

2. HIV の複製プロセス～ウイルスゲノムを中心として～

櫻木 淳一*

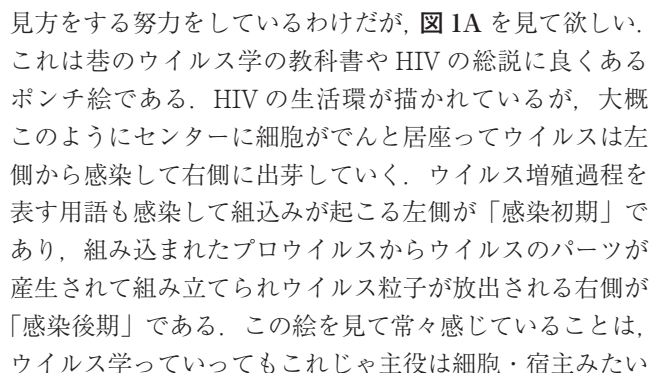
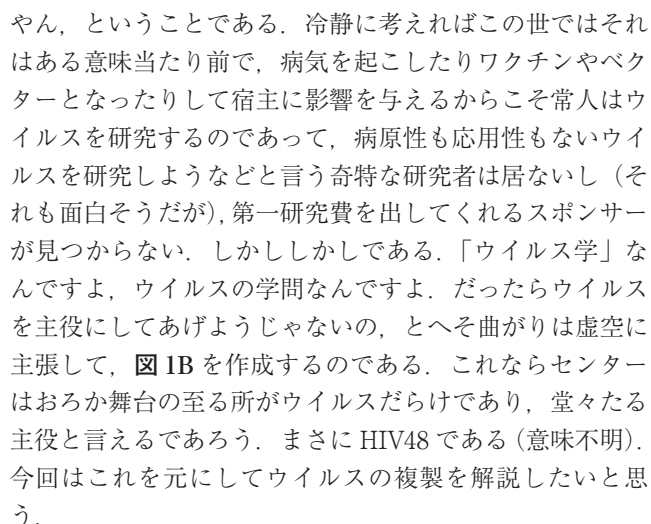
大阪大学 微生物病研究所

後天性免疫不全症候群 (AIDS) の病原体としてヒト免疫不全ウイルス (HIV) が発見されてから 30 年が過ぎた。その間、地球規模の脅威であるこの疾患に関して精力的な研究が全世界で遂行され、たくさんの成果が疾患との戦いの重要な糧となってきた。感染者に対する治療法は日々進化し続けており、もはや AIDS は死の病ではなく、慢性疾患であると言われるまでに状況は改善されてきている。しかしウイルスそのものに目を向けると一見明白となったかのように映る複製のストーリーにはいくつもの穴が開いており、根本的な理解には遠く及ばないのが現状である。本稿では特に HIV の主役をゲノム核酸と捉え、最新の知見を交えながらウイルス複製の何がわかり何がわかっていないのかをその様々なステップについて紹介する。

はじめに

「HIV のウイルス学」というお題で俣野編集長より執筆依頼を受けたが、このお題はあまりに広すぎて雲をつかむようである。しかし足りない頭 (と髪) ではてさて悩むうち、この文は雑誌「ウイルス」の特集の中の一チャプターに過ぎないことに思い当たった。さすれば格調高く真面目な学術的記事は岩谷さんを始めとする諸先生方がばりばり書いて華々しく誌面を飾っているに決まっている。私は目立たぬようにひっそりと少し目先の変った記事を書いてもバチは当たるまい。そもそも 50 近い万年下っ端に怖いものなど無いのである (嘘)。

本来人と同じことをするのが嫌だとエバっている私であるが、実は同じことをして競争になって負けるのが嫌なのである。それも負けず嫌いなのではなくて、負けた結果無駄な努力をしたことになるのが嫌なのである。要はものぐさでどうやったら楽に実験できるか、時間と予算を節約で

きるか、その試行錯誤に多大な時間をかけている本末転倒な人間なのである。そういうわけでいつもひねくれた物の見方をする努力をしているわけだが、を見て欲しい。これは巷のウイルス学の教科書や HIV の総説に良くあるポンチ絵である。HIV の生活環が描かれているが、大概このようにセンターに細胞がでんと居座ってウイルスは左側から感染して右側に出芽していく。ウイルス増殖過程を表す用語も感染して組み込みが起こる左側が「感染初期」であり、組み込まれたプロウイルスからウイルスのパーツが産生されて組み立てられウイルス粒子が放出される右側が「感染後期」である。この絵を見て常々感じていることは、ウイルス学っていってもこれじゃ主役は細胞・宿主みたいやん、ということである。冷静に考えればこの世ではそれはある意味当たり前で、病気を起こしたりワクチンやベクターとなったりして宿主に影響を与えるからこそ常人はウイルスを研究するのであって、病原性も応用性もないウイルスを研究しようなどと言う奇抜な研究者は居ないし (それも面白そうだが)、第一研究費を出してくれるスポンサーが見つからない。しかししかしである。「ウイルス学」なんですよ、ウイルスの学問なんですよ。だったらウイルスを主役にしてあげようじゃないの、とへそ曲がり主張して、を作成するのである。これならセンターはおろか舞台の至る所がウイルスだらけであり、堂々たる主役と言えるであろう。まさに HIV48 である (意味不明)。今回はこれを元にしてウイルスの複製を解説したいと思う。

連絡先

〒 565-0871

大阪府吹田市山田丘 3-1

大阪大学 微生物病研究所

TEL: 06-6879-8348

FAX: 06-6879-8347

E-mail: sakuragi@biken.osaka-u.ac.jp

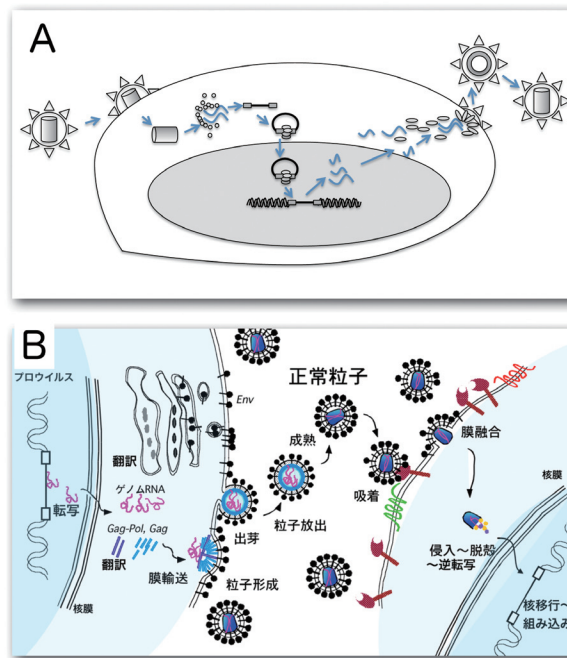


図1 HIVの生活環の模式図。

A) 細胞中心の世界観。

B) ウイルスが主役の世界観

もう一つ主張していきたいことは、ウイルスの構造における主役は何なのか、ということである。ドーキンスは「生物は遺伝子によって利用される"乗り物"に過ぎない」と言ったらしい。かのOEDにはウイルスの解説として「蛋白被膜に囲まれた核酸からなる感染性の濾過性物体」と書かれている。要するに、ウイルスとして皆が想起するあの丸かたたり細長かたたりする粒子の像は容れ物でしかない、とも言えるのではないかと指摘したいのである。現金書留の封筒は書留の主役だろうか。カレーライスのお皿はカレーの主役だろうか。やはり主役は中身、ウイルスならゲノム核酸とここは言いきってしまいたい。レトロウイルスゲノムならssRNAからdsDNAまで変幻自在なものも主役に相応しい役者振りではないだろうか。ということでその主役の一生？についてドラマチックに見出しを立ててみたのが表1である。これからその各章について解説を加えてみたい。なお、表1はひどい三文映画のアオリにしか見えないような気がしないでもないがそれはひとえに筆者の貧弱な文才に因るものであって、実際には非常にダイナミックで魅力的なウイルスゲノム動態の数々がこれまでの先人達の慧眼と情熱によって解明されてきた。この掌編ではそのすべてを余すことなく伝えることはとうてい出来ないが、魅力の片鱗を伝える努力だけは惜しまないつもりである。

1. 転写～核外輸送

HIVは感染細胞のゲノム中にプロウイルスとして存在する。細胞が休止期にあるなど活性が低い場合、ウイルスは産生されずしばしば外見上非感染細胞と見分けがつかない状態となる。これは一般的に潜伏感染(Latent Infection)と呼ばれるが、なぜ潜伏が持続しあるいは解除されるのかは完全には解明されていない。多くのプロウイルスは潜伏時殆ど転写が抑制された状態で存在すると考えられるが、その機構に関しては様々な事象が指摘されている¹⁾。ゲノム組込部位のクロマチン環境や、核内におけるプロウイルスの物理的位置の影響、NF- κ BやNFAT(Nuclear Factor of Activated T-cells)などの転写因子の量、CTIP2(COUP-TF Interacting Protein 2)・DSIF(DRB-Sensitivity Inducing Factor)・NELF(Negative Elongation Factor)など転写抑制因子の存在、ウイルスプロモーター部位(LTR)のクロマチン構造や抑制性ヌクレオソーム、ヒストンの脱アセチル化やメチル化など上げればきりが無いほどであるが、そもそも細胞の遺伝子発現機構にしても今なお新発見は毎日のように報告されているわけで、それだけ複雑なメカニズムが存在しているということであろう。

とにもかくにも抑制が解除されるとウイルスゲノムの発現が開始されるが、ここでもHIVはかなり複雑な発現機序を辿る。HIVのプロモーター部位であるLTRのU3領

表 1

レトロウイルスのゲノムのFate

1. 転写～核外輸送

- * 深い森の中で独り眠る。
- * LTRからの転写により覚醒変身!しかし核内でスプライセオソームに捕まる。
- * Revや、核外輸送機構によって細胞質へ 脱出!

2. 翻訳～アセンブリ

- * たくさんのリボソームがカラダを通り過ぎる…
- * RNaseによる攻撃をGag前駆体の保護によりかわしつつ、パートナーと出会う。
- * 細胞内輸送に便乗しつつ、Gag前駆体に包まれる。

3. 出芽・粒子成熟

- * 外界に放出、同時に環境激変!パートナーとの結びつきが堅固に。

4. 融合～脱殻・逆転写

- * 突如再び細胞内へ。そしてパートナーと一体化して再び変身!

5. 核移行～組込

- * インテグラーゼやVprと共に核内へ。
- * 宿主ゲノムに組み込まれて再び眠りに?

域には多くの転写因子結合モチーフが存在しており (図 2A), ヒストン修飾やクロマチン構造変化で転写因子がアクセス可能となると転写が開始される。しかし最初期の転写は効率が悪く, RNA ポリメラーゼはストールしたり外れたりしがちであり, たとえゲノム全長が転写されても多くのスプライシングシグナルを持つ HIV ゲノムは核内スプライセオソームに捕まり, 完全にスプライスされた 2 kb 強の短いサブゲノム RNA だけが核外に輸送されて翻訳される。この翻訳産物が Tat・Rev と Nef であり, 前者二つは巧妙なウイルス発現スイッチングの鍵として働く。Tat は核移行シグナル (NLS) を持ち核へ移行してトランスアクチベーターとしてゲノム RNA 産生量を飛躍的に増加させる。Tat は RNA に直接結合することで転写開始ではなく伸長反応を促進するが, その標的はゲノム RNA 5' 最末端の 59 塩基で TAR (Trans-Acting Responsive region) と呼ばれる。TAR は非常に強固で安定した一本のステムループ構造をとり, Tat はこのステム上部に突き出たバルジと呼ばれる部分に結合する。さらに TAR ループ上部に CDK9 と CyclinT1 からなる伸長促進因子 P-TEFb が結合し, Tat との複合体を形成するとこれが RNA ポリメラーゼの伸長反応を強力に安定化/促進することで高効率に完全長のゲノム RNA が産生される。これだけだと正のフィードバックで Tat の発現が増えるばかりだがここで働くのが Rev である。Tat と同様に Rev も NLS を持ち核に移行す

るが, その働きは非スプライス RNA の核外輸送支援である。Rev は不完全もしくは全くスプライスされない RNA にのみ存在する Env 遺伝子をコードする RNA の一領域 RRE (Rev Response Element) に結合する。Rev-RRE 複合体は核内外輸送に広く関わる細胞性因子 Crm1 と結合し, スプライシングをバイパスして核外へ輸送される。RRE を持った RNA がスプライシングを逃れる機序は明らかでないが, ある種の核内 RNA ヘリカーゼが関わっているとする説もある。このように Rev が増加することによって非スプライス RNA の細胞質量が増加し, 相対的に Tat/Rev の鋳型となるスプライス RNA は減少することで際限ない正のフィードバックにはブレーキがかかる²⁾ (図 2B)。

2. 翻訳～アセンブリ

こうして細胞質に移行したウイルス RNA は, mRNA として翻訳の鋳型となる。完全長の非スプライス RNA である 9kb のゲノム RNA からは構造蛋白である Gag とウイルス酵素である Pol が翻訳され, 不完全にスプライスされた 4kb のサブゲノム RNA からは Env や Vpr, Vif, Vpu 等のアクセサリー蛋白が発現する。Pol は Gag 遺伝子 RNA の 3' 末近くに存在するステムループ構造のフレームシフトシグナルの働きによって Gag-Pol 融合蛋白として発現し, 発現時の Gag, Gag-Pol はプロセシングを受ける前の前駆体 (Precursor) であるため分子量を冠してそれぞれ Pr55,

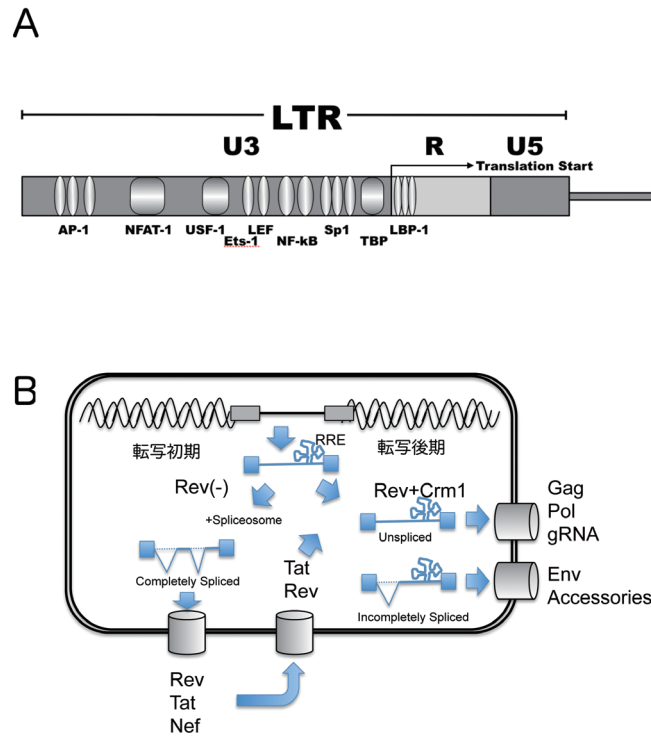


図2 HIVの転写とウイルスRNAの核外輸送。

A) LTRの転写因子モチーフ配置例。AP-1: activator protein 1, NFAT-1: Nuclear factor of activated T cells 1, USF-1: upstream transcription factor 1, LEB: Lymphoid enhancer factor, TBP: TATA binding protein, LBP-1: leader-binding protein-1.

B) RNAの核外輸送機構。Tat・Revが核移行することで転写の初期/後期がスイッチする。

Pr160と呼ばれる。mRNAの翻訳開始のためのリボソーム結合は一般的にm7-GTPCap依存性とIRES介在性の二通りがあるが、HIVのmRNAに関しては細胞性mRNAと同様にCap構造を持つため基本的にはCap依存性の翻訳を受けると考えられている。しかし実験的にはHIVの5'-UTR(非翻訳領域)はIRES活性を持っており、しかもHIV-1と-2ではその様式が異なるという報告もある³⁾。

こうして細胞質内で発現されたウイルス蛋白とRNAは集合してウイルス粒子(ビリオン)を形成するが、この一連の過程をアセンブリと呼ぶ。従来ウイルス因子の細胞内動態は新月期(Eclipse)と呼ばれ、電子顕微鏡を用いても視覚化することは困難であったが近年は蛍光や発光など様々な技術革新によって可視化が試みられ、多くの知見が蓄積している。アセンブリに関しても生化学的・分子生物学的のみならず生細胞内標識等により様々なダイナミックな動態が明らかになってきているが、いまだに包括的なストーリーとしては完成していない。まず翻訳されたPr55, Pr160は集合しながらゲノムRNAを取り込んでいくものと考えられているが、これをゲノムパッケージング、あるいは単にパッケージングとも呼び、筆者の専門領域である。前述の通りHIVは完全長RNAから構造蛋白Pr55を発現するが、このRNAはパッケージングされる対象ともなる

ウイルスゲノムRNA(gRNA)である。他の短いサブゲノムRNAあるいは周囲に大量に存在する細胞性RNAと区別してgRNAだけをパッケージングするために、Pr55とgRNAの間には特異的な相互作用が必要であるが、これをもたらすのがPr55上のヌクレオカプシド(NC)領域とgRNA上のパッケージングシグナル(Psi)である。Psiはゲノムの5'末約350塩基の範囲に存在しており、TARやpolyAシグナルを含む複数のステムループ構造から構成されていると考えられている。HIVを含むレトロウイルスはgRNAがビリオン中で二量体として存在しており、その理由としていくつかの仮説が挙げられているが、もっとも重要と考えられているのは二量体化がパッケージングの必須な一ステップであるという説である^{4,5)}。筆者らはPsiを二つ持つHIV-1のgRNAが単量体を形成して効率良くビリオンに取り込まれることを見いだしており^{6,8)}、二量体化したPsi領域がパッケージングシグナルとして認識されることで極めて特異的かつ効率的にゲノムパッケージングが起きることを強く示唆した。さらに分子生物学的及びウイルス学的解析を元にPsi領域がこれまでに報告のない独特なシュドノット様構造をとっている可能性を指摘し、二量体化のメカニズム解明に新たな方向を示した⁹⁾(図3)。

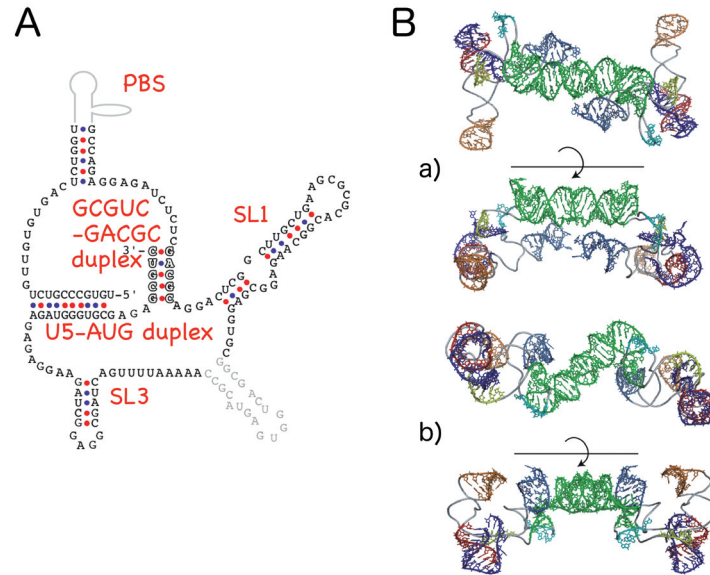


図3 HIV-1Psi 内二量体化シグナル (DLS) の新規予測構造.

A) ウイルス学的・分子生物学的解析を元にした二次構造モデル.

B) 計算機科学によって予測された二量体化 DLS の立体構造. a) b) 二つのモデルに収斂した. 両モデルとも 90 度回転像と共に示してある. 文献9より転載.

また、パッケージングの過程で興味をもたれるのは翻訳との相関関係である。前述の通り gRNA は構造蛋白 Pr55 の鋳型でもあるので、パッケージの様式として翻訳されている gRNA が自己の翻訳産物によってパッケージされる (シスパッケージング)、鋳型とは別に翻訳されていない gRNA がパッケージされる (トランスパッケージング)、そもそも翻訳とパッケージに相関は全くない (ランダムパッケージング) の 3 通りが考えられる。HIV-1 に関してはランダムであることはほぼコンセンサスとなっているが、HIV-2 についてはシスを示唆する報告が多数あった¹⁰⁾。しかしながらその多くは一つのラボからの報告であり、近年の新技术を用いた報告では HIV-1 と同様にランダムではないかとの指摘がある¹¹⁾。筆者もこの問題に関しては解析を進めており、これまでのところランダムではないかという感触を得ている。

二量体化した gRNA は最終的に数千分子の Pr55・Pr160 と共に一つのビリオンを形成するが、その過程の多くは未解明である。Pr55 中の NC 領域は核酸結合能を有する亜鉛フィンガー蛋白だがわずかに 7kd 相当の大きさでしかなく、物理的に一分子に対して核酸 4-7 塩基の結合がせいぜいである。そうなる少なくとも数百分子が集合して Psi 領域を特異的に認識する必要があるがその構造・機序とも全くわかっていない。わかっているのは Staufen や DDX6, KIF, ABCE-1, AP-2, 3 といった様々な細胞内因子が Pr55 の細胞内トラフィッキングに関わっているということだけ

で、結果として Pr55 はミリストイル化された N 末のおかげもあってビリオン形成に必要な分子数を確保した状態で細胞膜直下に蓄積し、分泌経路であるゴルジ小胞輸送に乗り翻訳後修飾を受けて細胞膜上に発現している Env と出会うと考えられている¹²⁾。

3. 出芽・粒子成熟

ウイルスがどうやって正確に同一構造の粒子を量産できるのかということは、筆者が研究を始めてからずっと個人的に抱いている疑問なのだが、これについて真正面から取り組んでいる研究はあまり見たことがない。HIV についてもその事態は同様で、細胞膜直下でアセンブリしながら細胞膜をかぶって細胞外へ出芽する粒子形成過程で主に理解が進んでいることは、細胞が最後にビリオンを切り離す放出と呼ばれる過程の機序であり、ここには ESCRT と呼ばれる一連の蛋白複合体が関わりとされている¹²⁾。ESCRT は -0 から -III までである複合体で、主に細胞質内で初期エンドソームから後期エンドソーム (MVB) を作り出すときに段階的に働くと考えられている。つまり通常は細胞内オルガネラから細胞質側に出芽する膜粒子形成に関わっているわけで、ビリオン出芽はこれと逆方向の細胞外への放出ということになる。この動きを制御していると考えられているのが Pr55 上にある Late Domain と呼ばれる領域で、主に C 末に位置する p6 領域内の PTAP モチーフが大きな役割を担っている。そもそもは p6 欠損ウイルスが細胞膜

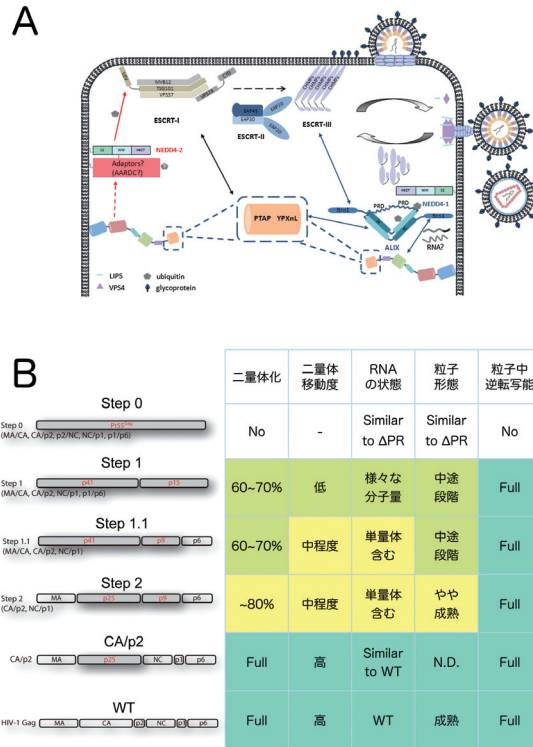


図4 ビリオン出芽と成熟.

- A) 放出に関わる因子の模式図. ESCRT系の他にウイルス側のPTAPではないモチーフを用いると考えられているALIX系の経路も示されている. 文献12より引用.
- B) ビリオン成熟過程の様々な性質の変遷. 文献17よりまとめた.

上に出芽した状態で放出されず、時には数珠上になって係留されている電顕像が確認されたことから解析が始まり¹³⁾、その後長年の探索を経てTSG101がp6と相互作用して粒子放出に関わることが指摘された¹⁴⁾。TSG101はESCRT-Iの構成因子の一つであり、そこからESCRT-0のHRSやESCRT-IIIのCHMPといった因子とPr55との関わりが指摘されてきている(図4A)^{12,15)}。しかし重ねて書くがこれらの因子はあくまで粒子放出という出芽の最終段階に関わるものであって、ビリオン形成の機序や出芽のエネルギーソースなど大部分は未解明である。逆に考えれば数多の有力誌を彩ったこの放出というトピックもHIVの生活環のごく一部に過ぎないのであり、まだまだメシのタネは転がっていると気付けば生きる希望も湧くというものである。

放出されたビリオンは前駆体Pr55・Pr160によって構成されているが、放出と同時にあるいは直後に劇的な構造変化が起きる。これが粒子成熟であり、Pr160内のウイルスプロテアーゼ(PR)が活性化して前駆体の切断(プロセッシング)が起こることによって引き起こされる^{15,16)}。PR活性化のスイッチが何なのかは明らかではないが、アセンブリによってPRおよび基質の局所的濃度が上昇することが

一つのきっかけではないかと考えられている。成熟によってビリオン内部ではPr55が切断され、MAは膜の裏打ち蛋白となり、コア蛋白(CA)はフラレン型格子を形成して円錐台状のコアを形成する。NCはgRNAとタイトに結合してコアの中にリボヌクレオチド蛋白複合体を形成する。Pr160の切断により逆転写酵素(RT)とインテグラーゼ(IN)が独立することでビリオンが感染能を獲得する。gRNAは粒子成熟するまでは二量体の結合が脆弱だが、成熟によって安定した結合となり逆転写に適した状態となる。Pr55には5カ所のPR切断部位があるが、筆者らは成熟過程のPr55切断には決まった順序があることに着目し、切断部位に変異導入を行うことで成熟過程を段階的に中断させた一連の変異体を作成して粒子形態やgRNA二量体化、感染能の変遷について解析した。その結果これらのイベントの進行はそれぞれ異なる段階で起きていくという興味深い知見を得ている(図4B)¹⁷⁾。

4. 融合～脱殻・逆転写

放出され成熟して感染能を獲得したビリオンは次の標的を探して巷をさまようわけだが細胞外環境にあって安閑としていられるわけもなく、多様な宿主免疫系から熾烈な攻

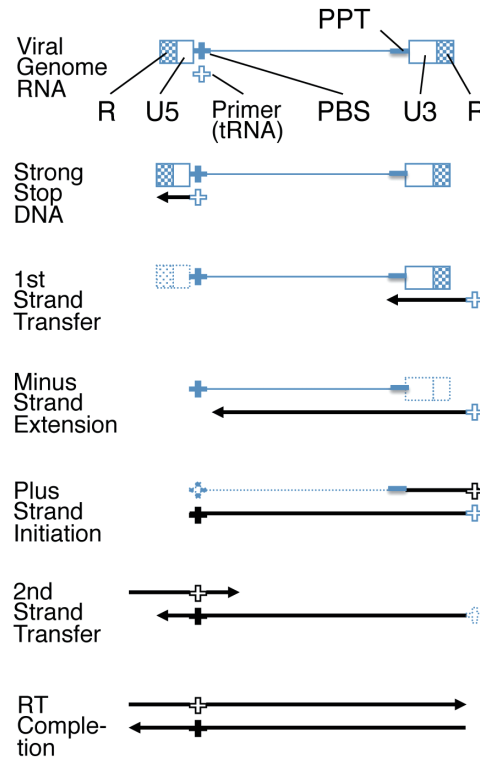


図5 HIV 逆転写の過程.

パッケージされた vRNA には宿主の Lys-tRNA が PBS (Promer Binding Site) にプライマーとしてアニールしている。RT が活性化するとプライマーから (-) 鎖の DNA が 5' 末端まで合成される (Strong Stop DNA)。5' 末端の R 領域は 3' 末端にも存在するので、RNaseH によって一本鎖となった ssDNA は 3' R と相補鎖形成するために飛び移る (1st Strand Transfer)。そのまま (-)DNA 鎖は合成が進む (Minus Strand Extension)。このとき gRNA は RNaseH によって分解されるが U3 領域に隣接する部位にプリン塩基ばかりが連続する PPT (Poly Purine Tract) があり、ここは RNaseH の分解を受けない。このため PPT 部の RNA がプライマーとなり (+) 鎖 DNA 合成が開始する (Plus Strand Initiation)。 (+) 鎖合成は 3' 末端まで進むが (-) 鎖 DNA の末端には tRNA がプライマーとしてついているので (+) 鎖 DNA は tRNA の一部まで鋳型として合成される。この塩基配列は (-) 鎖 DNA 末端の PBS 領域と相補鎖形成するので、今度は (+)DNA が鎖をジャンプする (2nd Strand Transfer)。その後両鎖が末端まで合成されることで完全なプロウイルスが完成する。

撃を受ける。しかしそのあたりは（筆者は手に負えないので）他の先生方の解説にお任せずとして、ここではビリオンが標的に吸着してからの話を進めたい。最初ウイルスが細胞に吸着するときは非特異的・可逆的な静電気結合を介していると考えられるが、その後細胞表面の CD4 分子とウイルスの Env の gp120 が特異的な結合をすることで細胞侵入が開始される。結合によって gp120 の立体構造が変化して gp120 内の V3 領域が細胞膜近傍に露出し、V3 を含む立体構造上の領域がコレセプターである CXCR4 や CCR5 と結合できるようになる。コレセプターと結合した gp120 はおそらくさらに構造変化を起こし、それに伴い Env の膜蛋白で細胞融合活性を持つ gp41 の N 末端の疎水性部分が露出して細胞膜に刺さる。その後ウイルス膜と細胞膜を引き寄せるように gp41 が構造変化し、双方の膜融合を起こさせて、ウイルスコアが細胞質内に侵入するもの

と考えられている¹⁸⁾。

主役である gRNA を内包したコアは細胞質内で徐々に壊れて、RT が活性化して逆転写反応が起こり gRNA は二本鎖 DNA (vDNA) へと再び変換される。コアが崩壊する過程を脱殻と呼ぶが、このイベントは現在 HIV 研究でもっともホットなトピックの一つであり、近年フォローしきれないほど新説が提唱されている^{19,20)}。例えば脱殻が起こる場所についても細胞質内という説もあるし、核膜孔近傍という説もある。タイミングについても感染後迅速に起こる、核近傍までコアが輸送されるまで起こらない、逆転写が完了してから起きる、いやそもそも逆転写が脱殻のエネルギーだなど百家争鳴である。結局実験条件の違いによって様々な事象が観察されているようで、はっきりしたコンセンサスはまたもや得られていないのである（その分言ったもの勝ちではないかという気もしないでもない）。

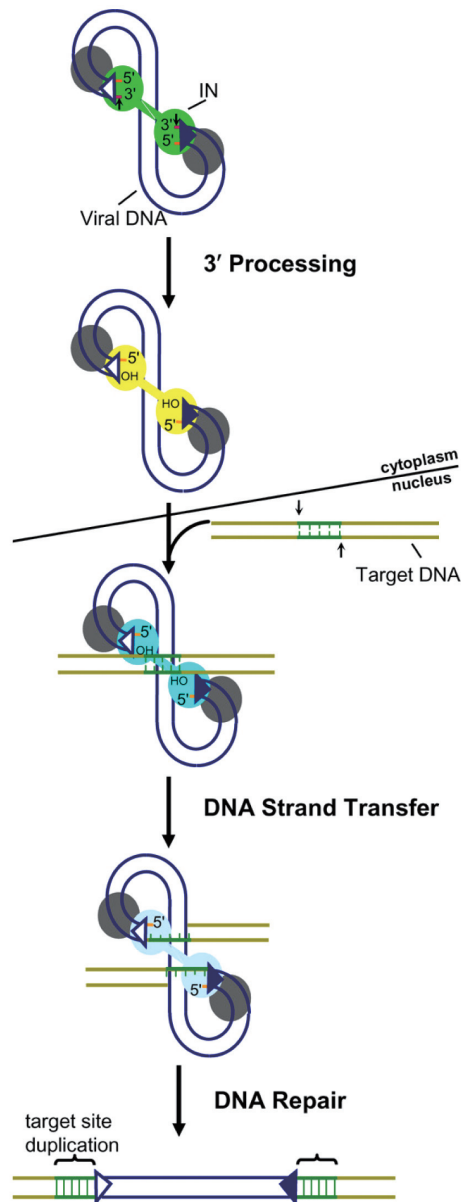


図6 インテグラーゼによるDNA組込みの様式。
文献23より転載。

HIVgRNAの逆転写に関してはその一連の巧妙な反応が長年のレトロウイルス研究によって明らかにされており、非常に興味深い。細胞由来のtRNAをプライマーとして取り込み、二度のストランドジャンプを経て二本鎖vDNAが完成されるまでの過程は良くできたからくりを見るようで、ウイルスは有機ナノマシンであると強く思われる(図5)。RTは伸長中に二量体化したgRNA間を飛び移りながらDNAを合成する(ゲノム組換え)。RTにはRNA-DNAハイブリッドのRNA鎖を切断するRNaseH部位が付属しているため逆転写と同時にgRNAは分解されてしまいvDNAはビリオンあたり最大一本しか生成されない。HIVの場合RTにエラー修復機構が欠損していることもあり遺

伝子の塩基配列には多様性が生まれ様々なサブタイプとして分類されているが、二本のゲノムが異なるサブタイプ由来である場合組換え体が生成しさらなる多様性を獲得する。筆者らはゲノム二量体化と組換えの相関について興味を持ち、それぞれの効率の定量法を構築して解析を行った。その結果二量体化と組換えの間には非常に厳密な相関があることを示している²¹⁾。

5. 核移行～組込

逆転写を終えてvDNAとなったゲノムは組込み前複合体(Pre-Integration Complex: PIC)の構成要素となって核へ移行する^{22,23)}。PICにはvDNA, IN, RT, NC, Vpr, MA,

CA と LEDGF (Lens Epithelium-Derived Growth Factor) 等の細胞性因子が含まれているが、核移行および組込みに必要な因子どちらの反応にも必須と考えられるのが IN である。IN は一般的な核移行蛋白と同様に Importin α / β 1 と共役して核移行を行うが、他に Importin 7 や TNPO3 といった輸送性因子との相互作用も報告されている。また PIC 内には核移行能を持つ Vpr や MA あるため、これらが補償的に働く、あるいは別経路の核移行機構がある可能性も考えられている。

核移行した PIC はホストゲノムに組込まれるが、ここでも非常に複雑な酵素反応が進行する (図 6)^{23,24)}。まず IN 二量体が vDNA の両端にそれぞれ結合し、二つの二量体が会合して四量体を形成して vDNA が指輪状になる。次に vDNA の両 3' 末端が 2 塩基切断除去される (3'-プロセシング)。さらに宿主染色体側にも 5' 末端が突出する形でニックが入り、そこに vDNA の 3' 末端が各々結合する (ストランドトランスファー)。vDNA の 5' 側の 1 本鎖部分 2 塩基は切断除去され染色体側の 1 本鎖部分の修復と末端結合は宿主修復系により行われる。これによって組込みサイトの前後宿主シーケンスの数塩基が重複する。

近年注目を集めているのは CA の組込み反応への影響である²⁰⁾。HIV は染色体にまんべんなく組み込まれるわけではなく、転写のアクティブな領域や、高発現遺伝子が集まっている領域を好む。この傾向を制御している因子の一つが PIC 構成因子でもある細胞因子の LEDGF と言われているが、近年 CA も PIC 内にあって TNPO3 や核膜孔複合体構成因子 Nup153/358 との相互作用を介して組込みサイト選別に関わっている可能性が示唆されている^{25,26)}。しかし CA が IN, vDNA と共に核内まで侵入するということは考えにくく、PIC が移行に用いる核膜孔を CA が選別することで組込みの部位がコントロールされているのではないか、つまり通る核膜孔によって染色体のアクセスサイトが決まるという斬新な仮説が提唱されている。

こうして組み込まれた vDNA は次に活性化するまで眠りにつくが、感染細胞が活性化していれば眠る間もなく子孫を作り続けることとなる。反対に休止細胞に感染した場合は潜伏化するが、細胞によっては組込み前の PIC の状態でウイルスが長期間維持されている例もある¹⁾。人間同様 HIV も引き籠もりやニートからワーカホリックまで様々ということであろうか。

6. 終わりに

非常な駆け足でウイルス核酸の起床から就寝? までを追っていったがいかがであろうか。筆者が何十年も言い続けていることであるが、ウイルスに限らず教科書や総説を読むとその対象に関するトピックが物語のごとく描かれていて、ぱっと見は何もかもわかっているように受け止めがちである。しかし実際は研究なんて穴だらけであり明らか

でない・調べられていないことはいくらでもある。今回久々に包括的な総説を書いてみて、HIV の研究は個別に非常に深化しているがそれらが有機的に繋がりを持って広がっているかというところはどうだろうかと感じた。判っている部分の厚みは増しているが、塞がっていない穴も依然多いという印象である。見つけた穴に興味を湧いたら、その穴埋め (穴掘り?) を自分が手がける意味を見いだせるかどうか研究の最初の醍醐味である。そうした実態を意識してもらうために本稿は「わざと」穴だらけで不親切な解説に終始している。ウイルス構造因子以外の解説も最小限に留めたが、それも「わざと」とである (大事なことなので二度書いた)。拙文を読んで欠落感が気になったのであれば読んで終わりにせず、是非自分で調べて世界を広げて欲しい。それが将来、一流紙を飾り世界を変える発見のきっかけになる可能性は決してゼロではないのだから。

7. 謝辞

この原稿を書く機会を与えて下さった俣野哲朗編集長、ディスカッションにお付き合いいただいた塩田達雄教授・櫻木小百合博士に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Van Lint, C, Bouchat, S & Marcello, A. HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology* 10, 67, doi:10.1186/1742-4690-10-67 (2013).
- 2) Cullen, BR. Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends in biochemical sciences* 28, 419-424, doi:10.1016/S0968-0004(03)00142-7 (2003).
- 3) de Breyne, S, Soto-Rifo, R, Lopez-Lastra, M & Ohlmann, T. Translation initiation is driven by different mechanisms on the HIV-1 and HIV-2 genomic RNAs. *Virus research* 171, 366-381, doi:10.1016/j.virusres.2012.10.006 (2013).
- 4) Nikolaitchik, OA, Dilley, KA, Fu, W, Gorelick, RJ, Tai, SH, Soheilian, F, Ptak, RG, Nagashima, K, Pathak, VK & Hu, WS. Dimeric RNA recognition regulates HIV-1 genome packaging. *PLoS pathogens* 9, e1003249, doi:10.1371/journal.ppat.1003249 (2013).
- 5) Sakuragi, J, Sakuragi, S & Shioda, T. Minimal region sufficient for genome dimerization in the human immunodeficiency virus type 1 virion and its potential roles in the early stages of viral replication. *Journal of virology* 81, 7985-7992 (2007).
- 6) Sakuragi, J, Iwamoto, A & Shioda, T. Dissociation of Genome Dimerization from Packaging Functions and Virion Maturation of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol* 76, 959-967 (2002).
- 7) Sakuragi, J, Shioda, T & Panganiban, AT. Duplication of the Primary Encapsidation and Dimer Linkage Region of HIV-1 RNA Results in the Appearance of Monomeric RNA in virions. *Journal of virology* 75, 2557-2565 (2001).
- 8) Sakuragi, J, Ueda, S, Iwamoto, A & Shioda, T. Possible role of dimerization in human immunodeficiency virus

- type 1 genome RNA packaging. *Journal of virology* 77, 4060-4069 (2003).
- 9) Sakuragi, J, Ode, H, Sakuragi, S, Shioda, T & Sato, H. A proposal for a new HIV-1 DLS structural model. *Nucleic acids research* 40, 5012-5022, doi:10.1093/nar/gks156 (2012).
 - 10) Kaye, JF & Lever, AM. Human immunodeficiency virus types 1 and 2 differ in the predominant mechanism used for selection of genomic RNA for encapsidation. *Journal of virology* 73, 3023-3031 (1999).
 - 11) Ni, N, Nikolaitchik, OA, Dilley, KA, Chen, J, Galli, A, Fu, W, Prasad, VV, Ptak, RG, Pathak, VK & Hu, WS. Mechanisms of human immunodeficiency virus type 2 RNA packaging: efficient trans packaging and selection of RNA copackaging partners. *Journal of virology* 85, 7603-7612, doi:10.1128/JVI.00562-11 (2011).
 - 12) Meng, B & Lever, AM. Wrapping up the bad news: HIV assembly and release. *Retrovirology* 10, 5, doi: 10.1186/1742-4690-10-5 (2013).
 - 13) Gottlinger, HG, Dorfman, T, Sodroski, JG & Haseltine, WA. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 3195-3199 (1991).
 - 14) Garrus, JE, von Schwedler, UK, Pornillos, OW, Morham, SG, Zavitz, KH, Wang, HE, Wettstein, DA, Stray, KM, Cote, M, Rich, RL, Myszka, DG & Sundquist, WI. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107, 55-65 (2001).
 - 15) Sundquist, WI & Krausslich, HG. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2, a006924, doi:10.1101/cshperspect.a006924 (2012).
 - 16) Sakuragi, J. Morphogenesis of the Infectious HIV-1 Virion. *Frontiers in microbiology* 2, 242, doi:10.3389/fmicb.2011.00242 (2011).
 - 17) Ohishi, M, Nakano, T, Sakuragi, S, Shioda, T, Sano, K & Sakuragi, JI. The relationship between HIV-1 genome RNA dimerization, virion maturation and infectivity. *Nucleic acids research* 39, 3404-3017 (2011).
 - 18) Sakuragi, J. [Structure and function of HIV virion]. *Uirusu* 52, 95-102 (2002).
 - 19) Arhel, N. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* 7, 96, doi:10.1186/1742-4690-7-96 (2010).
 - 20) Fassati, A. Multiple roles of the capsid protein in the early steps of HIV-1 infection. *Virus research* 170, 15-24, doi:10.1016/j.virusres.2012.09.012 (2012).
 - 21) Sakuragi, J, Sakuragi, S, Ohishi, M & Shioda, T. Direct correlation between genome dimerization and recombination efficiency of HIV-1. *Microbes Infect* 12, 1002-1011 (2010).
 - 22) Delelis, O, Carayon, K, Saib, A, Deprez, E & Mouscadet, JF. Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology* 5, 114, doi:10.1186/1742-4690-5-114 (2008).
 - 23) Krishnan, L & Engelman, A. Retroviral integrase proteins and HIV-1 DNA integration. *The Journal of biological chemistry* 287, 40858-40866, doi:10.1074/jbc.R112.397760 (2012).
 - 24) Masuda, T. Interplay of HIV Integrase with Host Factors. *The journal of AIDS research* 10, 3-9 (2008).
 - 25) Koh, Y, Wu, X, Ferris, AL, Matreyek, KA, Smith, SJ, Lee, K, KewalRamani, VN, Hughes, SH & Engelman, A. Differential effects of human immunodeficiency virus type 1 capsid and cellular factors nucleoporin 153 and LEDGF/p75 on the efficiency and specificity of viral DNA integration. *Journal of virology* 87, 648-658, doi:10.1128/JVI.01148-12 (2013).
 - 26) Schaller, T, Ocwieja, KE, Rasaiyaah, J, Price, AJ, Brady, TL, Roth, SL, Hue, S, Fletcher, AJ, Lee, K, KewalRamani, VN, Noursadeghi, M, Jenner, RG, James, LC, Bushman, FD & Towers, GJ. HIV-1 capsid-cyclophilin interactions determine nuclear import pathway, integration targeting and replication efficiency. *PLoS pathogens* 7, e1002439, doi:10.1371/journal.ppat.1002439 (2011).

The replication process of HIV:

~ with a central focus on the viral genome ~

Jun-ichi SAKURAGI

Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University.

It has been 30 years passed since the discovery of HIVs as the agents of AIDS. During the period, many energetic research works about this gigantic menace have been performed globally and many outcomes have been applied to intercept the epidemic. Because of a brilliant progress of the therapeutic strategy, it is said that AIDS is no longer the deadly disease, but one of the mere chronic disease nowadays.

On the other hand, giving an eye to the virus itself, many dark gaps are found in a superficially good-looking story of the viral replication. Thus, we are still far from fundamental understanding of the virus. In this review, I especially pick up the viral genome RNA as a central player of the story and give an introduction about various steps of viral replication. With several recent reports, I will exposit well-known and/or unclear events around virus.

