

特集：HIV 複製研究の最前線

HIV ゲノム二量体化の機構

The Mechanism of HIV-1 Genome Dimerization

櫻 木 淳 一

Jun-ichi SAKURAGI

大阪大学微生物病研究所ウイルス感染制御分野

Department of Viral Infections, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

1. はじめに

HIV-1 を含むレトロウイルスのポジティブ一本鎖 RNA ゲノムはウイルス粒子内で非共有的に結合して二量体を形成しているという、極めてユニークな性質を持つ。これはレトロウイルスの特徴である、ゲノムの逆転写反応の際に起きる遺伝子組換えによって、子孫の遺伝的多様性をもたらすなどしてウイルス生残を有利にすると解釈されている。しかしながらレトロウイルスのゲノム二量体化機構については、未解明な部分が多く存在していることも事実である。筆者は、粒子内 HIV-1 ゲノム二量体化をゲノムパッケージングと独立した形でとらえて解析することのできる実験系、HIV ゲノム組換え効率を定量できる複数の実験系を独自に構築し、これらを用いて二量体化シグナル (DLS) のウイルス増殖における役割およびゲノム組換えの解析を行ってきた。その結果ゲノム二量体化がウイルスの感染環の様々なステップで重要な役割を果たしていることを見だし、また、ゲノム二量体化効率とゲノム組換えの間に極めて密接な相関が存在すること示唆するデータも得てきている。したがって HIV ゲノム二量体化及びゲノム組換えの機序の解明は、遺伝的多様性を主要な生き残り戦略としている HIV の制圧の端緒を開き、抗ウイルス薬やワクチン開発を実施する科学的基盤を提供することにもつながると考えられる。本稿では筆者の成果を中心に HIV ゲノム二量体化の機構について現在までの知見を紹介する。

2. レトロウイルスのゲノムパッケージング

ゲノム二量体化の機構の解説にあたり、まずその前提となるウイルスのパッケージングについて概説する。パッケージングシグナル (E/psi) とはウイルスゲノムが粒子に特異的に取り込まれる (パッケージング) ために持つゲノ

ム上の構造である。レトロウイルスのゲノムは約 9,000 塩基の一本鎖ポジティブ RNA であり、E/psi はその 5'末端の 500 塩基前後の領域から成っている。一般的に RNA は通常一本鎖であるため、鎖の中で相補的な部分が水素結合をして二本鎖状になり、糸がよじれるような形の高次構造をとる場合が多い。RNA の二次構造において、水素結合した塩基が連なって相補した二本鎖状になった領域をステム、ステムの端に出来る折り返し領域をループ、ステムの途中が途切れて 2-4 塩基程度相補鎖形成をしていない部分 (ステム途中にはみ出して見える部分) をバルジと呼ぶ。レトロウイルスの E/psi 部位は複数のステム-ループ (バルジを含む) が連続して並ぶ二次構造をとりうる配列である (図 1)。これらのステム-ループ-バルジ群は一本鎖が露出したステム・バルジ部分を介してさらに相互に結合することでより複雑な高次構造をとり、この特徴的な分子の形状がシグナルとして認識され、ウイルス粒子蛋白と特異的に結合してゲノム RNA が粒子に取り込まれると考えられている¹⁾。

3. ウイルスゲノム二量体化の理由

レトロウイルスのゲノムはウイルス粒子内で二量体化していることが古くから知られている。1970 年代には既にこの結合が共有結合ではないことや、電子顕微鏡像の解析等から RNA 鎖の 5'末端近傍で結合していることなどが報告されている²⁻⁵⁾。HIV-1 においてもこれは同様であり、ゲノム RNA の詳細な電子顕微鏡像の解析により、RNA 結合部が単純な一点ではないという興味深い可能性が示唆されている (図 2)⁶⁾。粒子内に同一のゲノムを複数保持することは、ゲノム損傷時の補償や、組換えによる遺伝的多様性の獲得を通じてウイルスの生残に有利に働くと説明されてきた⁷⁾。しかしほとんどのウイルスではゲノムは一セットしかないし、二量体化しているレトロウイルスゲノムは多くの場合一つのプロウイルスからの転写産物であり、遺伝的には同一で多様性を持ち得ない。従ってこれらの仮説が、レトロウイルスだけがゲノムを一粒子内に積極的に複

著者連絡先：〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-1 大阪大学微生物病研究所ウイルス感染制御分野
e-mail : sakuragi@biken.osaka-u.ac.jp

2008 年 1 月 31 日受付

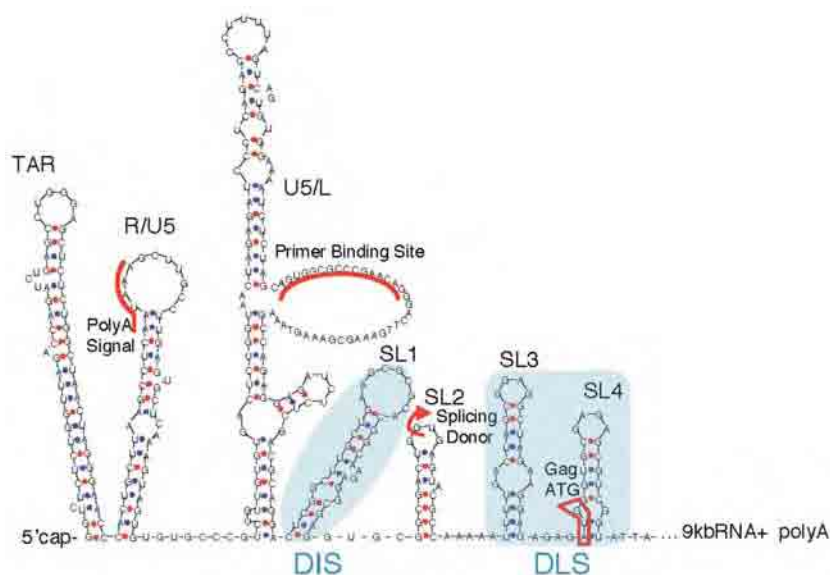


図 1 HIV ゲノム上のパッケージングシグナル領域の二次構造予測図。示した七つのステム-ループ構造すべてが効率良いゲノムパッケージングに必要である。in vitro の解析から指摘されている DIS/DLS についても示してある。

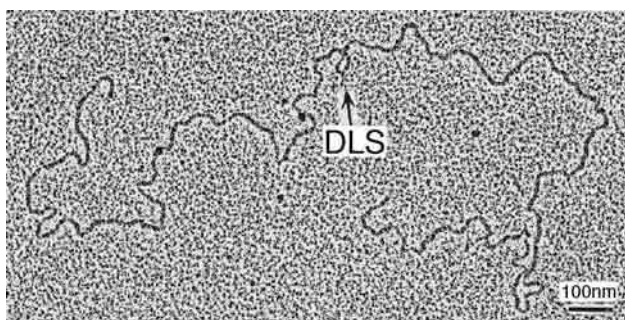


図 2 HIV ゲノム RNA 二量体の電子顕微鏡像。ループ状になった結合部が見える。バーは 100 nm であるが、これはウイルスの直径とほぼ等しい。Höglund, S. et al. : Virology 233 : 271-279 (1996) より許可を得て転載。

数持たなければならぬ必然性を十分説明しているとはいえない。ウイルスは物理的な小ささこそが生き残りのための大きな価値であり、一つあれば十分な遺伝情報を重複して持つことは無駄が多いように思える。二量体化の理由を十分に説明できる結論を求めて、筆者は様々な角度からこの古くて新しい命題の解明に取り組んだ。

4. ウィルス粒子を用いたゲノム二量体化シグナルの探索

レトロウィルスのゲノム RNA の 5'断片 (1,000 塩基程度) を in vitro で合成し、適当なバッファ環境中で加熱後冷却

すると、RNA 断片が二量体化することが知られている。さらにこの溶液中にウイルスの Gag 前駆体蛋白や NC を加えることによって二量体が安定化することも示されている。この現象を実際のウイルスゲノム二量体化を再現したものと捉えて、断片への変異導入によるゲノム二量体化領域のマッピングがおこなわれて来た⁸⁻¹⁰。特に HIV-1 では多くの研究がおこなわれ、二量体化結合配列 (Dimer Linkage Sequences : DLS) や二量体化開始部位 (Dimer Initiation Site : DIS) といった領域が in vitro の系を用いてかなり詳細に解析されている^{11,12} (図 1)。こうした機能領域はすべてパッケージングシグナル内に位置していることが明らかとなっている。しかし実際にウイルス内で起こっている現象ははるかに複雑で、様々な因子が介在する可能性がある。たとえば、in vitro の系ではフルゲノムと RNA 断片の構造の違いは考慮されておらず、そもそも細胞内での粒子形成・二量体化のタイミングはほとんど判っていない。二量体化が起きる時点で介在する因子はまったく不明であり、細胞内は温度は定常であり in vitro の系での加熱後冷却などあり得ない環境である。また、粒子が成熟する前の二量体の結合は非常に不安定で、逆に成熟粒子内の RNA はほぼ 100% 二量体化しているといった性質が in vitro の系ではまったく再現されていない。このような様々な疑問に答えるためには、ウイルス粒子を用いたいわば in vivo ゲノム二量体化の研究を行うことがより現実的に即した現象解析となると考えられた。しかしながら今まで示してきたように、in vitro の解析から示唆される HIV-1 の DIS/DLS

の必要領域は E/psi と重なっている。このためウイルス粒子を用いてゲノム二量体化の解析を行おうとした場合、DIS/DLS に大きな変異を導入することはゲノムパッケージングにも影響を与えることになり、観察される変化が二量体化とパッケージングのどちらかあるいは双方への影響の結果なのかを判断できないというジレンマがあった。このためまず HIV-1 のパッケージングシグナル領域 (E/psi) 等に比較的小さい変異を導入し、ウイルス粒子内 RNA の二量体形成及び維持に作用するシス因子の探索をネイティブノザン法を用いて試みることから実験を開始した。その結果 *in vitro* の実験系で示されてきた RNA 二量体化に必要とされている領域 (DIS/DLS) が、ウイルス粒子内での二量体形成には必ずしも必要十分ではないことを見いだした。むしろウイルスゲノムはウイルス粒子内にパッケージされる限りは常に二量体化する傾向が見られた¹³⁾。こうした結果は *in vitro* の実験だけでは二量体化を説明するには不足であることを示していた。

5. 単量体化ゲノムを持つ成熟ウイルス粒子

引き続き二量体化についての解析を考えるにあたり、筆者は一つのアイディアを思いついた。DIS/DLS がゲノム上に一つだから、二本が束になる。では DIS/DLS が一本のゲノム上に二つあったら？ 筆者が考えた可能性は三つである (図 3A)。そこで実際に同一ゲノム上に、DIS/DLS と E/psi を含むと考えられる領域 (今後 E/DLS とする) をもう一つ挿入することで重複させた変異体 DDN を作成して調べてみると、約半分程度のゲノムが単量体化していることが観察された (図 3B)。つまり少なくとも一部はモデル 1 のようになり、分子内の E/DLS 同士が結合する結果、分子間反応が不可能となり二量体化が競争的に阻害されたと考えられた。この粒子内単量体の生成は非常に明瞭であり、E/DLS の挿入箇所に依存しておらず、このようにゲノムが不完全にしか二量体化していなくても、DDN のゲノムパッケージング及びウイルス粒子の形成・成熟には影響は見られなかった¹⁴⁾。

さらに本来の E/DLS 領域を可能な限り削除して、3' 寄りの Env 領域に二つの E/DLS をタンデムに挿入した変異体を作成した。こうして同一 RNA 上の二つの E/DLS の反応性を等価にして、RNA 鎖内での反応性を高めた結果、単量体ゲノム RNA のみを含む成熟ウイルス粒子の作成に世界で初めて成功した¹⁵⁾。この変異体粒子に HIV の Env を補って感染実験を行った結果、やや低下したものの変異体ゲノムの初期逆転写能も観察され、吸着・融合・脱殻等が進行していることを意味していた。これらの結果は HIV-1 のゲノム二量体化とパッケージングが分離可能であること、ウイルス粒子の成熟及び出芽・感染にゲノム二量

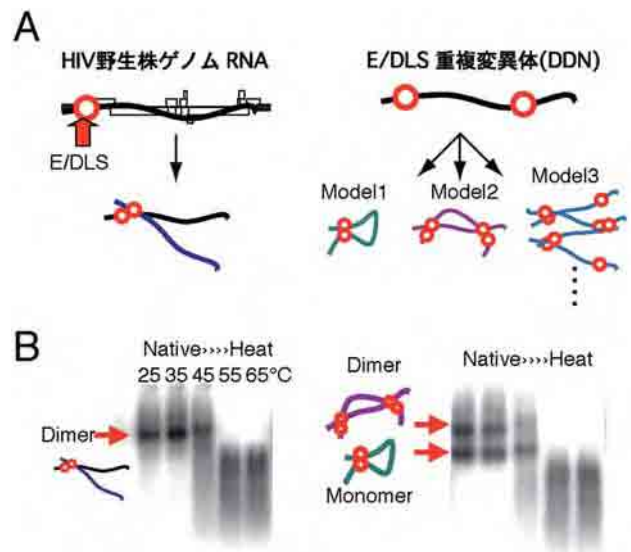


図 3 E/DLS 重複変異体の説明図。A) 二量体化シグナルを重複させることによって、分子内結合が起き、単量体化する (モデル 1)・分子間結合が二カ所でき、二量体化する (モデル 2)・分子間結合が鎖状に起き、多量体化する (モデル 3) という三つの可能性が考えられた。B) ネイティブノザンプロットのデータ。野生株 RNA は 25–35°C のネイティブ環境下で移動度が小さい。55–65°C で解離し、移動度の大きい単量体になることから、ネイティブでは二量体であることが判る。DDN ゲノムではネイティブで既に多くの RNA が単量体として存在している。

体化が必須ではないことを示唆していた。

6. ゲノム二量体化とパッケージングとの関係

変異体 DDN の粒子内ゲノムは、E/DLS がゲノムの二カ所に存在していて、それらがウイルス粒子内では一部分子内結合することで単量体化していると考えられる。そこで DDN ゲノムの二つの E/DLS のどちらか一方に変異を入れて、その変異が粒子内で働く二量体化シグナルを破壊するものであれば、DDN のゲノム分子内結合が阻害されることになる。結果としてゲノム分子間結合の方が増加し、導入変異の影響を粒子内単量体の減少としてモニターでき、機能領域の検索系となりうる (図 4A)。もしその変異が同時に E/psi を破壊したとしても、ゲノム上のもう一方の E/DLS は完全であるのでゲノムのパッケージング能は保たれるという理屈である。つまり、この系を使うことによって、ゲノム二量体化とパッケージングという二つの重なった機能の「切り分け」が可能になることが期待された。実際にいくつかの派生変異体の作成・検討の結果この

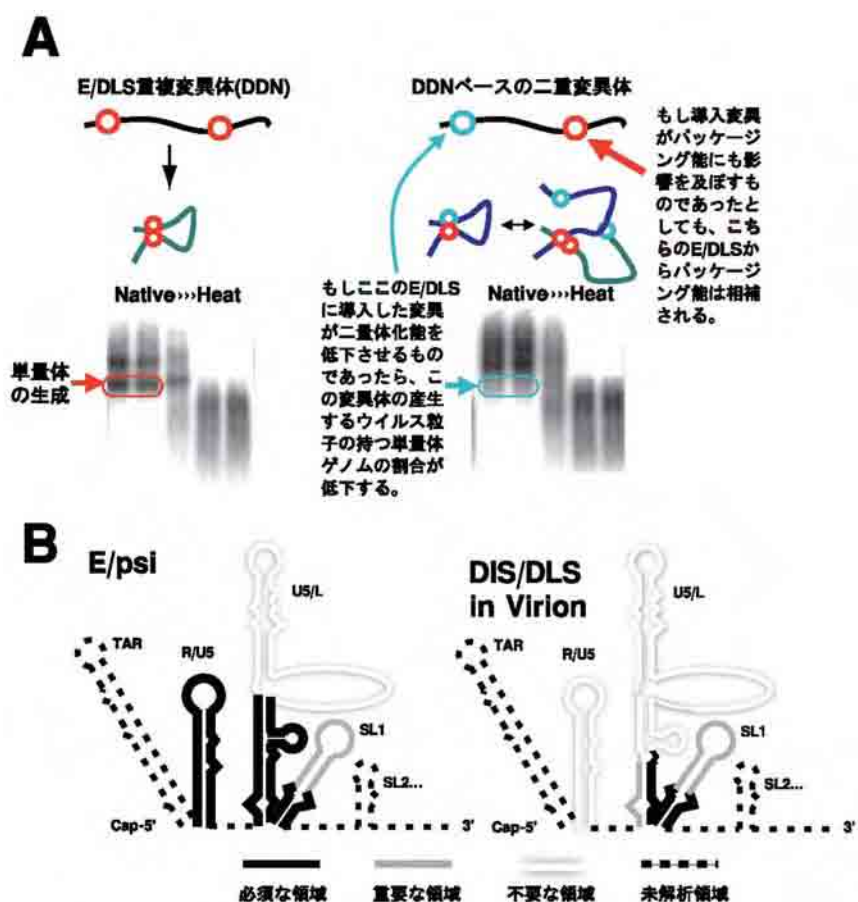


図 4 HIV 粒子内ゲノム二量体化責任領域の探索。A) 探索系の模式図。B) ゲノム二量体化とパッケージングの機能マッピング。

系が理屈通りに動くことを確認したのち、E/DLS 領域に様々な変異を導入した変異体群を用いてウイルス粒子内での DIS/DLS の機能領域の詳細な検索を行った。同時に、E/DLS を一つしか持たない野生株型のゲノム上に同様の変異群を導入した変異体群も作成し、それらの変異がゲノムパッケージングに及ぼす影響についても調べ、マッピングを行った。その結果の比較図を図 4B に示した。ここから HIV-1 の E/psi が DIS/DLS よりかなり広い領域にわたっていること、DIS/DLS が E/psi に完全に含まれていることなどが見て取れる。また調べた範囲の一部領域において、大きな変異を入れるとパッケージングも二量体化もほとんど阻害され、小さな変異では双方ともおよそ半分程度の機能の残存が見られるなど、二つの機能の順相関が見られる領域があるという重要な知見も明らかとなった¹⁶⁾。一連の解析結果をあわせ考察した結果、到達した一つの仮説は、ゲノム二量体化が複数の段階からなるパッケージングというイベントの必須の一段階である、というものである。DIS/DLS 領域が二分子集合して、特定の構造をとるこ

とで初めてウイルス蛋白に特異的に認識されうる信号となる、つまりパッケージングされるためには全長のゲノムが二本結合している必要は無いが、二つの DIS/DLS 領域が作り出す構造あるいは反応が重要ということである。二量体化には不要だがパッケージングには必要な領域も解析の結果見られたが、これは二量体化が完成したあとのステップで機能するシグナルと考えれば説明がつく。

7. 粒子内で働くゲノム二量体化シグナルの必要十分領域の同定

この二量体化機能領域検索システムをさらに応用して、HIV-1 ゲノム二量体化の必要十分領域の決定を目指した。まず十分領域の検索の結果 5' 末端はステムループ R/US と U5/L の境界領域を含み、3' 末端は Gag の ATG コドンを含む SL4 までの領域が十分領域として特定された。上記で決定された領域を元に、さらに詳細な変異導入による解析を試みた。図 4 で示した部分的な二量体化機能領域のマップを元に、まずステムループ U5/L 領域の上部ステム

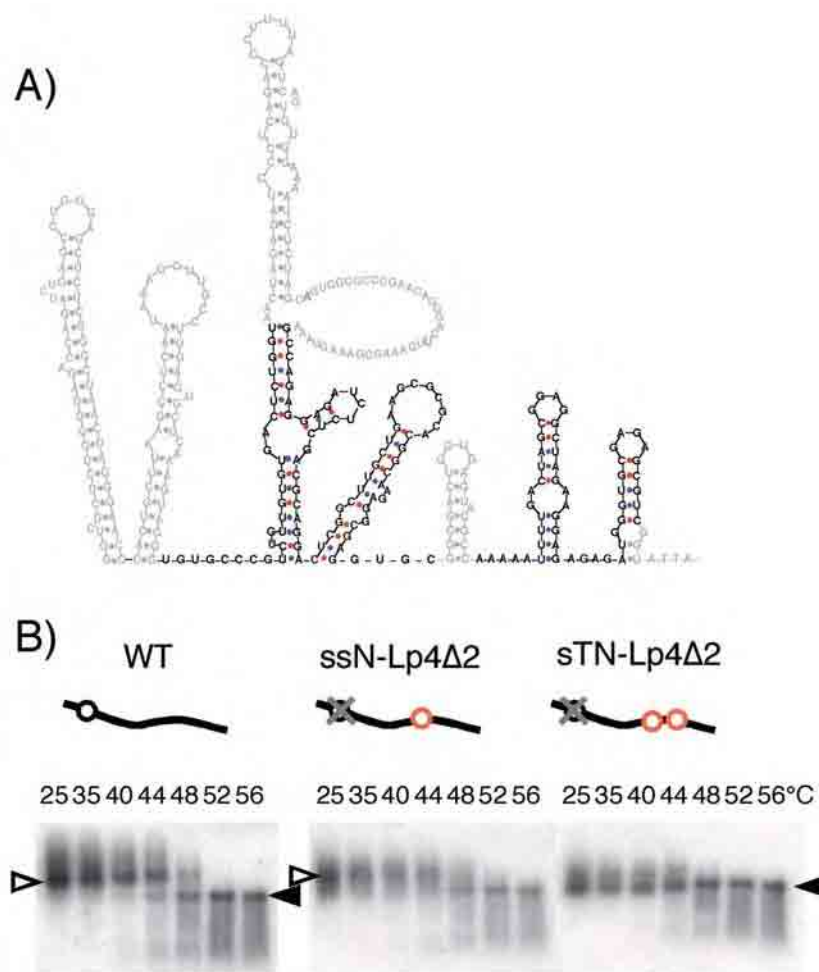


図 5 HIV ゲノム二量体化必要最小領域 Lp4 Δ 2。A) RNA 構造予測図。実線部が該当領域。図 1 と比較されたい。B) Lp4 Δ 2 領域を二つ持つ変異体 (sTNLp4 Δ 2) ではウイルスゲノムがほぼ完全に単量体化している。白矢頭は二量体の、黒矢頭は単量体の位置を示す。

ループ及びプライマー結合領域を十分領域より削除した結果、予想通り二量体化能は保持されていた。さらに十分領域に存在する四つのステムループ SL1-4 をそれぞれ削除した変異体を作成し検討すると、スプライスドナーとして機能している SL2 のみが二量体化領域として機能していないことが明らかとなった。これで決定した HIV-1 のゲノム二量体化必要十分領域 (Lp4 Δ 2) はわずか 144 塩基であり、ウイルスゲノム 5' 末端に存在するポリ A 付加シグナル、プライマー結合領域、スプライスドナーといった機能領域はすべて不要であった (図 5A)。Lp4 Δ 2 領域をゲノム上に二カ所含む変異体 sTNLp4 Δ 2 を作成して粒子内ゲノムを解析したところほぼすべてが単量体化しており、Lp4 Δ 2 領域が実際に粒子内でゲノム二量体化の必要十分因子として働きうるということが確かめられた (図 5B)¹⁷⁾。

8. ゲノム二量体化のウイルス感染能に及ぼす影響

HIV-1 のゲノムは長さや配列の制限が比較的緩く、非必須遺伝子領域に GFP, PLAP 等のマーカー遺伝子を挿入した変異体は特に効率低下も復帰変異も起こすことなく自律的に増殖しうることが知られている。Lp4 Δ 2 領域はこれらのマーカー遺伝子よりずっと短く、ウイルスの増殖に影響を与えうる機能領域もすべて欠如している。このことから、Lp4 Δ 2 領域を HIV ゲノム上の非必須遺伝子領域内に挿入してもゲノムの二量体化能以外に影響を与えることは考えにくく、結果として自律的に複製する単量体化ゲノムを持ったウイルスを作成できると考えた。そこでこの領域を vpr もしくは nef 領域に挿入して、ゲノムが一部単量体化することが確認された変異体をヒト T 細胞由来の MT-4 細胞に感染させたところ、野生株よりもかなり遅れ

て増殖が確認された (図 6A)。しかしながら増殖してきた変異体のゲノム RNA を精製・解析するとすべて野生株と同様に二量体化しており、その塩基配列を解析したところいずれの変異体にも挿入断片を欠落する復帰変異が起っていた。単一ゲノム上に二量体化シグナルを複数持つ変異体の、この致命的欠損がウイルス感染環のどのステップに存在するのかを詳細に解析したところ、逆転写の (一) 鎖合成時に大きな阻害が観察された (図 6B)¹⁷⁾。これらのことはゲノム二量体化が、効率的な逆転写反応進行にも何らかの役割を果たしている新しい可能性を示唆するものであり、興味深い。

9. ゲノム二量体化効率と組換え効率の完全な一致

現在 HIV-1 のサブタイプは 10 種類以上報告されており、それらの組換え体も多数報告されている。組換え体の

頻繁な発生やその広がりには象徴される HIV ゲノムの易変異性はウイルス病原性や進化に深く関与しており、ゲノムの二量体形成とその結果としての逆転写時の相同組換えはその一翼を担っていると考えられる。著者のいままでの実験系を応用し、同一ゲノム上の二つの二量体化シグナルを別々のサブタイプ株由来にすることで、本来観察することが非常に困難な、異なる株間のヘテロゲノム二量体化を単純化して捉えることが可能となる (図 7A)。こうした解析はウイルスの変異や進化を理解する上で重要な知見を得られると期待された。多数のサブタイプの E/DLS 領域をクローニングしてサブタイプ間の二量体化効率をパネル化した結果、ウイルスの遺伝的近縁さと効率の間に相関は見られなかった一方、二量体化に大きな役割を果たすと考えられている DLS 内の SL1 部のみ (DIS) を異なるサブタイプに交換した変異体を作成して解析すると、二量体化の主要な表現型は DIS のヘアピンループの塩基配列の相同性に依存していることが明らかとなった (図 7B)。さらに HIV サブタイプ間ゲノム組換えを簡便に定量する実験系を構築し¹⁸⁾、サブタイプ A・B・C および DIS 変異体の様々な組み合わせによる組換え効率を測定した。その結果ヘテロゲノム組換え効率とヘテロゲノム二量体化効率との間ではほぼ完全に一致した相関が存在しているという、極めてクリアなデータを得た (図 7C)。このことは、ゲノム二量体化効率がゲノム組換えを直接的に規定し、ウイルスの病原性や生残戦略に深く関わっていることを示唆している。また、DIS の塩基配列が大きく異なるサブタイプの組み合わせでも中程度のヘテロ二量体化効率であったり、DIS の一致だけでは完全に良好な二量体化が得られない場合も見られ、二量体化が必ずしも一義的に DIS に依存してはいないことを示唆していると考えられた。

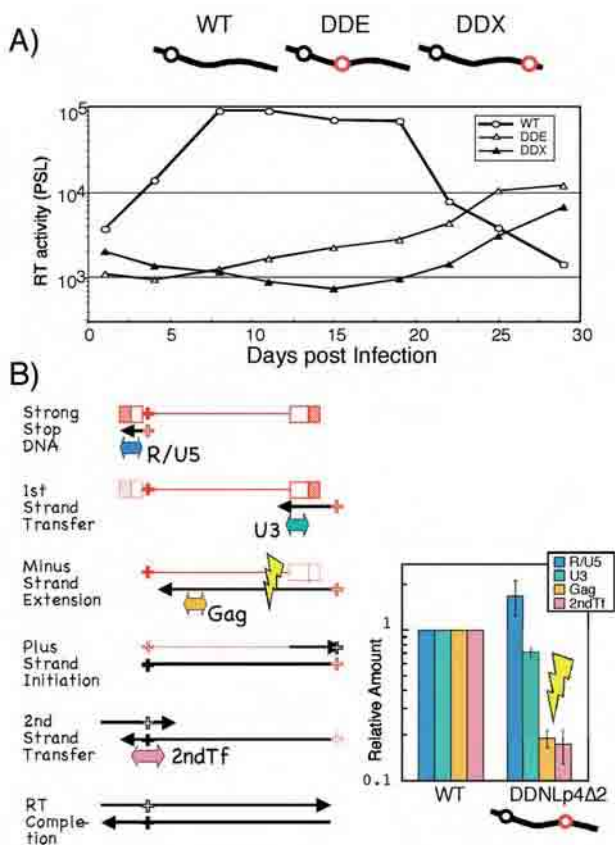


図 6 ゲノム二量体化のウイルス感染環における働き。各変異体の模式図をグラフ上下に示した。A) 単量体化ゲノム変異体の増殖曲線。B) 変異体の逆転写産物の定量。左は HIV 逆転写進行の模式図と、定量に用いたプライマーの位置関係。右は逆転写産物の定量結果。稲妻は阻害の起っているステップを表す。

10. 結 語

これまで述べてきたように、ウイルスのゲノム二量体化・ゲノム組換えという現象は学術的に非常に興味深く、広がりを持っていることが伝わったであろうか。またゲノム二量体化が病原性を規定する素反応の一つという側面を持つのであるならば、これらの現象の解析がワクチンや薬剤開発などに直結するデータを生み出す可能性さえあることを意味する。しかしながらゲノム二量体化・ゲノム組換えで未だに明らかになっていないことは多々存在しており、実験系によって結論にズレがある知見も少なくない。今後もいっそうの研究が求められており、様々な分野の方に興味を持っていただきたい題材である。筆者はこの題材に共に取り組んでくださる方を広く求めている。あまり大きなことは言えないが、とにかく日本ではほとんど誰も手掛けていない題材であることは確かと思われるので、取り

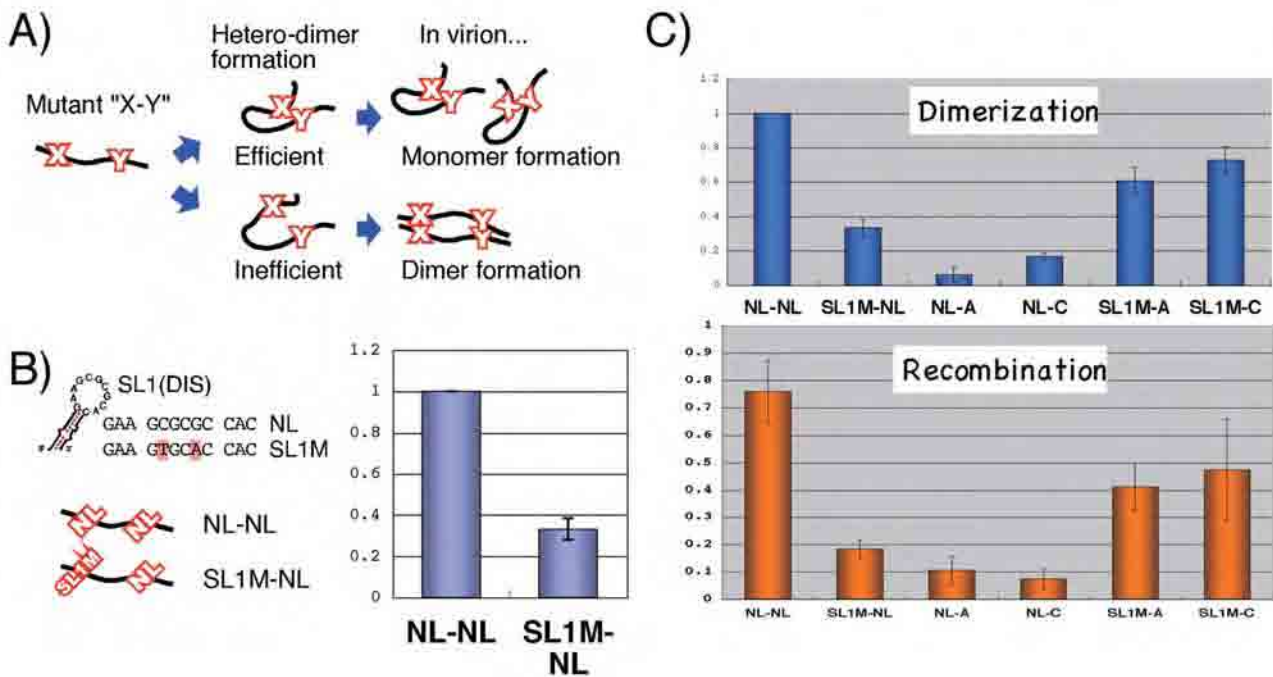


図 7 サブタイプ間ヘテロゲノム二量体化とゲノム組換え。A) ヘテロゲノム二量体化効率測定の様式図。サブタイプ X と Y のゲノムがヘテロ二量体を効率良く形成する場合、変異体 X-Y においてはゲノム分子内相互作用が起これり、結果として単量体形成がドミナントになる (上)。サブタイプ間でヘテロ二量体化が起これり、くければ変異体ゲノムは二量体形成に偏る (下)。B) 二量体形成における DIS の役割。DIS のヘアピンループは六塩基からなるパルンドローム配列を形成しており、この部分が分子間で相補鎖形成して結合することが二量体化を誘起すると考えられている。ここに二塩基置換を導入し、異なるパルンドロームを持つ変異体 (SL1M) を作成した。グラフはヘテロ二量体化効率の相対値。C) 二量体化と組換え効率のほぼ完全一致。NL-A, NL-C はそれぞれ NL (サブタイプ B) とサブタイプ A, C の間のそれぞれの効率を表す。

組めば国内での第一人者を名乗れることくらいは確約したい。

文 献

- 1) D'Souza V, Summers MF : How retroviruses select their genomes. *Nat Rev Microbiol* 3 : 643-655, 2005.
- 2) Riggin CH, Bondurant M, Mitchell WM : Physical properties of moloney murine leukemia virus high-molecular-weight RNA : a two subunit structure. *J Virol* 16 : 1528-1535, 1975.
- 3) Kung HJ *et al.* : Electron microscope studies of tumor virus RNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 39 : 827-834, 1975.
- 4) Canaani E, Helm KV, Duesberg P : Evidence for 30-40S RNA as precursor of the 60-70S RNA of Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70 : 401-405, 1973.
- 5) Bender W, Davidson N : Mapping of poly (A) sequences in the electron microscope reveals unusual structure of type C oncornavirus RNA molecules. *Cell* 7 : 595-607, 1976.
- 6) Höglund S, Öhagen Å, Goncalves J, Panganiban AT, Gabuzda D : Ultrastructure of HIV-1 genomic RNA. *Virology* 233 : 271-279, 1997.
- 7) Hu WS, Temin HM : Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle : pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 : 1556-1560, 1990.
- 8) Roy C *et al.* : An analytical study of the dimerization of in vitro generated RNA of Moloney murine leukemia virus MoMuLV. *Nucleic Acids Res* 18 : 7287-7292, 1990.
- 9) Alford RL, Honda S, Lawrence CB, Belmont JW : RNA secondary structure analysis of the packaging signal for Moloney murine leukemia virus. *Virology* 183 : 611-619, 1991.
- 10) Bieth E, Gabus C, Darlix JL : A study of the dimer formation of Rous sarcoma virus RNA and of its effect on

- viral protein synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res* 18 : 119–127, 1990.
- 11) Skripkin E, Paillart JC, Marquet R, Ehresmann B, Ehresmann C : Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 : 4945–4949, 1994.
 - 12) Darlix JL, Gabus C, Nugeyre MT, Clavel F, Barre-Sinoussi F : Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J Mol Biol* 216 : 689–699, 1990.
 - 13) Sakuragi JI, Panganiban AT : Human immunodeficiency virus type 1 RNA outside the primary encapsidation and dimer linkage region affects RNA dimer stability in vivo. *J Virol* 71 : 3250–3254, 1997.
 - 14) 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. *J Virol* 75 : 2557–2565, 2001.
 - 15) 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.
 - 16) Sakuragi J, Ueda S, Iwamoto A, Shioda T : Possible role of dimerization in human immunodeficiency virus type 1 genome RNA packaging. *J Virol* 77 : 4060–4069, 2003.
 - 17) 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. *J Virol* 81 : 7985–7992, 2007.
 - 18) Sakuragi J, Sakuragi S, Ohishi M, Shioda T : A rapid recombination assay of HIV-1 using murine CD52 as a novel biomarker. *Microbes Infect* : Available online 9 January, 2008.