

総 説

1. インテグラーゼと逆転写酵素：HIV 複製サイクルの点と線

増 田 貴 夫, 河 合 剛 太

千葉工業大学 先進工学部生命科学科

レトロウイルスは、ゲノム RNA の DNA 変換（逆転写反応）と染色体への組み込み（組み込み反応）により感染成立させる特徴を有し、逆転写酵素（RT）とインテグラーゼ（IN）により連続的に遂行される。RT と IN はウイルスゲノムにタンデムにコードされており、両者は融合した形で翻訳されウイルス粒子に取り込まれる。最近我々は、HIV-1 IN が RT と融合した状態（RT-IN）を介して逆転写反応をシス制御する可能性を見出した。一方、逆転写反応の鋳型となるウイルス RNA の解析から、HIV-1 の転写開始点のゆらぎにより生じる 5' 末端 G 塩基数の違いが、HIV ゲノム RNA の粒子内取り込み（パッケージング）を規定し、さらに逆転写反応にも影響を及ぼすことを見出した。本稿では、HIV の酵素タンパク質（RT-IN）およびゲノム核酸（5'UTR RNA）の構造・機能相関研究に関する著者らの研究成果から提示された HIV ゲノム変換機構に関して、逆転写反応を中軸としたレトロウイルス複製の各素過程間の新しい相互連携について考察した。

はじめに

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）は、ヒトの T 細胞やマクロファージに長期の持続感染を成立することにより、後天性免疫不全症候群（AIDS）を引き起こす病原性レトロウイルス¹⁾で、レンチウイルス属に分類される。レンチ（lenti）はラテン語で「遅い」の意義があり、HIV 感染から AIDS 発症までの時間が薬剤未治療の場合では約 10 年と非常にゆっくりと進行することによる。この長期にわたる HIV 持続感染は、レトロウイルス感染の特徴であるウイルスゲノムの染色体組み込み（プロウイルス DNA）に起因する。このプロウイルス DNA はウイルス粒子内の一本鎖（+）RNA ゲノムを二本鎖 DNA に変換（逆転写反応）し、宿主細胞の染色体に組み込む（インテグレーション反応）ことで樹立される。いずれもウイルスがコードする逆転写酵素（RT）とインテグラーゼ（IN）が酵素蛋白質として主要な触媒機能を果たす。RT は 1970 年代にト

リのラウス肉腫ウイルスより発見された^{2,3)}。当時の分子生物学のセントラルドグマでもあった DNA から RNA への変換（転写）の流れとは逆方向の反応を触媒するウイルス酵素であり、レトロウイルスの語源ともなった。一方、IN は、RT の発見から数年後、トリ骨髄芽球症ウイルスよりエンドヌクレアーゼ活性を有する 32 k Da のタンパク質（p32）として同定された⁴⁾。その後、p 32 は、ウイルス DNA の末端に作用し、組み込み反応に関わることが明らかにされたのは 1980 年以降である⁵⁾。2007 年に HIV IN の酵素活性のひとつであるストランドトランスファー活性の阻害薬（STI）が米国 FDA に認可されて以来、RT と IN 阻害剤の併用による抗レトロウイルス療法が HIV 感染症の治療戦略として確立されるまでに至った⁶⁾。著者らは、IN の酵素活性の生化学的特性が明らかになってきた 1990 年代に、HIV リバースジェネティクス解析から IN の点変異が組み込み反応だけでなく、逆転写反応にも致命的な影響を及ぼすことを見出した⁷⁾。現在、IN の組み込み以外の未知機能を標的とした IN 阻害剤開発⁸⁾も進んでいるが、IN の多機能性の分子機構の詳細に関しては依然として不明な点が多く残されている⁹⁾。本稿では、著者らが HIV-1 IN の多機能性を規定する分子機構の解明研究から得られた HIV-1 のゲノム変換制御に関わる新たな知見を概説する。

連絡先

〒 275-0016

千葉県習志野市津田沼 2-17-1

千葉工業大学 先進工学部生命科学科

TEL/FAX: 047-478-0425

E-mail: takao.masuda@it-chiba.ac.jp

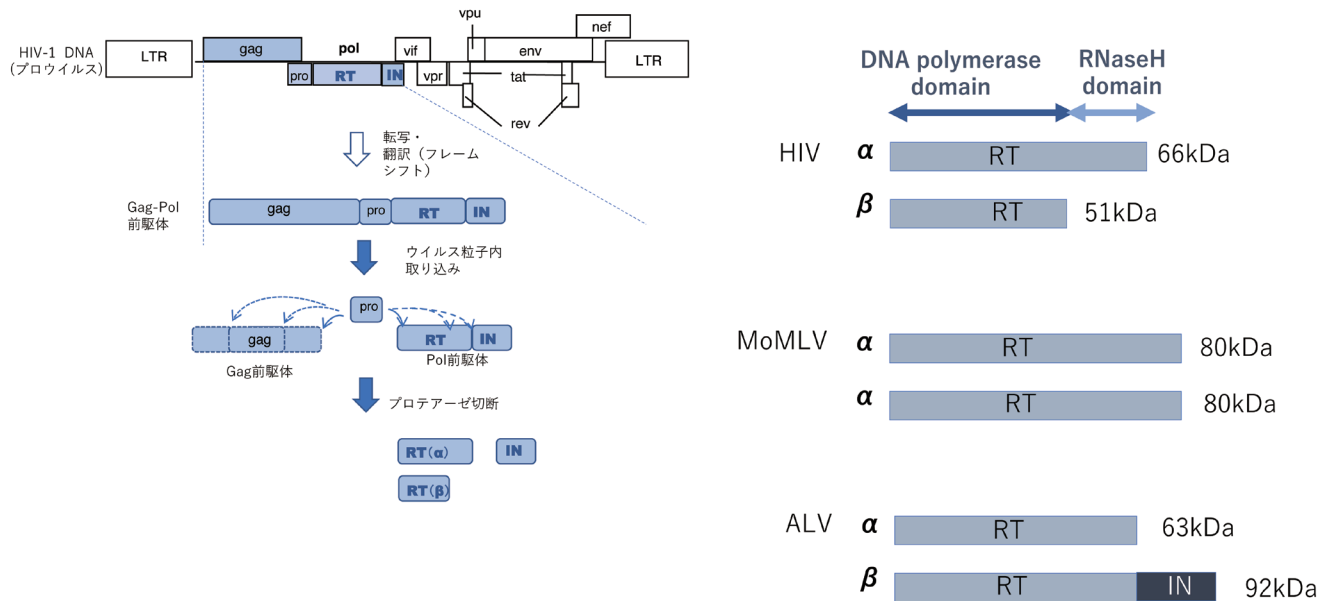


図1 Gag-Pol 前駆体蛋白質と RT 二量体構造

HIV-1 プロウイルス DNA の遺伝子マップと Gag-Pol 前駆体蛋白質の合成とプロテアーゼ切断パターン (左). 代表的なレトロウイルス (HIV, MoMLV, ALV) の RT ダイマー (二量体) 構造 (右).

Pol 前駆体蛋白質と RT ヘテロダイマー構造

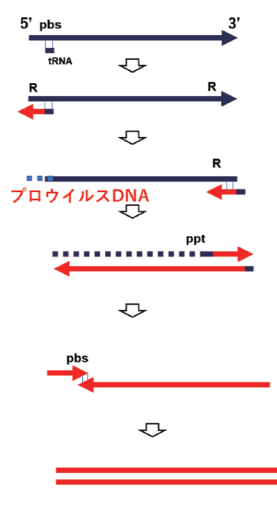
HIV-1 の RT と IN はタンデムに Pol 遺伝子にコードされ, *gag/pol* 遺伝子間のフレームシフト翻訳により Gag-Pol 前駆体として合成されウイルス粒子内に取り込まれる¹⁰⁾. その後, Pol にコードされているプロテアーゼにより RT と IN が融合している状態の Pol 前駆体蛋白質を経て大部分は個々の蛋白質へと切断される. HIV-1 RT は最終的には, 切断サイトの異なる α 鎖 (p66) と β 鎖 (p51) のヘテロ二量体となる (図 1). α 鎖には DNA ポリメラーゼ活性ドメインと RNase H 活性ドメイン¹¹⁾を有しているが, β 鎖は RNase H 活性ドメインを欠いておりその分短い¹²⁾. RT 酵素活性は α 鎖が担っており, β 鎖は二量体構造維持に必要と考えられている¹²⁾. RT 二量体構造は他のレトロウイルスでは異なっており, マウス白血病ウイルス (MoMLV) では, α 鎖のホモ二量体となっている¹³⁾. 一方, トリ骨髄芽球症ウイルス (ALV) の RT はヘテロ二量体であるが, β 鎖の方が長く IN と融合している¹⁴⁾ (図 1 右). RT の二量体構造がウイルスにより異なる点は興味深く, 後述する HIV-1 の IN 融合による RT 酵素活性アロステリック制御は, レトロウイルス RT と IN の進化過程を反映したものなのかもしれない.

レトロウイルス逆転写反応と組み込み反応

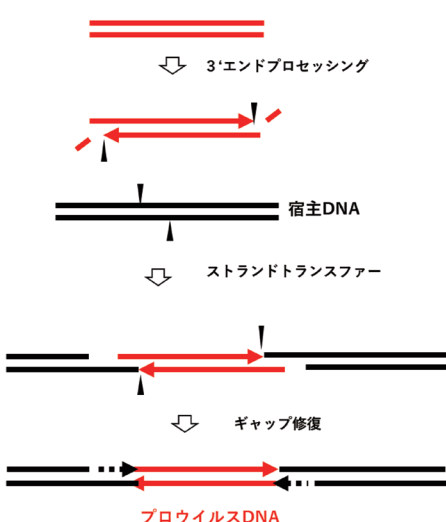
逆転写反応は, ウイルスゲノム RNA (gRNA) の 5' UTR に結合している宿主細胞由来 tRNA (HIV-1 の場合

tRNA^{Lys3}¹⁵⁾ をプライマーとした短いマイナス鎖 (-) cDNA 断片の合成から開始される. cDNA に変換された RNA 領域 (R-U5) は RT が所有する RNase H 活性により分解除去される. その後, ウイルスゲノムの両端に存在するリピート配列 (R 配列) の相補性を介して最初に合成された短い (-)cDNA は, ウイルス gRNA の 3' 末端へ転移する (1st strand-transfer)¹⁶⁾. これにより, gRNA 全長の (-) cDNA 合成が可能となる. (-) cDNA の伸長合成が進み (-) cDNA と二本鎖を形成している gRNA の大部分は, RT の RNase H 活性により分解される. ところが, gRNA にはポリプリン配列 (ppt) が存在し, この配列は RNase H に抵抗性を有しており, RNase H 分解を免れた短い ppt 断片がプラス鎖 (+) DNA 合成のプライマーとして機能する. tRNA の pbs 領域まで伸長した (+) DNA は, pbs の相補性を利用して 5' 末端へ転移する (2nd strand-transfer). 転移した (+) および (-) cDNA の伸長反応により, ウイルス DNA の合成は完結する. このようにレトロウイルスの逆転写反応は, ウイルス RNA の部分的 cDNA 断片の 2 回の転移反応を巧妙に組み合わせて完結する¹⁷⁾. 逆転写反応により二本鎖 DNA となった LTR 末端領域の配列を IN が特異的に認識し, 宿主細胞の染色体 DNA と融合したプロウイルス DNA となる (図 2B). 組み込み反応では, ウイルス DNA の 3' 末端から 2 塩基の切除する (3' エンドプロセッシング). その後, ウイルス DNA の各 3'-OH 基の求核反応により, 宿主 DNA のリン酸エステル結合を切断すると同時に再結合する (ストラン

A) 逆転写反応



B) 組み込み反応



C) 逆転写・組み込みカップリング仮説

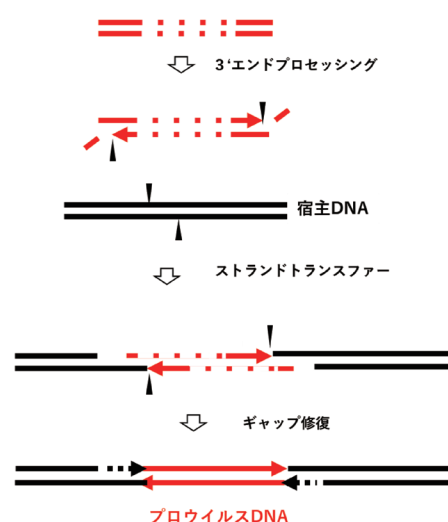


図2 逆転写反応と組み込み反応

逆転写反応 (A), 組み込み反応 (B) のウイルスゲノム変換機構をウイルス RNA (青線), ウイルス DNA (赤線) および宿主染色体 DNA (黒線) で表記. 逆転写反応と組み込み反応のカップリング仮説 (C) では, 組み込み反応依存的に逆転写反応が完結する概念図を示す.

ドランスファー反応). IN が触媒するのは, この二つの反応であり, この間に生じたウイルスと宿主 DNA のギャップは, 宿主細胞の DNA 修復系酵素により修復されてプロウイルス DNA となる¹⁸⁾.

逆転写反応における IN の役割

著者らは, IN の点変異が組み込み反応だけでなく逆転写反応にも致命的な影響を及ぼす⁷⁾ ことに着目し, その IN の未知機能を探る中で, Pol 前駆体である IN が RT と融合状態 (RT-IN) を介して逆転写反応を制御する可能性を見出した. この実験では, RT と IN を欠損させた HIV-1 変異体に Vpr 蛋白質と融合させた RT, IN, RT-IN 蛋白質をウイルス粒子内に取り込ませる相補実験により, HIV-1 感染時の細胞内での逆転写反応への影響を調べた. その結果, 細胞内での逆転写反応には RT 単独では不十分であり, Pol 前駆体由来の RT と IN が融合した状態 (RT-IN) を介して逆転写反応が効率よく遂行されることを見出した¹⁹⁾. そこで, IN 融合による RT 酵素活性への影響の有無を無細胞逆転写アッセイ^{20,21)} により評価した (図3). 本アッセイ系では, リコンビナント RT および RT-IN 蛋白質を調整し, 種々の濃度の dNTPs 存在下で cDNA 合成効率を比較した. その結果, RT-IN は, RT 単体と比較して, 低濃度 dNTPs 存在下 (0.1 から 10 μ M 以下) において有意に高い cDNA 合成効率を示した. この優位性は, HIV-1 プロテアーゼ処理により RT と IN を分断すると完全に失わ

れ, RT 単体と同様な効率まで低下してしまうことが明らかとなった²²⁾. 末梢血 T 細胞への HIV-1 の感染成立には, T 細胞レセプター等を介した活性化が必須となる^{23,24)} が, 細胞内 dNTP 濃度²⁵⁾ は, まさしく逆転写反応の律速因子の一つ²⁵⁾ といえる. したがって, RT-IN が有意性を示した低濃度 dNTPs 環境下での RT 活性の促進効果は生理学的意義を有していると考ええる. さらに, 国立感染症研究所の小谷治博士らと共同で行った分子動力学シミュレーション解析から, RT の IN との融合による酵素活性中心部に存在する dNTP 結合サイト近傍アミノ酸残の構造変化も確認された. 我々はこの RT-IN の機能構造関連研究結果を「IN による RT のシス-アロステリック制御」²²⁾ として報告した. 今後この IN 融合の効果が, HIV 以外のレトロウイルスでも検証されることになるかと思う.

逆転写反応の鋳型としてのウイルスゲノム RNA

HIV を含むレトロウイルスゲノム RNA は感染細胞内で宿主細胞の RNA ポリメラーゼ II によりプロウイルス DNA から転写合成される. したがって, 転写されたウイルスゲノムの両末端は, キャップ構造もしくは, ポリ A が付加修飾されており, 一部はスプライシングされて mRNA としてウイルス蛋白質の合成に使用される. 一方で, ウイルス粒子内には全長の mRNA が二量体化し Gag 蛋白質との相互作用によりウイルス粒子に取り込まれ, ウイルスゲノム RNA (gRNA) となる. HIV 感染細胞内で

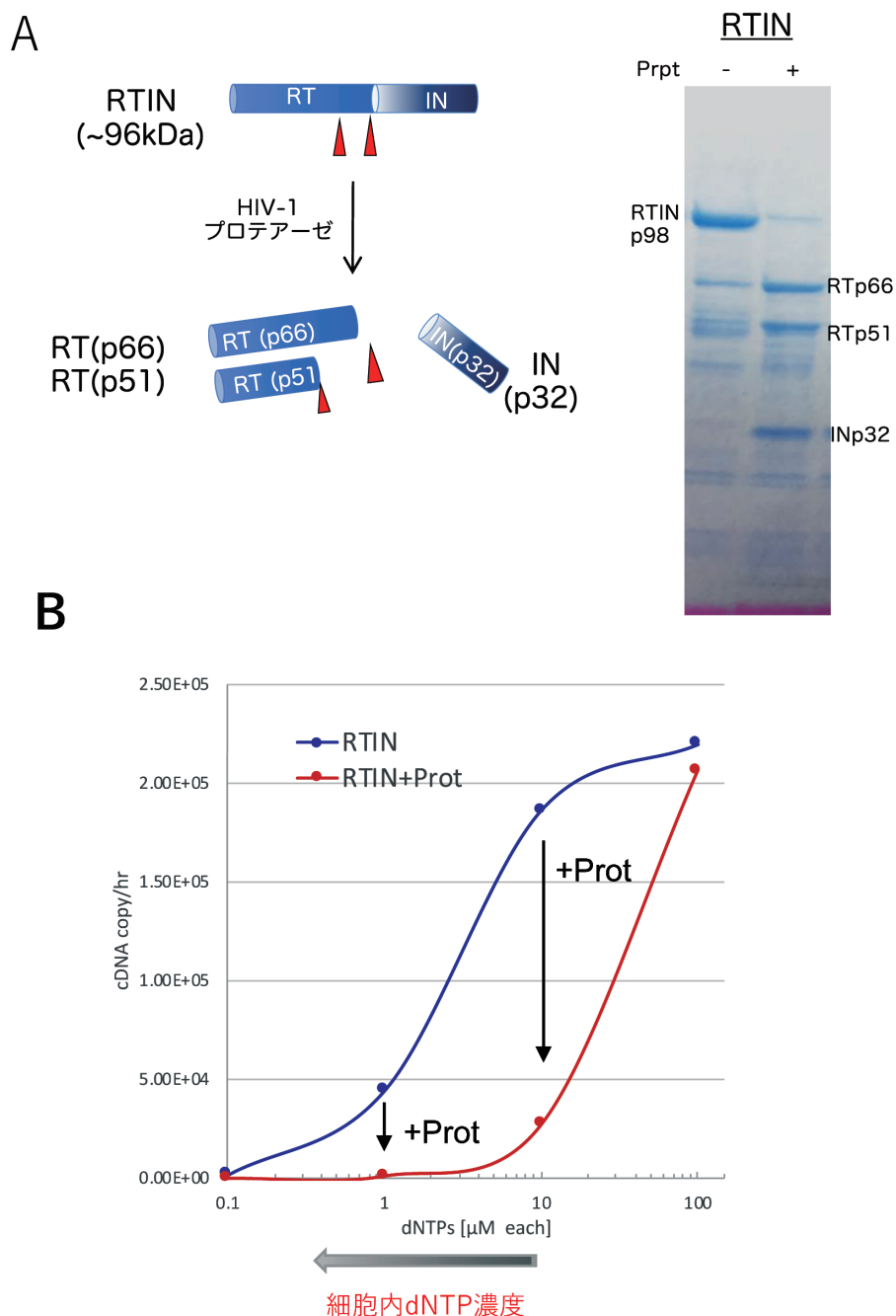


図3 RTIN を介した HIV 逆転写反応制御

A) RTIN のプロテアーゼ切断：リコンビナント RTIN (分子量約 96kDa) の HIV-1 プロテアーゼ (Prot) による切断産物を SDS-PAGE により解析した。B) RTIN のプロテアーゼ切断による RT 活性への影響：種々の濃度の dNTP 存在下 (0.1 ~ 100 μM) での cDNA 合成効率を無細胞逆転写アッセイ系により評価した²²⁾。

はプロウイルス DNA からの転写開始点の異なるウイルス RNA が発現しており、この転写開始点の違いによりウイルス粒子内取り込まれ逆転写反応の鋳型となるゲノム RNA が選別されていることを我々は偶然見出した²⁰⁾。HIV-1 プロウイルス DNA²⁶⁾ の LTR の U3 領域に存在する

TATA ボックス配列を宿主由来の RNA ポリメラーゼ II が認識して約 26 塩基下流から転写が開始される。この転写開始点が LTR の R 領域を規定することになるが、HIV-1 の場合、U3 と R の境界には三つのグアニン残基 (GGG) 配列が高度に保存されており²¹⁾、転写は GGG 配

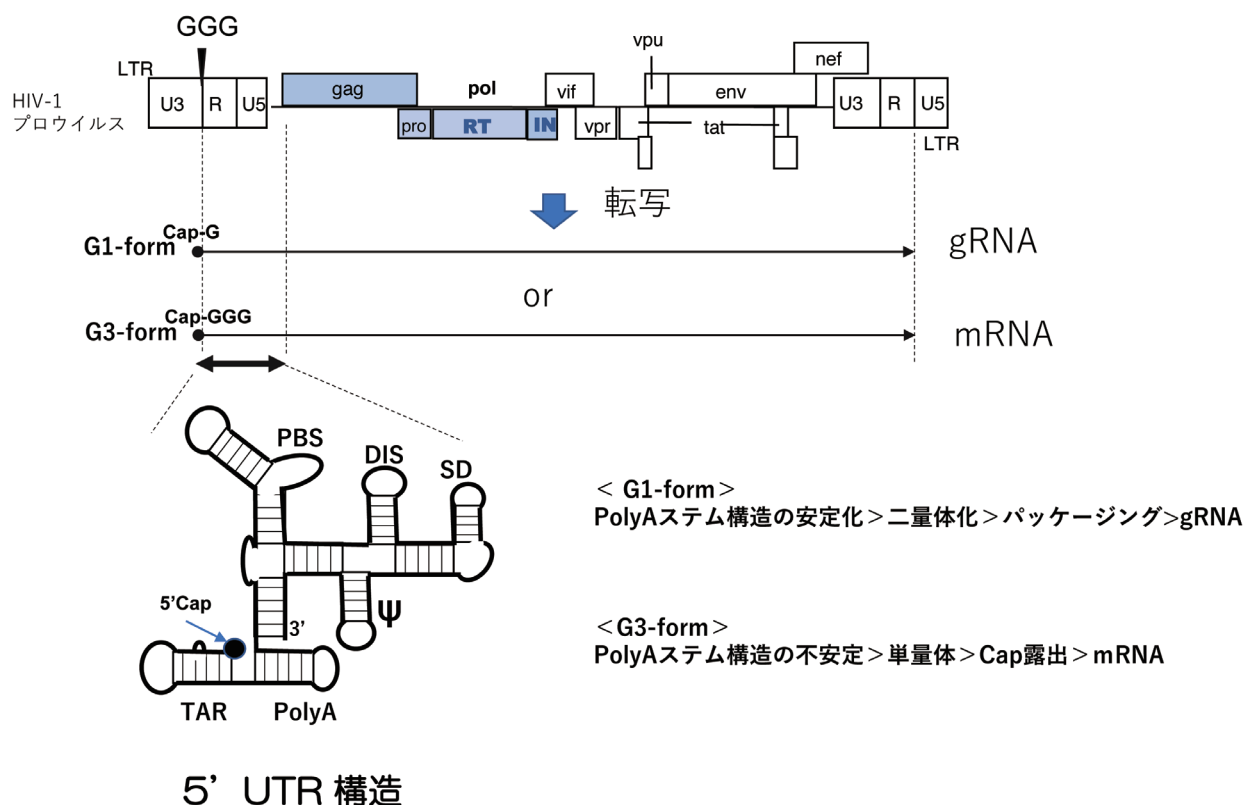


図4 HIV 転写開始点と5' UTR 構造

HIV-1 プロウイルス DNA の LTR 内の U3 と R の境界に高度に保存されている GGG 配列（上段）。GGG 配列のいずれかの G から転写が開始され、転写開始点の違いにより 5' 末端には G 残基の数の異なる転写産物が発現する。G 残基の数が 1 個のもの（G1-form）は、選択的にウイルス粒子内に取り込まれる²⁰⁾。G2、もしくは 3 個の場合（G3-form）は、主に mRNA として翻訳に使用される³⁰⁾。下部に 5'UTR 内の主なステムループ構造（TAR, PolyA, PBS, Ψ, DIS, SD）を簡略化した二次構造図²⁷⁾を示す。

列内のいずれかの場所から開始される（図4）。感染細胞内では、5' 側から一番目の G 塩基から転写されるタイプ（G3-form）が最も多く発現されており全転写産物の 6～8 割を占め、次いで 3 番目の G から開始される転写産物（G1-form）が 1～2 割程度、2 番目の G（G2-form）が 1 割以下であった。興味深いことに、ウイルス粒子内には、細胞内発現頻度が低い G1-form が最も多く検出された。さらにこの 5' 末端の G の数の違いが、逆転写反応の 1st strand-transfer（図2A）の安定化にも影響する結果を得た²⁰⁾。転写開始点の違いが gRNA のウイルス粒子内取り込み（パッケージング）だけでなく逆転写反応の安定的遂行をも規定していることを示唆する結果と考えられた。その後、著者らの NMR 等による構造・性状解析から、HIV-1 の転写開始点の違いが、HIV-1 RNA の 5' 非翻訳領域（5'UTR）の polyA ステム構造の安定性に大きな影響をもたらすことを確認した²⁷⁾。また、米国の Summers 博士らの研究グループからも、転写開始点による PolyA ステム構造の安

定性とその下流配列の構造変化が 5'UTR 構造に大きく影響し^{28,29)}、G1-form は、二量体化し、パッケージングに有利な構造をとっていた。一方、G2- および G3-form は単量体となり、Cap 構造が露出し、翻訳関連因子との相互作用に有利な構造をとることが示された³⁰⁾。以上、HIV-1 の転写開始点の違いが gRNA と mRNA の分業を規定していることも明らかになってきた。近年、転写開始点の違いによるウイルス RNA の使い分けは、HIV の大部分のサブタイプのみならず近縁の霊長類レンチウイルスでも確認され³¹⁾、ウイルスゲノム複製の新しい制御機構として確立されつつあり、今後一層の研究展開が期待される。

逆転写反応と組み込み反応の連携（カップリング仮説）

逆転写反応が完結するまでの間、次に働く IN はウイルスゲノムと何らかの相互作用を維持している必要がある。したがって、前述した RT-IN 蛋白質の特性は、逆転写反応と組み込み反応の連携のためには合理的であるとも考え

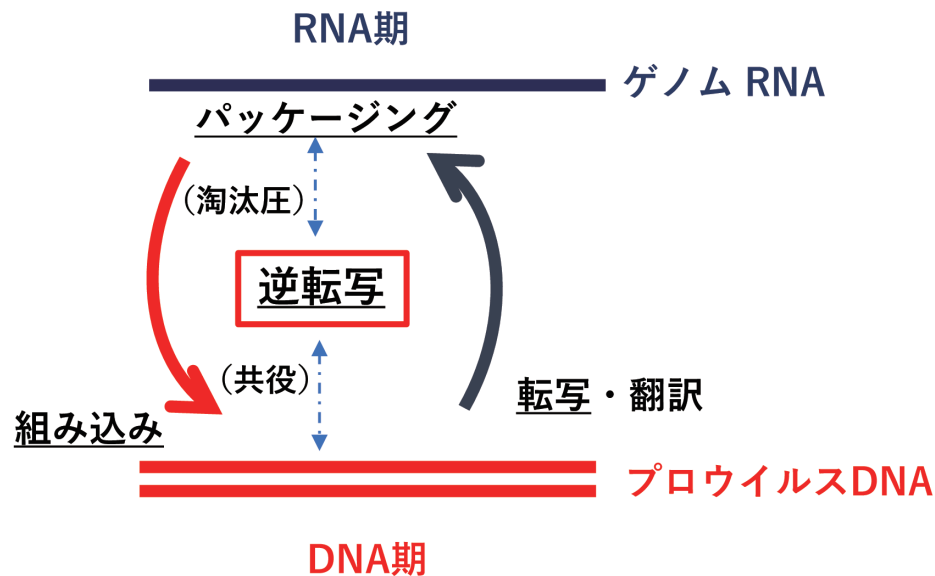


図5 逆転写反応を中軸とするレトロウイルスゲノム複製素過程間の連携

レトロウイルスのゲノム複製は、RNA期とDNA期の二つのフェーズに分けることができる。プロウイルスDNAから転写されたRNAの一部がウイルス粒子に選択的に取り込まれ（パッケージング）、逆転写反応の鋳型となる。逆転写反応を中軸とした転写・パッケージング、組み込み反応との相互連携の概念図を示す。

られる。また、RT-INの研究成果により、INによるRTの構造機能変化（シス-アロステリック効果）として捉えることができた。しかしながら、無細胞再構築アッセイ系で評価する限りにおいて、2回目のストランドトランスファー効率は極めて効率が低く、逆転写反応の全過程（図2A）の再構築には至っていない。したがって、逆転写反応の2回目のストランドトランスファー以降の律速解除因子・機構に関しては、まったくのブラックボックス状態にあるといえる。そこで、ppt配列からの（+）鎖DNA合成によりINの認識配列であるLTR領域³²⁾が二本鎖DNAとなっていることに着目し、組み込み反応が逆転写反応の途中に介入するというカップリング仮説を考えてみた。INによる組み込み反応（図2B）が宿主のDNA修復系を惹起し、組み込みのギャップ修復のみならず逆転写反応の最終段階にも関わっている可能性は十分あると思われる。著者らが解明を目指してきたINの逆転写反応における必須性を説明する仮説として、憶測の域を出ないが、イメージを図2C記載した。逆転写反応の完結と組み込み反応がリンクしていると考え（カップリング仮説）は、近年、HIV-1ゲノムの脱殻や逆転写反応は、核内輸送後すなわち宿主細胞の核内で遂行される考え方³³⁾とも矛盾しない。レトロウイルスの複製様式は、ウイルスゲノムの状態により大きくRNA期とDNA期の二つのフェーズに分けることができる（図5）。転写と逆転写反応が変換点となり、両フェーズを交互に繰り返すことでウイルスゲノム複製サイクルとなる。本稿で述べたHIV-1 INのシス-アロステリック効果や、トリ骨髄芽球症ウイルスのRTβ鎖はINと融合した形をとっていることは、RTとINは、もともと同一分子として機能していたのかもしれないとさえ感じることが

ある。上述したカップリング仮説は、INの逆転写反応における必須機能の本体なのかもしれない。一方で、転写開始点がHIVゲノムのパッケージングを規定する機構も、逆転写反応の鋳型としての淘汰圧の結果のように思えてならない。逆転写反応と転写反応との最適解を求めて、HIVおよび近縁の霊長類レンチウイルスは転写開始点の揺らぎと選択的パッケージングを確立（進化）してきたのではないかと考えている。ゲノムRNAの選択的パッケージングも、逆転写反応での優位性が淘汰圧として働いた可能性など、逆転写反応を中軸としたレトロウイルス複製各素過程間の相互連携を示唆しているものと考えられる。

おわりに

RTが発見されてから50年以上もたった現在においても、まだその分子機構には解明されていない点が多く残されている。著者らはINの逆転写反応の関与のメカニズムの解明を進める中で、RTとの融合蛋白質としてのINの役割を見出すことができた。しかしながら、INの必須ともいえる逆転写反応における未知機能の全貌を解明するまでには至らなかった。これも無細胞環境下で逆転写反応全体を再構築できなかったことに起因している。それでも、レトロウイルスゲノム複製機構を各素過程の点から線への相互連携の視点でとらえることの重要性は示せたのではないと思う。一方で、HIV-1の転写開始点の違いによりウイルスRNAの運命が規定されことを見出せたのは、幸運であった。情報収集技術やAI技術の急速な発展の波は、ウイルス学研究手法も多岐に変貌させている。いかなる手法であっても自分の手で得た実験結果を自分の頭で考察すること以外に研究者の存在意義はないと思う。仮に予想し

た実験結果が得られなくても「さもないければやらなかった研究」からこそ新しいコンセプトの種が見つかると思っている。

謝辞

執筆の機会を与えてくださった本誌編集部の先生方に御礼申し上げます。本総説は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）エイズ対策実用化研究事業の「HIV多機能分子が制御する新規感染機構の根幹構造の解明」班での研究成果を中心にまとめたものであり、本研究班に携わって下さった多くの研究者ならびに支援者の方々に感謝致します。

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

引用文献

- 1) Muesing M. A., Smith D. H., Cabradilla C. D., Benton C. V., Lasky L. A., Capon D. J. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* 313:450-8, 1985.
- 2) Temin H. M., Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226:1211-3, 1970.
- 3) Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226:1209-11, 1970.
- 4) Schiff R. D., Grandgenett D. P. Virus-coded origin of a 32,000-dalton protein from avian retrovirus cores: structural relatedness of p32 and the beta polypeptide of the avian retrovirus DNA polymerase. *J Virol* 28:279-91, 1978.
- 5) Duyk G., Leis J., Longiaru M., Skalka A. M. Selective cleavage in the avian retroviral long terminal repeat sequence by the endonuclease associated with the alpha beta form of avian reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:6745-9, 1983.
- 6) Hazuda D. J. HIV integrase as a target for antiretroviral therapy. *Curr Opin HIV AIDS* 7:383-9, 2012.
- 7) 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* 69:6687-96, 1995.
- 8) Engelman A., Kessl J. J., Kvaratskhelia M. Allosteric inhibition of HIV-1 integrase activity. *Curr Opin Chem Biol* 17:339-45, 2013.
- 9) Masuda T. Non-Enzymatic Functions of Retroviral Integrase: The Next Target for Novel Anti-HIV Drug Development. *Front Microbiol* 2:210, 2011.
- 10) Sundquist W. L., Krausslich H. G. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006924, 2012.
- 11) Sevilya Z., Loya S., Hughes S. H., Hizi A. The ribonuclease H activity of the reverse transcriptases of human immunodeficiency viruses type 1 and type 2 is affected by the thumb subdomain of the small protein subunits. *Journal of molecular biology* 311:957-71, 2001.
- 12) Kohlstaedt L. A., Wang J., Friedman J. M., Rice P. A., Steitz T. A. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256:1783-90, 1992.
- 13) Levin J. G., Crouch R. J., Post K., Hu S. C., McKelvin D., Zweig M., Court D. L., Gerwin B. I. Functional organization of the murine leukemia virus reverse transcriptase: characterization of a bacterially expressed AKR DNA polymerase deficient in RNase H activity. *J Virol* 62:4376-80, 1988.
- 14) Grandgenett D. P., Gerard G. F., Green M. A single subunit from avian myeloblastosis virus with both RNA-directed DNA polymerase and ribonuclease H activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:230-4, 1973.
- 15) Jiang M., Mak J., Ladha A., Cohen E., Klein M., Rovinski B., Kleiman L. Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 67:3246-53, 1993.
- 16) Berkhout B., Vastenhouw N. L., Klasens B. I., Huthoff H. Structural features in the HIV-1 repeat region facilitate strand transfer during reverse transcription. *RNA* 7:1097-114, 2001.
- 17) Hu W. S., Hughes S. H. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, 2012.
- 18) Brown P. O. Integration. Coffin J. M., Hughes S. H., Varmus H. E. (編) : Cold Spring Harbor (NY):pp. 161-203, 1997.
- 19) Takahata T., Takeda E., Tobiume M., Tokunaga K., Yokoyama M., Huang Y. L., Hasegawa A., Shioda T., Sato H., Kannagi M., Masuda T. Critical Contribution of Tyr15 in the HIV-1 Integrase (IN) in Facilitating IN Assembly and Nonenzymatic Function through the IN Precursor Form with Reverse Transcriptase. *J Virol* 91, 2017.
- 20) Masuda T., Sato Y., Huang Y. L., Koi S., Takahata T., Hasegawa A., Kawai G., Kannagi M. Fate of HIV-1 cDNA intermediates during reverse transcription is dictated by transcription initiation site of virus genomic RNA. *Sci Rep* 5:17680, 2015.
- 21) Huang Y. L., Kawai G., Hasegawa A., Kannagi M., Masuda T. Impact of 5'-end nucleotide modifications of HIV-1 genomic RNA on reverse transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 516:1145-51, 2019.
- 22) Masuda T., Kotani O., Yokoyama M., Abe Y., Kawai G., Sato H. Cis-Allosteric Regulation of HIV-1 Reverse Transcriptase by Integrase. *Viruses* 15, 2023.
- 23) Stevenson M., Stanwick T. L., Dempsey M. P., Lamont C. A. HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J* 9:1551-60, 1990.
- 24) Tsurutani N., Kubo M., Maeda Y., Ohashi T., Yamamoto N., Kannagi M., Masuda T. 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* 74:4795-806, 2000.
- 25) Traut T. W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* 140:1-22, 1994.
 - 26) Adachi A., Gendelman H. E., Koenig S., Folks T., Willey R., Rabson A., Martin M. A. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 59:284-91, 1986.
 - 27) Obayashi C. M., Shinohara Y., Masuda T., Kawai G. Influence of the 5'-terminal sequences on the 5'-UTR structure of HIV-1 genomic RNA. *Sci Rep* 11:10920, 2021.
 - 28) Nikolaitchik O. A., Liu S., Kitzrow J. P., Liu Y., Rawson J. M. O., Shakya S., Cheng Z., Pathak V. K., Hu W. S., Musier-Forsyth K. Selective packaging of HIV-1 RNA genome is guided by the stability of 5' untranslated region polyA stem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, 2021.
 - 29) Kharytonchyk S., Monti S., Smaldino P. J., Van V., Bolden N. C., Brown J. D., Russo E., Swanson C., Shuey A., Telesnitsky A., Summers M. F. Transcriptional start site heterogeneity modulates the structure and function of the HIV-1 genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113:13378-83, 2016.
 - 30) Brown J. D., Kharytonchyk S., Chaudry I., Iyer A. S., Carter H., Becker G., Desai Y., Glang L., Choi S. H., Singh K., Lopresti M. W., Orellana M., Rodriguez T., Oboh U., Hijji J., Ghinger F. G., Stewart K., Francis D., Edwards B., Chen P., Case D. A., Telesnitsky A., Summers M. F. Structural basis for transcriptional start site control of HIV-1 RNA fate. *Science* 368:413-7, 2020.
 - 31) Rawson J. M. O., Nikolaitchik O. A., Shakya S., Keele B. F., Pathak V. K., Hu W. S. Transcription start site heterogeneity and preferential packaging of specific full-length RNA species are conserved features of primate lentiviruses. *Microbiol Spectr* 10:e0105322, 2022.
 - 32) 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* 72:8396-402, 1998.
 - 33) Arhel N. J. Early HIV replication revisited. *Nat Microbiol* 5:1065-6, 2020.

Integrase and reversetranscriptase: New insights into the HIV genome replication system in line.

Takao MASUDA and Gota KAWAI

Department of Life Science, Faculty of Advanced Engineering, Chiba Institute of Technology, Chiba, Japan

Reverse transcriptase (RT) and integrase (IN) are retrovirus enzymes to convert virus genomic RNA into provirus DNA state in host cells. The RT and IN encoded tandemly in the pol gene, are translated as a fused form and incorporated into the virus particles. Recently, we discovered the potential role of HIV-1 IN to regulate the reverse transcription through the fused state with RT (RT-IN). On the other hand, analysis of HIV-1 transcripts have revealed the variations in number of guanine residue at the 5' end (5'G) due to fluctuations in the transcription initiation point within HIV-1 provirus DNA. Importantly, the number of 5' G dictates the packaging of HIV genome RNA into virus particles serving as a template for the reverse transcription reaction. In this review, we provide new insights into the mechanism of HIV genome replication based on our recent findings of the structural-functional correlation of HIV enzymes (RT and IN) and virus genomic RNA.