

### 3. HIV-1 ゲノム逆転写過程の新規制御機構

増田 貴夫

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科免疫治療学分野

逆転写反応はウイルスが標的細胞に吸着／侵入後、一本鎖 RNA ゲノムを鋳型にして二本鎖 DNA を合成する過程であり、レトロウイルス複製を特徴づける反応過程である。我々は、この逆転写過程で主役を演じる逆転写酵素に加えて、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) インテグラーゼが、宿主因子と協調して逆転写酵素活性を増強することを無細胞逆転写アッセイ系による解析から明らかにした。さらに、インテグラーゼの多量体形成の維持が逆転写過程での機能に重要であることを示唆する結果を得た。本稿では、逆転写酵素に加えて、インテグラーゼおよび宿主因子による HIV-1 逆転写過程の新規制御機構について概説する。

#### はじめに

HIV-1 含むレトロウイルスはウイルス粒子内の一本鎖 RNA ゲノムを二本鎖 DNA に逆転写し、宿主染色体に組み込むことで感染を成立させる (図 1)。逆転写反応および組み込み反応はウイルス酵素である逆転写酵素 (RT) およびインテグラーゼ (IN) により触媒される<sup>11)</sup>。我々はこれまでに、HIV-1 インテグラーゼがウイルスゲノムの組み込み過程<sup>14)</sup>に加え、脱殻過程<sup>14, 16)</sup>、逆転過程<sup>22)</sup>、核内輸送過程<sup>10)</sup>における機能的関与を明らかにしてきた。なかでも、インテグラーゼに高度に保存されているアミノ酸残基に点変異を導入することにより、ウイルスの複製が逆転写過程の開始もしくは途中でほぼ完全に停止してしまうことを世界に先駆け見出し報告した<sup>14)</sup>。その後インテグラーゼ変異体の NMR による構造解析から、インテグラーゼの逆転写過程での機能には、インテグラーゼの多量体形成時の構造が重要であることを示唆する結果も報告してきた<sup>18)</sup>。さらに、我々は HIV-1 インテグラーゼに結合

しかつ逆転写過程をサポートする宿主因子として survival motor neuron (SMN) 複合体<sup>7)</sup>の構成因子のひとつである SMN interacting protein 1 (SIP1/Gemin2) を同定した<sup>8)</sup>。Gemin2 は感染後すみやかにプレインテグレーション複合体にとりこまれ HIV-1 の逆転写反応をサポートすることを見出していたが、その作用機序の詳細は不明であった。本稿では、HIV-1 インテグラーゼおよび Gemin2 の逆転写酵素活性への直接的な機能関与とその詳細な分子機構の解析<sup>17)</sup>から得られた知見を紹介したい。

#### 無細胞 HIV-1 逆転写アッセイ系の確立

逆転写酵素 (RT) 活性測定のもっとも単純な無細胞アッセイ系として、合成 poly (A) RNA を鋳型としオリゴ dT をプライマーとしてアイソトープ標識された dTTP の取り込みで評価する方法が汎用されている。一方、実際のレトロウイルス感染細胞内での逆転写過程では約 10kb のウイルス RNA を鋳型とし、tRNA をプライマーとして用いている点が大きく異なる。加えて、マイナス鎖 cDNA (図 2, strong-stop cDNA) 合成からはじまり、最終的に二本鎖 DNA の合成に至るまでには、部分的に合成された cDNA のストランドトランスファー (2 回) が必要となる (図 2)。こうした感染細胞内での逆転写過程を擬似する無細胞アッセイ系として、ウイルス粒子そのものを用いる endogenous RT アッセイが知られている<sup>14)</sup>。この endogenous RT アッセイは、精製したウイルス粒子を界面活性剤等により処理し、dNTPs を加えて反応させる方法である。しかしながら、この方法では、界面活性剤処理が実験結果を大きく左右し、宿主因子等の作用を検討するには不向きであった。

#### 連絡先

〒 113-8519

東京都文京区湯島 1-5-45

東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 免疫治療学分野

TEL: 03-5803-5799

FAX: 03-5803-0235

E-mail: tmasu.impt@tmd.ac.jp

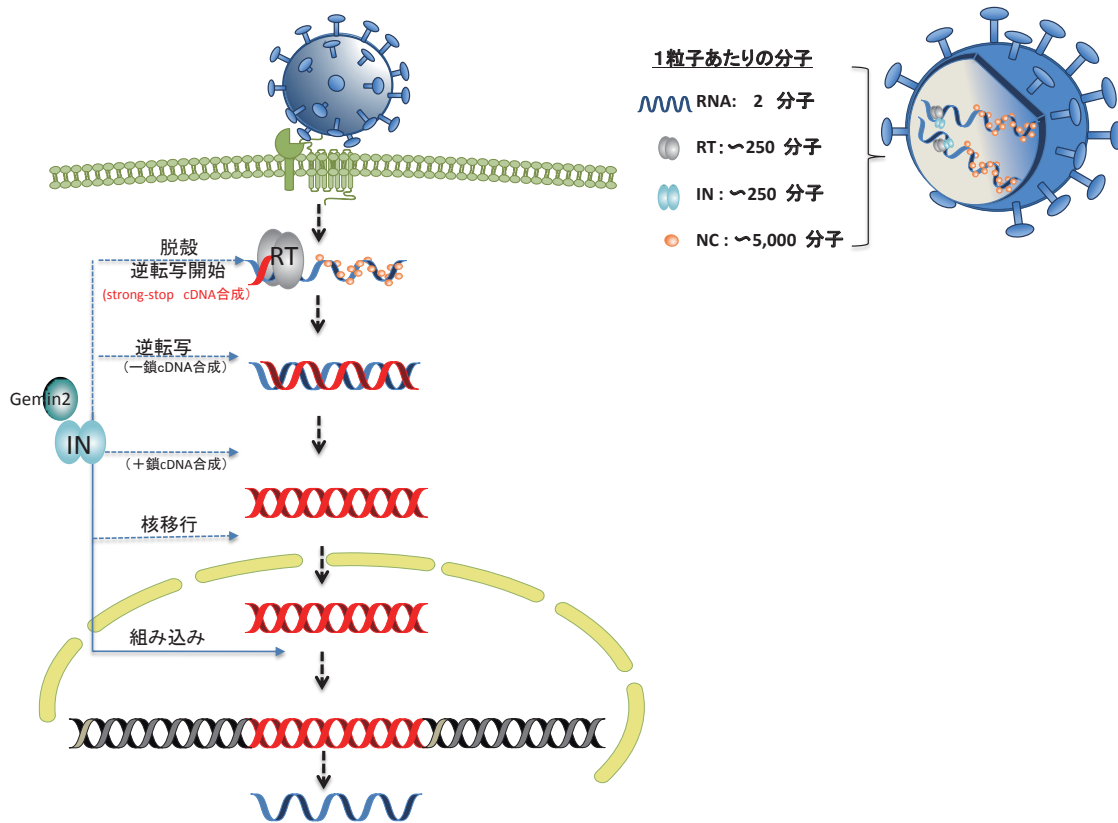


図1 HIV-1複製と粒子内ゲノム複合体

HIV-1はCD4分子およびケモカインレセプターを介し標的細胞に吸着/侵入する。ウイルス粒子内の一本鎖RNA(青線)は脱殻後、逆転写酵素(RT)によりマイナス(-)鎖cDNA(赤線)の合成(strong-stop cDNA合成)が開始する。その後、プラス(+)鎖cDNA合成過程を経て、最終的に2本鎖DNAに変換される。その後、ウイルスDNAは核内へ輸送され、インテグラーゼ(IN)により宿主染色体DNA(黒二重らせん)に組み込まれる。組み込まれたウイルスDNAは宿主の転写機構(RNAポリメラーゼII)により転写、翻訳され増殖する。ウイルス粒子内のRNAも、RNAポリメラーゼIIによって作成されるため宿主mRNAの特徴であるキャップ構造とpoly(A)が付加されている。ウイルス粒子内には、ヌクレオキャプシド(NC)によりコーティングされた1本鎖RNAが2セットとRTおよびINが約250分子ずつ存在している (Briggs J.A. et. al., Nature Struct. Mol. Biol., 2004, Swanson C.M. & Malim M.H. Cell, 2008)。

そこで、我々は、各種因子を簡便に評価しうる新たな無細胞逆転写アッセイ系の樹立を試みた。まず、HIV-1ベクター<sup>15)</sup>を鋳型とし、T7ポリメラーゼによるin vitro転写系を用いて、逆転写過程に必要とされるシス配列(R, PBS, PPT)を保有するウイルスRNAを調整した(図3A)。レトロウイルス粒子内に存在するウイルスゲノムRNAは、宿主RNAポリメラーゼIIによる転写産物である。従って、ウイルスゲノムRNAにより近づける目的で、5'末端にはCap構造を擬似したCapアナログを、そして3'末端にはpoly(A)を付加させ逆転写反応のHIV-1鋳型RNAとして用いた。また、レトロウイルスの逆転写開始のためのプライマーは宿主由来のtRNAを用いて行われる。本アッセイ系では、操作上の簡便性を考慮し、tRNAの代わりにプライマー結合サイト(PBS)に相補的な合成RNA(pbs-RNA)をプライマーとして用いた(図3B) HIV-1鋳型RNAと合成RNA(pbs)プライマーをアニーリング

させ、リコンビナントRTおよびdNTPsを加えれば逆転写反応すなわちウイルスcDNA合成は開始する。合成されたcDNAをHIV-1特異的プライマーを用いたリアルタイムPCRにより定量し、逆転写活性の指標とした。このアッセイ系で重要な点は鋳型RNAおよびRTの量比である。ウイルス粒子内のHIV-1鋳型RNAとRTの比率は約1:125と見積もられている(図1)<sup>1, 21)</sup>。従って本アッセイ系で用いたHIV-1 RNAとRTはそれぞれ0.04fmoles/reaction, 3.5fmoles/reactionで行った。

#### HIV-1 インテグラーゼおよび Gemin2 の逆転写過程への直接的影響

HIV-1 インテグラーゼ(IN)の逆転写過程への直接的影響を無細胞逆転写アッセイ系により評価した(図4A)。野生型IN(IN-WT)は濃度依存的に逆転写効率を増強させた。一方、IN欠損変異体(IN1-70)では、そのような

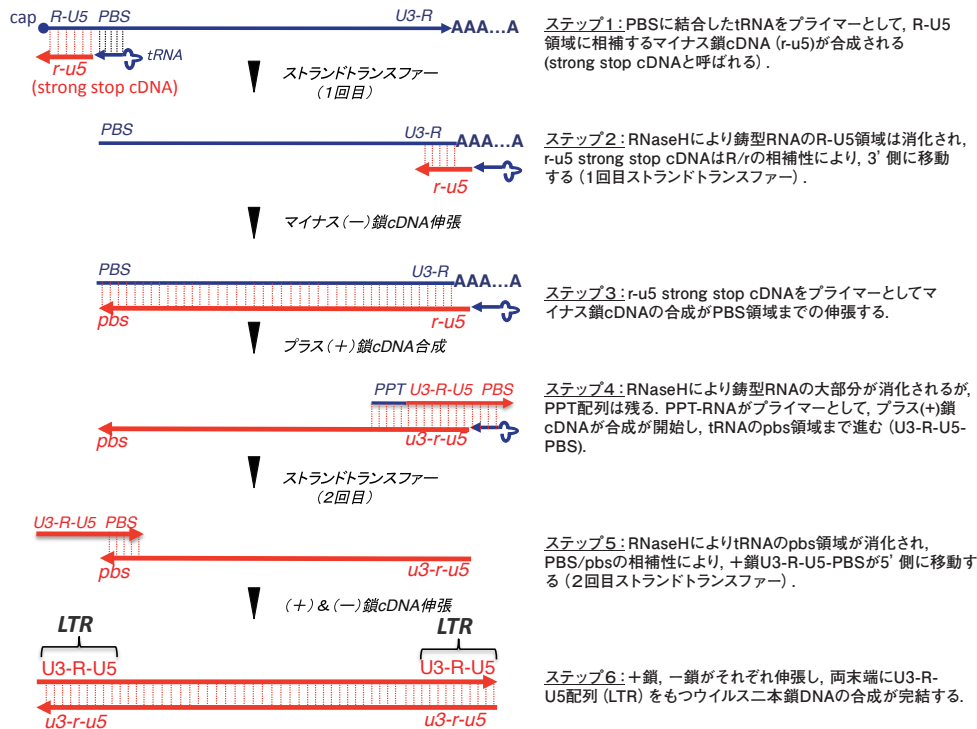


図2 レトロウイルス逆転写反応

ウイルス RNA を青線、cDNA を赤線で示した。PBS:tRNA プライマー結合部位、PPT: ポリプリン配列、LTR: Long Terminal Repeat, U3, R, U5: LTR 内配列。いずれも英大文字はプラス (+) 鎖、小文字は、マイナス (-) 鎖を表す。

活性はみとめられなかった。特筆すべき点は、IN による逆転写活性の増強効果は、HIV-1 鋳型 RNA と RT の比率が約 1 : 100 の反応条件下で最大となり、ウイルス粒子内での RNA/RT 比率とほぼ一致したことである。すなわち、より生理学的条件下に近づけることが、逆転写過程における各種因子の影響を評価するうえで重要な点といえる。

一方、逆転写活性を有意に増強させるためには IN が 35fmoles/reaction 以上必要であった。これは、RT 比で 10 倍以上の IN が必要であることを意味する。しかしながら、実際のウイルス粒子内には RT と等量の IN しか存在しない (図 1)。RT と等量 [3.5fmoles/reaction] の IN 存在下では有意な逆転写活性の増強は認められない。そこで、この RT/IN 比が 1 : 1 の条件下で、宿主因子 Gemin2 を加えてみた。その結果、RT/IN 比が 1 : 1 の条件下においても Gemin2 を添加することにより、有意に逆転写効率を上昇させることがわかった (図 4B)。この Gemin2 の効果は IN 非存在下あるいは、IN 欠損変異体 (IN1-70) では観察されなかった。さらに、IN を過剰量加えた場合、Gemin2 の増強効果は認められなくなった。この結果は、Gemin2 の逆転写増強効果は IN-WT 依存的であることを意味する。すなわち、全長の IN-WT が Gemin2 と相互作用し、逆転写増強に必要とされる IN の機能的構造変化もしくはその維持に関与したものと考えられた。IN および Gemin2 の

増強効果の分子機構に関しては、RT の HIV-1RNA へのアセンブリーを促進あるいは安定化しているという実験結果も得られている<sup>17)</sup>が、詳細は不明である。UCLA の Chow 博士らのグループは、IN と RT の相互作用に関する研究を報告しており<sup>24, 25)</sup>、IN が RT の cDNA 合成開始および伸張反応を促進するという実験結果を報告している<sup>4)</sup>。Gemin2 が IN-RT 相互作用にいかなる影響を及ぼすか今後の進展が期待される。

#### Gemin2 はインテグラーゼの多量体形成に重要である

IN の多量体形成は、組み込み活性に重要であることが知られている。我々が逆転写過程に必要とされる IN の機能における多量体形成<sup>3, 9, 23)</sup>の重要性について検討したところ、細胞内で発現させた WT-IN 蛋白を 3, 3'-Dithiobis sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP) 架橋法により単量体、二量体、四量体形成を確認した (図 5A)。同じ条件下で、各種 IN 変異体を調べた。用いた変異体 (Y15A, K186Q, LL241, 242AA, delta-KRK) はいずれも複製レベルで逆転写過程が顕著に低下し、感染性もほぼ完全に失ってしまうことが確認されたものである<sup>14, 18, 22)</sup>。これらの IN 変異体の多量体形成能に関して調べたところ、四量体形成が全ての変異体で顕著に低下していることが明らかとなった。この結果は、逆転写過程での IN の機能には四量体形

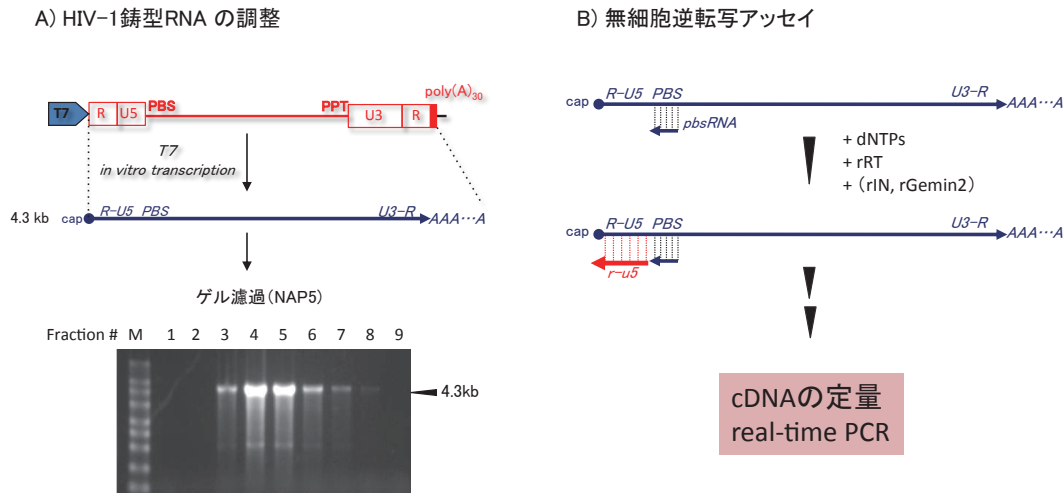


図 3 無細胞逆転写アッセイ

A) HIV-1 鋳型 RNA の調整：逆転写過程に必須なシス配列 (U3, R, U5, PBS, PPT) を含む HIV-1 レプリコン配列 (約 4.3kb) を T7 プロモーター下流に挿入し、3' 末端に poly(A)<sub>30</sub> 配列を付加させたミニ HIV-1 プラスミドを作成した。このミニ HIV-1 プラスミドを制限酵素により線状化し、cap アナログ存在下で T7 RNA ポリメラーゼによる in vitro 転写反応を行った。転写反応後、ゲル濾過 (NAP5 カラム) により、HIV-1 RNA を分画、精製した。B) 無細胞逆転写アッセイ：A で調整した HIV-1 RNA を PBS に相補的な合成 RNA (pbsRNA) と 1 : 1 の比率でアニーリングさせ、リコンビナント逆転写酵素 (rRT) と dNTPs 存在下で 42°C、30 分反応させた。逆転写産物 cDNA (r-u5) の定量を種々の HIV-1 特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR 法により定量し、逆転写活性の指標とした。種々の濃度のインテグラーゼ (rIN)、Gemin2 (rGemin2) 反応液に添加し、逆転写過程への直接的影響を評価した。

成が重要であることを示唆する。興味深いことに、Gemin2 をノックダウンさせた細胞内で WT-IN を発現させた場合、変異体と同様に四量体形成が顕著に低下することがわかった (図 5B)。以上、IN の多量体形成は逆転写過程での機能に重要であり、宿主因子 Gemin2 は IN の多量体形成およびその維持に重要な役割をもっていることが示された。

これまでの IN 構造解析結果<sup>2, 5, 18, 23)</sup> と合わせて、現時点で我々が考えている HIV-1 IN の多量体形成と Gemin2 の関与に関するモデルを図 6 に示した。IN は全長 288 アミノ酸で構成され、N 末端ドメイン (NTD: 1-50)、中央酵素活性ドメイン (CCD: 51-210)、C 末端ドメイン (CTD: 210-288) で構成される。IN 単量体が会合し二量体を形成し、二量体が会合して四量体が形成されるものと考えている。最近になって、PFV (prototype foamy virus) のインタソームの X 線結晶解析結果が報告された<sup>9)</sup>。インタソームとは、IN とウイルス DNA との“組み込み前の複合体”を意味するが、この研究では、IN が認識するとされるウイルス DNA の末端配列に相当する 19bp の合成オリゴ DNA との共結晶を用いている。レトロウイルス IN の構造解析研究の中でも、IN 全長の構造を明らかにした最初の報告であった。その後、この PFV IN の構造解析結果を基に、HIV-1 IN のインタソーム構造のシュミレーション解析結果も報告された<sup>12)</sup>。この報告によると、HIV-1 IN

の四量体形成インターフェース領域において、Tyr (Y15) および Lys-Arg-Lys (KRK186-188) 各残基間での水素結合が関与するという結果が示されている。したがって、IN の逆転写過程での機能に重要な Y15 および KRK186-188 残基は IN 四量体形成に関与し、さらに、この四量体は IN の組み込み活性においてのみならず逆転写過程での機能とも相関するという我々の仮説をサポートするものと考えられる。図 5B で示したように、この IN 四量体形成は Gemin2 をノックダウンさせた細胞内では顕著に低下していた。さらに四量体形成能の低下が認められた Y15, KRK186-188 の変異体 (図 5A, Y15A, K186Q, delta KRK) は Gemin2 との相互作用も顕著に低下することも明らかになった<sup>17)</sup>。以上より、宿主因子 Gemin2 は IN 四量体構造を認識して相互作用し、その構造維持により機能的活性化状態あるいは細胞内での IN の安定化に関与するものと考えている (図 6)。

#### HIV-1IN と Gemin2 の相互作用の ウイルス複製における意義

以前の我々の研究で、Gemin2 をノックダウンさせた細胞に HIV-1 を感染させると、逆転写効率が顕著に阻害されることをすでに報告している<sup>8)</sup>。しかしながら、この Gemin2 ノックダウンの影響が IN を介したものであるかどうかについては明確ではなかった。したがって、IN と

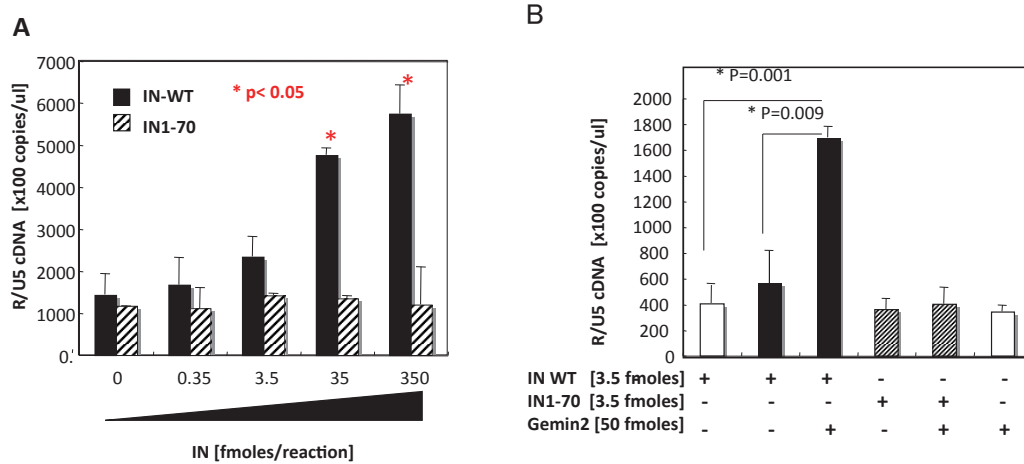


図4 IV-1 無細胞逆転写アッセイによるインテグラーゼおよび Gemin2 の評価 (文献 17 より改変)

A) HIV-1RNA/pbs [0.04fmoles/reaction], RT [3.5fmoles/reaction] に種々の量 [0.35 ~ 350fmoles/reaction] の野生型 IN (IN-WT) もしくは、欠損変異体 IN (IN-1-70) を加え逆転写反応を行った。縦軸は strong-stop に相当する, R/U5 領域を増幅するプライマーにより見積もられた, HIV-1cDNA 量を示す。IN [35fmoles/reaction] 以上で有意 (\*) な増加を認めた。B) RT と等量の IN [3.5fmoles/reaction] 存在下で, Gemin2 [50fmoles/reaction] の影響を評価した。IN-WT 存在下 (+) でみ Gemin2 の有意 (\*) な増加を認めた。

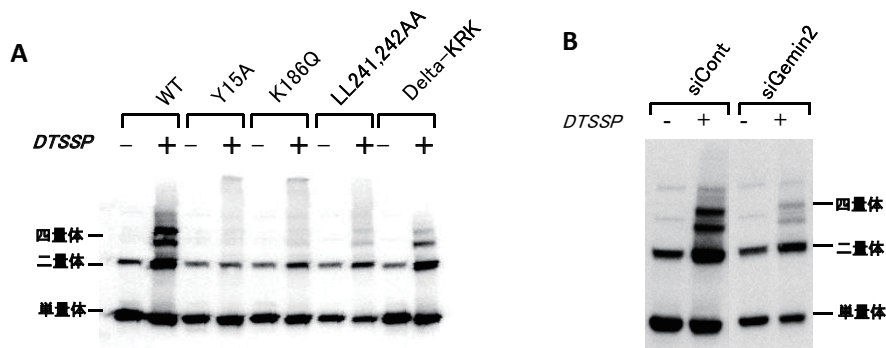


図5 HIV-1 IN 変異体の多量体形成能と Gemin2 の役割 (文献 17 より改変)

A: HIV-1 IN 野生型 (WT) および逆転写過程に致命的な影響を及ぼす IN 変異体 (Y15A, K186Q, LL241,242AA, Delta-KRK186-188) 発現ベクターをそれぞれ 293T 細胞に導入し発現させた。細胞質分画を架橋剤 (DDSP) 処理 (+) および未処理 (-) 後, PAGE-ウエスタン法により IN の多量体形成能を評価した。単量体, 二量体, 四量体の位置を示す。B: siRNA 導入により Gemin2 をノックダウン (siGemin2) させた 293T 細胞に WT-IN を発現させ, IN 多量体形成能における Gemin2 の役割を検討した。

Gemin2 と相互作用が実際の HIV-1 複製における意義を明確にする必要があった。まず, 我々は IN 内の Gemin2 結合に必須なモチーフを同定した。このモチーフを含む合成ペプチド (IN70-80) は, IN と Gemin2 の相互作用を低下させた。この IN と Gemin2 相互作用を阻害するペプチドは IN および Gemin2 の逆転写過程における増強効果を低下させることを無細胞逆転写アッセイにより確認した。以上の結果より, IN と Gemin2 の相互作用は逆転写活性の増強に重要であることが示された。つぎに, このペプチドを導入した細胞に HIV-1 を感染させ, ウイルス複製での影響を評価した。その結果, この IN と Gemin2 相互作用を阻害するペプチドは, HIV-1 複製を阻害し, その作用点も逆転写過程であることがわかった<sup>17)</sup>。さらにこの

Gemin2 結合モチーフに点変異を導入し, Gemin2 との結合を失った変異 IN をもつ HIV-1 は, 感染直後の strong-stop cDNA 合成が顕著に低下しており, 感染性がほぼ完全に失われることも確認した (未発表)。以上より, IN と Gemin2 相互作用による RT 活性化は HIV-1 複製においても重要であると考えられる。

#### 今後の課題

無細胞逆転写アッセイ系を用いた実験結果より, IN および宿主因子 Gemin2 が逆転写反応の初期段階, すなわち strong-stop cDNA の合成を促進することを示した。逆転写過程における IN の関与に関しては他の研究グループからも, HIV-1 IN<sup>4, 6, 13, 24, 25)</sup> のみならず, 酵母のトランス

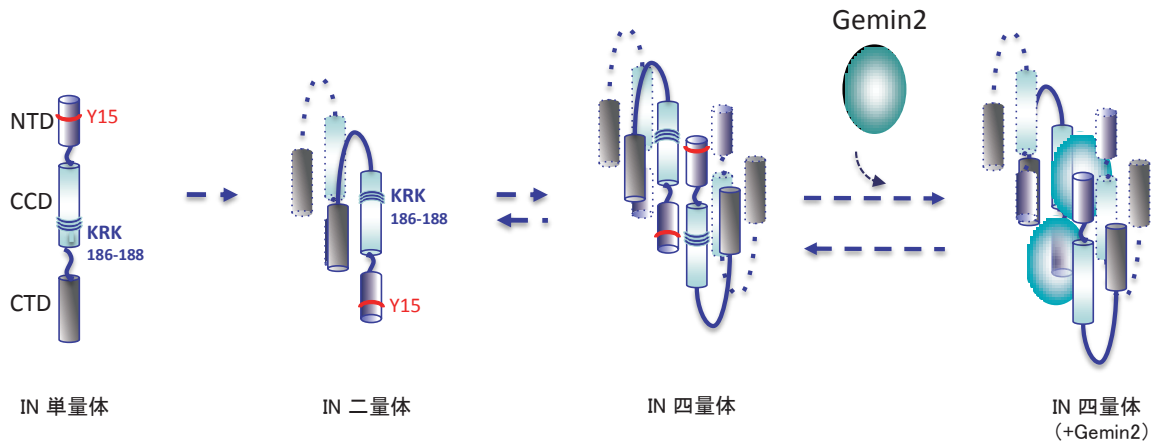


図6 HIV-1IN 多量体形成モデル

HIV-1 IN 単量体は N 末端ドメイン (NTD:1-50)、中央酵素活性ドメイン (CCD:51-210)、C 末端ドメイン (CTD:210-288) で構成される。IN 単量体が会合し、二量体、四量体を形成する。Gemin2 は IN の四量体形成の安定化に関与するものと考えている。IN の逆転写過程での機能に重要な Tyr 残基 (Y15) および Lys-Arg-Lys 残基 (KRK186-188) は IN 四量体形成においても重要な役割を持つと考えている。

ポゾンである Ty3 エレメントでも確認されすでに報告されている<sup>19, 20)</sup>。しかし、図2で述べたように最終的に二本鎖 cDNA を合成に至るまでは、cDNA のストランドトランスファー等さらなる制御が存在する。現在までに、このストランドトランスファーに関与する宿主因子の関与に関しては殆どわかっていない。我々の樹立した無細胞逆転写アッセイ系において IN と Gemin2 存在下においても、strong-stop cDNA の合成以降のステップの促進効果は確認されていない。逆転写過程の完結に至るまでにはさらなる宿主因子の関与が示唆される。

#### おわりに

インテグラーゼの本来の役割は逆転写産物である二本鎖 DNA を宿主細胞の染色体 DNA に組み込む過程を触媒することである。インテグラーゼの組み込み活性阻害剤が 2008 年、日本でも AIDS 治療薬として認可され、その治療効果を含めた今後の進展が期待される。一方、これまでの抗ウイルス剤での遍歴からも薬剤耐性変異体の出現は不可避であり、さらなる新規作用点を有する抗 HIV 剤の開発が急務である。本研究は我々が見出したインテグラーゼの逆転写過程での機能に着目し、その構造変化と機能との相関性を明らかにした。この逆転写過程の新規制御機構は新規作用点を有する抗 HIV 剤開発の分子基盤となるものと信じている。

#### 参考文献

- 1) Briggs, J. A., M. N. Simon, I. Gross, H. G. Krausslich, S. D. Fuller, V. M. Vogt, and M. C. Johnson. 2004. The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol* 11: 672-675.
- 2) Cai, M., R. Zheng, M. Caffrey, R. Craigie, G. M. Clore, and A. M. Gronenborn. 1997. Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase. *Nat Struct Biol* 4: 567-577.
- 3) Cherepanov, P., G. Maertens, P. Proost, B. Devreese, J. Van Beeumen, Y. Engelborghs, E. De Clercq, and Z. Debyser. 2003. HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem* 278: 372-381.
- 4) Dobard, C. W., M. S. Briones, and S. A. Chow. 2007. Molecular mechanisms by which human immunodeficiency virus type 1 integrase stimulates the early steps of reverse transcription. *J Virol* 81: 10037-10046.
- 5) Dyda, F., A. B. Hickman, T. M. Jenkins, A. Engelman, R. Craigie, and D. R. Davies. 1994. Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. *Science* 266: 1981-1986.
- 6) Engelman, A., G. Englund, J. M. Orenstein, M. A. Martin, and R. Craigie. 1995. Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication. *J Virol* 69: 2729-2736.
- 7) Fischer, U., Q. Liu, and G. Dreyfuss. 1997. The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 90: 1023-1029.
- 8) Hamamoto, S., H. Nishitsuji, T. Amagasa, M. Kannagi, and T. Masuda. 2006. Identification of a novel human immunodeficiency virus type 1 integrase interactor, Gemin2, that facilitates efficient viral cDNA synthesis in vivo. *J Virol* 80: 5670-5677.
- 9) Hare, S., S. S. Gupta, E. Valkov, A. Engelman, and P. Cherepanov. 2010. Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. *Nature* 464: 232-

- 236.
- 10) Ikeda, T., H. Nishitsuji, X. Zhou, N. Nara, T. Ohashi, M. Kannagi, and T. Masuda. 2004. Evaluation of the functional involvement of human immunodeficiency virus type 1 integrase in nuclear import of viral cDNA during acute infection. *J Virol* 78: 11563-11573.
  - 11) Katz, R. A., and A. M. Skalka. 1994. The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem* 63: 133-173.
  - 12) Krishnan, L., X. Li, H. L. Naraharisetty, S. Hare, P. Cherepanov, and A. Engelman. 2010. Structure-based modeling of the functional HIV-1 intasome and its inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15910-15915.
  - 13) Lu, R., A. Limon, E. Devroe, P. A. Silver, P. Cherepanov, and A. Engelman. 2004. Class II integrase mutants with changes in putative nuclear localization signals are primarily blocked at a postnuclear entry step of human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 78: 12735-12746.
  - 14) Masuda, T., V. Planelles, P. Krogstad, and I. S. Chen. 1995. 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.
  - 15) Miyoshi, H., U. Blomer, M. Takahashi, F. H. Gage, and I. M. Verma. 1998. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 72: 8150-8157.
  - 16) Nakamura, T., T. Masuda, T. Goto, K. Sano, M. Nakai, and S. Harada. 1997. Lack of infectivity of HIV-1 integrase zinc finger-like domain mutant with morphologically normal maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 239: 715-722.
  - 17) Nishitsuji, H., T. Hayashi, T. Takahashi, M. Miyano, M. Kannagi, and T. Masuda. 2009. Augmentation of reverse transcription by integrase through an interaction with host factor, SIP1/Gemin2 Is critical for HIV-1 infection. *PLoS One* 4: e7825.
  - 18) Nomura, Y., T. Masuda, and G. Kawai. 2006. Structural Analysis of a Mutant of the HIV-1 Integrase Zinc Finger Domain That Forms a Single Conformation. *J Biochem (Tokyo)* 139: 753-759.
  - 19) Nymark-McMahon, M. H., N. S. Beliakova-Bethell, J. L. Darlix, S. F. Le Grice, and S. B. Sandmeyer. 2002. Ty3 integrase is required for initiation of reverse transcription. *J Virol* 76: 2804-2816.
  - 20) Nymark-McMahon, M. H., and S. B. Sandmeyer. 1999. Mutations in nonconserved domains of Ty3 integrase affect multiple stages of the Ty3 life cycle. *J Virol* 73: 453-465.
  - 21) Swanson, C. M., and M. H. Malim. 2008. SnapShot: HIV-1 proteins. *Cell* 133: 742, 742 e741.
  - 22) Tsurutani, N., M. Kubo, Y. Maeda, T. Ohashi, N. Yamamoto, M. Kannagi, and T. Masuda. 2000. 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.
  - 23) Wang, J. Y., H. Ling, W. Yang, and R. Craigie. 2001. Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: implications for domain organization in the intact protein. *Embo J* 20: 7333-7343.
  - 24) Wilkinson, T. A., K. Januszyk, M. L. Phillips, S. S. Tekeste, M. Zhang, J. T. Miller, S. F. Le Grice, R. T. Clubb, and S. A. Chow. 2009. Identifying and characterizing a functional HIV-1 reverse transcriptase-binding site on integrase. *J Biol Chem* 284: 7931-7939.
  - 25) Zhu, K., C. Dobard, and S. A. Chow. 2004. Requirement for integrase during reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and the effect of cysteine mutations of integrase on its interactions with reverse transcriptase. *J Virol* 78: 5045-5055.

# **Viral and host factors affecting efficient reverse transcription of HIV-1 genome**

**Takao MASUDA**

Department of Immunotherapeutics, Graduate School of Medicine and Dentistry,  
Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan  
E-mail: tmasu.impt@tmd.ac.jp

Reverse transcription of retroviral RNA into double stranded DNA is a characteristic feature of retroviruses including human immunodeficiency virus type I (HIV-1). There has been accumulating evidence for the involvement of retroviral integrase (IN) in the reverse transcription of viral RNA. Here, we summarized recent our studies demonstrating direct functional roles of IN and its binding partner of host factor, Gemin2 in the reverse transcription. We established new in vitro cell-free assay to mimic natural reverse transcription and found that HIV-1 IN and host factor, Gemin2 synergistically stimulate reverse transcriptase (RT) activity. Analysis of intracellular stability and multimer formation of IN suggest that that high-ordered structures, especially tetramer formation of IN is critical for the function. In addition, Gemin2 might have a role to keep the higher-order structure of IN. Thus, we provide new aspects of reverse transcription of HIV-1 through IN and host factors in addition to RT.