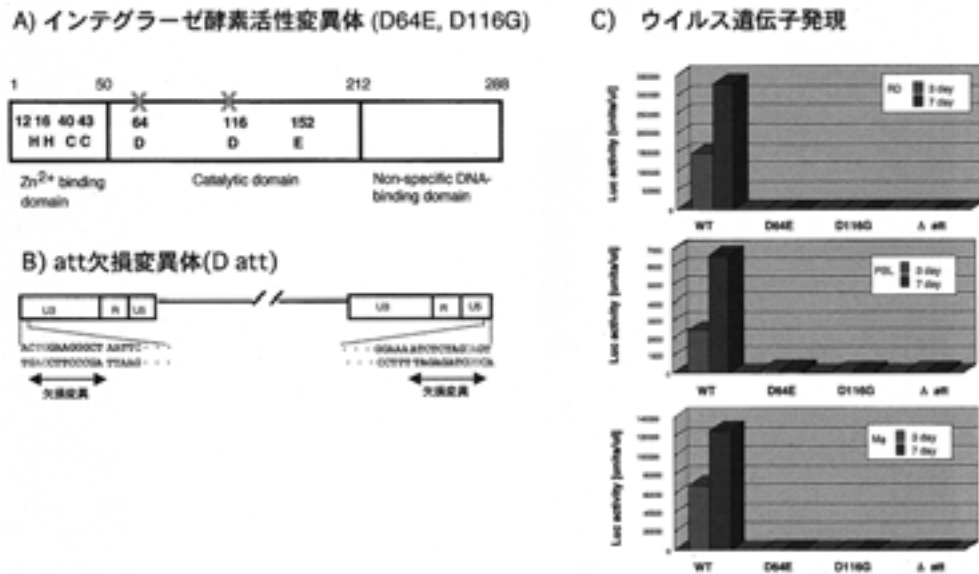


図3 インテグレーション欠損 HIV のウイルス複製

A) HIV-1 のインテグラーゼの酵素活性中心64位のグルタミン酸 (D) をアスパラギン酸に置換した変異体 (D64E) および116位のDをグリシンに置換した変異体 (D116G) をインテグラーゼ (IN) 活性欠損 HIV-1 として作製した⁸⁾。B) LTR のU3およびU5領域の末端に存在するインテグラーゼの基質部位 (att 部位) 10bp を欠損させた, att 欠損変異体 (Δ att)⁷⁾ を示す。C) 各 HIV 変異体 (D64E, D116G, Δ att) のシユドタイプウイルス (NL43luc/Mo-MuLVenv) を調整後, ヒト横紋筋肉腫由来細胞株 (RD), ヒト末梢血由来, リンパ球 (PBL), および単核球由来マクロファージ (MDM) に感染後3日および7日目のウイルス遺伝子発現をルシフェラーゼ活性測定により評価した。

レンチウイルスベクターとしても注目されている^{4,5)}。

以上, 脱殻, 逆転写反応, 核移行, 組み込みといった一連の反応過程はプレインテグレーション複合体とよばれるウイルスゲノムとウイルス蛋白を中心とした複合体の総合的機能といえる。

遺伝子組み込み機構⁶⁾

レトロウイルスの遺伝子組み込み反応においてはインテグラーゼがウイルス DNA の末端領域を基質として認識し作用する。この反応過程は大きく3つのステップ①3'-プロセッシング反応, ②ジョイニング反応, ③修復に分けることができる (図1)。インテグラーゼが直接接触するのは①3'-プロセッシング反応と②ジョイニング反応であり, 最後の③修復は宿主細胞のDNA修復酵素系によりおこなわれると考えられている。これまでに, ③の修復による宿主染色体DNAの一本鎖部分の相補鎖の合成の結果, プロウイルスDNAの両端には数塩基 (HIV-1の場合5塩基) からなる同一塩基配列が生じることになる。以上, レトロウイルスの遺伝子組み込み反応には, 酵素としてのインテグラーゼの特異的基質としてウイルスDNAの末端領域が必要となる。ウイルスDNAの両端にはLTR (Long terminal repeat) と呼ばれる繰り返し塩基配列が存在する。我々は以前に, インテグラーゼはその両端のLTRの

各末端, 約13bpがHIV-1インテグラーゼの特異的基質配列 (att 部位) であることを報告した⁷⁾。

ウイルス複製における遺伝子組み込みの意義

ウイルス複製における遺伝子組み込みの生物学的意義としてウイルスゲノムの①自己複製, ②遺伝子発現と③安定化の3点について以下にまとめた。

①自己複製: ウイルス遺伝子はエピソームにみとめられる自己 (DNA) 複製機構をそれ自体では保持していない。したがって, ウイルスDNA遺伝子の複製は, 宿主染色体に組み込まれることで宿主染色体の複製機構に依存して行われる。

②遺伝子発現: 宿主染色体に組み込まれない状態にあるウイルス遺伝子からの遺伝子発現能を調べるため我々は, 遺伝子組み込み能を欠損させた HIV 変異体を作製した。遺伝子組み込み能を特異的に欠損させるために, インテグラーゼの酵素活性中心に点変異を導入した変異体 (図3A, D64E, D116G)⁸⁾あるいはインテグラーゼの特異的基質である att 部位に10bpの欠損変異を導入した (図3B, Δ att)⁷⁾。遺伝子組み込み能欠損 HIV 変異体をシユドタイプウイルスによる single-round 感染実験系を用いて解析した (図3)。なお感染標的細胞として, ヒト横紋筋肉腫由来細胞株 (RD), ヒト末梢血由来, リンパ球 (PBL),

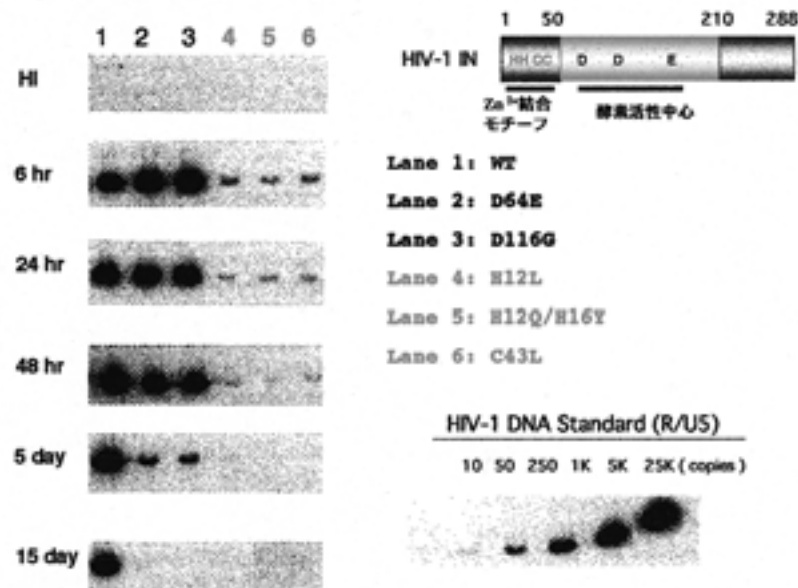


図4 HIV-1 インテグラーゼ変異体のウイルス DNA 合成 (逆転写) と安定性[®]
 HIV-1 インテグラーゼの酵素活性中心変異体 (D64E, D116G), および Zn²⁺ + 結合モチーフ (HHCC) 変異体 (H12L, H12Q/H16Y, C43L) および親株コントロール (WT) のシュドウイルス (NL43luc/Mo-MuLVenv) を RD 細胞に感染させた. ウイルス感染後経時的 (6 時間~15 日) に, 全 DNA を採取し, HIV-1 LTR を特異的に検出するプライマー (R/U5) を用いた PCR 解析により, 感染後逆転写反応により合成された HIV-1 DNA の定量解析を行った. HI: 65°C 30 分処理により熱不活化した各ウイルスを陰性対照として用いた.

および単核球由来マクロファージ (MDM) を用いた. その結果, いずれの細胞においても非組み込み型のウイルス遺伝子組み込み能を欠損したウイルスの遺伝子発現は, 野生株とくらべて, 1% 以下にまで低下することが明らかとなった (図 3). したがって, ウイルス遺伝子効率の良い遺伝子発現 (転写) には組み込み過程は重要といえる.

③安定化: 上記の遺伝子組み込み能を欠損させた HIV 変異体を用いて, 非組み込み型のウイルス DNA の安定性について調べた. 図 4. に各 HIV-1 インテグラーゼ変異体の感染後のウイルス DNA 合成 (逆転写) と安定性を, HIV-1 LTR を特異的に検出するプライマー (R/U5) を用いた PCR 解析結果を示した. インテグラーゼの酵素活性中心に点変異を導入した変異体 (図 4, lane 2. D64E, lane 3. D116G) は, 親株コントロール (図 4, lane 1, WT) と同程度のウイルス DNA 合成 (逆転写) 産物が検出された. WT の場合は, 感染後約 24 時間でウイルス DNA レベルはほぼ定常レベル (プラトー) に達し, 15 日まで同レベルのウイルス DNA が検出された. この感染系はウイルス再感染のない single-round 感染実験系なので, このことは感染後 24 時間で合成され宿主染色体に組み込まれたウイルス DNA は少なくとも 15 日間は安定している事を意味している. 一方, インテグラーゼの酵素活性中心変異体 (D64E, D116G) の場合は, 感染後約 24 時間でのウイルス DNA

レベルはほぼ WT と同程度である (逆転写は正常であることを意味する) が, 48 時間以降減少し続け, 15 日目にはほとんど検出されない. この説明として, 細胞増殖の結果ウイルス DNA が希釈された点を考慮にいれても, 非組み込み型のウイルス DNA は不安定であることを示す結果と考えられる. さらに, 非組み込み型の HIV-1 DNA は環状化することが知られているが, 確かにインテグラーゼの酵素活性中心変異体ではこうした環状化 DNA が効率よく検出される (未発表). これは細胞核内に存在する DNA ライゲース酵素等による産物と考えられるのでウイルス DNA が核内に存在することを示唆する. 重要な点は, 非組み込み型の HIV-1 DNA は転写の鋳型としては, きわめて活性が低いことである.

以上, 一旦, 宿主染色体に組み込まれたウイルス DNA は非常に安定であり, レトロウイルスの組み込み反応は非可逆的の反応であるといえる. レトロウイルスに非常によく似た複製様式をもつ, レトロトランスポゾンの中には excision (切り出し) 反応と呼ばれる組み込み反応と逆の反応も報告されているが, レトロウイルスでは未だそうした報告もない. したがって, 相同組み替え等による部分的欠損ということはおこりうるが, プロウイルス DNA の切り出し反応はおそらくあっても非常に希な現象と考えられる. レトロウイルスの遺伝子組み込み部位の選択性に関し

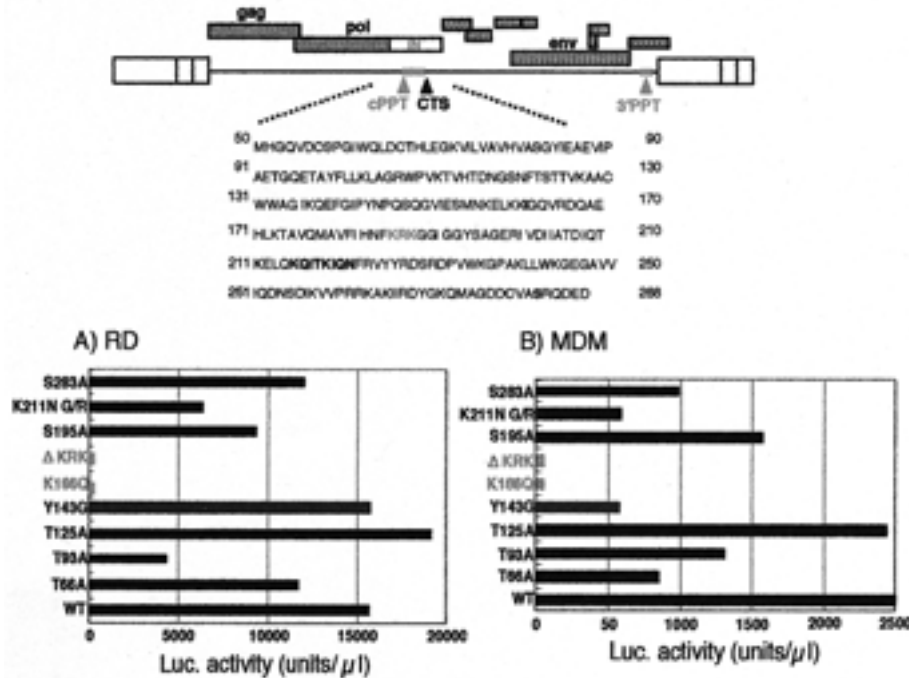


図5 HIV-1 インテグラーゼの変異体解析¹³⁾

HIV-1 インテグラーゼに保存されるアミノ酸残基 (S:セリン, T:スレオニン, Y:チロシン, K:リシン, R:アルギニン) に変異を導入した. 各 HIV-1 インテグラーゼの変異体を A) RD 細胞, B) 単核球由来マクロファージ (MDM) に感染後, 4 日目のウイルス遺伝子発現をルスフェラーゼ活性 (Luc. activity) により測定した.

では, レトロウイルス間でそれぞれある程度の選択性はみとめられているが, 核酸配列自体というより, むしろその構造が重要であるらしい. レトロウイルスの遺伝子発現は宿主細胞の転写機構を借りておこなう. したがって, 宿主細胞の遺伝子発現 (転写) が頻繁におこなわれている場所にウイルス遺伝子を組み込むことは, ウイルス複製において重要な意義を持つと考えられるが, この点はまだはっきりとしていない.

感染初期過程におけるインテグラーゼの機能的関与

①脱殻: HIV-1 のインテグラーゼ蛋白は全長288個のアミノ酸から構成されており, 構造的に N-末端ドメイン (N 末から数えて 1-50 位までのアミノ酸), 中央酵素活性ドメイン (51-212 位までのアミノ酸), そして C-末端ドメイン (213-288 位までのアミノ酸) の領域にわけることができる⁹⁾. ウイルス遺伝子の組み込み (インテグレーション反応) には, 中央酵素活性ドメイン (51-212 位までのアミノ酸) が重要であり, D-D-E は, インテグラーゼの酵素活性中心であることは上述した. N-末端ドメイン (Zn^{2+} 結合ドメイン) には各 2 ずつのヒスチジン (H) とシステイン残基 (C) から構成される HHCC モチーフが存在する. これら 4 つのアミノ酸残基は全てのレトロウイルスで保存されている. この N-末端ドメインはインテグラーゼ分子の二量体形成の安定化に重要で, 間接的にインテグレーション

活性維持に関与していることが報告された¹⁰⁾. また, NMR 解析により, この N-末端ドメインの構造が明らかにされた. この報告によると, 当領域は 4 つの α ヘリックス構造からなるヘリックスターン-ヘリックス (HTH) 構造をとるが, HHCC モチーフの各 2 ずつのヒスチジンとシステイン残基は Zn^{2+} と配位し構造の安定化に関与することが示された¹¹⁾. 我々はこの HHCC モチーフの骨格となるヒスチジンあるいは, システイン残基のアミノ酸置換変異により, ウイルスの感染性がほぼ完全に失われことを見いだした. これらの変異 HIV-1 は 3 種いずれも, 感染後の逆転写反応が著しく阻害されていることが明らかとなった (図 3 レーン 6~8, H12L, H12Q&H16Y, C43L). さらに詳しく調べると, RNA パッケージング, gag-pol プロセッシング, ウイルス粒子内 RT 活性⁸⁾, ウイルス粒子構造及び吸着/侵入過程までは見かけ上正常であった¹²⁾. 以上の結果から, これら HHCC 変異株の複製は吸着/侵入過程以降, 逆転写開始まで, おそらく脱殻過程に支障をきたしているものと考えられた. この結果が, HHCC モチーフに導入した点変異の間接的な影響を反映しているのかそれとも, 当領域が HIV-1 の複製過程のなかでインテグレーション以外にも重要な役割をもっていることを意味するのか今後さらに研究が必要である.

②逆転写: 我々はインテグラーゼ蛋白全長にわたり, 種間で保存されているアミノ酸の置換変異体を作製し解析を続

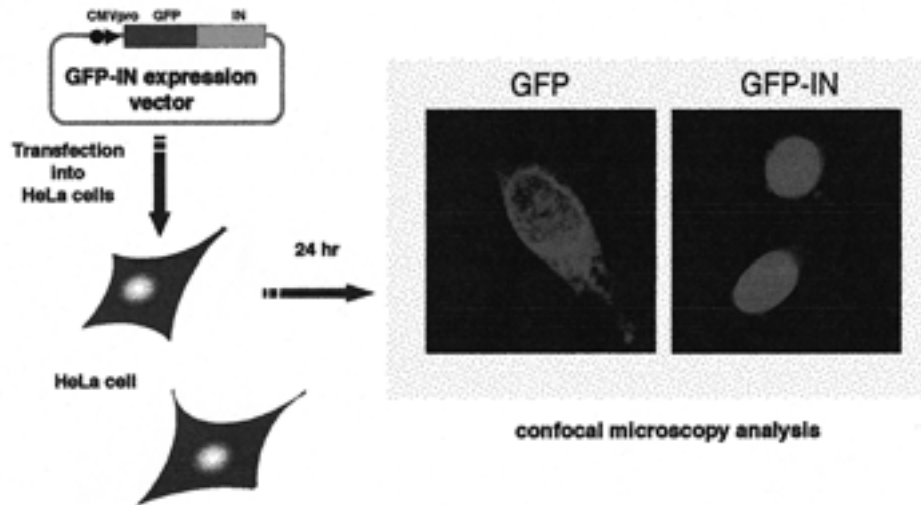


図6 HIV-1 インテグラーゼの核局在性
HeLa 細胞に GFP (コントロール) あるいは GFP-インテグラーゼ融合蛋白発現ベクターを導入し、24時間後共焦点顕微鏡により、各蛋白の細胞内局在性を検討した。その結果、HIV-1 GFP-インテグラーゼの核局在性を確認した¹³⁾。

けている。そうしたなかで、186位～188位に存在する KRK 配列に点 (K186Q) もしくは欠損 (Δ KRK) 変異を導入すると、ウイルス感染性が失われることを見出した。この変異体は感染後の逆転写反応の後期過程に支障をきたした結果であることがわかった¹³⁾。最近、インテグラーゼをコードする遺伝子の一部にウイルス DNA の核内輸送に関与する領域があることが報告された¹⁴⁾。通常、レトロウイルスの逆転写反応においてプラス (+) 鎖 DNA 合成はウイルス遺伝子の 3' 末端に存在するポリプリン配列 (3' PPT) をプライマーとして用いるが、HIV を含むレンチウイルスは、ウイルス遺伝子の中央部にもうひとつのポリプリン配列をもっており、セントラルポリプリン配列 (cPPT: central polypurine tract) と呼ばれる¹⁵⁾。興味深いことに、HIV を含むレンチウイルスの場合、3' PPT から合成を開始した (+) DNA 鎖は cPPT の約100塩基下流領域 (CTS: central termination sequence) で合成が停止してしまう¹⁶⁾。同時に cPPT から新たな (+) DNA 鎖の合成も開始される。すなわち、 (+) DNA 鎖はウイルス遺伝子の中央部で不連続なかたちで合成されることになる。この際、 (+) DNA 鎖は cPPT から約100塩基の重複部分が生じるが、これをセントラル DNA フラップと呼ぶ¹⁴⁾。Zennouらは、ウイルス遺伝子がセントラル DNA フラップ構造を介してウイルス遺伝子が中央部で折りたたまれて、細胞の核膜孔を通過することすなわち、ウイルス遺伝子の核内輸送を容易化している可能性を示した。さらに、このセントラル DNA フラップ構造をとるための配列 (cPPT および CTS) を既存の HIV ベクター (cPPT および CTS 配列を

もたない) に挿入することで、非分裂細胞においても遺伝子導入効率が顕著に上昇するという、結果を示した^{14,17)}。

③核内輸送: HIV-1 インテグラーゼの細胞内局在性を GFP-インテグラーゼ融合蛋白発現系により検討した。HeLa 細胞に GFP 発現ベクターを導入後、24時間後に共焦点顕微鏡により GFP-インテグラーゼ融合蛋白を観察したところ、HIV-1 インテグラーゼは非常に強い核局在性を示すことがあきらかとなった¹³⁾。現在我々は、こうした核内局在に関与するドメイン及び細胞性因子の検索をふくめ検討中である。最近こうした HIV-1 インテグラーゼの核内輸送機構に関する論文も報告されており^{18,19)}、HIV-1 インテグラーゼがウイルス DNA の核内輸送に関与することが示唆されている。

まとめ

インテグラーゼは本来の酵素活性の場であるインテグレーションに加え、脱殻、逆転写、核移行等ウイルス感染初期過程の各ステップにも機能的に関与していることが明らかになった。こうした、インテグラーゼの新たな機能とその関与ドメインの解析は、インテグラーゼを標的とした抗 HIV 阻害剤開発においてもあらたな戦略法を提示しうるものと期待される。

文 献

- 1) Brown, P. O., Bowerman, B., Varmus, H. E. & Bishop, J. M. Correct integration of retroviral DNA *in vitro*. *Cell* **49**, 347-356.(1987).

- 2) Farnet, C. M. & Haseltine, W. A. Integration of human immunodeficiency virus type 1 DNA *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4164–4168. (1990).
- 3) Bukrinsky, M. I. et al. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6125–6129 (1993).
- 4) Miyoshi, H., Smith, K. A., Mosier, D. E., Verma, I. M. & Torbett, B. E. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* **283**, 682–686. (1999).
- 5) Naldini, L. et al. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263–267. (1996).
- 6) Katz, R. A. & Skalka, A. M. The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem* **63**, 133–173 (1994).
- 7) Masuda, T., Kuroda, M. J. & Harada, S. Specific and independent recognition of U3 and U5 att sites by human immunodeficiency virus type 1 integrase *in vivo*. *J Virol* **72**, 8396–8402 (1998).
- 8) Masuda, T., Planelles, V., Krogstad, P. & Chen, I. S. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the U3 att site : unusual phenotype of mutants in the zinc finger-like domain. *J Virol* **69**, 6687–6696 (1995).
- 9) 増田貴夫. HIV-1 インテグレーションと複製, ウィルス**48**, 19–25 (1998).
- 10) Zheng, R., Jenkins, T. M. & Craigie, R. Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13659–13664 (1996).
- 11) Cai, M. et al. Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase [published erratum appears in *Nat Struct Biol* 1997 Oct ; 4 (10) : 839–40]. *Nat Struct Biol* **4**, 567–577 (1997).
- 12) Nakamura, T. et al. Lack of infectivity of HIV-1 integrase zinc finger-like domain mutant with morphologically normal maturation. *Biochem Biophys Res Commun* **239**, 715–722 (1997).
- 13) Tsurutani, N. et al. Identification of critical amino acid residues in human immunodeficiency virus type 1 IN required for efficient proviral DNA formation at steps prior to integration in dividing and nondividing cells. *J Virol* **74**, 4795–4806 (2000).
- 14) Zennou, V. et al. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**, 173–185. (2000).
- 15) Charneau, P., Alizon, M. & Clavel, F. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol* **66**, 2814–2820 (1992).
- 16) Charneau, P. et al. HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. *J Mol Biol* **241**, 651–662. (1994).
- 17) Zennou, V. et al. The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol* **19**, 446–450. (2001).
- 18) Bouyac-Bertoia, M. et al. HIV-1 infection requires a functional integrase NLS. *Mol Cell* **7**, 1025–1035. (2001).
- 19) Depienne, C. et al. Characterization of the nuclear import pathway for HIV-1 integrase. *J Biol Chem* **276**, 18102–18107. (2001).