

平成10年度 厚生科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV 病原性の分子基盤の解明に関する研究

研究報告書

班長 山田章雄

国立感染症研究所
筑波医学実験用霊長類センター

目次

I. 総括研究報告書

1. HIV 病原性の分子基の盤解明に関する研究..... 1
国立感染症研究所 筑波医学実験用センター 山田章雄

II. 分担報告書

2. HIV 感染症の病態進行に関わる宿主側因子に関する研究..... 5
東京大学医科学研究所 感染症研究部 塩田達雄
3. gp41 の活性化融合殻構造を確認するヒト型モノクロナル抗体の特性..... 9
京都大学ウイルス研究所 免疫不全ウイルス研究施設 服部俊夫
4. プロウイルスコピー数の増加とウイルス粒子産生量の関係の解析..... 14
国立感染症研究所 エイズ研究センター 小田原隆
5. gp41 細胞質内部分の構造機能関連についての基礎研究..... 16
国立感染症研究所 エイズ研究センター 松田善衛
6. HIV 修遺伝子産物の感染性ピリオン形成と感染性増強作用..... 22
国立感染症研究所 感染病理部 小島朝人
7. MAGIC-5 細胞株を用いた HIV-1 subtype E および subtype C..... 25
国立感染症研究所 獣医科学部 巽正志
8. 日本の HIV-1 の遺伝子・分子生物学的解析 (集団的解析) 33
国立感染症研究所 エイズ研究センター 仲宗根正
9. HIV-1 サブタイプ E 感染性分子クローンの構築..... 40
国立感染症研究所 エイズ研究センター 佐藤裕徳
10. SIV サル感染における nef 遺伝子の感染性・免疫機能に及ぼす影響..... 43
国立感染症研究所 筑波医学実験用霊長類センター 森一泰

III. 研究協力者

11. HIV-1 E 型 oligomeric envelope protein gp120-gp41 の高次構造と抗原性の解析 ... 49
国立感染症研究所 エイズ研究センター 杉浦瓦
12. Gag/GFP 融合タンパク導入・発現するヒト B リンパ細胞を標的細胞に用いた
HIVGag 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) 活性測定の試み 52
国立感染症研究所 エイズ研究センター 有吉紅也

- IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 55

I. 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

総括研究報告書

HIV 病原性の分子基盤の解明に関する研究

主任研究者 山田章雄 国立感染症研究所

研究要旨 本年度は HIV 病原性の本態を分子レベルで明らかにしてゆくための基盤を整えることを第一の目標とした。サブタイプ C の感染性 cDNA クローンを世界に先駆けて樹立することができた。現在サブタイプ E についても努力中であり、これらの cDNA クローンを用いて病原性遺伝子の同定などを進める予定である。一方、ウイルス中和能力のある抗体あるいは細胞融合阻止能のある抗体の作成を試み、両者とも成功した。また、本研究では宿主側の因子でこれまでにウイルス増殖に何らかの影響が報じられている宿主因子の遺伝的多型性を検討し、AIDS 病態と強く関わりを持つ宿主因子の探索を行った結果、RANTES のプロモーター領域に多型性を見いだすことができ、更にこの多型性が、AIDS 病態を就職することを明らかにした。その他に、nef 遺伝子の in vitro 及び in vivo の役割を検討した。

分担研究者

塩田達雄 東京大学医科学研究所感染症研究部 助教授
服部俊夫 京都大学ウイルス研究所附属免疫不全ウイルス研究施設 助教授
小田原 隆 国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官
松田善衛 国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官
小島朝人 国立感染症研究所感染病理部 室長
巽 正志 国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官
仲宗根 正 国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官
佐藤裕徳 国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官
森 一泰 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター 主任研究官
協力研究者
杉浦 互 国立感染症研究所エイズ研究センター グループ長
有吉紅也 国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官

A. 研究目的

HIV はウイルス感染者体内で著しい多様性

を示し、感染初期には比較的病原性の低い所謂 NSI タイプのウイルスがドミナントであるが、長い潜伏期を経て病原性の高い SI タイプへ変化してゆくことがエイズの発症と深く関わっていると考えられている。またエイズの爆発的流行地である低開発諸国等では母子感染を防止することがエイズ対策の面からも極めて重要であるが、特定のウイルスポピュレーションが母子感染の成立にかかわっている可能性が示されている。更にグローバルに見た場合流行ウイルスがその病原性をも含めダイナミックに変化している可能性ある。本研究では HIV の個体レベルならびに集団レベルでの evolution を分子レベルで、特に病原性の側面に重点を置き明らかにすることを目的とする。一方、エイズ征圧の有効な手段のひとつとして重要なワクチン開発に関しては、残念なことに現時点では第 3 相試験を実施するに至った候補はない。生産コスト、有効性から考えると生ワクチンが有力な候補ではあるが、安全性に対する不安が払拭されていない。サルでの SIV 感染モデルでは nef 欠損ウイルスの生ワクチンとしての有効性及び安全性が示されているが、必ずしも確立された見解ともいえない部分がある。そこで本研究では近い将来の生ワクチン開発への道を拓くことを念頭に置きつつ HIV 及び SIV の病原性の分子的基盤を明らかにすることも目的とする。

B. 研究方法

今年度は感染性 cDNA クロンの樹立を初めとする本研究の基礎を固めることに重点を置いた。感染性クロンの構築には Long PCR を駆使し、一方、*in vitro* の発現系を構築し、gp120, gp41 に反応し、生物活性を有する抗血清を作成した。また、国内のエイズ感染者から分離されたウイルスについて、分子疫学的解析を行う一方、ケモカインやサイトカイン遺伝子について遺伝的多型性の解析を行った。他方、*nef* の機能を *in vitro* のみならず *in vivo* においても検討した。

C. 研究結果

1. HIV 病原性を分子レベルで解析するうえで感染性 cDNA クロンは欠かすことのできないツールであるが、現時点では B サブタイプに対するもののみが樹立されており、世界中の研究者がこれを用いている。従って、サブタイプの異なるウイルスにおける病原性を詳細に解析することが難しい状況であった。今回 C サブタイプのウイルスに対する感染性クロンを樹立するために、まず Magic5 細胞を用いウイルスをできるだけ均一な集団としてクロン化した。次に Long PCR の条件を検討し正確に且つ全長の cDNA を合成した。また、コピー数の少ないプラスミドを基にクロニング用プラスミドを構築し、ここに前述の cDNA を挿入し、感染性クロンの樹立に成功した。

2. ウイルスエンベロープは宿主の液性免疫の標的と考えられるが、例えば中和活性の高い抗血清を得ることは難しいことが知られている。本研究では高次構造をできるだけ保つように発現させた gp140 を免疫源とし、中和活性の高い血清を作出することに成功した。また、合成ペプチドを用いて、gp41 の所謂 fusion core に反応するヒト型モノクローナル抗体を同定した。更に gp41 の細胞質内ドメインの機能解析を進めるために大腸菌で当該部分を発現させるシステムの確立を行った。

3. HIV 感染の病態に関わる宿主側因子を明らかにすることを目的に、これまで何らかの形でウイルス増殖を修飾するとされている宿主遺伝子の多型性について検討した。その結果マクロファージ指向性ウイルスの増殖を阻害する RANTES のプロモーター領域に多型性を見いだした。更に日本人 HIV 感染者と非感染者で多型性を詳細に調べたところ、特定のハプロタイプと AIDS の病態進行が相関

することが明らかになった。RANTES のプロモーター領域の変異が、RANTES 発現の増強を介して、AIDS の進行を遅らせていることが示された。

4. *Nef* の *in vitro* 及び *in vivo* における役割を検討した。これまでに *nef* がウイルスの細胞内侵入過程において重要であることを示してきたが、今回は cellular kinase との関連を検討したところ、細胞侵入過程における *nef* の役割は cellular kinase との相互作用に関わるドメインに変異を導入しても、変化がなかったことから、cellular kinase は少なくともウイルスの細胞内侵入には関与しないことが示唆された。

5. *Nef* 欠損 SIV の弱毒性の機構を解析するために、サルにおける免疫応答を詳細に検討したところ、CTL 活性と病態との間に関連が認められた。一方、中和抗体の産生は感染防御に積極的に関わっているとは考えにくい成績が得られた。また、CTL 検出の新しい方法として、GFP をマーカーにできないかを検討したが、現時点では満足のできる成績は得られていない。

6. 日本における HIV の実態を知るために日本で分離されたウイルスの V3 を中心とする領域の変化を経年的に調べたところ、サブタイプ B に加えて他のクレードが侵入してきていることが明らかになった。

D. 考察

本年度樹立に成功した感染性 cDNA クロンは各遺伝子の機能を解析するうえで極めて重要であるばかりか、ここで確立した手法を用いれば他のサブタイプに対するクロンをこれまでより遥かに効率良く樹立することが可能であると考えられる。また、エンベロープ蛋白に対する抗体に、ウイルス中和能並びにウイルスによる細胞融合を阻止する活性のあるものが得られたことはエンベロープ蛋白の構造と機能を解析するうえで強力なツールとなるものと思われる。その他、今年度得られた成績は残り 2 年間の本研究を遂行するうえでの重要な基礎となるものと考えられる。

E. 結論

HIV 病原性を分子レベルで明らかにすることを目的として、本年度は B 以外のサブタイプに対する cDNA クロンの樹立を試み、C サブタイプに関して感染性クロンを得ることができた。また、ケモカイン RANTES が AIDS

の病態の進行に深く関わる宿主因子であることを明らかにした。また、ウイルスエンベロープの生物活性を抑制する抗血清を得ることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fukao, T., Hirano, A., Nakamura, K., Yamazaki, Y., Yamada, A., Tshita, H., Inoue, R., and Kondo, N.: Perinatal mumps associated with bronchiolitis and respiratory distress. *Eur. J. Pediatr.*, 157, 952-953, 1998

Saito, H., Takahashi, Y., Harata, S., Tanaka, K., Sato, H., Suto, T., Yamada, A., Yamazaki, S., and Morita, M.: Cloning and characterization of the genomic RNA sequence of the mumps virus strain associated with a high incidence of aseptic meningitis. *Microbiol. Immunol.*, 42, 133-137, 1998

Kawana, R., Kitamura, T., Nakagomi, O., Matsumoto, I., Arita, M., Yshihara, N., Yanagi, K., Yamada, A., Morita, O., Yoshida, Y., Furuya, Y., and Chiba, S.: Inactivation of Human Viruses by Povidone-Iodine in Comparison with Other Antiseptics. *Dermatol.*, 195, S2, 29-41, 1997

山田章雄：ムンプスのヒトにおける病理と動物モデル、臨床とウイルス、26、13-16、1998

山田章雄：DNA ワクチン、治療学、32、1520-1523, 1998

G. 知的所有権の取得状況

特になし

Ⅱ. 分担研究報告書

HIV 感染症の病態進行に関わる宿主側因子に関する研究

分担研究者 塩田達雄 東京大学医科学研究所 感染症研究部

研究要旨 HIV 感染症の病態進行に関わる宿主側因子を解析する目的で、RANTES のプロモーター部分に遺伝的多形が存在するかどうかを検討した。その結果、転写開始部位から上流に数えて 28 番目に C あるいは G、403 番目に G あるいは A の多形が存在し、2 箇所の多形の組み合わせで 6 つの genotype と 3 つの haplotype が存在することが明らかになった。HIV-1 感染者 252 名、非感染者 176 名についてこれら 6 つの genotype と 3 つの haplotype の頻度を検討したところ、感染者、非感染者間でこれらの genotype あるいは haplotype の頻度に有意な差は認められなかった。しかし、HIV-1 感染者の CD4 陽性細胞の減少速度を比較したところ、28 番目および 403 番目の両方に変異を持つ haplotype を両側あるいは片側に持つ感染者はこの haplotype を全く持たない感染者に比べて CD4 陽性 T 細胞の減少速度が有意に遅いことが明らかになった。

A. 研究目的

HIV-1 感染症の病態進行は感染者毎に大きく異なる。本研究は HIV-1 感染症の病態進行の速度を決定する宿主側の因子を明らかにすることを目的とする。本年は、マクロファージ指向性の HIV-1 の増殖を競合的に阻害するケモカイン RANTES のプロモーター部分に遺伝的多形が存在するかどうか、遺伝的多形が存在した場合、その多形が HIV-1 感染症の病態進行に影響するか否か、を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

HIV-1 感染者 252 名および非感染者 176 名の RANTES のプロモーター領域の塩基配列を決定し、変異の有無を調べ、それぞれの感染者の CD4 陽性細胞の減少速度と対比させた。また、プロモーター活性は、各ハプロタイプのプロモーターにルシフェラーゼ遺

伝子を結合したコンストラクトを、U937 細胞あるいは SW480 細胞にトランスフェクトして、細胞溶解液のルシフェラーゼ活性を測定することにより行なった。

C. 研究結果

HIV 感染症の病態進行に関わる宿主側因子を解析する目的で、マクロファージ指向性 HIV-1 の増殖を阻害するケモカイン RANTES のプロモーター部分に遺伝的多形が存在するかどうかをまず検討した。その結果、転写開始部位から上流に数えて 28 番目に C あるいは G、403 番目に G あるいは A の多形が存在することが明らかになった。28 番目の多形は NF κ B 結合部位のすぐ近傍に存在していた。そして、この 2 箇所の多形の組み合わせで 6 つの genotype と 3 つの haplotype が存在することが明らかになった。-403 位と -28 位の両方に G を持つ

haplotype は存在しなかった。以下、変異の無い haplotype を I、-403 が A の haplotype を II、-403 が A で-28 が G の haplotype を III と呼ぶ。

HIV-1 感染者 252 名、非感染者 176 名についてこれら 6 つの genotype と 3 つの haplotype の頻度を検討した。その結果、感染者、非感染者間でこれらの genotype あるいは haplotype の頻度に有意な差は認められなかった。このことから、RANTES のプロモーター中の変異は HIV-1 の感染には抵抗性を付与しないことが示唆された。

一方、HIV-1 感染者の CD4 陽性細胞の減少速度を比較した。その結果、haplotype III を両側あるいは片側に持つ感染者は haplotype III を持たない感染者に比べて CD4 陽性細胞の減少速度が有意に遅いことが明らかになった ($P=0.008$)。このことから、haplotype III は HIV-1 感染症の病態進行を遅延させることが示唆された。

haplotype I, II, III 間でプロモーター活性を比較するため、各プロモーターを luciferase に結合したコンストラクトを作製した。得られたコンストラクトをヒト単球様細胞株 U937 と結腸癌由来細胞 SW480 にトランスフェクトしたところ、いずれの細胞でも haplotype III のプロモーターは haplotype I や II よりもプロモーター活性がわずかであるが確実に強いことが明らかになった。さらに、-28 位の変異だけを含む短いプロモーター領域だけを持つコンストラクトで比較しても haplotype III に存在する-28 位の G の変異を持つコンストラクトのプロモーター活性が高く、この変異 (RANTES-28G) が RANTES の転写を増強させることが示唆された。

D. 考察

RANTES にはマクロファージ指向性の HIV-1 の増殖を競合的に阻害する効果に加えて、HIV-1 特異的な細胞傷害性 T 細胞の活性を増強させる作用が知られている。我々の研究結果から、RANTES-28G は RANTES の発現を増強させ、その結果として HIV-1 感染症の進行を遅延させるものと考えられた。今後、RANTES-28G の日本人以外の人種における頻度や HIV-1 感染症の病態進行に対する影響を検討しなければならない。

E. 結論

RANTES のプロモーター部分に存在する変異 (RANTES-28G) が HIV-1 感染者においてより緩やかな病態進行速度と相関していた。また、この変異は RANTES の発現を増強させることが明らかになった。RANTES-28G は HIV-1 発症を遅延させる新しい宿主側遺伝子変異と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Facilitation of HIV-1 isolation from patients by neuraminidase. Xiaomi Xin, Tatsuo Shioda, Masao Fukushima, Huiling Hu, Shin-ichi Oka, Aikichi Iwamoto and Yoshiyuki Nagai. Arch. Virol. 143, 85-95, 1998.

2. Dissociation of ligand-induced internalization of CXCR-4 from co-receptor activity for HIV-1 Env-mediated membrane fusion. Huiling Hu, Tatsuo Shioda, Toshiyuki Hori, Chikaya Moriya, Atsushi Kato, Yuko Sakai, Kouji Matsushima, Takashi Uchiyama and Yoshiyuki

Nagai. Arch. Virol. 143, 851-861, 1998.

3. Large quantity production with extreme convenience of human SDF-1 α and SDF-1 β by a Sendai virus vector. Chikaya Moriya, Tatsuo Shioda, Kei Tashiro, Takashi Nagasawa, Masaya Ikegawa, Yukano Ohnishi, Atsushi Kato, Huiling Hu, Xiaomi Xin, Mohammad K. Hasan, Midori Maekawa, Yutaka Takebe, Yuko Sakai, Tasuku Honjo, and Yoshiyuki Nagai. FEBS letters, 425, 105-111, 1998.

4. Importance of the N-glycan in the V3 loop of HIV-1 envelope protein for CXCR-4- but not CCR-5-dependent fusion. Emi E. Nakayama, Tatsuo Shioda, Masashi Tatsumi, Xiaomi Xin, Deshan Yu, Shinji Ohgimoto, Atsushi Kato, Yuko Sakai, Yukano Ohnishi and Yoshiyuki Nagai. FEBS letters, 426, 367-372, 1998.

5. Anti-HIV-1 and chemotactic activities of human SDF-1 α and SDF-1 β are abolished by CD26/dipeptidyl peptidase IV mediated cleavage. Tatsuo Shioda, Hiroyuki Kato, Yukano Ohnishi, Kei Tashiro, Masaya Ikegawa, Emi E. Nakayama, Huiling Hu, Atsushi Kato, Yuko Sakai, Huanliang Liu, Tasuku Honjo, Akio Nomoto, Aikichi Iwamoto, Chikao Morimoto, and Yoshiyuki Nagai. Proc. Natl.Acad.Sci.USA. 95, 6331-6336, 1998.

6. Location-specific unequal contribution of the N-glycans in SIV gp120 to viral infectivity and removal of multiple glycans without disturbing infectivity. Shinji Ohgimoto, Tatsuo Shioda, Kazuyasu Mori, Emi E. Nakayama, Huiling Hu and Yoshiyuki Nagai. J. Virol. 72, 8365-8370, 1998.

7. Negative regulation of anti-human immunodeficiency virus and chemotactic activity of human stromal cell-derived factor 1 α by CD26/dipeptidyl peptidase IV. Takashi Ohtsuki, Osamu Hosono, Hiroshi Kobayashi, Yasuhiko Munakata, Akiko Souta, Tatsuo Shioda and Chikao Morimoto. FEBS letters. 431, 236-240, 1998.

8. IL-4 and a glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4+ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication. Jianbin Wang, Akihisa Harada, Shuzo Matsushita, Shintaro Matsumi, Yi Zhang, Tatsuo Shioda, Yoshiyuki Nagai, and Kouji Matsushima. J. Leukoc. Biol. 64, 642-649, 1998.

9. Factors governing the activity *in vitro* of ribozymes transcribed by RNA polymerase III. Shiori Koseki, Tsuyoshi Tanabe, Kenzaburo Tani, Shigetaka Asano, Tatsuo Shioda, Yoshiyuki Nagai, Takashi Shimada, Jun Ohkawa, and Kazunari Taira. J. Virol. 73. 1868-1877, 1999.

10. Active late HIV-1 transmission and growth in the brain with HIV encephalitis. Gatanaga, H., Oka, S.,

Ida, S., Wakabayashi, T., Shioda, T., and Iwamoto, A. Arch. Virol. 144, 29-43, 1999.

11. Cytotoxic T-lymphocyte recognition of HLA-B*5101-restricted HIV-1 Rev epitope which is naturally processed in HIV-1 infected cells. Tomiyama, H., Chujo, Y., Shioda, T., Miwa, K., Oka, S., Kaneko, Y., and Takiguchi, M. AIDS. In press.

12. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. Huanliang Liu, David Chao, Emi E. Nakayama, Hitomi Taguchi, Mieko Gotoh, Xiaomi Xin, Jun-ki Takamatsu, Hidehiko Saito, Yoshihide Ishikawa, Tatsuya Akaza, Takeo Juji, Yutaka Takebe, Takeshi Ohishi, Katsuyuki Fukutake, Yoshikazu Maruyama, Shinji Yashiki, Shunro Sonoda, Tetsuya Nakamura, Yoshiyuki Nagai, Aikichi Iwamoto and Tatsuo Shioda. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Track II, In press.

2. 学会発表

1. CD26 による SDF-1a および SDF-1b の不活性化。塩田達雄、加藤宏幸、大西由佳乃、中山英美、加藤篤、坂井優子、劉煥亮、野本明男、岩本愛吉、森本幾夫、永井美之。第 46 回日本ウイルス学会（東京）。演題番号 IA31。

2. 日本人 HIV-1 感染者および非感染者における CCR5 遺伝子制御領域の変異頻度。劉煥亮、中山英美、後藤美江子、辛小蜜、川名愛、山田武司、

武部豊、永井美之、岩本愛吉、塩田達雄。第 46 回日本ウイルス学会（東京）。演題番号 IA28。

3. gp120 糖鎖欠失 SIVmac239 の作製及び増殖効率の検討。扇本真治、塩田達雄、森一泰、中山英美、胡慧靈、永井美之。第 46 回日本ウイルス学会（東京）。演題番号 IA12。

4. センダイウイルスベクターによる HIV-1 サブタイプ E エンベロープ gp120 の大量発現とその血清学的特性の解析。鳥吉英伸、塩田達雄、佐藤裕徳、阪口雅弘、加藤篤、岡慎一、江田康幸、時吉幸男、坂井優子、岩本愛吉、永井美之、武部豊。第 46 回日本ウイルス学会（東京）。演題番号 IA13。

5. Anti-HIV-1 and chemotactic activities of human SDF-1 α and SDF-1 β are abolished by CD26/dipeptidyl peptidase IV mediated cleavage. Tatsuo Shioda, Hiroyuki Kato, Yukano Ohnishi, Kei Tashiro, Masaya Ikegawa, Emi E. Nakayama, Huiling Hu, Atsushi Kato, Yuko Sakai, Huanliang Liu, Tasuku Honjo, Akio Nomoto, Aikichi Iwamoto, Chikao Morimoto, and Yoshiyuki Nagai. 1998 meeting of the Institute of Human Virology (Baltimore, USA). Abstract #124.

研究者 服部俊夫 東北大学大学院医学研究科 内科病態学 感染病態学

研究要旨 HIVの融合に関与するgp41由来のペプチドN36とC34を混合すると活性化融合殻構造と思われるアルファヘリックス構造が生ずる。この構造はヒト型モノクロナル抗体98-6で認識される。98-6エピトープは精製ウイルスのgp41のoligomerに存在するが、monomerには存在しない。しかし感染細胞内ではmonomerにも前駆体 (gp160)にも反応した。本構造の機能を考える上で貴重な所見と思われる。

A. 研究目的

HIVのenvは細胞膜受容体への結合を担うgp120と融合を担う膜貫通糖蛋白(gp41)よりなる。gp41のウイルス外ドメインには二つアルファヘリックス領域が存在し、当該ペプチドは融合を低濃度で抑制することが知られていた。研究者らはN端側に存在するDP107に対する抗体価が病勢の進行とともに低下することを見出した。本年度は、この抗体の低下が活性化融合殻構造 (fusion active core) に対する抗体の低下と関連している可能性を検索するために、本構造に対する抗体の検出を行い、感染者由来のヒト型モノクロナル抗体が本構造を認識していることを明らかにし、その認識されるエピトープの特性について検討を加えた。

B. 研究方法

当該領域の研究で以前より融合阻止活性が強いことが知られているDP107: aa 553-590とDP178: aa 638-673及び近年結晶化された活性化融合殻構造を構成するN36: aa 546-580とC34: aa 628-661の4種類のペプチドを合成した。これらのペプチド単独とこれらのペプチドの混合物の円偏光二色性(CD)解析を行った。次にこれらのペプチド単独あるいはその混合物をELISA plateにcoatingし、種々の抗体で反応性を確認した。主に解析に使用したのはヒト型モノクロナル抗体98.6と50-69抗体で、前者の認識するエピトープは立体構造であるが、aa 644-663を含む領域でDP178/C34と

overlapしている。またgp41のlinear epitopeのaa 727-732を認識するChessie 8やV3を認識するCβ1をコントロールとして用いた。これらの抗体を用い、精製したウイルスとHTLV-III_B感染H9細胞溶解液を抗原にしたWestern blotを行った。更にH9/III_Bを可溶性CD4で30分まで処理したあと細胞膜表面をビオチン化し、その後に溶解液を作ってこれらの抗体で免疫沈降を行い可溶性CD4がgp41/gp160の組成に及ぼす影響を観察した。

C. 研究成果

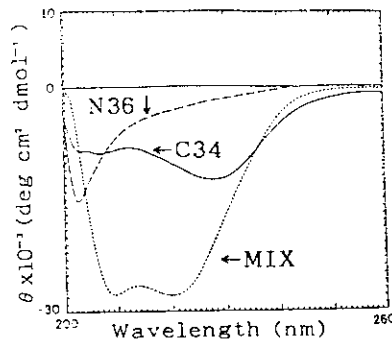
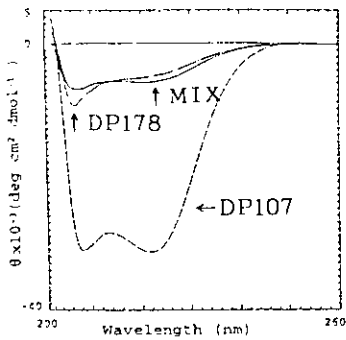
円偏光二色性解析

DP107は208と222nmにピークを有する典型的なα-ヘリックス構造を示した。一方、DP178はランダム構造をしており、この2つのペプチドを生理条件下で混合すると、DP107のα-ヘリックス構造が消失した。これらより、二つのペプチドは相互的に反応するが、活性化融合殻構造をとらないことが明らかになった。

そこで、結晶化に用いられたN36とC34を用いて同様の解析を行ったところ、これら二つのペプチドは単独ではランダム構造であったが、複合体では強いα-ヘリックス構造を検出できた。これらよりN36とC34を混合することにより活性化融合殻構造をmimicできる構造が出現すると思われる。

ELISA

抗N36抗体はDP107と抗C34抗体はDP178と



Western-blot

これらの所見は98-6抗体が活性化融合殻構造に新たに出てくるユニークな抗原を認識していることを示唆している。この構造はHIVの融合に際しての立体構造変化に伴い出現することが提唱されている機能構造である。そこで様々な状況下のどのようなgp41がこの構造

図1 ペプチドとその複合物のCD解析
強く反応した。その混合物においても抗N36と抗C34抗体はそれぞれのペプチド単独をプレートにコートした時と同程度の結合がみられた。98-6抗体はDP178と弱く反応するが、その結合はDP107/DP178混合物と同程度であり、この組み合わせでは混合物特有の抗原変化は観察できなかった(上段)。N36とC34単独のペプチドには抗N36および抗C34抗体は予測された反応を示した。混合物に対しては抗C34抗体の反応性が若干低下したが同程度の抗原がプレートにコートできたと思われた。98-6はDP178と同じくC34と反応したが、その反応性はN36を加えることにより著しく増加し、N36/C34複合体には新たな抗原が出現されることが明らかになった。(下段)

を有するか否かをWestern-blotで検索した。まず精製したウイルスを抗原にして種々の抗体でWestern-blotをおこなった。リネアーなエピトープを認識するChessie 8抗体で解析するとgp41のmonomer, dimer, trimer, tetramerが精製ウイルスには存在することが明らかになった。

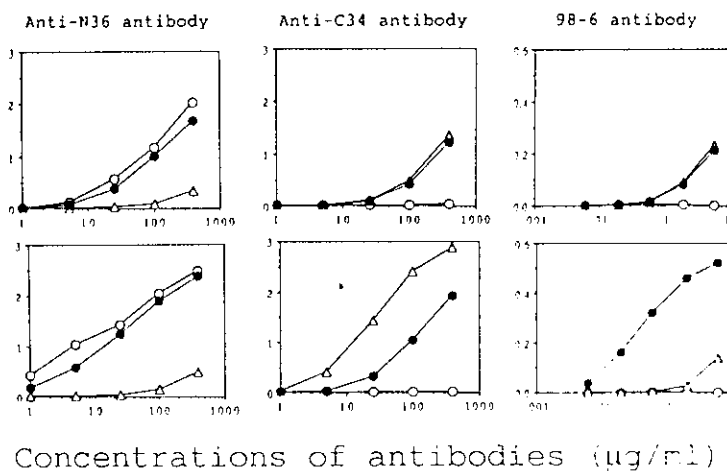
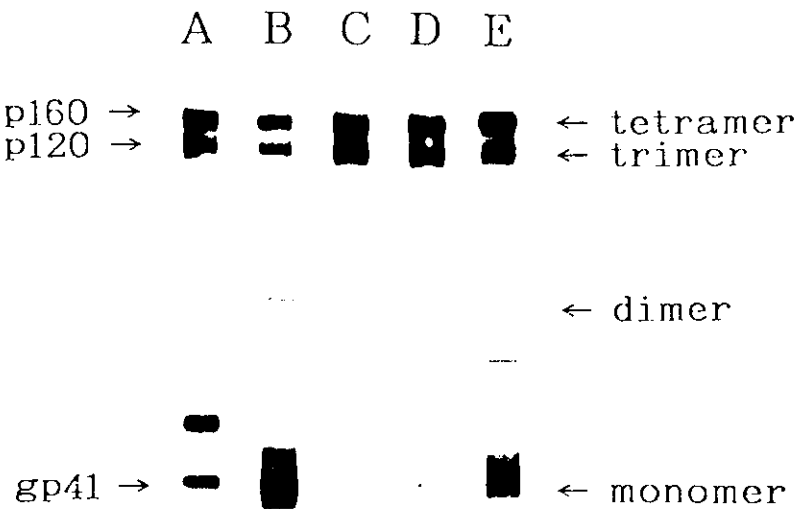


図3 精製ウイルスを抗原にしたWestern blot。A:HIV感染者血清 B:Chessie 8 C:98-6 D:50-69 E:抗gp41抗体(感染者血清由来)

方98-6および50-69抗体で解析した際にはmonomerには殆ど反応せず、trimer, tetramerに強く反応することが明らかになった。98-6抗体の特性が感染細胞内のgp41においても同じか否かを検討した。HTLV-IIIB株感染H9細胞の溶解液を抗原とした。Chessie 8抗体により感染細胞内にはoligomeは存在せず、gp41 monomerとgp160のみが存在する。98-6抗体はそのいずれとも反応した。

図2 ペプチドとその複合物を抗原にした際のELISA

上段: ○:DP107 △:DP178 ●:DP107/DP178
下段: ○:N36 △:C34 ●:N36/C34

れとも反応した。

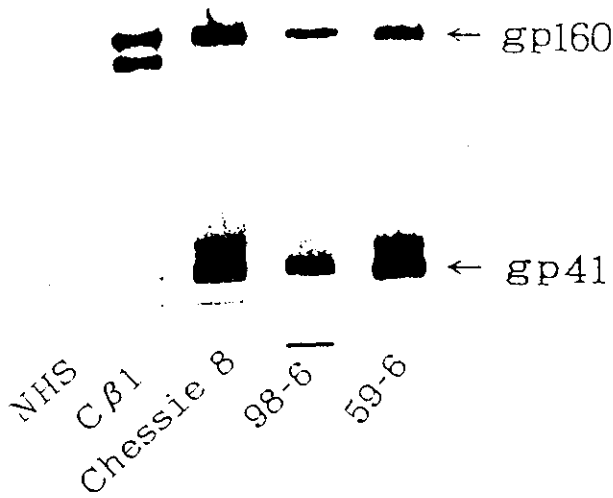


図4 HIV-1感染細胞株を抗原にしたWestern blot.

以上の事実は98-6抗体が認識する活性化融合殻構造は精製ウイルスのoligomerのみではなく、感染細胞内のmonomerや前駆体に既に存在していることを意味する。そこでこの抗原の役割をより鮮明にするために感染細胞を可溶性CD4で処理した後に、ビオチン化し、各種抗体で免疫沈降した。その結果から感染細胞膜表面においては、gp41のmonomer, trimer, tetramer/gp160のいずれも98-6エピトープを保有した。可溶性CD4を添加することにより、Chessie 8抗体の免疫沈降物には著変が観察されないが、98-6抗体で観察すると、tetramer/gp160の減少がみられ、それとともにgp41のmonomerが増加することが明らかになった。

D:考察

近年構造が確認されたgp41の活性化融合殻構造は、gp41の細胞外領域の二つのアルファヘリックス領域の三量体がアンチパラレルにコイル-コイル結合をした6本のbundleからなる構造である。この構造はgp120が細胞膜受容体に結合した後に、生じたgp41の活性化構造と思われる。故にこの構造に対する抗体の存在は本構造の機能的な意味付けに極めて重要な意味を持つ。我々は偶然にも本構造を認識するヒト型モノクロナル抗体が存在することを明らかにした。

精製ウイルスを抗原にした時には、本抗原はgp41のoligomerに特異的に発現していたが、感染細胞内あるいは膜表面上での本抗原の出現はoligomerに特異的ではなかった。またヒト型のモノクロナル抗体が存在することは、感染者の体内に一時的に出現する構造ではないことを示唆している。また可溶性CD4で処理することによりgp160/tetramerが減少し、一方ではgp41のmonomerが増加することが98-6抗体のみで観察されたことは本抗原を保有するgp160が可溶性CD4と反応することを強く示唆している。今後はこれらの構造の微細な立体構造を認識する抗体により、融合におけるウイルス蛋白の構造変化をより正確に捉えることが必要で、それらの解析より新たな感染阻止法が考案されるであろう。

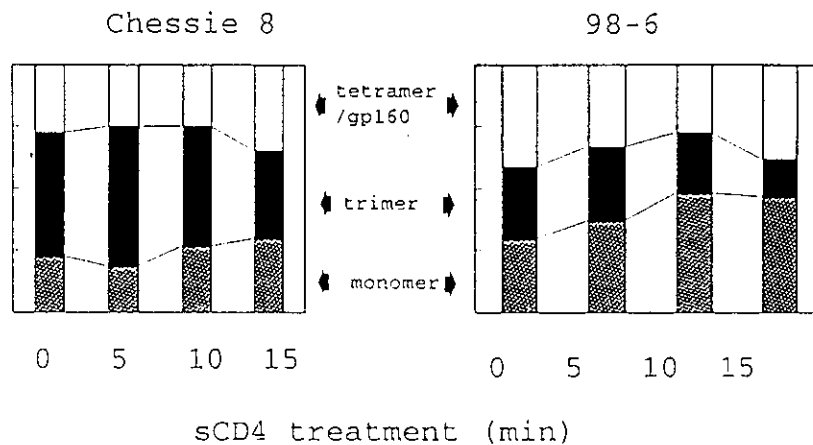


図5 可溶性CD4で処理したHIV-1感染細胞の免疫沈降

E: 結論

1. N36とC34を混合することにより出現する融合殻構造をヒト型モノクロナル抗体98-6は認識する。
2. 精製ウイルス抗原を用いると98-6エピトープはoligomer gp41に特異的に存在する。
3. HIV感染細胞溶解液を用いるとmonomeric gp41もtetramer/gp160も98-6エピトープを有する。
4. 感染細胞膜表面ではmonomer, trimer, gp160/tetramerが98-6エピトープを有するが、gp160/tetramerが可溶性CD4と反応する可能性が高い。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakaida H, Kawamata S, Hattori T, Uchiyama T.: V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 reduces cyclin E expression and induces G1 arrest in IL-2-dependent T cells. *AIDS Res. Hum Retrovir.* 14: 31-38, 1998
2. Hattori T, Komoda H, Pahwa S, Tateyama M, Zhang X, Xu Y, Oguma S, Fukutake K, Uchiyama T.: A decline of anti-DP107 antibody associates with clinical progression. *AIDS* 12:1557-1559, 1998
3. Sakaida H, Hori T, Yonezawa A, Sato A, Isaka Y, Yoshie O, Hattori T, Uchiyama T.: T-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived V3 loop peptides directly bind to CXCR-4 and inhibit T-tropic HIV-1 infection. *J. Virol* 72:9763-70, 1998.
4. Zhang X., Iwatani Y, Shimayama T., Yamada R., Koito A., Xu Y., Sakai, H., Uchiyama T., and Hattori T.: Phosphorothioate hammerhead ribozymes targeting a conserved sequence in V3 loop region inhibit HIV-1 entry. *Antisense & nucleic acid drug development.* 8:441-450, 1998.
5. Xu Y, Tamamura H, Arakaki R, Nakashima H, Zhang X, Fujii N, Uchiyama T, Hattori T.: An enhancement in the binding ability of tachyplesin

analogues to CXCR4 brought out a marked increase in anti-HIV activity as well as inhibitory activity against HIV entry mediated by CXCR4 *AIDS Res. and Hum. Retrovir.* in press

6. Tamamura H, Xu Y, Hattori T, Arakaki R, Omagari A, Otaka A, Ibuka T, Yamamoto N, Nakashima H, Fujii N.: A Low Molecular Weight Inhibitor against the Chemokine Receptor CXCR4: a Strong Anti-HIV Peptide T140 BBRC in press

2. 学会発表

*Zhang X., Xu Y., Uchiyama T., and Hattori T. : Phosphorothioate ribozyme against the novel target in V3 loop blocked HIV-1 infection. *Keystone Symposium, Molecular and Cellular biology of gene therapy.* Keystone, Co., Jan. 19-25, 1998.

*Zhang X., Iwatani Y., Sakai H., Ishimoto A., Xu Y., Uchiyama T., Hattori T. : Phosphorothioate ribozyme targeting V3 loop region inhibited both early and late phase of replication of HIV-1. *The 4th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, July 3-5, 1998*

*Zhang X., Xu Y., Uchiyama T., and Hattori T.: Anti-HIV-1 activities by DNAzyme against a conserved sequence of env, Cold Spring Harbor, NY., Sep. 23-27, 1998.

*Zhang X., Xu Y., Uchiyama T., and Hattori T.: Activity of DNAzyme against V3 loop conserved region of HIV-1. *The 46th annual meeting of the Japanese society for virology, Tokyo, Oct. 12-14, 1998.*

*Hattori T., Komoda H, Pahwa S, Tateyama M, Zhang X, Xu Y, Uchiyama T. Natural antibody responses against two distinct α -helical regions in gp41. *US-Japan Cooperative Medical Science Program, Hyatt Regency Suites, Palm Springs CA, March 18-20, 1998* Williamsburgs, VA

*Hattori T, and Zolla-Pazner S. HIV-1 gp41の活性化融合構造に対する液性抗体反応。第28回日本免疫学会シンポジウム6 エイズ 神戸、1998年12月2-4日

*徐又農、張曉燕、内山卓、服部俊夫：HIVのgp41由来のペプチドの構造と感染抑制機構。第28回日本免疫学会総会、神戸、11月30-12月6日 1998

*徐又農、張曉燕、内山卓、服部俊夫：HIVの膜貫通タンパク gp41由来のペプチドの抑制機構の検討。第46回日本ウイルス学会総会、東京、1998年10月12-14日 1998

*谷口裕子、武田哲、薦田温子、徐又農、張曉燕、服部俊夫：HIV-1 gp41の活性化融合殻構造に対する抗体の特性。第12回日本エイズ学会 東京、1998年12月1-2日 1998

プロウイルスコピー数の増加とウイルス粒子産生量の関係の解析

分担研究者 小田原 隆 国立感染症研究所エイズ研究センター

研究要旨：マウス白血病ウイルス（MLV）をNIH3T3細胞に感染増殖させると、宿主染色体に組み込まれたプロウイルスのコピー数は、平均10ヶ程度まで増加する。欠損ウイルスをNIH3T3細胞に導入し、異なるプロウイルスコピー数を持つ細胞クローンを得て行った解析から、プロウイルスコピー数が3から4ヶとなって初めて、干渉現象とウイルス産生量の増大が起きることが示唆された。細胞の干渉現象は、プロウイルスコピー数の制御を介して、ウイルス産生量の調節に関与している可能性が考えられた。干渉の程度は、細胞表面のウイルスレセプター量によって決まるはずなので、レセプター発現量とプロウイルスコピー数増加・ウイルス産生の相関を見ることを企図して、まず、レセプターを持たないHeLa細胞に野生型MLVのプロウイルスを導入しウイルス産生を調べたところ、nonpermissiveなHeLa細胞では、MLVのRNA発現やGag蛋白のプロセッシングが低下し、低い感染力価のウイルス産生しか見られないことが分かった。

A. 研究目的

レトロウイルスが感染している細胞内のプロウイルスコピー数が、ウイルスの増殖にどのように寄与するかは、これまで、あまり考慮されてこなかった。しかし、マウス白血病ウイルスをNIH3T3細胞に感染増殖させると、プロウイルスのコピー数は平均10ヶ程度まで増加する。また、HIVを高産生する細胞クローンでも、やはりプロウイルスのコピー数が増加していたとの報告もある。

本研究は、細胞内のプロウイルスコピー数が増加することが、感染性ウイルス粒子の産生にどのように寄与しているかを明らかにすることを目的に行った。

B. 研究方法

野生型ウイルスのpermissive cellへの感染においては、再感染によりプロウイルスコピー数の変動が起きるのをコントロールすることが難しいので、コピー数とウイルス産生の関係を正確に見れない。そこで、マウス白血病ウイルス（MLV）の pol 遺伝子 rt 領域に306塩基の小欠失を持つ欠損ウイルス Δwt を作り、そのDNAを宿主細胞NIH3T3に繰り返し導入することで、異なったコピー数の Δwt プロウイルスを有する細胞クローンを得、それらの細胞クローンについて、ウイルスRNA及び蛋白の発現量、Env蛋白機能によるXC細胞の融合能・干渉現象、そして、培養上清中へのウイルスRNA産生量が、どのように相関するかを解析した。また、ウイルスレセプターを持たない細胞になら、野生型のプロウイルスを一定数に保って存在させ得るので、ヒトHeLa細胞に野生型のMLVプロウイルスを繰り返し導入し、上と同様の解析、ならびに上清への感染性ウイルス産生量を解析することにした。

C. 研究結果

rt 領域に小欠失を持つ Δwt のDNAを繰り返しNIH3T3細胞に導入し、プロウイルスコピー数の異なる11ヶのクローンを得た。これらの細胞クローン間で、細胞内のウイルスRNA発現は、各クローンが有するプロウイルスコピー数に比例した。

Env蛋白の機能によるXC細胞融合活性を調べると、コピー数が1ヶのクローンは全く細胞融合を起こさず、コピー数が3、4ヶのクローンにおいてXC細胞融合活性が認められるようになり、8ヶのプロウイルスを持つクローンは、野生型ウイルスの感染増殖している細胞に匹敵する細胞融合活性を示した。同種Env蛋白を用いるウイルスの感染に対する干渉現象を調べると、コピー数が1ヶのクローンは全く干渉を示さなかったが、コピー数が3から4ヶのところでは干渉がかかるようになることが分かった。

これらの細胞クローンの培養上清中に産生されるウイルス粒子量を、培養上清からのRT-PCRによるウイルスRNA量測定にて評価すると、コピー数が3から4ヶのところでは、3²、3³倍に急増することが分かった。

一方、ヒトHeLa細胞に導入した野生型のMLVプロウイルスの転写は、マウスNIH3T3細胞内におけるようには安定せず、多数のコピーが導入され、最初は、高いRNA発現量を示したクローンでも、2-3ヶ月の継代中には、転写量が低下してしまうことが分かった。このため、ヒトHeLa細胞では、細胞内のウイルスRNA量が、プロウイルスコピー数と厳密に比例するとは言えなかった。

多コピーのプロウイルスが導入された細胞クローンを、RNA転写量の高い時点で解析すれば、強いXC細胞融合活性を示して、ウイルス感染NIH3T3細胞に近いレベルのEnv蛋白を膜表面に発現していることが示唆された。しかし、それらの

細胞からのウイルス産生量は、かろうじて感染性ウイルスが検出できるに止まった。この細胞をマウスNIH3T3細胞とco-cultureすると、2日後には、高いウイルス産生を認めた。

NIH3T3細胞とHeLa細胞からのウイルス産生効率の違いが、RNA転写量の違いだけで説明可能かどうかを明らかにするため、野生型MLVを導入したHeLa細胞をNIH3T3細胞とco-cultureし、細胞内のウイルス蛋白発現、上清のウイルス粒子中の構造蛋白プロセッシング、感染性ウイルスの産生量を比較検討した。HeLa細胞から産生するウイルスでは、Gag蛋白のプロセッシングが不完全となっており、それが、感染力価の低下に寄与している可能性が示唆された。

D. 考察

NIH3T3細胞に複製不能なMLV (Δwt) のDNAを導入し、細胞クローン間で比較解析した結果、宿主細胞内のウイルスRNA発現量は、その細胞の染色体に組み込まれたプロウイルス数に単純比例して増加したが、機能的Env蛋白の生成や上清へのウイルス産生量は、プロウイルスコピー数が3から4ヶとなるところで大きく上昇することが分かった。これは、ウイルスの構造蛋白が多量体を形成して機能するためには一定の閾値を超えた蛋白量が必要となるためと考えられる。細胞を殺すくらい過剰の構造蛋白を産生して増えるウイルスとは異なり、細胞傷害性のないレトロウイルスでは、構造蛋白の発現量は、機能蛋白を生成可能な閾値近くに制御されている可能性が強い。

Δwt 導入細胞クローンの示す干渉は、ウイルス粒子産生量が急上昇するのと同じ3から4コピーのプロウイルス数で、やはり大きく変化し、プロウイルス数が8ヶになると、完全な干渉が成立することが分かった。このことは、野生型の感染細胞で、細胞当たりのプロウイルス数が平均10ヶ程度まで増えていることとよく合う。野生型ウイルスの感染では、細胞の干渉が完全になるまで、再感染によってプロウイルスのコピー数が増加していると考えられる。細胞の干渉現象は、細胞内のプロウイルスコピー数の調節を介して、その細胞からのウイルス産生量を規定している可能性が考えられる。細胞のウイルスレセプター発現量が低ければ、干渉は低いレベルで成立すると予想されるので、そのような細胞は、レトロウイルスの潜在化に有利となる可能性もある。

レセプター発現量とプロウイルスコピー数増加・ウイルス産生との相関を調べることを企図し

て、まず、レセプターを持たないHeLa細胞に野生型のMLVプロウイルスを導入しウイルス産生を起こせるかどうかを見たところ、nonpermissiveなHeLa細胞からでも、感染性のウイルス産生を起こせたが、その産生レベルは非常に低かった。HeLa細胞内では、RNA転写量が不安定となることと、Gag蛋白のプロセッシングが不完全になるという問題が生じていることが分かった。レセプター分子を更に導入したときに、再感染—プロウイルス数増加—ウイルス産生増大というサイクルを起こせないかどうかを検討中であるが、前述のように、構造蛋白発現量が機能蛋白生成の閾値近くに制御されていると考えられるレトロウイルスでは、レセプターを補うだけでnonpermissiveな細胞でも効率よい感染サイクルを実現できるかどうかは不明である。レセプターを導入したtransgenic mouseをHIV感染の動物モデルとして用いる際にも、同様の問題が生じることが考えられる。

E. 結論

MLVの欠損ウイルスをNIH3T3細胞に導入した実験で、プロウイルスコピー数が3から4ヶとなって初めて、効率よいウイルス産生と干渉現象の成立を見た。細胞のレセプター発現量・干渉現象とプロウイルスのコピー数・ウイルス産生量の関係を更に検証するため、nonpermissiveなHeLa細胞に野生型のMLVプロウイルスを導入し、ウイルス産生を調べたが、HeLa細胞では、MLVのRNA発現やGag蛋白のプロセッシングが低下していた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Odawara T., Oshima M., Doi K., Iwamoto A., and Yoshikura H. Threshold number of provirus copies required per cell for efficient virus production and interference in Moloney murine leukemia virus-infected NIH 3T3 cells. *J. Virol.*, 72: 5414-5424 (1998)
- 2) Oshima M., Odawara T., Hanaki K., Igarashi H., and Yoshikura H. cis Elements required for high-level expression of unspliced gag-containing message in Moloney murine leukemia virus. *J. Virol.*, 72: 6414-6420 (1998)

2. 学会発表

- 1) 小田原隆：ヒトHeLa細胞からのマウス白血病ウイルスの産生。第46回日本ウイルス学会総会、1998年10月、東京

研究要旨

HIV-1 エンベロープタンパク質はレセプター結合に関与する p120 と膜融合に中心的役割を果たす gp41 の複合体からなる。HIV-1 gp41 の細胞質内部分は約 150 アミノ酸とレンチウイルス以外のレトロウイルスに比較して長く、その構造機能関連は完全には理解されていない。今回その構造機能の理解を目的に gp41 細胞質内部分のバクテリアでの大量発現の系を開発した。

A. 研究目的

レンチウイルスである HIV-1 の外被タンパクはレセプター結合能を持つ gp120 と膜融合に関与し gp120 をウイルス膜に固定している gp41 との複合体からなる。gp41 はウイルス感染に必須である膜融合の直接の担い手であり、その細胞外部分については最近 3 次元構造が明らかにされた。一方、gp41 の膜貫通部分および細胞質内部分については構造-機能連関がよく知られていない。特にその細胞質内部分は他のレトロウイルスと比較して長いことが特徴的であり、Gag タンパク質との相互作用や gp120/gp41 複合体の細胞内運搬などに関与する可能性が示されている。本研究は膜融合を含め病原性に対する gp41 細胞質内部分の構造-機能的解析を進めることを最終目標とする。初年度は gp41 細胞質内部分の大腸菌を用いての大量生成のための系の開発を試みた。

B. 研究方法

gp41 細胞質内部分の大腸菌での発現にあたっては、次の 3 点を考慮に入れて系の開発を試みた。1) HIV-1 の偏ったコドン使用頻度の問題、2) 精製の簡便化、3) gp41 のもつ toxicity のコントロール。

アミノ酸のコドン使用頻度は有核生物と原核生物でかなり異なっている。また HIV-1 の env 遺伝子のコドン使用頻度には偏りがあり、特に細胞質内部分に多く見られるアルギニンのコドンの多くは大腸菌においては出現頻度の著しく低いコドンが使われている。このような状態で強制発現をかけると発現効率の低下だけでなく、場合によっては本来のアミノ酸ではないアミノ酸が導入されることが知られている。これらの問題を回避するため、オリゴヌクレオチドを用いてコドンが大腸菌において最適化した gp41 遺伝子を人為的に合成し使用した。

gp41 の細胞質内部分には 2 つの非常に強い

amphipathic helices の存在が知られており、それらの helices の hydrophobic regions は発現タンパク質を不溶性にする可能性が高い。そのため可溶性を付与するだけでなく精製を容易にするためにキチン結合タンパク質を gp41 下流に付加した。また、可溶化するためにタンパク変性剤 (urea, guanidine-HCl など) を作用させる必要が生じた場合でも精製可能なようにヒスチジンタグをつけた。

上記の gp41 細胞質内部分に存在する非常に強い amphipathic helices は細胞に対して毒性をもつ可能性がある。そのため、発現の強いコントロールが必要とされる。この目的を達成するため発現プロモータにはラムダファージの PL プロモーターを用い、その活性はトリプトファンオペロンの支配下にあるラムダファージリプレッサーによって制御した。この系は非常に強力な発現コントロールが達成できるのと同時に、構造解析 (特に結晶化などによる) に必要な大量のタンパク質生成の際の発現誘導が IPTG などの高価な発現誘導剤を用いることなく、培養液を通常トリプトファンを含有する LB メディウムにするだけで経済的に行える利点をも持つ。

C. 研究結果

大腸菌での使用コドンを最適化した gp41 遺伝子は互いにオーバーラップする約 45-110 塩基長のオリゴヌクレオチド 10 本を用いて作成した。これにより、90 以上のコドンについてバクテリアで最適なコドンに塩基置換を行った。塩基配列決定により、一部塩基配列に誤りがあったため mutagenesis によってそれを修正した後再度塩基配列を確認し使用した。発現ベクターとしては、アンピシリン抵抗性のプラスミドに比して by stander の増殖抑制が強いカナマイシン抵抗性遺伝子を持つプラスミドをバックボーンとして用い、PL プロモータの下流に gp41-キチン結合タンパク質融合タンパク質遺伝子をクローニングし最終産物を得た。発

現のための大腸菌としてはトリプトファンオペロン下流にラムダリプレッサー遺伝子を持つGI724株を用いた。プラスミド導入後、トリプトファン比存在下に大腸菌を増殖させた後(37℃)、培養液をLBメディウムに置換してタンパク質の発現を誘導した(2-3時間)。この操作により、予想されたサイズである分子量約70kDのタンパク質が誘導された。このタンパク質は抗ヒスチジンタグ抗体およびHIV-1感染者血清に反応性を示した。発現されたタンパク質の可溶性を見るため発現タンパク質を含む大腸菌を超音波破碎後、超遠心により沈殿および上清の分画にわけて調べた結果、ほとんどのタンパク質が不溶画分に属していることがわかった

D. 考察

現在までに、人為的gp41遺伝子の作成およびそれを組み込んだ発現ベクターの作成を終え、予想された分子量を持つリコンビナントタンパク質の発現を確認した。しかし、当初の予想に反してキチン結合タンパク質の付与によっても可溶化は不十分で、単純な超音波破碎後、アフィニティカラムの使用による精製は困難である事が予想された。現在種々の界面活性剤を使用した可溶化の方法を検討するとともに、可溶化が不可能な場合の精製法について検討中である。

E. 結論

gp41細胞質内部分をバクテリアを用いて大量発現させる系を作成した。今回使用した系ではその発現がよくコントロールされており、発現されるタンパク質の毒性の問題は解決された。また発現が安価なトリプトファンの添加により誘導できる利点がある。発現されたタンパクの精製法については今後の検討が必要とされる。

F. 研究発表

論文発表・学会発表とも該当なし

G. 知的所有権の取得状況

該当なし